



ALEXANA BALDONI

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

LAVRAS – MG

2013

ALEXANA BALDONI

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

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

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS – MG

2013

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

Baldoni, Alexana.

Expressão de genes relacionados com a qualidade fisiológica de
sementes de soja / Alexana Baldoni. – Lavras: UFLA, 2013.
57 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Soja - Sementes - Qualidade fisiológica. 2. PCR em tempo
real. 3. Enzimas. 4. Transcritos. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 633.3421

ALEXANA BALDONI

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

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

APROVADA em 09 de julho de 2013.

| | |
|---|------|
| Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias | UFV |
| Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho | UFLA |
| Dr. Renato Mendes Guimarães | UFLA |
| Dr. João Almir de Oliveira | UFLA |

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

Aos meus queridos avós, Jacy (in memorian), Ionice (in memorian) e Jandira (in memorian), pelos valiosos ensinamentos deixados. Saudade!

OFEREÇO

*Aos meus pais, Cida e Antônio, por todo o amor, dedicação e incentivo.
À minha irmã Ayssa, por todo o apoio.
Ao meu avô Adelino, pelo exemplo de perseverança.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema e fonte de amor inesgotável, por me permitir ser seu instrumento.

À amiga e orientadora Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela valiosa orientação, me proporcionando todo esse aprendizado e por sempre acreditar em mim, antes mesmo que eu o fizesse.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de pós-graduação em Fitotecnia do Departamento de Agricultura, pela oportunidade em realizar esse trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos

A toda minha família e amigos, em especial ao Tio Zizi, Luciene e Júlio.

Aos meus amigos, Zein, Nat e Orfeu, pela parceria e inúmeras horas de descontração.

Aos professores João Almir, Maria Laene e Renato Mendes, pela receptividade e atenção disponibilizada sempre que precisei.

À Thais Marques e Rucyan que muito me ajudaram na realização deste trabalho, sempre muito atenciosos e prestativos.

Aos funcionários do Setor de Grandes Culturas da UFLA, Alessandro, Manguinha, Júlio e Agnaldo, pela ajuda na execução dos trabalhos de campo.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, D. Elza, Laís, Elenir, Dalva, Wilder e Walbert, por toda a ajuda, atenção e carinho.

Aos amigos do setor de hemodiálise da Santa Casa de Lavras, por me ajudarem a valorizar o que realmente importa nesta vida.

Às amigas Carla, Simone e Vivian pela parceria, boas conversas e ajuda com a pesquisa.

Aos amigos da pós-graduação do Setor de Sementes, pela convivência fraterna.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a concretização deste objetivo.

“Ninguém quer saber o que fomos, o que possuíamos, que cargo ocupávamos no mundo, o que conta é a luz que cada um já tenha conseguido fazer brilhar em si mesmo”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A produção de sementes de soja com alta qualidade fisiológica é importante para a garantia de populações de plantas recomendadas para cada cultivar. Sabe-se ainda que existe variabilidade genética para essa característica entre as cultivares de soja. Objetivou-se estudar a expressão de genes envolvidos com a qualidade fisiológica de sementes de soja, em níveis proteico e de transcritos. Por meio de testes de germinação e vigor, as sementes das cultivares CD 206 e CD 201 foram classificadas como de alta qualidade enquanto que as cultivares Savana e Emgopa 316 foram classificadas como baixa qualidade. As análises fisiológicas, enzimáticas e de transcritos foram realizadas em sementes de cada cultivar em duas épocas de colheita, R8 e R8 + 15 dias. Em nível proteico foram estudados os sistemas isoenzimáticos álcool desidrogenase (ADH), fosfoglico isomerase (PGI), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), malato desidrogenase (MDH) e fosfoglico isomerase (ICL). Para o estudo dos níveis de transcritos foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). O método utilizado foi o do CT comparativo considerando-se os níveis de expressão relativos a cultivar de alta qualidade CD 201. Concluiu-se que ocorre maior expressão das enzimas envolvidas na respiração, álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e fosfoglico isomerase (PGI), em sementes com alta qualidade fisiológica, principalmente quando a colheita é retardada. Os perfis proteômico e transcriptômico relacionados aos genes envolvidos nos sistemas removedores de radicais livres, em sementes de soja variam entre cultivares e com a época de colheita de sementes.

Palavras-chave: Isoenzimas. Genes. Qualidade fisiológica. Sementes. Soja.

ABSTRACT

The production of soybean seeds with high physiological quality is important in guaranteeing plant populations recommended for each cultivar. It is known that there is genetic variability for this characteristic among soybean cultivars. In this context, we aimed at studying the expression of genes involved with the physiological quality of soybean seeds, at the levels of protein and transcripts. By means of the germination and vigor tests, the seeds of the CD 206 and CD 201 cultivars were classified as high quality while the Savana and Emgopa 316 were classified as low quality. The physiological, enzymatic and transcript analyses were performed on seeds of each cultivar at two harvesting times, R8 and R8 + 15 days. At a protein level, we studied the alcohol dehydrogenase (ADH), phosphoglucosomerase (PGI), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malate dehydrogenase (MDH) and phosphoglucosomerase (ICL) isoenzymatic systems. For the study of the transcript levels we used the PCR technique in real time (qRT-PCR). The method used was the CT comparative, considering the expression levels relative to the CD 201 high quality cultivar. We conclude that a larger expression of enzymes involved in respiration, alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH) and phosphoglucosomerase (PGI) occurs in seeds of high physiological quality, especially with a late harvest. The proteomic and transcriptomic profiles related to the genes involved in the free radicle removing systems in soybean seeds vary between cultivars and with the time of seed harvesting.

Keywords: Isoenzymes. Genes. Physiological quality. Seeds. Soybean.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| ADH | Álcool desidrogenase |
| CAT | Catalase |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico sintetizado a partir do acido ribonucléico |
| cm | Centímetro |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| CT | Ciclo de Threshold |
| DEPC | Dimetilpirocarbonato |
| DIC | Delineamento inteiramente casualizado |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNase/ | RNaseEndonucleases |
| dNTP | Deoxirribonucléico trifosfato |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| g | grama (unidade de peso) / gravidade (centrífuga) |
| HCl | Ácido clorídrico |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| ICL | Isocitrato liase |
| L | Litro |
| M | Molar (unidade de molaridade) |
| MDH | Malato desidrogenase |
| mg | Miligrama |
| mg.L ⁻¹ | Miligrama por litro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |

| | |
|------------------------------|--|
| mRNA | RNA mensageiro |
| N ₂ | Nitrogênio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADH | Forma reduzida do NAD ⁺ |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NCBI | Centro Nacional de Informações em Biotecnologia |
| O ₂ | Oxigênio |
| O ₂ ^{•-} | Radical superóxido |
| 1O ₂ | Oxigênio singleto |
| -OH | Radical hidroxila |
| pH | Pares de bases |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PGI | Fosfoglico isomerase |
| pH | Concentração de prótons |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| p/v | Peso por volume |
| qRT PCR | PCR em tempo real |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| rRNA | RNA ribossômico |
| RPM | Rotações por minuto |
| RT PCR | Reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa |
| SOD | Superóxido dismutase |
| T-DNA | Ácido desoxirribonucleico de transferência |
| t/ha | Tonelada por hectare |
| U | Unidade |
| v/v | Volume por volume |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | Qualidade de sementes de soja | 15 |
| 2.2 | Compostos antioxidantes | 17 |
| 2.2.1 | Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) | 18 |
| 2.2.2 | Enzimas envolvidas com a qualidade fisiológica | 19 |
| 2.2.3 | Expressão Gênica | 22 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 | Obtenção das sementes | 24 |
| 3.2 | Testes de germinação e vigor | 26 |
| 3.3 | Análise da expressão gênica | 28 |
| 3.3.1 | Extração de RNA total e síntese de cDNA | 28 |
| 3.3.2 | Tratamento com DNase | 29 |
| 3.3.3 | Desenho de primers | 29 |
| 3.3.4 | PCR em tempo real | 30 |
| 3.3.5 | Análise de isoenzimas | 31 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 4.1 | Análises fisiológicas | 33 |
| 4.2 | Análise da expressão gênica | 35 |
| 5 | CONCLUSÕES | 50 |
| | REFERÊNCIAS | 51 |

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de cultivares de soja com características agronômicas de interesse da indústria sementeira e de grãos tem aumentado de forma significativa nos últimos anos, no Brasil.

Por meio de pesquisas tem sido observada diversidade genética entre cultivares de soja, para a característica de qualidade fisiológica. Aprimorar estudos nessa linha de pesquisa é importante em função das condições climáticas no Brasil, durante o processo de produção de sementes. Principalmente após a maturidade fisiológica das sementes, as altas temperatura e a umidade relativa podem acelerar o processo de deterioração, o que pode causar redução da qualidade fisiológica de sementes.

No processo de deterioração em sementes estão envolvidas enzimas que atuam nos processos respiratórios, como a álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e fosfoglicico-isomerase (PGI), além das relacionadas à remoção de radicais livres como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e ainda aquelas relacionadas à degradação de materiais de reserva como a isocitrato liase (ICL), dentre outras.

Sendo assim, nos programas de melhoramento tem-se buscado cada vez mais, aprimorar tecnologias para a seleção de cultivares de soja com alta qualidade fisiológica das sementes. De uma maneira geral, têm sido utilizados neste processo de seleção testes de germinação e de vigor.

Os conhecimentos em nível molecular, principalmente por meio das técnicas transcriptômicas e proteômicas possibilitam avanços na obtenção de cultivares com sementes de alta qualidade. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos relacionados à qualidade fisiológica de sementes permite que genes, diferencialmente expressos, possam ser identificados e a sua função metabólica investigada (KUHN et al., 2001).

Existem estudos moleculares envolvendo expressão gênica em soja, relacionada à tolerância à seca (POLIZEL et al., 2011; STOLF-MOREIRA et al., 2010) e outros tipos de estresses abióticos e bióticos. Contudo estudos envolvendo a expressão de genes diretamente relacionados com a qualidade de sementes de soja, ainda são escassos na literatura.

Assim, estudos relacionados com a expressão de enzimas em sementes de soja, associadas à qualidade fisiológica dessas sementes, são importantes nos programas de controle de qualidade de sementes incluindo-se a etapa de seleção de cultivares com alta qualidade fisiológica. Objetivou-se com essa pesquisa estudar a expressão de genes envolvidos com a qualidade fisiológica de sementes de soja, colhidas em diferentes épocas, em nível proteico e de transcritos pela técnica de PCR em tempo real.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade de sementes de soja

A soja apresenta-se no cenário mundial como um dos grãos mais consumidos. São encontradas quantidades significativas de proteínas nos grãos e também um percentual considerável de óleo, tendo grande importância para o setor industrial, seja alimentício, cosmético ou mais recentemente o de biocombustíveis. Dessa forma, é cada vez maior a demanda por sementes de alta qualidade que garantam estandes adequados que possibilitem produtividades elevadas. Para isso, nos programas de melhoramento de soja tem-se buscado aprimorar os conhecimentos relacionados aos mecanismos de controle de expressão gênica de várias características de interesse, inclusive a relacionada à qualidade das sementes.

A semente de soja, para ser considerada de alta qualidade, deve ter características fisiológicas e sanitárias adequadas, bem como garantias de purezas física e genética. Esses fatores respondem pelo desempenho da semente no campo, culminando com o estabelecimento da população de plantas requerida pela cultivar, aspecto fundamental que contribui para que sejam alcançados níveis altos de produtividade (FRANÇA-NETO et al., 2010).

Sabe-se que a qualidade fisiológica das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica. A partir desse momento, processos degenerativos de natureza física, fisiológica ou bioquímica começam a ocorrer, caracterizando a deterioração. Assim a época de colheita também é de grande importância para a obtenção de sementes com elevada qualidade. O atraso na colheita compromete o poder germinativo, porém, a redução observada nessa característica varia com a cultivar (SEDIYAMA et al., 1972). Silva, Mesquita e Pereira (1979), ao analisarem quatro épocas diferentes de colheita das sementes de soja 'Bossier' e

'Davis', verificaram que a época mais favorável para essa operação variou com a cultivar e dependeu do grau de umidade das sementes, por ocasião da colheita.

De acordo com Braccini et al. (2000), há considerável diferença de comportamento entre as cultivares de soja quanto à tolerância ao retardamento da colheita. Além disso, há elevada correlação entre a redução do poder germinativo promovida pelo retardamento da colheita e o aumento na incidência de sementes infectadas por fungos e bactérias. Assim, o retardamento da colheita propicia a deterioração de sementes com efeitos significativos sobre a qualidade de sementes.

A deterioração é considerada toda e qualquer mudança degenerativa, após a semente ter atingido sua máxima qualidade sendo que os mecanismos responsáveis por essas modificações ainda não foram totalmente elucidados. Segundo Moraes (2000), a rapidez com que ocorre a perda da qualidade das sementes após a maturidade fisiológica é função da espécie, da cultivar e das condições impostas à sementes no campo, após a colheita e durante as operações de beneficiamento e armazenamento. A sensibilidade das sementes ao processo de deterioração, em determinado ambiente, tem sido atribuída à constituição genética. Além disso, as condições de temperatura e umidade relativa do ar, durante o armazenamento, são de grande importância na evolução da deterioração, a qual não pode ser evitada, mas pode ser minimizada no armazenamento sob condições adequadas.

A deterioração, em muitos casos é imperceptível na fase inicial, manifesta-se no decorrer do tempo, provocando reflexos negativos no vigor (GARCIA et al., 2004). A deterioração é um processo que envolve complexas alterações que interferem no potencial fisiológico da semente. É um processo que inicia-se desde a fertilização do óvulo cuja velocidade é determinada principalmente pela interação entre o genótipo, o teor de água da semente e a temperatura do ambiente (DELOUCHE, 2002).

Muitos dos processos deletérios, sofridos pelas plantas submetidas a condições adversas, são mediados por espécies reativas de oxigênio (ERO's), geradas em diferentes compartimentos celulares como consequência do mal funcionamento de vias metabólicas com reflexos nos processos fisiológicos em sementes.

O efeito sinalizador ou destrutivo de ERO's depende de suas concentrações, locais de produção e interação com compostos relacionados a outros estresses na planta, assim como do estágio de desenvolvimento da mesma (GECHEV et al., 2006). Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto, a produção de EROS pode ser considerada como uma característica universal do estresse (CARRILLO; VALE, 2005). O efeito destrutivo das ERO's pode ser minimizado, no entanto, por compostos antioxidantes.

2.2 Compostos antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que atuam em baixas concentrações em substratos oxidáveis inibindo ou retardando significativamente a lipoperoxidação (HALLIWELL, 1995). As sementes, em geral são ricas em ácidos graxos essenciais, fibras e compostos fenólicos, que exercem atividade antioxidante.

A destruição do maior número de radicais livres e atividades de espécie de oxigênio ocorre por meio de oxidação e de antioxidantes endógenos, principalmente reduzindo moléculas (LORENZI; MATOS, 2002). Os níveis metabólicos normais de espécies reativas de oxigênio são mantidos pela atividade antioxidante de diversas enzimas ou componentes celulares (LEAL et al., 2005). Porém o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou

do aumento de espécies oxidantes, gera um estado pro - oxidante, que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (AQUINO et al., 2005).

2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Uma vez que tenha havido a formação das espécies reativas de oxigênio, as mesmas vão atuar nos tecidos vegetais causando danos, tanto fisiológicos como bioquímicos. As espécies reativas de oxigênio, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (APEL; HIRT, 2004). Em células de plantas, as ERO's, principalmente o H_2O_2 , são geradas no citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e espaço apoplástico (MITTLER, 2002; NAVROT et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas (QUAN et al., 2008).

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

As ERO's são formadas em etapas de redução univalente, a partir do oxigênio molecular. O primeiro passo na redução de O_2 produz radicais de vida relativamente curta, os superóxidos. Esses radicais de oxigênio não conseguem atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram gerados. Os superóxidos formam hidroxiperóxidos com duplas ligações (enos) ou duplas ligações alternadas (dienos), além de oxidar aminoácidos

específicos, como metionina, histidina e triptofano. O superóxido também pode causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares. Posteriormente, a redução do oxigênio gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, apesar de não ser um radical livre, atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de sua produção (BREUSEGEM et al., 2001). A última e mais reativa espécie a ser formada nessa reação é o radical hidroxil (OH \cdot). Esse radical é formado pela redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}) na reação de Fenton e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção. O hidroxil apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM et al., 2001; NORDBERG; ARNER, 2001).

2.2.2 Enzimas envolvidas com a qualidade fisiológica

Em relação aos estudos de genes envolvidos com a qualidade fisiológica de sementes tem-se que, algumas enzimas estão diretamente envolvidas no processo de deterioração tais como a malato desidrogenase (MDH), que desempenha papel significativo no ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxaloacetato produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Já a álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima que está relacionada com a respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005). O acetaldeído acelera a deterioração das sementes (ZHANG; KIRKHAM, 1994), portanto, com o aumento da atividade da ADH, as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria desse composto.

Enzimas removedoras de radicais livres também desempenham papel importante na qualidade de sementes. A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima do grupo a trabalhar atuando na linha de defesa contra formas reativas de oxigênio, uma vez que essa enzima anula a ação dos superóxidos O₂, catalisando reações de transferência de 2 elétrons para produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MCDONALD, 1999).

Outra enzima relacionada à qualidade de sementes é a catalase (CAT), uma enzima intracelular, encontrada no glioxissoma nos vegetais, com capacidade de transformar formas reativas de oxigênio em formas inofensivas, bem como a decomposição do peróxido de hidrogênio (LEHNINGER, 2006).

Albuquerque et al. (2009) relataram diferenças na atividade enzimática da catalase quando sementes de sucupira preta foram submetidas à embebição, onde foi observada maior atividade enzimática para o lote B, sendo a mesma reduzida, à medida que as sementes avançavam no processo de germinação. Nas sementes do lote A, observaram-se comportamento inverso da atividade enzimática, sugerindo-se uma recuperação da sua atividade ao longo da germinação.

De acordo com Jeng e Sung (1994), quando a semente é envelhecida, ocorre maior peroxidação dos lipídios e redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos, sugerindo que a diferença observada entre os lotes está relacionada com o nível de deterioração das sementes.

Em sementes de soja, a isocitrato liase é considerada uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e está envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas, e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos. A atividade dessa enzima aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados e na síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Nesse ciclo, os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares

solúveis (sacarose), os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981).

O estudo de expressão de enzimas relacionadas à qualidade fisiológica de sementes é importante no processo de seleção de cultivares com melhor qualidade de sementes e resistentes a danos causados por intempéries, no período de maturação (VIEIRA, 2000). Tem-se verificado que algumas cultivares de soja, apesar de altamente produtivas, apresentam problemas de qualidade de sementes, dificultando, assim, a recomendação das mesmas (SILVA et al., 1970).

Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de soja pode variar em função do genótipo (GRIS et al., 2010; MENEZES et al. 2009), sendo essa característica importante durante o processo de seleção realizado nos programas de melhoramento. Dessa forma, há necessidade de se conhecer o controle genético, para essa característica, assim como associar as características do tegumento de sementes com a qualidade fisiológica das mesmas.

Menezes (2008) avaliou a variabilidade genética para a qualidade fisiológica de sementes entre diferentes cultivares de soja por meio de testes de germinação e vigor. Em outra etapa, a partir de seis cultivares, previamente selecionadas, sendo três de alta qualidade fisiológica e três de baixa, compondo um dialelo parcial 3 x 3, mais as cultivares parentais, foi estudado o controle genético para a qualidade fisiológica de sementes. Em relação ao controle genético, os efeitos da capacidade geral e específica de combinação, bem como os efeitos recíprocos, foram significativos para a qualidade fisiológica das sementes. Foi verificada a predominância do efeito recíproco, indicando que a qualidade fisiológica de sementes de soja pode ser explicada pelo efeito materno.

A maioria dos caracteres dos organismos superiores é controlada por genes nucleares que segregam, de acordo com o comportamento dos

cromossomos na meiose. Entretanto, existe outro grupo de caracteres herdado em função dos genes ou produtos gênicos presentes no citoplasma, no qual o gameta feminino contribui com quase a totalidade do citoplasma para o descendente (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004).

2.2.3 Expressão Gênica

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica possa ser investigada (KUHN, 2001). A expressão gênica pode ser estudada em nível protéico ou de transcritos das células. A eletroforese bidimensional (2D), que fornece um mapa com todas as proteínas presentes nas células naquele momento, auxiliado pela espectrometria de massa, tem permitido separar, quantificar e identificar grupos de proteínas associadas a situações específicas (SILVA, 2002).

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

O qPCR difere do PCR clássico pela mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo da reação da PCR. Na prática, uma câmera de vídeo

grava a luz emitida por um fluoróforo, que é incorporado dentro dos novos produtos amplificados. Assim, o qPCR permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Comparado com outras técnicas de avaliação existentes, essa permite uma detecção de um dado ácido nucleico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON; SAINDRENAN, 2004).

A quantificação é a característica mais importante do qPCR. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser deduzida considerando diferenças de Ct, entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000). Comparada com o PCR clássico, uma das principais vantagens do qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis. É altamente sensível na detecção de DNA ou RNA devido à combinação de amplificação realizada pelo passo de PCR e o sistema de detecção. Em qualquer caso, a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de PCR, por gel de eletroforese, curva de dissociação e dados de sequenciamento. É uma técnica muito conveniente para estudos com limitada quantidade de material inicial ou para se avaliar a expressão de um grande número de genes com quantidades mínimas de RNA (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das sementes

O trabalho foi realizado na área experimental e no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A cidade de Lavras encontra-se na região Sul do estado de Minas Gerais que, segundo classificação de Köppen, apresenta clima tipo Cwa (OMETO, 1981). Está situada em altitude de 918m, a 21°14 de latitude sul e 45°00 de longitude oeste.

Os dados relativos à temperatura, umidade relativa e precipitação pluviométrica, registrados na Estação Climatológica Principal de Lavras (MG), durante o período de produção das sementes são apresentados nos Gráficos 1, 2 e 3.

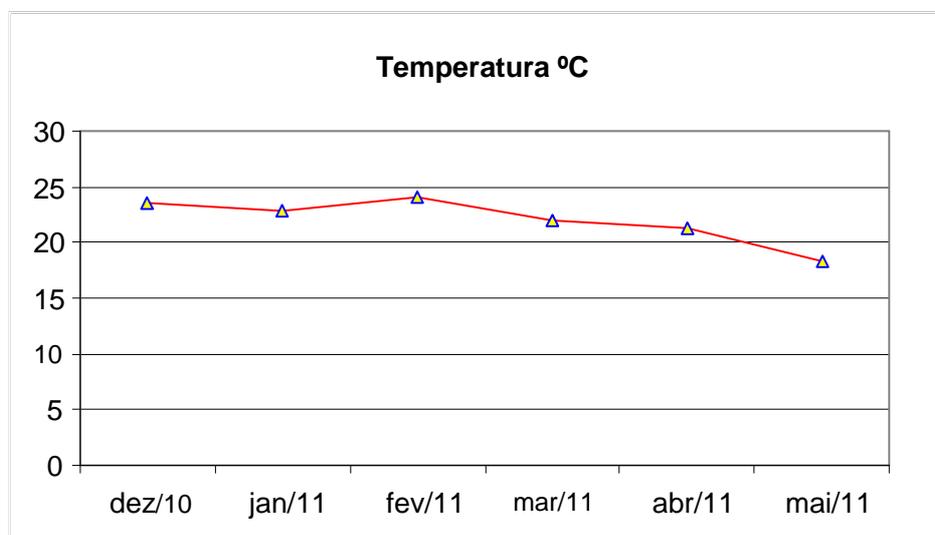


Gráfico 1 Variação mensal da temperatura média do ar, de dezembro de 2010 a maio de 2011

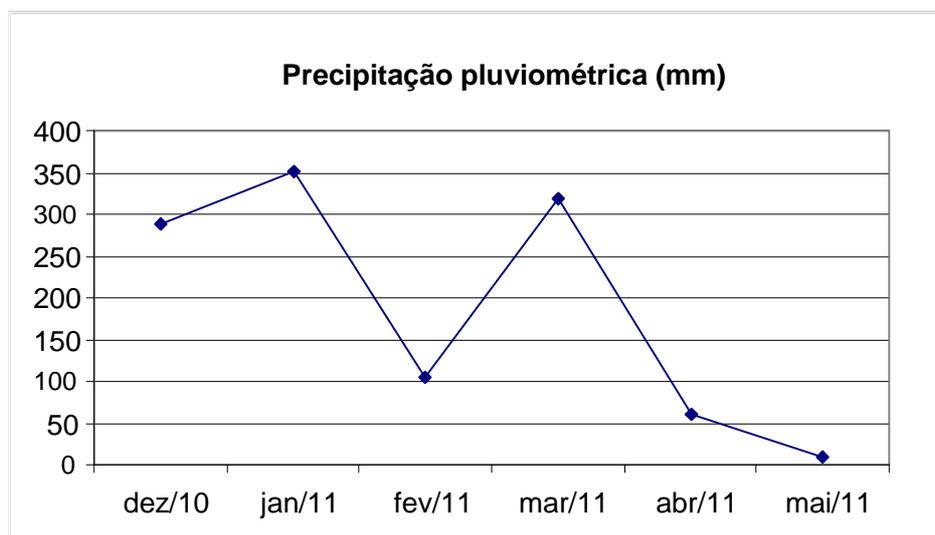


Gráfico 2 Pluviometria mensal média de dezembro de 2010 a maio de 2011

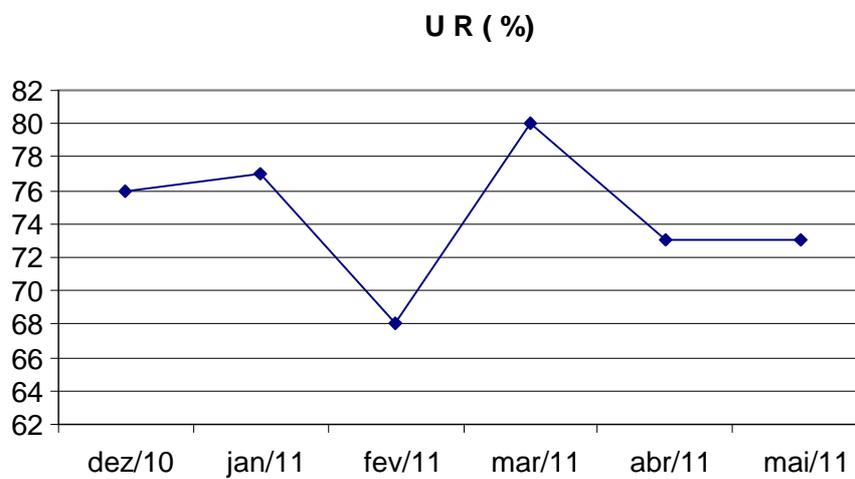


Gráfico 3 Umidade Relativa mensal média de dezembro de 2010 a maio de 2011

Sementes das cultivares Savana, Engopa 316, Conquista, MS 8400, CD 201, CD 206, CD 202 e CD 215 foram produzidas em área com solo classificado como Latossolo Roxo distroférico, realizando-se a semeadura em sistema convencional.

De acordo com a análise de solo foi feita a adubação de semeadura conforme recomendações de Ribeiro, Guimarães e Vicente (1999). No tratamento das sementes foi utilizado o fungicida Vitavax Thiram 200 SC na dosagem de 250 ml/100kg de sementes. Em seguida, as sementes foram inoculadas com produto comercial turfoso, objetivando-se garantir uma população mínima de 1200000 bactérias/semente.

A multiplicação das sementes foi realizada no delineamento de blocos casualizados com três repetições, realizando-se a semeadura em dezembro de 2010. As unidades experimentais constaram de 4 linhas de 5m cada, sendo consideradas apenas as 2 linhas centrais como área útil. O desbaste foi realizado mantendo-se uma população de 16 plantas por metro linear.

A colheita manual foi realizada quando as plantas se encontravam nos estádios fenológicos de acordo com Fehr e Caviness (1977). A secagem foi realizada à sombra, até as sementes atingirem 13% de água.

Foram utilizadas as sementes retidas em peneiras de crivo circular entre 5,55mm e 6,35 mm para uniformização do tamanho das sementes para posterior realização das avaliações.

3.2 Testes de germinação e vigor

Para a realização dos testes de germinação e envelhecimento acelerado, as sementes foram tratadas com fungicida Vitavax Thiram 200SC, na dosagem de 250ml/kg de sementes. Utilizaram-se em ambos os testes 300 sementes por cultivar. No teste de germinação, as sementes foram semeadas entre papel tipo

Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel, visando umedecimento adequado e uniformização do teste. As sementes permaneceram no germinador regulado para $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas aos cinco dias (primeira contagem) e oito dias (contagem final), computando-se a porcentagem de plântulas normais, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de envelhecimento acelerado, o método utilizado foi o de minicâmaras do tipo “gerbox”, em que 42g de sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa, contendo 40 mL de água e submetidas à temperatura de 42°C durante 72 horas. Em seguida, foi realizado o teste de germinação segundo Vieira e Carvalho (1994), com 6 repetições de 50 sementes para cada cultivar.

Para a realização do teste de condutividade elétrica foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada cultivar, aparentemente intactas e pesadas. Em seguida, foram colocadas em copos de plásticos com capacidade de 200 ml, contendo 75 mL de água deionizada durante 24 horas à temperatura de 25°C . Por meio de um condutivímetro de massa, marca DIGIMED, modelo CD 21A, foi efetuada a leitura da condutividade da solução de embebição das sementes de cada cultivar e os resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ de sementes (VIEIRA; CARVALHO, 1994).

A análise estatística foi realizada, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2003) e os dados foram interpretados por meio da análise de variância em esquema fatorial 8×2 , sendo 8 cultivares e 2 épocas de colheita (estádios R8 e R8 + 15 dias). Foi empregado o teste de Scott-Knott para a comparação das médias.

3.3 Análise da expressão gênica

Após a colheita, parte das sementes foi imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C , para posteriores análises da expressão de genes relacionados com a qualidade fisiológica de sementes. Utilizou-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a análise de transcritos e a técnica de eletroforese para análise de proteínas.

3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Todos os materiais utilizados foram previamente submetidos a H_2O tratada com DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato), para inibir a ação das enzimas RNases. O RNA total foi extraído em duas repetições biológicas para cada amostra, utilizando o reagente PureLink Plant RNA (INVITROGEN) segundo recomendações do fabricante e, para 0,1 g da semente, 500 μL de PureLink Plant RNA e agitado em vórtex por 20 seg. e mantido em repouso na posição horizontal por 5 min., para melhor homogeneização do material. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 xg a 4°C , durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo adicionando-se 300 μL de clorofórmio, 100 μL de cloreto de potássio (5M) seguido de agitação. Novamente foi realizada a centrifugação a 14.000 xg a 4°C , durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo adicionando-se o mesmo volume de álcool isopropílico e o microtubo foi mantido em repouso, durante 10 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 xg, a 4°C , por 10 min. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de etanol 70% centrifugando-se a 14.000 xg em temperatura ambiente, durante 1 min. O sobrenadante foi removido e o pellet secado por 10 min, o qual foi ressuspendido em 20 μL de água com DEPC 0,1% e armazenado a -80°C .

A quantificação do RNA total extraído foi feita em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância a 260 e 280nm, observando a razão de comprimento de onda 260/280 cujos valores se encontraram na faixa de 1,8 a 2,0, o que indica extração de alta qualidade. A integridade do RNA também foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,5%), contendo tampão TBE 1x e corado com solução de brometo de etídeo. A corrida aconteceu a 90V, durante 30 min.

3.3.2 Tratamento com DNase

Posteriormente, as amostras extraídas de RNA foram tratadas com DNase (AMBION), conforme instruções do fabricante. Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit Hight-Capacity cDNA ReverseTranscription (APPLIED BIOSYSTEMS).

3.3.3 Desenho de primers

Os primers utilizados foram desenhados por meio do programa Primer Express 3 (Applied Biosystems). Os genes GAPDH e CYP2 foram selecionados como controles endógenos por apresentarem expressão constitutiva, em todos os tratamentos.

Tabela 1 Primers utilizados na análise de qRT-PCR

| Gene | Sequência do Primer |
|---------|--------------------------------|
| GAPDH F | 5' TCCAAGGGGACCTAACGGAGA 3' |
| GAPDH R | 5' TGGGTCAAGAGCTGGATGGTG 3' |
| CYP2 F | 5' CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA 3' |
| CYP2 R | 5' CCCCTCCACTACAAAGGCTCG 3' |
| SOD F | 5' GTTGAAAAGCCA GGGGACA 3' |
| SOD R | 5' TCTTACCCCTTGA GCGTGG 3' |
| ADH F | 5' TCCTGACTATTATTTCCGCATCAC 3' |
| ADH R | 5' TTATCACACATGCGCTTGAATTT 3' |
| CAT F | 5' TGTGCTGCAGTTGCGTACA 3' |
| CAT R | 5' CGGAAAACCAAGTCTCATCAACTA 3' |
| PGI F | 5' AACACGGCACTGACAGTTACG 3' |
| PGI R | 5' GAGCACCACCCTGTTTGGTT 3' |
| MDH F | 5' GGCACCCTGTTTGGTGGGACA 3' |
| MDH R | 5' GTTGAAAAGCCA GGGGACA 3' |
| ICL F | 5' TGGGTCAAGAGCTGGATGGTG 3' |
| ICL R | 5' CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA 3' |

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

3.3.4 PCR em tempo real

As reações foram preparadas em triplicatas para cada uma das duas repetições biológicas e realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Real Time PCR (APPLIED BIOSYSTEMS) utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS). A expressão quantitativa relativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerando como calibrador sementes da cultivar CD 201, considerada de alta qualidade.

As condições das reações foram 50 ° C durante 2 min, 95 ° C durante 10 min, 45 ciclos de 95 ° C durante 2 min, 62 ° C durante 30 s e 72 ° C durante 30 s. Após terem sido realizadas as devidas padronizações, as reações de amplificação foram conduzidas em um volume final da reação de 20 µL contendo: 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS),

2 μ L de cDNA (250 ng), 0,4 μ L de cada um dos primers forward e reverse e 7,2 μ L de água ultrapura autoclavada.

Após a amplificação por PCR em tempo real, cada produto da amplificação foi analisado por uma curva de dissociação certificando que, para cada gene e tratamento, o produto amplificado não apresentou bandas inespecíficas e/ou formação de dímeros de primer.

A análise dos dados foi realizada por meio do programa 7500 Software SDS (Versão 2.0.1) (APPLIED BIOSYSTEMS).

3.3.5 Análise de isoenzimas

Para a análise das enzimas, duas repetições de 50 sementes de cada tratamento foram maceradas em mortar contendo nitrogênio líquido e antioxidante PVP (Polivinil Pirrolidone). Para a análise das isoenzimas ICL e MDH, a extração do material vegetal foi realizada aos 2 dias após a semeadura (durante o processo de germinação). Foram retiradas subamostras de 100 mg nas quais foram adicionadas 300 μ L de éter etílico + 300 μ L de água para retirada do óleo. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm, 4° C, realizando-se esse processo duas vezes. Para a extração das enzimas, 250 μ L do tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8 + 0,1% de beta mercaptoetanol) foi utilizado. Em seguida, as amostras foram agitadas rapidamente em vortex permanecendo durante a noite em geladeira. Na manhã seguinte, as amostras foram centrifugadas a 4° C a 14000 rpm, por 30 minutos. Foram aplicados 50 μ L do sobrenadante no gel de corrida (gel separador – poliacrilamida 7,5% e gel concentrador – poliacrilamida 4,5%). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi a Trisglicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 150 V, por 5 horas. Após a eletroforese, procedeu-se à revelação das enzimas superóxido dismutase

(SOD), álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT) e fosfogluco-isomerase (PGI), malato desidrogenase (MDH) e isocitrato liase (ICL) (ALFENAS, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises fisiológicas

Por meio da análise de variância, houve diferença significativa para a qualidade fisiológica das sementes de soja entre cultivares e épocas de colheita avaliada pelos testes de germinação e vigor.

De acordo com os resultados observados nos testes de germinação, condutividade elétrica e envelhecimento acelerado (Tabela 1), foi possível diferenciar as cultivares utilizadas nesse estudo, quanto à qualidade fisiológica de sementes quando a colheita foi realizada 15 dias após o estádio R8.

Já pelo teste de condutividade elétrica, houve diferença também de vigor entre as cultivares, quando a colheita foi realizada no estádio R8.

Tabela 1 Médias de germinação, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica de sementes de cultivares de soja, safra 2010/11

| Testes Época | Germinação | | Env. Acelerado | | Condut. Elétrica | |
|-------------------|------------|--------|----------------|--------|------------------|------------|
| | R8 | R8 + | R8 | R8 + | R8 | R8 + |
| Cultivares | | | | | | |
| CD 206 | 86 A a | 83 A a | 82 A a | 66 A b | 54,16 A a | 72,41 A b |
| CD 201 | 86 A a | 84 A a | 76 A a | 66 A a | 75,66 B a | 85,75 B b |
| MS 8400 | 87 A a | 76 B b | 83 A a | 68 A b | 80,58 A a | 88,08 B a |
| CONQUISTA | 90 A a | 70 C b | 78 A a | 52 B b | 74,25 B a | 90,58 B b |
| CD 202 | 84 A a | 86 A a | 72 A a | 73 A a | 74,58 B a | 78,08 A a |
| SAVANA | 88 A a | 68 C b | 68 A a | 44 B b | 87,75 C a | 108,08 C b |
| ENGOPA 316 | 88 A a | 67 C b | 80 A a | 27 C b | 69,66 B a | 110,66 C b |
| CD 215 | 87 A a | 76 B b | 68 A a | 51 B b | 78,91 A a | 94,83 B b |
| CV % | 8,05 | | 17,68 | | 12,6 | |

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

A classificação das cultivares em diferentes níveis de qualidade fisiológica variou com a época de colheita. Em sementes das cultivares CD 206, CD 201 e CD 202 colhidas no estágio R8 +15 dias foram observados os maiores valores de germinação. O retardamento de colheita normalmente afeta a qualidade das sementes, pois as mesmas podem estar expostas a condições adversas (GRIS et al., 2010).

Para o teste de envelhecimento acelerado não houve diferença de vigor das sementes entre as cultivares, quando a colheita foi realizada no estágio R8. No entanto, quando a colheita foi realizada 15 dias após o estágio R8, menores valores de vigor foram observados em sementes das cultivares Conquista, Savana, Engopa 316, MS 8400 e CD 215.

Pelo teste de condutividade elétrica, houve diferenças significativas quanto ao vigor entre as cultivares e os estágios de colheita. De acordo com Vieira e Krzyzanowski (1999), os valores padrões de condutividade a serem considerados devem ser de 70-80 μ S/cm/g, indicando de alta para média a qualidade de sementes de soja. Os valores de condutividade elétrica em sementes colhidas no estágio R8, estiveram no padrão em referencial, com exceção dos observados em sementes da cultivar Savana. Em sementes colhidas no estágio R8 + 15 dias, considerando o padrão em referência, apenas as cultivares CD 206 e CD 202 foram classificadas como de alto vigor. Em valores absolutos, os maiores valores de condutividade foram observados em sementes das cultivares Savana e Engopa 316.

Deve-se ressaltar que, pelos resultados observados nos testes para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, houve maior distinção das cultivares quando as sementes foram colhidas 15 dias após o estágio R8. Com exceção dos resultados observados no teste de condutividade elétrica, não foi possível distinguir as cultivares quanto à qualidade fisiológica quando a colheita foi realizada no estágio R8. Provavelmente isso tenha acontecido em

função das condições climáticas favoráveis durante o processo de maturação e após o ponto de maturidade fisiológica das sementes.

As temperaturas médias entre os meses de março e maio foram amenas. A precipitação pluviométrica a partir de março foi reduzida, com valores baixos entre abril e maio, com reflexos diretos na umidade relativa do ar. (Gráficos 1, 2 e 3).

Foi observado ainda, por meio dos testes de germinação, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica, para a cultivar CD 202, alta qualidade fisiológica das sementes, mesmo com o retardamento da colheita das sementes. Menores valores de germinação e vigor foram observados em sementes das cultivares Engopa 316 e Savana, principalmente quando houve o retardamento de colheita das sementes. Ressalta-se que esses resultados são comparáveis, uma vez que as sementes das oito cultivares foram produzidas sob as mesmas condições edafoclimáticas. Assim foram consideradas com sementes de baixa qualidade, as cultivares Engopa 316 e Savana e com alta qualidade as cultivares CD 201 e CD 206.

4.2 Análise da expressão gênica

Em relação à atividade das enzimas, para a enzima álcool desidrogenase (ADH), observou-se a maior atividade em sementes das cultivares CD 201 e CD 206, classificadas como alta qualidade fisiológica, em ambas as épocas de colheita, com maior expressão dessa enzima em sementes da cultivar CD 206 (Figura 1). Tal enzima está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo a redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005). A atividade da ADH foi mais intensa em sementes das cultivares de alta qualidade, aos 15 dias após o estágio R8. Provavelmente a ação dessa enzima tenha sido mais efetiva em sementes nessa condição, uma vez que, em sementes colhidas

15 dias após o estágio R8 foi observada menor qualidade fisiológica. A ADH está envolvida no processo respiratório e tem como função a remoção do acetaldeído em sementes.

Aos 15 dias após o estágio R8, as sementes encontram-se mais vulneráveis à deterioração e conseqüentemente com maior produção de acetaldeído que é considerado mais tóxico às sementes, quando comparado ao etanol (ZHANG; KIRKHAM, 1994). Padrão semelhante para a atividade da ADH foi encontrado por Vidigal et al. (2009), em sementes de pimenta, com alta qualidade fisiológica nas quais foi observada a maior atividade da enzima ADH.

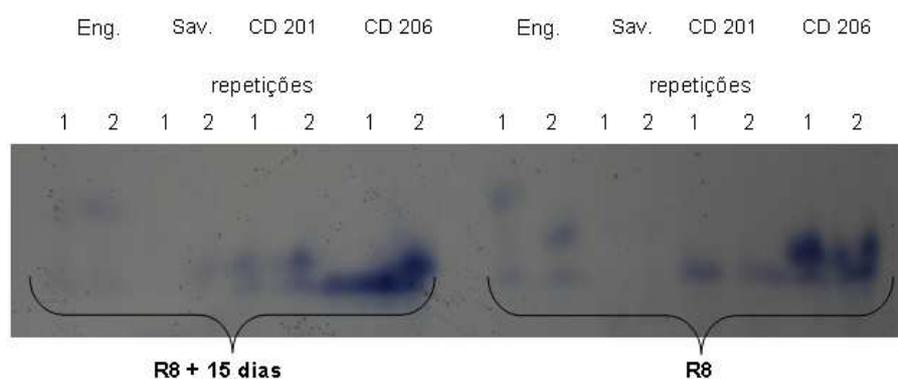


Figura 1 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de alta (CD 201 e CD 206) e baixa qualidade fisiológica (Engopa 316 e Savana), durante as épocas de colheita R8 e R8 + 15 dias, revelados para a enzima ADH

A atividade da enzima fosfoglicico isomerase (PGI) pode ser observada na Figura 2. A expressão dessa enzima foi maior em sementes de alta qualidade e colhidas 15 dias após o estágio R8. A PGI atua nas reações de glicólise (LEHNINGER, 2006) e desempenha função vital às plantas.

A maior expressão desta enzima em sementes das cultivares com alta qualidade reflete a efetividade da enzima no processo de fosforilação de

açúcares na glicólise, importante para a produção de energia, durante a respiração.

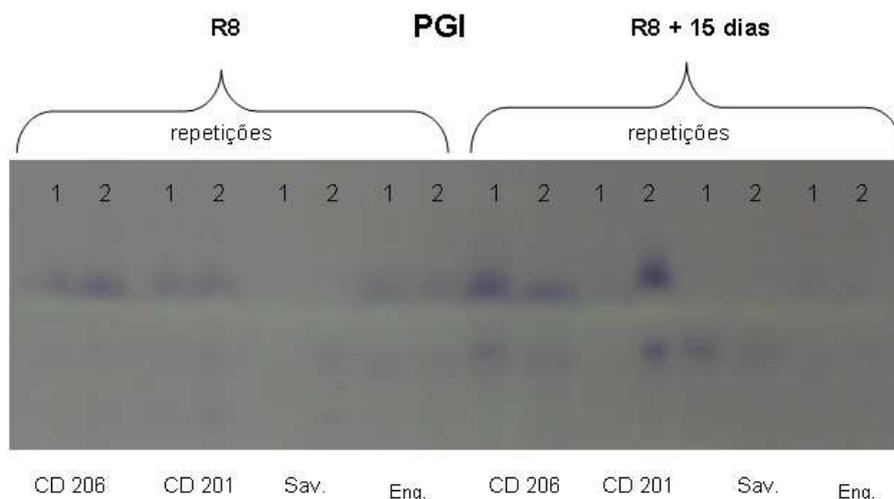


Figura 2 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de alta (CD 201 e CD 206) e baixa qualidade fisiológica (Engopa 316 e Savana), durante as épocas de colheita R8 e R8 + 15 dias, revelados para a enzima PGI

Em outros trabalhos de pesquisa nos quais foram correlacionados a respiração em sementes e as atividades de enzimas envolvidas na respiração, verificou-se maior expressão destas enzimas em sementes com alta qualidade fisiológica. Castro 2011, ao estudar a respiração de sementes de milho por meio do teste de Pettenkofer, observou maior respiração das sementes com alta qualidade e maior expressão nessas sementes da enzima MDH. Por meio de cálculos estequiométrico se obtém a quantidade de CO₂ liberado pela respiração das sementes. Em consequência do processo de deterioração das sementes, ocorre um comprometimento da atividade respiratória dessas. Sendo assim, sementes de qualidade fisiológica inferior deveriam apresentar bandas com menor intensidade.

Além das enzimas envolvidas na respiração, aquelas relacionadas à remoção de radicais livres em sementes também são importantes como marcadores moleculares para a qualidade de sementes. Nesta pesquisa, para a enzima SOD, observou-se que, em sementes colhidas no estágio R8, há maior atividade em sementes classificadas como de baixa qualidade, Savana e Engopa 316.

Já em sementes colhidas 15 dias após o estágio R8, observou-se alteração nos padrões da enzima SOD em sementes de todas as cultivares avaliadas. Em sementes da cultivar CD 201, CD 206 e Engopa 316, colhidas no estágio R8 + 15 dias, houve maior expressão de algumas isoformas que também se expressaram em sementes colhidas no estágio R8 e o aparecimento de outras isoformas a exemplos daquelas numeradas na Figura 3, como 1, 2, 3 e 4. Em sementes das cultivares Savana e Engopa 316, classificadas com baixa qualidade fisiológica houve menor expressão de algumas isoformas dessa enzima, a exemplo das numeradas como 5 e 6. Nas sementes destas cultivares houve redução significativa da qualidade fisiológica das sementes avaliadas pelo teste de germinação e vigor, avaliada quando a colheita foi retardada 15 dias após o estágio R8.

A SOD é considerada uma enzima removedora de radicais livres e é considerada uma das primeiras a atuarem na defesa contra espécies reativas de oxigênio (ERO's). A baixa qualidade fisiológica em sementes das cultivares Savana e Engopa 316, colhidas no estágio R8, pode estar associada à maior atividade da SOD, sendo possível que tal comportamento esteja relacionado à eliminação de ERO's que foram produzidos em sementes dessas cultivares. O peróxido de hidrogênio, formado como produto da SOD, apesar de menos reativo que o acetaldeído, em altas concentrações torna-se tóxico, pois pode reagir formando radicais hidroxila (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992), que causam peroxidação de lipídios.

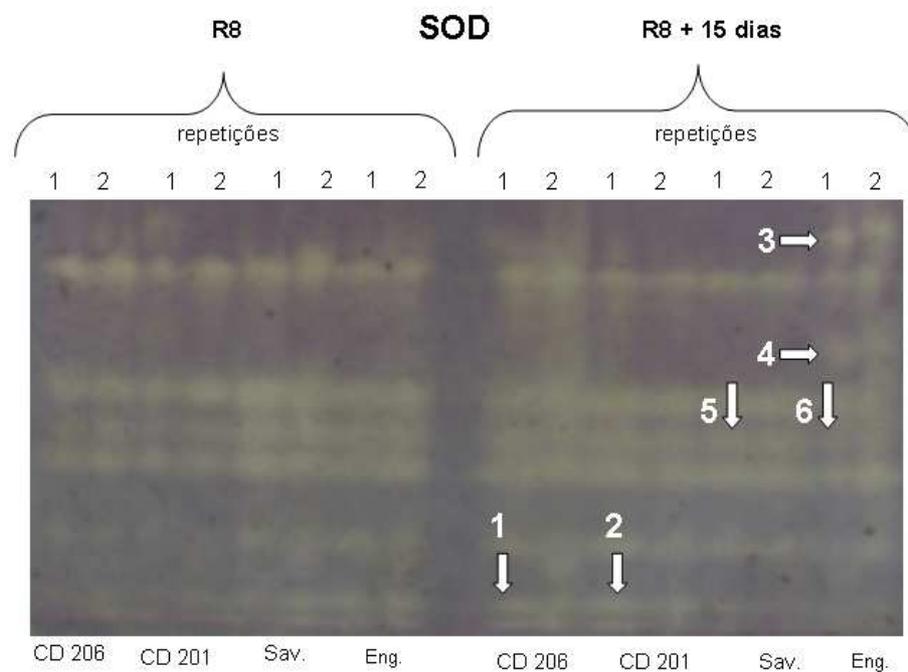


Figura 3 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de alta (CD 201 e CD 206) e baixa qualidade fisiológica (Engopa 316 e Savana), durante as épocas de colheita R8 e R8 + 15 dias, revelados para a enzima SOD

Outra enzima envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio, formado a partir da atividade da SOD é a catalase (CAT). Nesta pesquisa, não foi observada diferença na expressão da enzima entre os tratamentos dentro de cada época de colheita. No entanto, comparando-se as duas épocas de colheita, a expressão dessa enzima foi maior em sementes colhidas no estágio R8 (Figura 4). Em sementes colhidas 15 dias após o estágio R8 também foi observada menor qualidade fisiológica das sementes, em relação à das colhidas no estágio R8. Em sementes deterioradas, tem sido observada menor atividade dessa enzima com menor eficiência dos sistemas removedores de radicais livres. Segundo Jeng e Sung (1994), quando a semente é envelhecida, ocorre maior

peroxidação dos lipídios e redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos como a CAT.

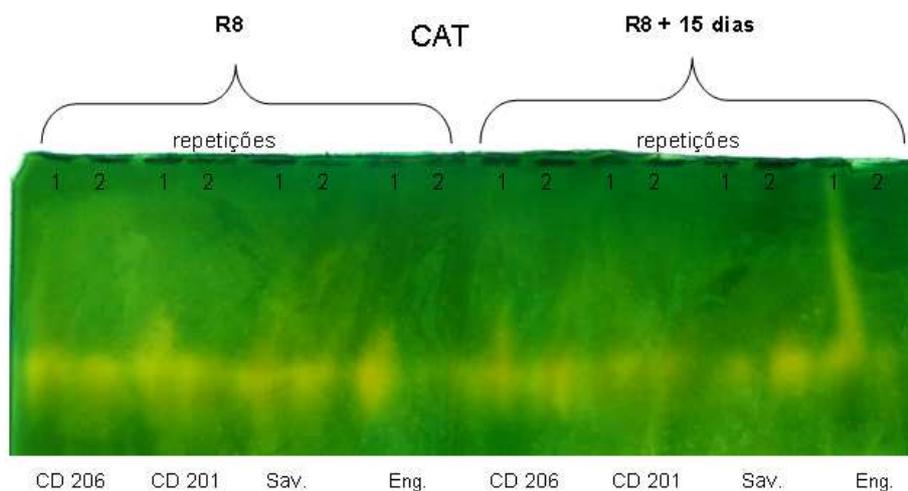


Figura 4 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de alta (CD 201 e CD 206) e baixa qualidade fisiológica (Engopa 316 e Savana), durante as épocas de colheita R8 e R8 + 15 dias, revelados para a enzima CAT

Em relação à enzima MDH (Figura 5), observou-se redução da atividade desta em sementes colhidas 15 dias após o estágio R8, em sementes das cultivares CD 206, CD 201 e Savana. Não foi observada a atividade dessa enzima em sementes da cultivar Engopa 316, nas duas épocas de colheita. Como já mencionado, em sementes com baixa qualidade fisiológica espera-se menor atividade respiratória. A enzima Malato Deshidrogenase (MDH) tem sido associada com a biossíntese de oxalacetato (OAA), pela interconversão do malato para oxalacetato, durante o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs) em plantas (WEEDEN; WENDEL, 1990). Assim, essa enzima assume uma função importante em uma ampla variedade de reações biossintéticas, tais como síntese de aminoácidos, gluconeogénese, manutenção dos potenciais redox

e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas (LIN et al., 2003). Contudo, espera-se que a atividade de MDH seja intensa nos primeiros estádios do processo de germinação em que a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento.

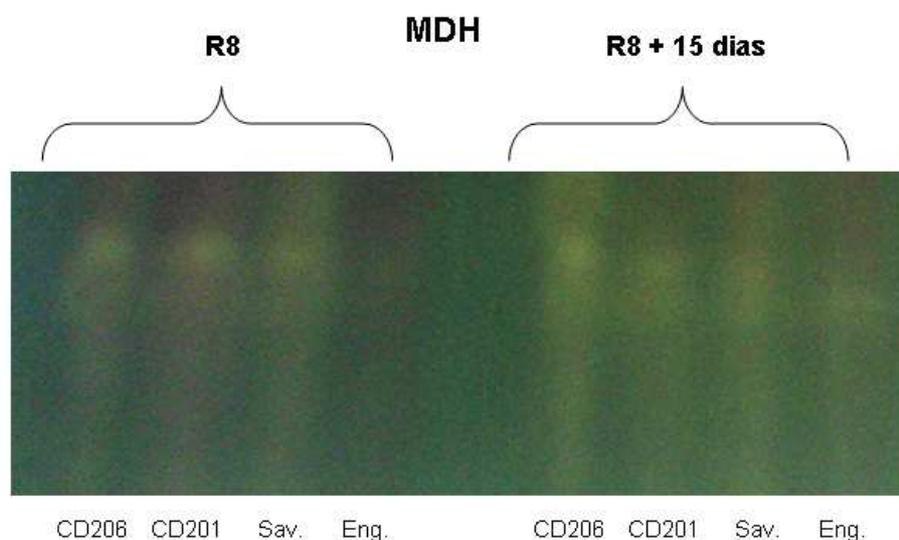


Figura 5 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de alta (CD 201 e CD 206) e baixa qualidade fisiológica (Engopa 316 e Savana), durante as épocas de colheita R8 e R8 + 15 dias, revelados para a enzima MDH

Foi verificada menor expressão da enzima ICL (Figura 6), em sementes colhidas no estágio R8 em relação às colhidas 15 dias após o estágio R8. No entanto, em sementes da cultivar Engopa 316 foi observada redução da atividade dessa enzima, com o retardamento da colheita. Martins et al. (2000), pesquisando a atividade da ICL em sementes de soja durante a germinação, observaram que frente a condições de estresse, houve um aumento da atividade enzimática. Esses dados corroboram com a maior atividade observada da ICL durante a época R8 + 15 dias, quando as sementes estão mais sujeitas à deterioração. Em sementes colhidas no estágio R8 houve mais atividade da

enzima ICL em sementes da cultivar CD 206. Em sementes colhidas com 15 dias após o estágio R8, houve menor atividade dessa enzima em sementes da cultivar Engopa 316, em relação às demais, nessa mesma época. Carvalho (2013) constatou maior atividade da ICL em cultivares de sementes de soja com melhor qualidade fisiológica.

Em sementes mais deterioradas tem sido observada menor atividade dessa enzima, com menor eficiência dos sistemas removedores de radicais livres. Em sementes de soja, a isocitrato liase é considerada uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e está envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas, e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos.

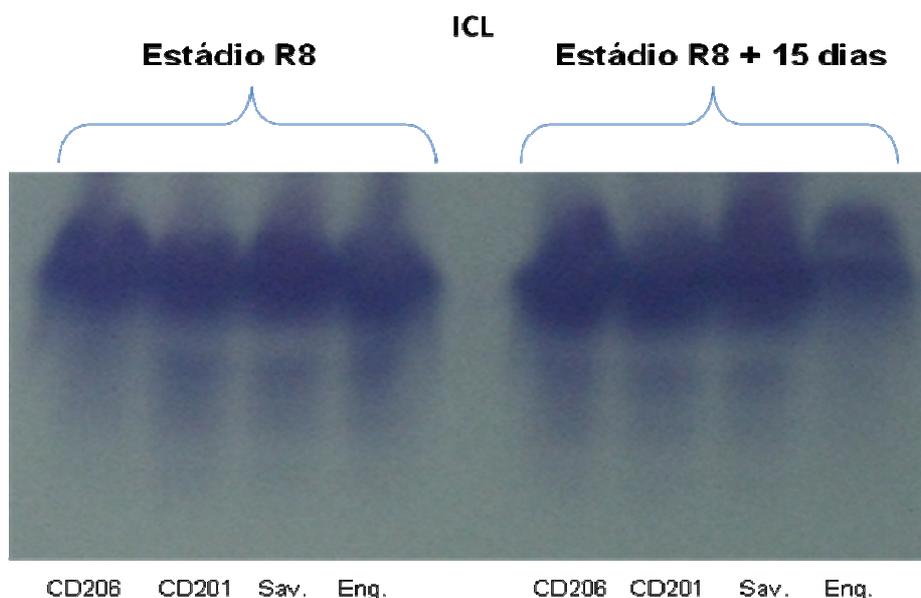


Figura 6 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de alta (CD 201 e CD 206) e baixa qualidade fisiológica (Engopa 316 e Savana), durante as épocas de colheita R8 e R8 + 15 dias, revelados para a enzima ICL

Em relação ao estudo de expressão gênica de transcritos, pela técnica de RTq-PCR, em sementes das quatro cultivares selecionadas anteriormente e colhidas em duas épocas, considerou-se a expressão relativa à cultivar CD 201 que foi classificada com sementes de alta qualidade fisiológica. No Gráfico 4 observa-se a expressão dos genes álcool desidrogenase (ADH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e fosfoglico isomerase (PGI), em sementes das cultivares de baixa e alta qualidade, durante o estágio R8. A expressão do gene SOD foi maior em sementes das cultivares Savana e Engopa 316, consideradas de baixa qualidade fisiológica. Já nas sementes colhidas 15 dias após o estágio R8, (Gráfico 5), maior expressão deste gene foi observada em sementes da cultivar CD 206 e menor expressão foi observada em sementes da cultivar Engopa 316, sendo essa última classificada como de baixa qualidade de sementes. A SOD é a primeira enzima que atua na linha de defesa contra formas reativas de oxigênio, uma vez que essa enzima anula a ação dos superóxidos O_2 , catalisando reações de transferência de 2 elétrons para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MCDONALD, 1999).

Para o gene CAT, também envolvido no sistema de remoção de radicais livres, foi observada maior expressão em sementes da cultivar CD 206 e menor expressão em sementes das cultivares Savana e Engopa 316, de baixa qualidade, colhidas no estágio R8. Quando a colheita foi retardada, R8 + 15 dias, a expressão desse gene apresentou-se maior em sementes da cultivar Savana, classificada como de baixa qualidade.

Com relação aos resultados dos genes envolvidos em processos respiratórios, o gene ADH foi mais expresso em sementes das cultivares de alta qualidade, quando colhidas no estágio R8. Em termos numéricos maior expressão foi observada em sementes colhidas 15 dias após o estágio R8. Ressalta-se que a expressão da enzima ADH, avaliada pela técnica de

eletroforese, também foi maior em cultivares com sementes classificadas como de alta qualidade fisiológica.

Quando a colheita foi retardada (R8 + 15 dias), maior expressão do gene ADH foi observada em sementes das cultivares CD 206 e Engopa 316 e menor expressão em sementes das cultivares CD 201 e Savana. Assim para esse gene, considerando o retardamento da colheita não foi possível estabelecer uma relação entre a qualidade fisiológica de sementes e a expressão do gene ADH avaliado nesta pesquisa.

A expressão do gene PGI foi maior em sementes da cultivar CD 201, considerando o estágio R8 e menor em sementes da cultivar Savana, sendo que a expressão do gene nessa última não se diferenciou daquela observada em sementes da cultivar CD 206. A expressão desse gene em sementes das cultivares de baixa qualidade diminuiu na época de colheita R8 +15 dias em relação às colhidas no estágio R8. Para a cultivar CD 206 colhidas 15 dias após o estágio R8, a expressão foi maior em relação às observadas em sementes das demais cultivares. Maior expressão desse gene foi observada também na cultivar CD 201, em relação à observada em sementes das cultivares Savana e Engopa 316. Quando foi avaliada a expressão da enzima PGI por meio da técnica de eletroforese, também foi observada maior atividade desta enzima, em sementes de alta qualidade, corroborando também com os resultados observados nos testes de germinação e vigor.

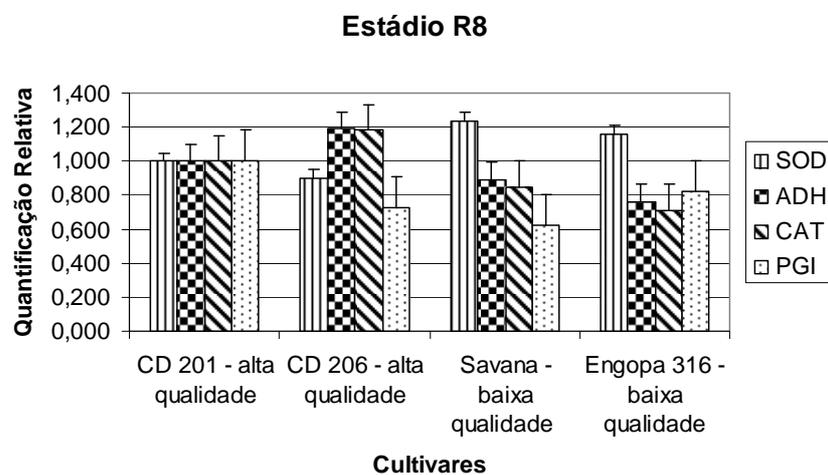


Gráfico 4 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes SOD, ADH, CAT e PGI, durante o estágio de desenvolvimento R8, de sementes de soja de alta e baixa qualidade fisiológica. Barras referentes ao desvio padrão das triplicatas.

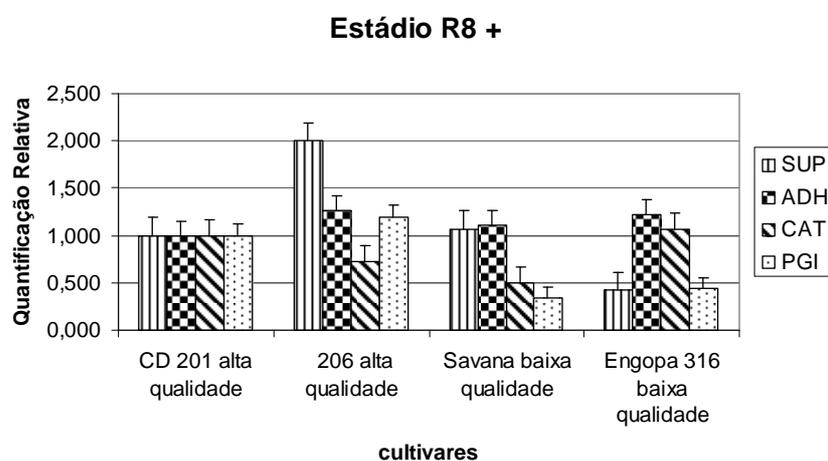


Gráfico 5 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes SOD, ADH, CAT e PGI durante a época de colheita R8 +15 dias, de sementes de soja de alta e baixa qualidade fisiológica. Barras referentes ao desvio padrão das triplicatas.

Maior expressão do gene MDH foi observada em sementes das cultivares Savana e Engopa 316, quando as sementes foram colhidas no estágio R8 (Gráfico 6). No entanto, quando a colheita foi realizada 15 dias após o estágio R8 (Gráfico 7), a maior expressão desse gene foi observada em sementes da cultivar CD 201. Nessa condição de colheita, não houve diferença na expressão desse gene entre as sementes das cultivares CD 206, Savana e Engopa 316.

Em relação à expressão do gene ICL, associado à enzima isocitrato liase foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Na sequência, em ordem decrescente, foi observada maior expressão do gene em sementes das cultivares CD 206, Engopa 316, Savana e CD 201, quando colhidas no estágio R8 (Gráfico 6). No entanto, sementes colhidas 15 dias após o estágio R8, maior expressão do gene foi observada em sementes da cultivar CD 201, seguida das sementes das cultivares CD 206 e Engopa 316, cujos valores de expressão do gene, nessas duas últimas, não diferenciaram entre si. Menor valor de expressão deste gene foi observada em sementes da cultivar Savana classificada como de baixa qualidade fisiológica de sementes (Gráfico 7).

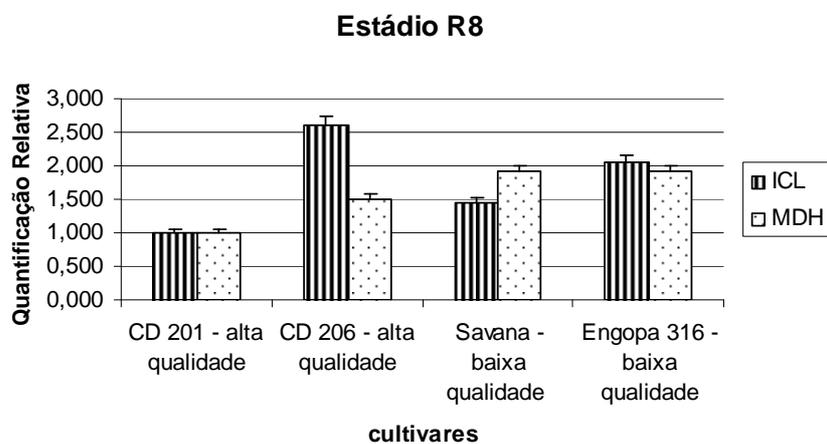


Gráfico 6 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes ICL e MDH durante o estágio de desenvolvimento R8, de sementes de soja de alta e baixa qualidade fisiológica. Barras referentes ao desvio padrão das triplicatas

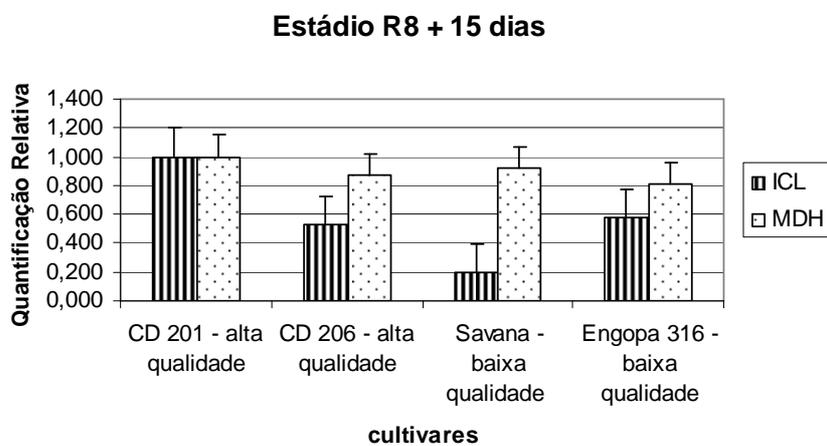


Gráfico 7 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes ICL e MDH durante a época de colheita R8 +15 dias, de sementes de soja de alta e baixa qualidade fisiológica. Barras referentes ao desvio padrão das triplicatas

Ao avaliar conjuntamente os dados de expressão de transcritos, os de expressão de enzimas avaliada pela técnica de eletroforese e os resultados dos testes de germinação e vigor, verificam-se algumas situações que explicam a complexidade dos fatores que interferem na qualidade fisiológica de sementes de soja. Segundo Carrington e Ambron (2003), a presença de RNAm não significa necessariamente a presença do produto protéico porque existem diferentes mecanismos de regulação da expressão gênica, que podem ser utilizados de acordo com a necessidade da célula..

Outro aspecto que deve ser considerado é que o controle genético da qualidade fisiológica de sementes de soja é complexo em função de muitos genes estarem envolvidos. Nessa situação, estudos voltados para a expressão desses genes por meio de transcritos podem ser limitados, uma vez que isoenzimas importantes nos processos de deterioração, respiração, germinação, são codificadas por diferentes genes. Estudar um gene de efeito maior requer estudos mais complexos, nem sempre viáveis para a seleção dos mesmos, devido ao maior número de genes, de efeitos menores, associados à característica de qualidade fisiológica.

Assim, quando se avalia a expressão de uma isoenzima por meio da técnica de eletroforese, várias enzimas codificadas por genes diferentes, mas que possuem afinidade pelo mesmo substrato, podem se expressar. Dessa forma, os transcritos selecionados, nesse tipo de estudo, podem ser mais restritos em detrimento da análise proteômica. Um exemplo é a MDH, que se expressa no citoplasma, mitocôndria e peroxissomo, e é codificada por diferentes genes.

Além dos aspectos acima mencionados deve-se considerar ainda que características ligadas ao tegumento de sementes de soja, a exemplo de lignina, podem também influenciar na qualidade fisiológica dessas sementes. Com base nos resultados observados nesta pesquisa, verificou-se que a expressão ou não de genes relacionados à qualidade fisiológica de sementes é mais importante em

situações nas quais ocorre alguma condição de estresse. Nesta pesquisa isto foi possível com o retardamento da colheita em 15 dias após o estágio R8. Considera-se ainda que, a seleção de enzimas relacionadas à característica de qualidade fisiológica, codificadas por poucos genes sejam importantes em estudos desta natureza.

5 CONCLUSÕES

Ocorre maior expressão das enzimas envolvidas na respiração, álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e fosfoglico isomerase (PGI), em sementes de soja com alta qualidade fisiológica.

Os perfis proteômico e transcriptômico relacionados aos genes envolvidos nos sistemas removedores de radicais livres, em sementes de soja variam entre cultivares e com a época de colheita de sementes.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupirapreta (*Bowdichia virgilioides* kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- AQUINO, F. W. B. et al. Phenolic compounds in imburana (*Amburana cearensis*) powder extracts. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, n. 6, p. 739-745, Nov. 2005.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. van; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BRACCINI, A. L. et al. Germinação e sanidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) colhidas em diferentes épocas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 4, p. 1017-1022, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.
- BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 3, p. 405-414, Aug. 2001.

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

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

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de La Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, Cordoba, v. 2, n. 2, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2013.

CARRINGTON, J. C.; AMBROS, V. Role of MicroRNAs in plant and animal development. **Science**, New York, v. 301, n. 5631, p. 336-338, 2003.

CARVALHO, E. R. **Manganês via foliar em soja convencional e transgênica RR**: efeitos na qualidade de sementes, atividade enzimática, lignina e produtividade. 2013. 134 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

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

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

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 82, n. 1, p. 47-85, Jan. 2002.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**. Versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003. Software.

FRANÇA NETO, J. B. et al. Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 26-32, 2010.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-122, Jan. 1999.

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

GARCIA, D. C. et al. A secagem de sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 603-608, mar./abr. 2004.

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

GRIS, C. F. et al. Qualidade fisiológica e teor de lignina no tegumento de sementes de soja convencional e transgênica RR submetidas a diferentes épocas de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2010.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, May 1995.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age penault seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

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

LEAL, L. K. A. M. et al. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 388, n. 2, p. 86-90, Nov. 2005.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1130 p.

LIN, C. F. et al. Cloning and prokaryotic expression of a cDNA encoding a putative mitochondrial malate dehydrogenase in *Oryza sativa*. **DNA Sequence**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 75-77, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

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

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

MENEZES, M. **Aspectos genéticos associados à qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2008. 112 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

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

NAVROT, N. et al. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Plant Science**, Shannon, v. 129, n. 1, p. 185-195, 2007.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec. 2001.

OMETO, J. C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 525 p.

POLIZEL, A. M. et al. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 3641-3656, 2011.

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

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. **Genética na agropecuária**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VICENTE, V. H. A. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Lavras: UFLA, 1999. 359 p.

SEDIYAMA, C. S. et al. Influência do retardamento da colheita sobre a deiscência das vagens e sobre a qualidade e poder germinativo das sementes de soja. **Experientiae**, Viçosa, MG, v. 14, n. 5, p. 117-141, set. 1972.

SILVA, C. L. S. **Apoximia em citrus**: expressão diferencial de m RNA e proteínas em plântulas e embriões sigóticos e apomíticos. 2002. 121 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

SILVA, C. M.; MESQUITA, A. N.; PEREIRA, L. A. G. Efeito da época de colheita na qualidade da semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 41-48, 1979.

SILVA, E. R. et al. Comportamento de variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em algumas localidades de Minas Gerais. **Experientiae**, Viçosa, MG, v. 10, n. 6, p. 123-183, jun. 1970.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Soybean physiology and gene expression during drought. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 1946-1956, Oct. 2010.

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

VIDIGAL, D. S. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 129-136, 2009.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-26.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p. 46-72.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxidedismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. **Plant Cell and Physiology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 785-791, May 1994.