



IZABEL COSTA SILVA NETA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
TOLERÂNCIA À BAIXA TEMPERATURA DE
GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE MILHO**

LAVRAS – MG

2014

IZABEL COSTA SILVA NETA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA À BAIXA
TEMPERATURA 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**

Silva Neta, Izabel Costa.

Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura
de germinação em sementes de milho / Izabel Costa Silva Neta. –
Lavras : UFLA, 2014.

81 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Transcriptômica. 3. Proteômica. 4. Milho -
Estresse abiótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

IZABEL COSTA SILVA NETA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA À BAIXA
TEMPERATURA 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 07 de fevereiro de 2014

Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dra. Tathiana Silva Timóteo	DOW AGROSCIENCES

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

LAVRAS – MG
2014

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu chegasse até aqui, pelas oportunidades e por nunca me desamparar, tornando a minha caminhada mais segura.

A minha orientadora, Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho, exemplo de dedicação e profissionalismo, por confiar em meu trabalho e me incentivar. Cada reunião serviu de estímulo, tanto na execução do trabalho como para vida profissional, pois sua dedicação ao que faz me inspira a ser uma profissional melhor.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura, 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), a concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro, respectivamente.

A minha família, meus pais Geraldo e Nilma, pelo amor incondicional, pela dedicação e apoio em todas as minhas decisões e aos meus irmãos, Ulisses e Juliana, que nunca mediram esforços para me incentivar, pelo carinho e companheirismo de sempre.

Ao meu namorado Luiz Fernando, pelo incentivo, paciência e companheirismo.

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. Renato Mendes Guimarães, Profa. Luciane Vilela Resende e Pesquisadora Tathiana Silva Timóteo pelas valiosas contribuições.

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

Em especial a Thaís Lima Marques e Danielle Resende Vilela.

Agradeço aos membros do Grupo do Milho, pela amizade e pela ajuda na condução do experimento no campo.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Elenir, Elza, Walbert, 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 Sophia Mangussi e Viviane Abreu, 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, Michelle, Natássia, Mariana, Vivi, Sophia, Samira, pela paciência, amizade, carinho, companheirismo em todos os momentos e por tornarem meus dias mais alegres e ternos. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado vocês em minha vida!

Aos membros do NESem e G-milho, pela amizade e contribuição profissional.

As pesquisadoras Aline Clemente e Francielle Caixeta pela contribuição nas análises moleculares.

Ao pesquisador Adriano Delly Veiga, pela contribuição nos trabalhos de campo, análises estatísticas e por estar sempre disponível a ajudar.

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

RESUMO

Sabe-se que durante o período de germinação de sementes e emergência de plântulas a temperatura é um fator determinante que influencia o estabelecimento de plântulas no campo. Assim cultivares tolerantes a baixas temperaturas nessas fases são fundamentais nos programas de melhoramento. A identificação de genes de importância, os quais poderão ser usados ou manipulados em programas de melhoramento vislumbrando a produção de sementes de milho tolerantes ao estresse causado pelo frio. Diante disso, objetivou-se nesta pesquisa caracterizar linhagens de milho tolerantes ao frio durante o processo de germinação por meio de testes fisiológicos, perfil de ácidos graxos, transcriptômica e proteômica. Para realização do trabalho foram utilizadas sementes de linhagens com diferentes níveis de tolerância e baixas temperaturas, sendo três classificadas como tolerantes e três classificadas como suscetíveis a baixas temperaturas de germinação. Para obtenção de material em quantidade suficiente para realização do trabalho, foi instalado um campo para multiplicação das sementes das linhagens selecionadas. Após as sementes colhidas e classificadas, realizou-se, testes fisiológicos, e na análise de ácidos graxos determinou-se os teores dos ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico e ecosenoico. Na análise proteômica foi avaliada a expressão das proteínas resistentes ao calor, catalase, peroxidase, esterase, superóxido dismutase e α -amilase. Na análise de transcritos foi estudada a expressão dos genes AOX1, AOX2, ZmMPK-17 e ZmAN-13. Pode-se concluir que os materiais mais suscetíveis a baixas temperaturas de germinação apresentaram maiores teores de ácidos graxos saturados. A expressão da α -amilase em sementes embebidas por 72 horas na temperatura de 10 °C é inferior à expressão quando as sementes são embebidas a 25 °C pelo mesmo período de tempo. Há variação da expressão das proteínas resistentes ao calor em sementes das linhagens avaliadas. Os genes AOX e Zm-AN13 se mostraram promissores para identificação de materiais de milho tolerantes à baixa temperatura de germinação.

Palavras-chave: RT-qPCR. Enzimas antioxidantes. Eletroforese. Ácidos graxos. Estresse abiótico.

ABSTRACT

It is known that during the seed germination and seedling emergence the temperature is a decisive factor influencing the seedling establishment in the field. So, cultivars tolerant to low temperatures in these phases are fundamental in breeding programs. The identification of importance genes, which may be used or manipulated in breeding programs envisaging the production of corn seeds tolerant to cold stress. Therefore, this study aimed to characterize corn strains tolerant to cold during the germination process by physiological tests, fatty acid profile, transcriptomic and proteomic. To carry out the work seed strains with different levels of tolerance and low temperatures were used, with three classified as tolerant and three classified as susceptible to low temperatures of germination. To obtain material in sufficient quantity to perform the work, was installed a field for seed multiplication of selected strains. After the collected and sorted seeds, it was held, physiological tests, and analysis of fatty acids were determined the levels of palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic and eicosenoico. In proteomic analysis was evaluated the protein expression heat to resistant, catalase, peroxidase, esterase, superoxide dismutase and α -amylase. In the transcripts analysis was studied the expression of AOX1, AOX2, ZmMPK-17 and ZmAN-13. It can be concluded that the most susceptible materials at low temperatures of germination showed higher levels of saturated fatty acids. The α -amylase expression in seeds imbibed for 72 hours at a temperature 10 °C is lower than the expression when the seeds are imbibed at 25 °C by the same period of time. There is expression variation of the proteins resistant to heat in seeds of the tested strains. The genes AOX and Zm-AN13 showed promise for identifying corn materials tolerant to low temperature germination.

Keywords: RT-qPCR. Antioxidant enzymes. Electrophoresis. Fatty acid. Abiotic stress.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequências dos <i>Primers</i> utilizados na análise de <i>qRT-PCR</i> em sementes de diferentes linhagens de milho.	34
Tabela 2 Resumo da análise de variância dos dados obtidos para germinação (GER), protrusão radicular (P), índice de velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de protrusão (IVP), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de sistema radicular (CSR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de sistema radicular (MSSR) de seis linhagens de milho submetidas a quatro temperaturas de germinação.	39
Tabela 3 Porcentagem de germinação de seis linhagens de milho submetidas a diferentes temperaturas de germinação.	41
Tabela 4 Porcentagem de protrusão de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação.	43
Tabela 5 Índice de velocidade de protrusão de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação.	43
Tabela 6 Índice de velocidade de germinação de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação.	44
Tabela 7 Peso de matéria seca (g) da parte aérea de seis linhagens de milho submetidas a 4 temperaturas de germinação.	45
Tabela 8 Peso de matéria seca (g) do sistema radicular de seis linhagens de milho submetidas a 4 temperaturas de germinação.	45
Tabela 9 Comprimento (cm) da parte aérea das plântulas de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação.	46
Tabela 10 Comprimento (cm) do sistema radicular das plântulas de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação. ..	47
Tabela 11 Teor de extrato etéreo das sementes secas de seis linhagens de milho.	49

Tabela 12 Perfil de seis ácidos graxos em sementes secas de seis linhagens de milho.....	50
Tabela 13 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 24 horas a 10 °C.....	51
Tabela 14 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 48 horas a 10 °C.....	52
Tabela 15 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 24 horas a 25 °C.....	53
Tabela 16 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 48 horas a 25 °C.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Atividade da enzima catalase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h.	55
Figura 2 Atividade da enzima catalase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h.	56
Figura 3 Atividade da enzima peroxidase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h.	57
Figura 4 Atividade da enzima peroxidase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h.	58
Figura 5 Atividade da enzima esterase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h.	59
Figura 6 Atividade da enzima esterase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h.	60
Figura 7 Atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h.	60
Figura 8 Atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h.	61
Figura 9 Atividade da enzima α -amilase em sementes de milho submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 72h.	62
Figura 10 Atividade de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho de seis linhagens.	63

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Expressão do gene AOX em relação ao tratamento 63-10 °C.....64
- Gráfico 2 Expressão do gene ZmMPK-17 em relação ao tratamento 64-S.....67
- Gráfico 3 Expressão do gene ZmAN-13 em relação ao tratamento 64-25 °C. ...68
- Gráfico 4 Expressão do gene AOX-2 em relação ao tratamento 54-10 °C.....70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Importância do milho e demanda de sementes em locais sujeitos a baixas temperaturas	15
2.2	Mecanismos de tolerância ao frio	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Local	27
3.2	Multiplicação das sementes de seis linhagens contrastantes em relação à tolerância a baixas temperaturas de germinação	27
3.3	Avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes de milho	28
3.4	Análise análise proteômica de genes relacionados à tolerância ao frio por meio da técnica de eletroforese	30
3.5	Análise de transcritos de genes relacionados à tolerância ao frio por meio da técnica de qRT-PCR	32
3.6	Análise de ácidos graxos pela técnica de cromatografia gasosa (C.G.)	36
3.7	Análise estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados em todo mundo. Essa cultura apresenta grande importância econômica devido às diversas formas de utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia.

A cultura do milho, devido aos programas de melhoramento genético, em geral, tem boa adaptação às diversas condições climáticas, mas há circunstâncias em que as variações bruscas de temperatura podem afetar o crescimento em vários estádios de desenvolvimento da planta.

A semeadura sob baixa temperatura, por exemplo, prolonga o ciclo da cultura, afetando a duração dos estádios fenológicos da planta. Temperaturas no solo, inferiores a 10 °C afetam negativamente a germinação, podendo causar sérios prejuízos à produção.

Para aumentar as chances de sucesso da cultura do milho em regiões com baixas temperaturas, há a necessidade de que as cultivares recomendadas para esses locais sejam tolerantes a essa condição climática, principalmente nas fases de germinação de sementes e emergência de plântulas.

A oferta de genótipos produtivos e com características de tolerância a baixas temperaturas é um desafio dos programas de melhoramento, pois em locais que apresentam invernos rigorosos, existe inibição ou retardamento do processo de germinação.

Alguns trabalhos têm sido realizados no sentido de desenvolver cultivares tolerantes ao frio durante os estágios de desenvolvimento da cultura do milho. No entanto, em alguns estudos tem sido observado que as causas da resposta ao frio, como a tolerância, são complexas e dependem de inúmeras mudanças fisiológicas e moleculares. Entretanto, essas mudanças e os genes relacionados ainda não estão bem elucidados.

Assim, a identificação dos genes relacionados à tolerância ao frio pode ser eficiente para o desenvolvimento de cultivares responsivas a essa condição

de estresse, buscando-se a identificação de marcadores funcionais para auxiliar no processo de seleção nos programas de melhoramento.

A técnica de PCR em tempo real tem se mostrado promissora em pesquisas que relacionam os genes de respostas das plantas aos estresses abióticos, como a tolerância ao frio.

Diante disso, objetivou-se nesta pesquisa caracterizar linhagens de milho tolerantes ao frio durante o processo de germinação por meio de testes fisiológicos, perfil de ácidos graxos, transcriptômica e proteômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do milho e demanda de sementes em locais sujeitos a baixas temperaturas

A cultura do milho ocupa lugar de destaque no contexto econômico brasileiro. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2013), para safra 2012/2013 o Brasil terá recorde de produção de milho com 79.077,9 mil toneladas, representando uma evolução de 8,4% em relação à obtida na safra 2011/2012.

Esse aumento na produção se deve, entre outros fatores, a um estabelecimento adequado do estande de plantas, devido principalmente ao uso de sementes de alta qualidade. De acordo com os últimos dados da Associação Brasileira de Sementes e Mudanças - ABRASEM (2013), na safra 2011/2012 a taxa de utilização de sementes de milho foi cerca de 90%. Essa alta taxa de utilização de sementes ocorre pelo alto nível tecnológico da cultura atrelado ao potencial produtivo dos híbridos disponíveis no mercado.

Na safra 2012/13, foram disponibilizadas 479 cultivares de milho, e dessas, 216 são transgênicas. Considerando todas as cultivares, 60,96 % são híbridos simples; 21,5% são híbridos triplos, 10,23% são híbridos duplos e 7,31% são variedades. Nessa safra, as cultivares de ciclo precoce (70,98%) são predominantes, seguidas pelas cultivares de ciclo superprecoce ou hiperprecoce (22,33%). As cultivares de ciclo semiprecoce ou normais representam apenas 6,69%. Dentre as cultivares transgênicas, 78,24% são híbridos simples, e o restante (21,76%), são híbridos triplos (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2013). Esses dados refletem a importância dos programas de melhoramento genético, a confiança do setor sementeiro na evolução da cultura do milho e a importância do uso de sementes no aumento da produtividade.

Na cultura do milho a demanda por sementes híbridas, com alta qualidade, tem aumentado significativamente, fazendo com que as empresas produtoras de sementes adotem, muitas vezes, padrões de qualidade mais rígidos do que os estabelecidos por órgãos oficiais (GOMES et al., 2000)

Nos últimos anos diversos trabalhos foram realizados no sentido de desenvolver cultivares resistentes aos estresses bióticos. As cultivares transgênicas são resultantes, atualmente no mercado de cinco eventos para o controle de lagartas, dois eventos que conferem resistência ao herbicida glifosato aplicado em pós-emergência e a tecnologia Liberty Link® de tolerância a herbicidas formulados com Glufosinato de Amônio (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2013).

No entanto, os estresses abióticos como déficit hídrico, salinidade e os estresses causados por elevadas ou baixas temperaturas tem afetado a produção do milho nas diversas regiões brasileiras, e ainda são poucos os trabalhos que visam a estudar os genes que caracterizam tolerância a esses estresses. Devido ao aumento da demanda por elevadas produções, existe a necessidade do desenvolvimento de cultivares com rendimentos mais elevados e com resistência aos estresses ambientais.

Dentre os estresses abióticos a baixa temperatura é um dos fatores limitantes ao desenvolvimento das plantas (WANG et al., 2009). Os efeitos negativos devido à ocorrência de baixas temperaturas sobre a cultura do milho são de difícil controle em nível de manejo, o que torna a tolerância das cultivares extremamente importante para estabilizar o rendimento de grãos nas áreas sujeitas à ocorrência de frio.

Em regiões brasileiras sujeitas a invernos rigorosos, como os estados do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC) os fatores ambientais exercem influência direta na época de semeadura do milho. Nessas regiões os produtores que possuem sistema de irrigação poderiam produzir até

três safras de milho se não fosse o período de inverno. Assim a semeadura só é realizada após o inverno e isso pode acarretar em sérios prejuízos, pois a colheita pode coincidir com períodos chuvosos.

Mesmo com as dificuldades impostas pelas baixas temperaturas, as regiões sul e sudeste do país têm grande responsabilidade na produção nacional de milho, segundo dados da CONAB, na safra 2011/2012 os estados de São Paulo e Minas Gerais (MG) foram responsáveis pela produção de 4,7 milhões de toneladas e os estados do PR, SC e RS por 18,5 milhões de toneladas de milho.

Apesar da alta produtividade do milho, em áreas sujeitas a invernos rigorosos, os resultados poderiam ser ainda melhores se a germinação das sementes não fosse influenciada pelas baixas temperaturas, pois isso possibilitaria a antecipação da semeadura.

De acordo com Frascaroli e Landi (2013), a semeadura precoce do milho pode resultar em várias vantagens agronômicas, tais como, maior rendimento obtido pela utilização de genótipos de ciclo normal, que são mais produtivos; melhor estabilidade de produção, alcançada pela antecipação de floração antes do período mais quente e mais seco do ano e; a possibilidade de colheita com antecedência, ou com um menor teor de água dos grãos.

Sabe-se que a germinação e a emergência de plântulas são bastante afetadas pela temperatura do solo. Temperaturas baixas também podem aumentar o tempo decorrente entre os estádios de desenvolvimento da planta, alongando o ciclo da cultura, podendo aumentar o número total de folhas, atrasar a formação do pendão e diminuir a disponibilidade de nutrientes para a planta (MAGALHÃES; DURÃES, 2011).

Sabe-se que baixas temperaturas atrasam o processo germinativo, no entanto, são escassos os estudos que relacionam o processo germinativo e suas fases de embebição ao estresse causado por baixas temperaturas.

Em condições de temperatura e umidade adequadas, a planta emerge dentro de 4 a 5 dias, porém, em condições de baixa temperatura e pouca umidade, a germinação pode ocorrer em até duas semanas ou mais (MAGALHÃES; DURÃES, 2011).

Forsthofer et al. (2006) trabalhando na região de Eldorado do Sul (RS) (30°4'S e 51°43'W, altitude de 46 m), com comparação entre épocas de semeadura do milho dentro do mesmo nível de manejo, verificaram que o número de grãos por m², quando a semeadura foi feita em outubro, foi superior ao obtido quando as semeaduras foram realizadas em agosto e dezembro. De acordo com esses autores, o melhor arranjo de plantas, a suplementação hídrica e o maior aporte de nutrientes, dentro da mesma época de semeadura, associado às maiores disponibilidades de radiação solar e temperatura do ar na época intermediária, foram condições que permitiram que o rendimento de grãos fosse maximizado quando a semeadura ocorreu no início da primavera. Tais dados confirmam que as semeaduras após o período de inverno potencializam o rendimento de grãos de milho no Sul do Brasil. No entanto, se forem disponibilizados no mercado, cultivares com tolerância às baixas temperaturas no período de germinação esses dados podem ser alterados e, a semeadura nos meses de julho e agosto poderia acarretar em altas produções, com colheita em épocas que a cultura apresenta preços elevados, trazendo lucros aos produtores.

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração da expressão gênica. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos das células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN et al., 2001).

Assim, para que haja produção de híbridos tolerantes a baixas temperaturas, é de grande importância para a identificação e a caracterização de

genótipos que estejam relacionados a essa tolerância na fase de germinação. A elucidação desses mecanismos facilitará, por certo, o processo de geração de novos materiais genéticos, além de contribuir para o desenvolvimento de técnicas de seleção que podem reduzir o tempo e o trabalho para avaliação de fontes genéticas de tolerância a baixas temperaturas.

2.2 Mecanismos de tolerância ao frio

Em alguns estudos tem sido observado que as causas das respostas ao frio são complexas e dependem de numerosas mudanças fisiológicas e moleculares que ocorrem durante o estresse causado pela baixa temperatura e não obstante, estudos de mecanismos de resposta ao frio no milho não têm sido bem esclarecedores (YANG et al., 2011).

Segundo Pál, Janda e Szalai (2011), o ácido abscísico está envolvido na resposta das plantas ao estresse causado pelo frio. Esses autores verificaram que a aplicação exógena do ácido abscísico aumentou a tolerância das plântulas de milho à refrigeração, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a glutatona redutase, a glutatona S-transferase e a ascorbato peroxidase.

Frascaroli, Casarini e Conti (2005), verificaram que durante o tratamento com frio, linhagens de milho suscetíveis ao estresse causado por baixas temperaturas, apresentaram menor acúmulo de ácido abscísico, quando comparadas com linhagens tolerantes. Assim o acúmulo de ABA nas sementes pode ser utilizado como um fator para selecionar linhagens de milho tolerantes ao frio.

Também há relatos de que a elevada produção de ácidos graxos insaturados é uma resposta relacionada com aclimatação ao frio, assim a análise do perfil de ácidos graxos, a exemplo dos ácidos oleico, linoleico e linolênico, em sementes de milho pode auxiliar na seleção de materiais mais tolerantes a

baixas temperaturas. Nas plantas e em outros organismos a integridade da membrana e sua função são determinadas por sua estrutura e fluidez, sendo que esses atributos são afetados pela composição lipídica e pelo grau de insaturação de ácidos graxos (MIKAMI; MURATA, 2003). As membranas são as primeiras estruturas celulares que se danificam sob estresse por frio (GRAHAM; PATTERSON, 1982).

Em plantas sensíveis ao resfriamento, os lipídeos na bicamada têm uma percentagem alta de cadeias de ácidos graxos saturados e as membranas com essa composição tendem a se solidificar em um estado semicristalino à temperatura superior a zero °C. Como as membranas tornam-se menos fluidas, seus componentes proteicos podem não mais funcionar normalmente. Já os lipídeos de membranas de plantas resistentes ao resfriamento, normalmente apresentam proporção maior de ácidos graxos não saturados (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Alto nível de insaturação de ácido graxo de membrana é uma característica comum em células vegetais (WALLIS; BROWSE, 2002). A biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados é catalisada pelas dessaturases. A ω -6-dessaturase converte ácido oleico a linoleico e, a ω -3-dessaturase produz ácido linolênico a partir do ácido linoleico, como observado por Zhang et al. (2012) em trabalhos com *Arabidopsis thaliana*. Nessa espécie, a expressão de dessaturases (FAD8) foi fortemente induzida por baixa temperatura (GIBSON, 1994).

Liu et al. (2006) estudando o efeito da temperatura na cultura do tomate, verificaram que a expressão das dessaturases (LeFAD7) foi induzida por estresse causado por baixa temperatura (4° C), mas inibida pela alta temperatura (45°) nas folhas. No arroz o gene OsFAD2 sugere conferência de resistência a estresses em plantas crescidas sob condições de estresse causado por baixas temperaturas (SHI et al., 2012).

Kodama et al. (1995) observaram que a insaturação dos ácidos graxos é um dos fatores envolvidos na tolerância a baixas temperaturas, nas folhas jovens de tabaco.

Segundo Taiz e Zeiger (2004), em monocotiledôneas resistentes à baixa temperatura têm sido descobertos vários tipos de proteínas anticongelamento, induzidas pelo frio. Quando os genes específicos codificadores dessas proteínas foram clonados e sequenciados, descobriu-se que todas as proteínas anticongelamento pertencem à classe das endoquitinases e endoglucanases, que são induzidas por infecção de patógenos. Sugere-se assim, que em monocotiledôneas essas proteínas tem papel duplo, agindo na proteção das células contra o estresse pelo frio e o ataque de patógenos.

Proteínas associadas ao estresse osmótico, como as proteínas envolvidas na síntese de osmólitos, proteínas de estabilização de membrana e proteínas LEA, são também reguladas durante o estresse pelo frio. Alguns genes relacionados com a tolerância ao déficit hídrico, também atuam na tolerância ao frio, protegendo as células contra o congelamento, evitando a desidratação intracelular (HOWARTH; OUGHAM, 1993).

Kolippara et al. (2002), ao trabalharem com linhagens recombinantes (RILs) de milho selecionadas para a germinação em condições de frio e tolerância à dessecação, verificaram que proteínas LEA e enolases mostraram-se presentes tanto nos eventos de tolerância ao frio, quanto nos eventos de tolerância à dessecação.

As *dehydrins* (DHNs), pertencentes a uma subfamília do grupo de proteínas LEA (BATTAGLIA et al., 2008), são uma família de proteínas vegetais que se acumulam na fase final de desenvolvimento da semente e em tecidos vegetativos submetidos ao déficit hídrico, salinidade, temperatura baixa, ou tratamento com ácido abscísico (ALLAGULOVA et al., 2003).

Xing et al. (2011), caracterizaram um gene *dehydrin* no milho, ZmDHN2b, sendo que a expressão desse gene no milho foi induzida pelo frio e, na cultura do tabaco a superexpressão de DHNs conferiu tolerância ao frio. O que sugere que esse gene desempenha um papel importante na resposta das plantas ao estresse causado por baixa temperatura.

Baixas temperaturas também provocam alterações na conformação da membrana celular, com influência na homeostase redox celular e, assim, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (SUZUKI; MITTLER, 2006). Essas modificações ativam complexos enzimáticos, que iniciam vários eventos moleculares e que levam à indução da expressão de várias categorias de genes menores e com efeitos aditivos na sua expressão.

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).

A enzima AOX se expressa na via alternativa da respiração. Nessa via não ocorre conservação de energia na forma de ATP, toda energia livre é liberada na forma de calor. No entanto, pode ser usada para ajudar a manter os níveis normais de metabólitos e para reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, quando o fluxo de elétrons através da via do citocromo é limitado (WAGNER; MOORE, 1997).

Sugie et al. (2006), estudando a resposta de *Arabidopsis* ao estresse causado por baixas temperaturas, verificaram que a atividade da AOX resultou na atenuação da produção de EROS.

Segundo Karpova et al. (2002) a expressão de elevados níveis de AOX no milho ocorre em condições de deficiência respiratória ou despolarização da membrana, que são respostas da planta ao estresse causado pelo frio. Nesse

sentido o estudo dessas enzimas AOX é promissor para compreender as mudanças que ocorrem durante a germinação de sementes de milho quando submetidas a baixas temperaturas.

A quantidade de espécies reativas de oxigênio é rigidamente controlada por compostos antioxidantes de baixo peso molecular, tais como, ácido ascórbico e glutathiona, e enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR) (APEL; HIRT, 2004). A melhoria dos sistemas de defesa antioxidante para manter esse equilíbrio, mesmo sob condições de estresse pode resultar em uma maior tolerância ao estresse das plantas (WANG et al., 2009).

Farooq et al. (2008), trabalhando com tolerância ao frio em sementes de milho híbrido, verificaram que o condicionamento fisiológico de sementes com ácido salicílico aumentou a tolerância das mesmas à baixa temperatura, isso ocorreu principalmente, pela ativação dos antioxidantes, incluindo catalase, superóxido dismutase e peroxidase do ascorbato. Hodges et al. (1997), relataram que o nível da atividade das enzimas antioxidantes citadas anteriormente é uma ferramenta útil para seleção de híbridos de milho resistentes à baixa temperatura.

Para que as sementes de milho germinem em condições de baixa temperatura é preciso que elas resistam ao estresse causado por EROS. Stacy et al. (1996), descreveram o gene Per 1, que codifica uma peroxirredoxina com atividade antioxidante, esse gene se expressa em sementes na camada de aleurona e no embrião.

O gene Per 1 é expresso quase que exclusivamente em sementes, e a proteína se acumula no núcleo das células da camada de aleurona e do embrião (STACY et al., 1999). Devido a essa localização, Pulido, Cazalis e Cejudo (2009) sugeriram que as peroxirredoxinas contribuem parcialmente para a proteção do DNA nuclear nas sementes, contra o estresse oxidativo. Outra característica importante das peroxirredoxinas, é o fato de serem codificadas

com exceção do arroz e da couve chinesa (KIM et al., 2011), por um único gene em monocotiledôneas e dicotiledôneas (HALESKAS et al., 1998), o que pode tornar essa proteína um interessante marcador funcional.

Em estudo realizado por De Santis et al. (2011), utilizando três populações de milho divergentes entre si, com relação à tolerância às baixas temperaturas, foi verificado que a indução pelo frio da atividade do canal aniônico da membrana interna da planta (*plant inner membrane mitochondrial anion channel* - PIMAC) está relacionada com a tolerância a baixas temperaturas e ao não congelamento durante o crescimento das plântulas de milho das populações testadas. No entanto, novos estudos nessa área são necessários para verificar se a atividade da PIMAC e a sua relação com a tolerância ao frio pode ser estendida para outros genótipos de milho, além dos estudados.

Takesawa et al. (2002), verificaram que na cultura do arroz a expressão da glutationa-S-transferase, que é uma enzima detoxificante, está relacionada com um crescimento mais rápido do sistema radicular. Esse atributo é muito importante para a produção de cultivares de arroz tolerantes ao frio. Crescimento mais rápido das raízes e alta velocidade de germinação das sementes em condições de baixa temperatura deve aumentar a chance para as mudas de arroz se estabelecer, aumentando assim a produção de arroz em regiões mais frias.

Genes da família ZnF-AN1 presente no genoma do milho, se expressaram para um ou múltiplos estresses abióticos (JIN et al., 2007). Xuan et al. (2011), trabalhando com milho, descreveram a caracterização funcional do gene ZmAN13, um membro da família ZnF-AN1. Os autores verificaram a existência de apenas uma cópia desse gene no genoma do milho e, a expressão de ZmAN13, foi maior nas folhas do que em outros órgãos, sendo altamente induzida pelo tratamento com frio e ABA. A superexpressão de ZmAN13 em *Arabidopsis* conferiu a tolerância ao frio, mas provocou mais sensibilidade ao

estresse salino e estresse hídrico, mostrando que o ZmAN13 tem papel importante, mas diferencial nas respostas das plantas aos estresses abióticos.

Segundo Yang et al. (2011), o milho sofre um processo adaptativo complexo em resposta a baixas temperaturas. Para lidar com o estresse pelo frio, essa cultura evoluiu um considerável grau de plasticidade, incluindo a adaptação por meio de cascatas de redes moleculares. Esse autor e seus colaboradores indentificaram na cultura do milho, três genes que apresentaram alta expressão quando as plântulas foram submetidas a baixas temperaturas. Esses genes foram, ZmMAPKKK, ZmCLC-D e ZmRLK, no entanto, a função exata desses genes codificados no milho em resposta ao frio, ainda não é totalmente compreendida, embora seja sabido que alguns dos seus ortólogos são importantes para a resposta ao estresse em outras espécies vegetais.

Pan et al. (2012), desenvolveram um estudo com a cultura do milho onde identificaram e caracterizaram um novo gene ZmMPK17 do grupo D MAPK . Eles estabeleceram que ZmMPK17 está envolvido na resposta ao estresse hídrico (simulado com polietilenoglicol), à baixa temperatura, e à sinalização de moléculas de defesa. A superexpressão de ZmMPK17 em plantas de tabaco transgênicas resultou em tolerância ao estresse pelo frio e infecção viral. Foi sugerido que o ZmMPK17 pode servir para o estudo entre as respostas ao estresse biótico e abiótico.

Também as proteínas de ligação FKBP, as quais pertencem à superfamília peptidil-prolil cis/trans isomerase (PPIase), têm sido observadas em um amplo espectro de processos biológicos, incluindo enrolamento de proteínas, sinalização hormonais, crescimento de plantas, e resposta a estresses.

Evidências acumuladas ao longo dos últimos anos indicam FKBP como reguladores de múltiplas vias de sinalização em plantas. Assim, caracterizar os padrões de expressão desses FKBP em diferentes tecidos e sob condições de estresse irá ampliar o conhecimento do potencial regulador de FKBP no

desenvolvimento do milho e facilitar a caracterização funcional desse gene nas respostas aos estresses (YU et al., 2012).

Outro gene que tem sido estudado na cultura do milho é o ZmRFP1. Por meio de análises utilizando PCR em tempo real foi observado que os níveis de transcrição de ZmRFP1 na cultura do milho foram maiores nos tecidos aéreos, incluindo caules, folhas e pendões, no entanto, esse gene foi marcadamente regulado apenas quando exposto ao estresse causado pela seca e pela aplicação exógena de ácido abscísico, não se expressando em tratamento com estresses causados por calor, salinidade e baixas temperaturas (XIA et al., 2012).

A técnica de PCR em tempo real vem sendo utilizada como ferramenta nos estudos de expressão gênica e quantificação de sequências específicas em plantas (GACHON et al., 2004). Alguns autores como Fu et al. (2012), Yang et al. (2011) e Zhao et al. (2004), utilizaram essa técnica para estudar a expressão de alguns genes na cultura do milho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

A pesquisa foi realizada na área experimental, no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura e, no Laboratório de Análises Enzimáticas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, a cidade está localizada na região sul de Minas Gerais, latitude 21° 14'S, longitude 45° 00' W Gr. e 918 m de altitude. O clima de Lavras, pela classificação climática de Köppen, é Cwa, temperado chuvoso (mesotérmico), com inverno seco e verão chuvoso, subtropical. A precipitação anual normal é de 1.529,7 mm, sendo os maiores valores observados nos meses de dezembro (296 mm), janeiro (272 mm) e fevereiro (192 mm) (BRASIL, 1992; DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007).

3.2 Multiplicação das sementes de seis linhagens contrastantes em relação à tolerância a baixas temperaturas de germinação

Para execução do trabalho foram utilizadas sementes de seis linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância a baixas temperaturas, sendo três previamente classificadas como de alta tolerância à baixa temperatura (44, 54 e 57) e três de baixa tolerância à baixa temperatura (63,64 e 91).

Para obtenção de sementes para cada linhagem 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, assim como, os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura.

Para prevenir cruzamentos indesejados, no florescimento, 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 sólido).

Após a colheita, as espigas foram despalhadas manualmente e secadas com auxílio de secadora regulada a 30 °C.

Para as análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares realizadas nessa pesquisa, as sementes foram classificadas em peneiras com crivo 2,5/64x20-19mm.

3.3 Avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes de milho

- 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).

- Teste de germinação em diferentes temperaturas (10°, 15 °C, 20 °C e 25 °C)

Para os testes de germinação, foram utilizadas quatro temperaturas (10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C), sendo que para cada temperatura o teste foi conduzido, com quatro repetições de 50 sementes, com a semeadura entre papel tipo Germitest 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 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C

(+ou - 3 °C). As avaliações das plântulas normais foram realizadas com 4, 7, 14 e 21 dias após a montagem dos testes. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais das quatro repetições. Adotou-se como padrão para considerar plântulas normais, aquelas que apresentavam pelo menos 1 cm de raiz principal, com duas raízes adventícias e 1cm de parte aérea. Avaliou-se também a porcentagem de protrusão, adotando-se como padrão, as sementes com pelo menos 0,5cm de protrusão.

- 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 21 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 1 cm de raiz principal, com duas raízes adventícias e 1cm de parte aérea. Avaliou-se também o índice de velocidade de protrusão, adotando-se como padrão, as sementes com pelo menos 0,5cm de protrusão.

- Comprimento de parte aérea e sistema radicular

Para avaliação do comprimento de parte aérea e sistema radicular, foram utilizadas quatro temperaturas, sendo que para cada uma o teste foi conduzido, com quatro repetições de 15 sementes, com a semeadura entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 ml.g-1 de papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo B.O.D. regulada nas temperaturas de 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C, por 14 dias. A primeira avaliação foi realizada aos sete dias. Determinou-se o comprimento de parte aérea e sistema radicular para as linhagens que apresentaram mais de 50%

do total das plântulas com parte aérea e sistema radicular. Os tratamentos que ainda não apresentavam essas partes foram avaliados aos 14 dias após a semeadura.

- Matéria seca de parte aérea e sistema radicular

Para determinar a matéria seca de parte aérea e sistema radicular, foram utilizadas 4 repetições de 30 sementes. A semeadura foi realizada entre papel Germitest, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 ml.g⁻¹ de papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo B.O.D. regulada nas temperaturas de 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C (+ou - 3 °C). A primeira avaliação foi realizada aos sete dias, e determinou-se a massa de matéria seca para os tratamentos que apresentaram mais de 50% do total das plântulas com parte aérea e sistema radicular. Os tratamentos que ainda não apresentavam essas partes foram avaliados aos 14 dias após a semeadura. A massa de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular foi determinada separadamente. Os tecidos foram separados das sementes e acondicionados em sacos de papel e levados para a estufa regulada a 60 °C até a estabilização do peso. Após esse período o material foi pesado em balança de precisão.

3.4 Análise proteômica de genes relacionados à tolerância ao frio por meio da técnica de eletroforese

- Proteínas de tolerância ao calor

Para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor, utilizaram-se 11 sementes secas e inteiras para cada tratamento. Essas foram moídas por um minuto e quinze segundos em mortar sobre gelo, na presença de 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), e transferidos para

microtubos de capacidade de 1500 μ L. 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 (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5) 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 120 v e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006).

- Enzima alfa amilase

Para a extração da enzima α -amilase, as sementes foram colocadas para germinar em rolo de papel por um período de 72 horas, nas temperaturas de 10 °C e 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, 200mg do pó das sementes foram ressuspensos em 600 μ l do tampão de extração (Tris-HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,4% PVP). Em seguida foi feita aplicação de 40 μ l do extrato proteico em cada canaleta, nos géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador – contendo amido) e 4,5% (gel concentrador). A revelação foi feita de acordo Alfenas (2006).

- Enzimas catalase, esterase, peroxidase e superóxido dismutase

Para a análise eletroforética das enzimas catalase, esterase, peroxidase e superóxido dismutase, foram utilizadas sementes secas e embebidas em rolos de papel por 24 e 48 horas, nas temperaturas de 10 °C e 25 °C. 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).

3.5 Análise de transcritos de genes relacionados à tolerância ao frio por meio da técnica de qRT-PCR

A análise de transcritos de genes relacionados à tolerância ao frio 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, utilizaram-se sementes das seis linhagens (44, 54, 57, 63, 64, 91) secas e embebidas por 48 horas nas temperaturas de 10 °C e 25 °C.

- 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 *DNase* para evitar qualquer contaminação com *DNA*. Para isso foi utilizado o *DNase DNA Free* (*Ambion*) 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 utilizado 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.

- 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.

- 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 a baixas 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* em sementes de diferentes linhagens de milho

Gene ¹	Identificação	Sequência ³ 5'-----3'
Zm-AN13*	Desconhecido	F AGCTGTTGCCCAAGTCGAGTT R GCTGGGTCCGGCAACAT
AOX-1²*	Rota alternativa da respiração / antioxidante	F GCGAGGAGCAAACAGCAA R GGCCACTAGTGCGGTCAACT
AOX-2²*	Rota alternativa da respiração / antioxidante	F CCAAGACGCTGATGGATAAGG R AGCCATACCGCCTCTGGAA
ZmMPK-17*	Proteína quinase ativada por mitógenos	F CTCCGGTTGCTAGAGGGTTT R TGGATCAGCTAAAGCCTCTTCAG
Ubiquitina*	Controle endógeno	F AAGGCCAAGATCCAGGACAA R TTGCTTCCAGCGAAGATGA
ADH*	Controle endógeno	F AGGACGCTGAGTTAAGACC R CACATTTGGCAGATCAGTGC
OsFAD-7	Dessaturase	F ACCACTACCCGCACAGCAA R CACGGATTTCTTTCTGATTTTC
OsFAD-8	Dessaturase	F TCGGAGCCCAGGAAAGTCT R TTTCGTTGGGCTGGAACAG
Zm-dhn2	Dehidrina	F GACGACGACACGAAGACTCAGA R CGTCTCCGGCTTCTTGTG
AOX-3²	Rota alternativa da respiração / antioxidante	F CGAGAGAGCAGTCTAGTGATTAGTTGAT R GCCTAGGTGGCGCAGAAG
At-PER1	Peroxirredoxina/ Antioxidante	F TGGAGACGACACATGACAAGTTC R TCATGACTACTTCGCCAATTCTGGACCG
At-PER2	Peroxirredoxina/ Antioxidante	F CGTCACCGCCTCCATTTC R GGTGGATGGATCGAGGTAGGA

¹ADH: Desidrogenase Alcoólica; ²Precursor; ³F: sequência do *primer forward*, R: sequência do *primer reverse*; **Primers* que amplificaram para as sementes das linhagens de milho estudadas

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 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.

3.6 Análise de ácidos graxos pela técnica de cromatografia gasosa (C.G.)

Para a análise cromatográfica do perfil de ácidos graxos, as sementes das seis linhagens foram embebidas nas temperaturas de 10 °C e 25 °C pelos períodos de 24h e 48h e também foram utilizadas sementes secas.

- Extração de lipídios

Foram pesadas e maceradas 0,5 g de amostra liofilizada, em balança de precisão (0,1mg) e adicionados 1,0 ml de H₂O, 3,0 ml de metanol, 1,6 ml de clorofórmio e transferidas para o tubo de 10 ml com tampa roscável e agitado por 30 segundos em vórtex. Em seguida, centrifugou-se a 3500 rpm por 15 minutos, formando uma solução trifásica. Dessa solução foi descartado o sobrenadante (H₂O + metanol), rompendo a massa de amostra com pipeta pasteur e pipetando a parte do clorofórmio. O material coletado foi reservado, protegido da luz e do calor para posterior filtragem.

O material foi filtrado com papel filtro apropriado para C.G. e secado com ar de nitrogênio.

- Esterificação

Ao extrato de lipídeos foi adicionado 2 ml de NaOH 0,5M e metanol, a solução foi colocada em banho fervente por 5 minutos e depois resfriada com água gelada. À solução foi adicionado 2,5 ml de reagente esterificante (10g de cloreto de amônio, 15 ml de H₂SO₄ e 300 ml de metanol), e levado novamente em banho fervente por 5 minutos e depois resfriado com água gelada. Em seguida adicionado 2 ml de solução de NaCl saturada e agitado no vórtex por 10 segundos. Adicionou-se 2,5 ml de hexano e agitou-se por 10 segundos em vórtex e em seguida centrifugou-se por 3000 rpm, por 10 minutos. Ocorreu então a separação de fases, e a mistura de hexano e lipídeos foi transferida para frasco âmbar e secada com ar de nitrogênio e armazenada em temperatura -80 °C, até o momento da análise.

Antes da análise o substrato foi ressuspenso com 0,6 ml de hexano.

- Caracterização dos ésteres de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa, sendo utilizado o cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu), equipado com detector de massas e coluna capilar de sílica fundida com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, contendo polietilenoglicol como fase estacionária líquida. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metílicos (SupelcoTM 37 Component FAME Mix), de C:4 a C22:6, com pureza de 99,9%.

Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: modo de injeção “*split*”, com razão de divisão de 1:20; volume injetado de 1 µL; temperatura do detector de 240 °C; temperatura do injetor de 220 °C; programa de temperatura: início a 60 °C com rampa linear de 5 °C/minuto até atingir 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento de 10 °C/minuto até atingir 270 °C, permanecendo nesta temperatura. Para a realização da cromatografia em fase gasosa, foi necessário

redissolver as amostras em 0,5 mL de hexano. A identificação dos picos foi realizada por método comparativo com os tempos de retenção do padrão de ésteres de ácidos graxos e os resultados foram feitos por integração das áreas dos picos e expressos em porcentagem de área.

3.7 Análise estatística

Para a análise dos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica foi realizada análise conjunta em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x4, sendo seis genótipos e quatro temperaturas, com quatro repetições. A comparação das médias dos tratamentos para os testes foi feita pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR.

Para a análise dos resultados dos perfis de ácidos graxos foi realizada uma análise conjunta para cada associação de tempo e temperatura de embebição, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. A comparação das médias dos tratamentos para os testes foi feita pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água médio das sementes no momento da realização dos testes foi de 12,8% com variação máxima de 1%.

Pelo resultado da análise de variância (Tabela 2), houve diferenças significativas para interação entre as linhagens e as temperaturas estudadas para todas as características fisiológicas avaliadas.

Tabela 2 Resumo da análise de variância dos dados obtidos para germinação (GER), protrusão radicular (P), índice de velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de protrusão (IVP), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de sistema radicular (CSR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de sistema radicular (MSSR) de seis linhagens de milho submetidas a quatro temperaturas de germinação

Fatores ¹	GL	QM							
		GER (%)	P (%)	IVG	IVP	CPA (cm)	CSR (cm)	MSPA (g)	MSSR (g)
Temp.	3	2306,89*	356,82*	1876,94*	1587,77*	245,23*	287,64*	3,26*	0,78*
Rep T	12	10,22	2,18	0,22	0,36	0,38	0,91	0,01	0,00
Lin.	5	490,27*	147,17*	8,14*	28,59*	33,32*	40,89*	0,20*	0,05*
Lin.*T	15	245,55*	116,75*	3,12*	4,64*	8,60*	9,90*	0,09*	0,03*
Erro	60	32,22	3,05	0,38	0,32	0,61	1,08	0,01	0,00
CV (%)		6,30	1,79	5,90	4,14	14,33	15,04	16,49	22,04
Média		90,08*	97,31	10,46	13,82	5,46	6,91	0,68	0,34

¹Temp.: Temperatura; Rep T: Rep (Temp.); Lin.: Linhagem; Lin.*T: Lin.*Temp; CV: coeficiente de variação; Média: Média Geral.

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Com relação aos resultados obtidos no teste de germinação (Tabela 3), quando o teste foi realizado a 25 °C, não houve diferença estatística entre os materiais estudados. Mas, à medida que a temperatura foi reduzida, para 20 °C, 15 °C e 10 °C, pode-se observar uma estratificação dos materiais em relação à tolerância a baixas temperaturas.

Esse resultado é interessante, pois revela que a qualidade fisiológica das sementes avaliada pelo teste de germinação foi semelhante, sob temperatura recomendada para germinação de sementes de milho. No entanto, à medida que se reduziu a temperatura, maiores valores de germinação foram observados em sementes de genótipos mais tolerantes ao frio, evidenciando para essa característica o efeito do genótipo.

Quando a temperatura foi de 20 °C pode-se observar uma redução na porcentagem de germinação das sementes da linhagem 57, enquanto que as demais não diferiram estatisticamente, mantendo a porcentagem de germinação acima de 95%.

A 15 °C, as sementes das linhagens 54 e 57, apresentaram porcentagem de germinação inferior às demais. A 10 °C, a maior porcentagem de germinação foi observada em sementes da linhagem 91, seguida das linhagens 63 e 64. Germinação inferior a 80% foi observada para as linhagens 57 e 44 e em sementes da linhagem 54, esse valor foi menor que 50%. Vale ressaltar, que para todos os testes de qualidade das sementes, as avaliações foram feitas diariamente por 21 dias, sendo assim, considerou-se o resultado da germinação aos 21 dias após a semeadura.

Deve-se ressaltar os resultados obtidos para a linhagem 91, pois em todas as temperaturas avaliadas essa linhagem apresentou elevada porcentagem de germinação, sendo superior a 90% quando o teste foi realizado a 10 °C. Esses resultados evidenciam o potencial dessa linhagem para ser explorada em programas de melhoramento visando à tolerância a baixas temperaturas de germinação.

Ainda com relação ao teste de germinação, pode-se observar que de maneira geral, todas as sementes das linhagens tiveram maior porcentagem de germinação, à medida que o teste foi realizado em temperaturas superiores a 10 °C.

Tabela 3 Porcentagem de germinação de seis linhagens de milho submetidas a diferentes temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	74,00 C b	94,00 A a	98,00 A a	100,00 A a
54	47,00 D c	82,00 B b	96,00 A a	99,00 A a
57	76,00 C c	88,00 B b	86,00 A b	98,00 A a
63	83,00 B b	98,00 A a	94,00 A a	99,00 A a
64	84,00 B b	91,00 A a	94,00 A a	96,00 A a
91	93,00 A a	99,00 A a	97,00 A a	100,00 A a

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

Li et al. (2013), trabalhando com indução à tolerância ao frio em sementes de trigo durante a germinação verificaram que quando as sementes foram germinadas a 12 °C, a taxa de germinação foi bem inferior a taxa de germinação dos mesmos materiais a 22 °C. Esses autores também verificaram que o comprimento das plântulas submetidas a 22 °C eram 10 vezes superior ao comprimento das plântulas submetidas a 12 °C, evidenciando que baixas temperaturas reduzem o crescimento das plântulas.

A realização do teste de germinação nas diferentes temperaturas foi fundamental para estratificação dos lotes em diferentes níveis de tolerância a baixas temperaturas.

Com relação à tolerância ao frio, é muito importante que as sementes tenham uma rápida germinação, e originem plântulas normais mesmo na condição de baixa temperatura. Nesse sentido, foram realizados os testes de porcentagem de protrusão, índice de velocidade de protrusão e índice de velocidade de germinação. Essas avaliações foram importantes, porque nem sempre a semente que germina primeiro, origina uma plântula normal.

De acordo com Ulmanová, Středa e Chloupek (2013), as três características-chave do vigor das sementes em *Brassica oleracea*, foram germinação rápida, rápido crescimento do sistema radicular, e alto potencial de

crescimento da parte aérea para cima do solo com o aumento da resistência, essas características implicam em uma estratégia de evasão ao estresse.

De acordo com os resultados do teste de porcentagem de protrusão (Tabela 4), pode-se observar, que nas temperaturas de 25 °C e 20 °C, não houve diferença estatística entre as linhagens. Já a 15 °C, menores valores de protrusão foram observados para as linhagens 54 e 64. A 10 °C, em sementes das linhagens 57 e 91, foram observados os maiores valores de protrusão. Esse resultado evidencia a importância de realizar mais de um teste para avaliar o desempenho das sementes em baixas temperaturas, pois a linhagem 57 apresentou protrusão de 98%, no entanto, apenas 76% originaram plântulas normais.

A permanência das sementes protruídas abaixo do solo pode favorecer o ataque de pragas e doenças, além de serem menos competitivas à infestação de plantas daninhas. A utilização de sementes de baixo vigor está associada ao aumento da biomassa de plantas daninhas de 169-210% e diminuição da produtividade das culturas de 16-21% (RASMUSSEN, 2000).

Assim, em baixas temperaturas é necessário que a germinação das sementes e emergência das plântulas ocorra de maneira mais rápida para permitir uma maior exploração da área, reduzindo a competição com plantas daninhas e também o escape de pragas e fungos do solo. No entanto, é necessário que a plântula tenha potencial genético para suportar baixas temperaturas, pois caso contrário, os riscos de danos e até morte celular são altos.

Tabela 4 Porcentagem de protrusão de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	96,50 A b	100,00 A a	100,00 A a	100,00 A a
54	69,50 C c	96,00 B b	100,00 A a	100,00 A a
57	97,50 A a	100,00 A a	99,00 A a	99,00 A a
63	94,00 B b	99,00 A a	100,00 A a	100,00 A a
64	94,00 B b	96,00 B b	99,50 A a	98,50 A a
91	98,00 A a	100,00 A a	100,00 A a	100,00 A a

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

A menor porcentagem de protrusão foi observada em sementes da linhagem 54, resultado também observado no teste de germinação. Esses resultados evidenciam a suscetibilidade desse material a baixas temperaturas.

Com os resultados do índice de velocidade de protrusão (IVP) (Tabela 5) pode-se observar que nas temperaturas de 25 °C e 20 °C as linhagens 44 e 91 foram superiores as demais. Quando a temperatura foi de 15 °C, a 44 foi superior às demais. Essa característica de velocidade de protrusão é importante e pode ser explorada nos programas de melhoramento. No caso da linhagem 44 não foi observada alta porcentagem de germinação, mas a protrusão foi rápida.

Tabela 5 Índice de velocidade de protrusão de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	5,57 A d	13,57 A c	20,50 A b	24,00 A a
54	2,90 B d	8,13 D c	17,25 B b	23,50 B a
57	5,04 A d	9,04 C c	16,75 B b	21,25 C a
63	4,54 A d	8,33 D c	16,50 B b	20,75 C a
64	5,13 A d	9,00 C c	17,00 B b	23,00 B a
91	5,35 A d	9,93 B c	20,25 A b	24,50 A a

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

Em geral, todas as linhagens tiveram menor índice de velocidade de protrusão a 10 °C, e aumento do índice com o aumento da temperatura. A 10 °C, menor índice de velocidade de protrusão foi observado em sementes da linhagem 54, semelhante ao observado para a porcentagem de protrusão. As sementes da linhagem 54 que não protruíram permaneceram vivas. No entanto, as avaliações foram feitas em condições de laboratório em substrato de papel. Se elas estivessem no solo, em uma condição de campo, estariam sujeitas ao ataque de pragas e microrganismos, pois nessas condições há embebição das sementes com subsequente liberação de exudados que favorecem a proliferação de pragas.

Os resultados do índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 6) foram semelhantes aos do IVP. A 10 °C a linhagem 54 foi inferior às demais. A 15 °C, as linhagens 54 e 57 foram inferiores e, a 20 °C e 25 °C as linhagens 91 e 44 foram superiores as demais linhagens.

Tabela 6 Índice de velocidade de germinação de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	2,75 A d	6,00 A c	11,25 A b	24,00 A a
54	1,25 B d	4,75 B c	10,50 B b	23,50 B a
57	3,00 A d	5,00 B c	8,75 C b	21,25 C a
63	3,50 A d	5,75 A c	10,50 B b	20,75 C a
64	3,50 A d	5,50 A c	10,75 B b	23,00 B a
91	3,50 A d	6,00 A c	11,75 A b	24,50 A a

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

Com relação à matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, quando as sementes foram colocadas para germinar a temperatura de 10 °C por

14 dias (Tabelas 7 e 8), maiores valores foram observados para as linhagens 44, 57 e 64.

Tabela 7 Peso de matéria seca (g) da parte aérea de seis linhagens de milho submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	0,26 Ad	1,14 Aa	0,62 Ac	0,89 Bb
54	0,12 Bc	1,14 Aa	0,66 Ab	1,06 Aa
57	0,38 Ac	0,76 Bb	0,51 Ac	1,09 Aa
63	0,00 Bc	0,59 Bb	0,57 Ab	0,78 Ba
64	0,27 Ac	1,19 Aa	0,64 Ab	1,06 Aa
91	0,01 Bc	0,62 Bb	0,75 Ab	1,04 Aa

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

Tabela 8 Peso de matéria seca (g) do sistema radicular de seis linhagens de milho submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	0,11 Ac	0,61 Aa	0,38 Ab	0,46 Bb
54	0,06 Bc	0,57 Aa	0,42 Ab	0,53 Aa
57	0,17 Ab	0,31 Ca	0,35 Aa	0,42 Ba
63	0,00 Bb	0,32 Ca	0,43 Aa	0,39 Ba
64	0,09 Ab	0,31 Ca	0,28 Aa	0,40 Ba
91	0,01 Bc	0,46 Bb	0,42 Aa	0,62 Aa

Resultados seguidos pela mesma letra maiúscula na coluna, e minúscula na linha, 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 as linhagens 44 e 64 e para comprimento de sistema radicular (Tabela 9), a linhagem 54 foi a que apresentou os maiores valores. A linhagem 54 foi a que apresentou maior sensibilidade a baixas temperaturas, em todos os testes realizados. No entanto, as sementes que germinaram deram origem a plântulas com a raiz principal bem desenvolvida e

com poucas raízes adventícias, o que explica os baixos valores de matéria seca do sistema radicular a 10 °C.

Tabela 9 Comprimento (cm) da parte aérea das plântulas de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	1,69 Ac	9,34 Ab	7,00 Aa	8,92 Ba
54	1,16 Ac	9,64 Ab	6,66 Aa	10,68 Aa
57	1,32 Ac	3,37 Cb	3,70 Bb	6,10 Da
63	0,35 Bc	4,78 Bb	4,51 Bb	7,81 Ca
64	1,62 Ac	8,93 Ab	5,09 Ba	10,03 Aa
91	0,50 Bd	2,76 Cc	6,17 Ab	8,83 Ba

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

Quando as sementes de milho são colocadas para germinar a baixas temperaturas é necessário que após a protrusão radicular sejam formadas plântulas vigorosas capazes de suportar o estresse.

Devido a esse fato, uma forte pressão de seleção atua em resposta à germinação, resultando em uma série de estratégias para que o tempo e a forma de germinação sejam adequados ao lugar e ao momento para sobrevivência e estabelecimento das plântulas (SPINDELBOCK et al., 2013). Pode ter sido isso que aconteceu com a linhagem 54, as plântulas demoraram a germinar, mas quando germinaram apresentaram um maior comprimento de raiz e parte aérea.

A 15 °C, maior massa de matéria seca de parte aérea e maior comprimento de parte aérea foram verificados para as linhagens 44, 54 e 64 (Tabelas 7 e 9). Para matéria seca de sistema radicular os maiores valores foram observados para as linhagens 44 e 54 (Tabela 8) e o maior comprimento do sistema radicular foram verificados na linhagem 54 (Tabela 10).

Para a linhagem 54 apesar de ter sido observado os menores valores de germinação, houve um bom desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular

das plântulas. Essa característica é importante, pois o retardo na germinação pode ser um mecanismo de defesa da planta. Durante o período que a semente fica sem germinar ela pode estar metabolizando mais reservas para conseguir desenvolver uma plântula normal, que suporte as condições adversas.

Tabela 10 Comprimento (cm) do sistema radicular das plântulas de seis linhagens de milho, submetidas a 4 temperaturas de germinação

Linhagens	Temperatura			
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
44	2,63 Ac	10,07 Bb	7,43 Ba	10,51 Ba
54	3,16 Ac	13,16 Ab	10,11 Aa	12,64 Aa
57	2,30 Ab	6,43 Ca	5,98 Ba	7,32 Ca
63	0,76 Bc	6,90 Cb	6,57 Bb	8,42 Ca
64	1,21 Bc	5,93 Cb	6,23 Bb	10,95 Ba
91	1,21 Bd	4,54 Dc	9,07 Ab	11,34 Ba

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

Não houve diferença estatística para matéria seca de parte aérea e de sistema radicular entre as linhagens quando colocadas para germinar a 20 °C (Tabelas 7 e 8). Maior comprimento de parte aérea foi observado para as linhagens 44, 54 e 91 e maior comprimento de sistema radicular para as linhagens 54 e 91. Esse comportamento também foi verificado para matéria seca do sistema radicular. Já para matéria seca de parte aérea os valores observados para as linhagens 44 e 63 foram inferiores aos das demais linhagens.

Na cultura do sorgo, a tolerância ao frio foi avaliada por diferentes componentes, tais como germinação, emergência e crescimento das plântulas sob estresse de baixa temperatura (SOUJEOLE; MILLER, 1984). Maiti (1996) sugeriu que o alongamento do hipocótilo é um bom indicador da tolerância ao frio em sorgo. Yu et al. (2004), também trabalhando com tolerância ao frio em sorgo, verificaram que a temperatura teve efeito significativo para o índice de emergência, altura de plântulas, e matéria seca.

Farooq et al. (2008), trabalhando com sementes híbridas de milho, verificaram que houve efeito significativo da baixa temperatura sobre a germinação, crescimento das plântulas, estabilidade de membrana e atividade antioxidante. As baixas temperaturas aumentaram o tempo para que as plântulas emergissem, aumentaram também a expressão da enzima superóxido dismutase, além de reduzir a porcentagem de emergência, o coeficiente de uniformidade de emergência e o comprimento das raízes e do sistema radicular.

A avaliação do desenvolvimento da plântula é importante, pois é uma característica que pode auxiliar na seleção de materiais em programas de melhoramento. Neste trabalho, a avaliação da qualidade fisiológica permitiu a classificação das linhagens em relação à tolerância ao frio durante a germinação de sementes, sendo as linhagens 44, 54 e 57 classificadas como de baixa tolerância ao frio e as linhagens 63, 64 e 91, classificadas como tolerantes a essa condição.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que existe efeito da temperatura no desenvolvimento das plântulas, mas que muitas vezes a linhagem que apresenta maior germinação, não é a que apresenta maiores índices de crescimento. A tolerância ao frio é uma característica muito complexa, e apenas a avaliação de caracteres morfológicos não é suficiente para garantir a seleção de materiais tolerantes. O que justifica a associação desses resultados com os observados a partir de análises bioquímicas, proteômicas e transcriptômicas.

A aclimação das plantas ao frio tem sido relacionada à estabilidade da membrana celular, com aumento dos níveis de ácidos graxos insaturados e do aumento da concentração total de fosfolipídios (UEMURA; JOSEPH; STEPONKUS, 1995).

Nesse sentido, avaliou-se o teor de extrato etéreo das linhagens e a proporção de alguns ácidos graxos saturados e insaturados, de importância na composição de sementes.

Com relação ao teor total de extrato etéreo (Tabela 11), pode-se observar que nas sementes das linhagens 57, 64 e 91 os valores foram inferiores aos demais. No entanto, o teor de extrato etéreo não parece relacionar-se à tolerância às baixas temperaturas de germinação, pois nesse caso, o mais importante é saber a composição de ácidos graxos saturados e insaturados.

Tabela 11 Teor de extrato etéreo das sementes secas de seis linhagens de milho

Linhagem	Extrato Etéreo(g)
44	0,053333 a
54	0,056667 a
57	0,036667 b
63	0,056667 a
64	0,043333 b
91	0,043333 b
CV(%)	16,89

Resultados seguidos pela mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott

Pode-se observar, que de maneira geral, tanto nas sementes secas, ou embebidas nos diferentes períodos e diferentes temperaturas, o ácido linoleico foi o que apresentou maior proporção.

Nas sementes secas (Tabela 12), verifica-se que as linhagens 44 e 54, foram as que apresentaram maior porcentagem do ácido palmítico, que é um ácido graxo saturado. Essas duas linhagens foram classificadas como de baixa tolerância ao frio durante a germinação. Com exceção do tempo de embebição de 24 horas a 10 °C, que não houve diferença estatística na porcentagem de ácido palmítico entre as linhagens, o comportamento foi o mesmo, ou seja, as linhagens 44 e 54 apresentaram as maiores proporções desse ácido graxo saturado.

Tabela 12 Perfil de seis ácidos graxos em sementes secas de seis linhagens de milho

Linhagens	Sementes Secas					
	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Ecosenoico	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolênico
44	15,45 A	2,70 A	0,16 A	21,19 F	58,70 A	1,02 A
54	15,86 A	1,62 A	0,28 A	32,84 B	46,96 B	1,10 A
57	9,37 C	1,36 A	0,06 A	22,47 E	61,46 A	1,34 A
63	12,04 B	1,99 A	0,24 A	34,16 A	49,39 B	0,99 A
64	10,84 B	1,49 A	0,09 A	24,09 D	60,97 A	1,20 A
91	11,71 B	2,14 A	0,19 A	26,57 C	57,34 A	1,20 A
CV(%)	3,82	9,95	37,24	1,54	2,39	20,38

Resultados seguidos pela mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott

Quanto maior a instauração lipídica da membrana, maior as suas chances de se manter fluida e manter as atividades mesmo sob baixas temperaturas. A maior porcentagem de saturação de ácidos graxos nas linhagens 44 e 54 pode ter sido um dos fatores que as tornaram mais suscetíveis a baixas temperaturas. Sendo a linhagem 54 classificada como de baixa tolerância ao frio ressalta-se também em sementes secas dessa linhagem e da linhagem 63 os menores valores de ácido linoleico, ácido graxo insaturado.

Em genótipos de *Arabidopsis* mutantes para o gene *FAB1*, que atua na biossíntese de ácidos graxos, verificou-se que a membrana ficava mais saturada fazendo com que depois de prolongada exposição das plantas a baixas temperaturas, ocorresse uma redução na eficiência fotossintética do fotossistema II, redução do teor de clorofila e redução nos glicerolipídios dos cloroplastos (WU et al., 1997).

Em tomate, a expressão das dessaturases *LeFAD7* (que converte ácido graxo saturado a insaturado) foram induzidas nas folhas pelo estresse causado por temperaturas de 4 °C (LIU et al., 2006). Em folhas jovens de tabaco a dessaturação de ácidos graxos está relacionada à tolerância a baixas temperaturas (KODAMA et al., 1995).

Quando as sementes foram embebidas por 24 horas a 10 °C (Tabela 13), as linhagens 54 e 63, apresentaram menores porcentagens de ácido linoleico, no entanto, a linhagem 63, ao contrário da linhagem 54, apresenta maior porcentagem de ácido oleico, que também é um ácido graxo de cadeia insaturada, o que pode ter contribuído, para que ela fosse classificada como tolerante a baixas temperaturas. Para os demais ácidos graxos avaliados, não houve diferenças estatísticas entre as linhagens, quando embebidas a 10 °C por 24 horas.

Tabela 13 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 24 horas a 10 °C

Linhagens	Sementes embebidas por 24h a 10 °C					
	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Ecosenoico	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolênico
44	12,82 A	2,20 A	0,16 A	21,67 E	60,23 A	1,28 A
54	16,15 A	1,59 A	0,27 A	32,39 B	47,38 B	1,08 A
57	12,66 A	2,06 A	0,16 A	20,53 E	62,57 A	1,25 A
63	11,89 A	1,74 A	0,21 A	34,15 A	50,16 B	0,75 A
64	11,18 A	1,65 A	0,19 A	23,54 D	60,26 A	1,30 A
91	12,07 A	2,04 A	0,19 A	26,28 C	57,06 A	1,40 A
CV(%)	17,09	23,61	12,18	2,45	4,52	27,05

Resultados seguidos pela mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Pelo perfil dos ácidos graxos quando as sementes foram embebidas por 48 horas a 10 °C (Tabela 14) pode-se observar maior porcentagem do ácido graxo saturado esteárico e menor do ácido oleico, que é insaturado em sementes da linhagem 44. Isso pode explicar o fato dessa linhagem apresentar baixa tolerância ao frio. Em sementes das linhagens 54 e 63, foi verificada maior porcentagem de ácido oleico. No entanto, nas sementes da linhagem 54 houve menor porcentagem de ácido linoleico. Nessas condições não houve diferença estatística entre as linhagens, para os ácidos ecosenoico e linolênico.

Tabela 14 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 48 horas a 10 °C

Linhagens	Sementes embebidas por 48h a 10 °C					
	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Ecosenoico	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolênico
44	15,61 B	2,59 A	0,14 A	20,91 D	59,14 A	0,89 A
54	16,33 A	1,60 C	0,25 A	32,95 A	46,50 D	1,07 A
57	10,41 E	1,73 C	0,17 A	24,20 C	61,19 A	1,44 A
63	12,17 C	1,68 C	0,20 A	33,78 A	50,51 C	0,74 A
64	10,94 D	1,43 C	0,16 A	25,20 C	60,59 A	1,04 A
91	11,94 C	2,15 B	0,19 A	27,00 B	56,53 B	1,20 A
CV(%)	1,35	5,58	11,05	2,99	1,24	11,28

Resultados seguidos pela mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

A capacidade das plantas em suportar o estresse causado por baixas temperaturas não é constante, mas aumenta consideravelmente após a exposição progressiva a baixas temperaturas.

Trabalhando com tolerância ao frio em plantas de grão de bico, Shahandashti et al. (2013), verificaram que durante a aclimatação ao frio, a taxa de ácidos graxos insaturados aumenta em relação a taxa de ácidos graxos saturados. Esse aumento do teor de ácidos graxos insaturados se deve a atividade das dessaturases. Esses autores verificaram que quando as plantas foram submetidas a baixas temperaturas o teor do ácido linolênico aumentou consideravelmente.

Quando as sementes foram embebidas a 25 °C por 24 horas (Tabela 15) e por 48 horas (Tabela 16), não houve diferença estatística entre as linhagens para a porcentagem do ácido linolênico. Para a linhagem 54, foi observada a maior porcentagem de ácido palmítico, seguida da linhagem 44 e para esta mesma linhagem, a maior porcentagem de ácido esteárico. Com relação ao ácido oleico, para as linhagens 54 e 63 foram observados os maiores valores. Já para a linhagem 57 observou-se os maiores valores de ácido linoleico e para as sementes das linhagens 54 e 63, os maiores valores de ácido ecosenoico.

Tabela 15 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 24 horas a 25 °C

Linhagens	Sementes embebidas por 24h a 25 °C					
	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Ecosenoico	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolênico
44	14,94 B	2,51 A	0,20 B	20,94 D	59,74 B	1,01 A
54	15,98 A	1,66 C	0,26 A	32,43 A	47,29 E	1,17 A
57	10,42 E	1,73 C	0,15 B	21,32 D	63,99 A	1,63 A
63	12,17 C	1,76 C	0,25 A	34,16 A	49,42 D	0,90 A
64	11,16 D	1,56 C	0,17 B	24,59 C	60,30 B	1,20 A
91	12,03 C	2,11 B	0,22 A	26,83 B	56,47 C	1,35 A
CV(%)	1,29	4,83	7,53	3,19	1,25	6,15

Resultados seguidos pela mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott

Tabela 16 Perfil de seis ácidos graxos em sementes de seis linhagens de milho, embebidas por 48 horas a 25 °C

Linhagens	Sementes embebidas por 48h a 25 °C					
	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Ecosenoico	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolênico
44	14,86 B	2,62 A	0,16 B	20,92 E	59,69 B	0,98 A
54	15,70 A	1,67 C	0,28 A	32,65 A	47,28 E	1,16 A
57	10,28 F	1,77 C	0,19 B	22,28 D	63,75 A	0,80 A
63	12,17 C	1,71 C	0,27 A	32,95 A	50,62 D	0,95 A
64	11,12 E	1,57 D	0,22 B	24,65 C	60,13 B	1,22 A
91	11,65 D	2,15 B	0,20 B	26,32 B	57,35 C	1,33 A
CV(%)	1,47	1,57	8,17	0,73	1,11	43,17

Resultados seguidos pela mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott

A biossíntese de óleos nas sementes, em parte, é resultado do genótipo (LI et al., 2013). No entanto, sofre grandes influências ambientais. Isso pode ser observado pela composição de ácidos graxos, que mesmo depois da maturação das sementes, sofre alterações dependendo da temperatura em que essas são expostas.

Segundo Hughes e Dunn (1996), as mudanças que ocorrem nas membranas, quando essas são expostas a baixas temperaturas, se devem a uma redistribuição dos ácidos graxos saturados e insaturados. De acordo com Funnekotter et al. (2013), o efeito da instauração de ácidos graxos é substancialmente maior do que o efeito do comprimento das cadeias desses ácidos graxos, quando se refere à transição na temperatura.

Membrana celular com altos teores de ácidos graxos saturados tende a congelar em temperaturas bem superiores a 0 °C. Sendo então necessário que genótipos tolerantes a baixas temperaturas quando submetidos ao frio apresentem uma maior porcentagem de ácidos graxos insaturados.

A tolerância das plantas ao estresse causado por baixas temperaturas depende principalmente da capacidade de suas membranas em prevenir as injúrias e manter sua integridade (ZHANG et al., 2013). A instabilidade da membrana lipídica está diretamente relacionada à composição lipídica. O aumento na proporção de ácidos graxos insaturados confere a manutenção da fluidez da membrana, o que ajuda na manutenção de suas funções durante a exposição a baixas temperaturas (UPCHURCH, 2008).

O estudo do perfil dos ácidos graxos em diferentes tempos de embebição e temperatura auxilia na compreensão das alterações que ocorrem quando as sementes são submetidas a uma condição de estresse durante a germinação. Pode-se verificar por esses resultados que o perfil de ácidos graxos quando as sementes são embebidas a 10 °C é diferente daquelas embebidas a 25 °C, o que reflete a importância de se conhecer essas alterações para exploração nos programas de melhoramento.

A tolerância ao frio é uma característica complexa que está associada a vários fatores como a qualidade fisiológica, características bioquímicas e expressão de enzimas antioxidantes. Essas enzimas são importantes para a remoção de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Em plantas superiores, as espécies reativas de oxigênio, são geradas durante o metabolismo aeróbico normal, como a fotossíntese e respiração. No entanto, em condições de estresse, como baixas temperaturas, as EROS são produzidas em níveis elevados, podendo resultar em danos ao DNA, proteínas e lipídios. Sob condições de estresses bióticos e abióticos, as enzimas antioxidantes desempenham um importante papel na remoção de EROS.

Pela expressão das enzimas catalase (Figuras 1 e 2), peroxidase (Figuras 3 e 4), esterase (Figuras 5 e 6) e superóxido dismutase (Figuras 7 e 8), pode-se observar aumento da expressão dessas enzimas quando aumentou-se o período de embebição de 24h para 48h na temperatura de 25 °C. O mesmo não foi observado em sementes embebidas a 10 °C, o que pode ser explicado pela influencia de baixas temperaturas na redução do metabolismo germinativo, o que implica em menor atividade respiratória e consequentemente menor produção de EROS.

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. Com relação à expressão dessa enzima nas linhagens de milho estudadas verifica-se independentemente do tempo de embebição e da temperatura que maior expressão da enzima catalase foi observada na linhagem 63 (Figuras 1 e 2).

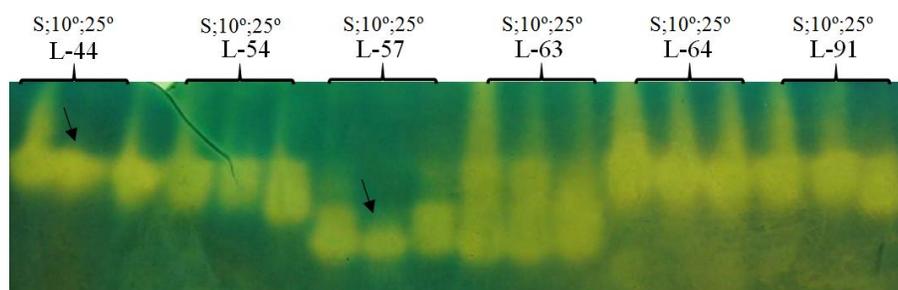


Figura 1 Atividade da enzima catalase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h

A embebição das sementes por 24 h a 10 °C (Figura 1), não foi eficiente para aumentar o nível de expressão da catalase, com relação ao observado em sementes secas. Nas linhagens 44 e 57, observa-se uma redução da expressão da catalase, quando embebidas por 24h por 10 °C em relação às sementes secas. Já quando as sementes foram embebidas por 48h, observou-se maior atividade da enzima catalase a 25 °C para todas as linhagens, enquanto que a 10 °C a expressão foi menor. (Figura 2). Redução no processo respiratório pode ser uma das causas para baixa expressão dessa enzima a baixas temperaturas, quando comparadas com sementes secas e embebidas a 25 °C. O período de 24h e 48h de embebição pode ter sido insuficiente para aumentar a produção de radicais livres decorrentes do estresse causado por baixa temperatura.

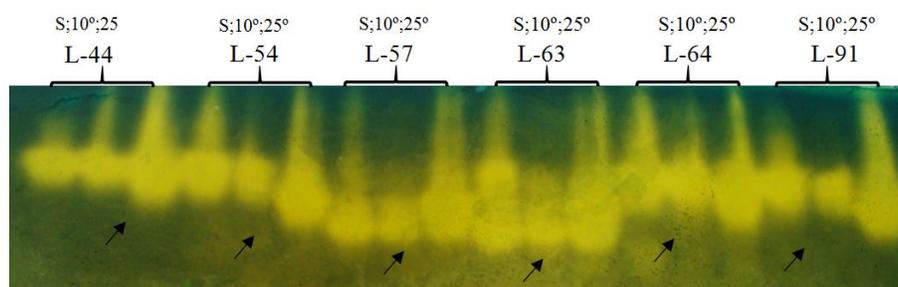


Figura 2 Atividade da enzima catalase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h

Li et al. (2013), avaliaram a expressão de enzimas antioxidantes e o teor de EROS em sementes de trigo, três dias após a semeadura em condições de baixas temperaturas. Verificaram aumento progressivo no teor de EROS e consequentemente aumento na expressão das enzimas antioxidantes, sob condições de baixas temperaturas. A expressão foi avaliada até o sétimo dia após a semeadura.

A expressão da enzima peroxidase foi observada em sementes secas das linhagens 44 e 63, e quando as sementes foram embebidas por 10 °C e 25 °C por 24 horas o padrão de expressão permaneceu praticamente igual ao observado em

sementes secas nessas linhagens. Para as demais linhagens não houve expressão da peroxidase em sementes secas e embebidas a 10 °C e 25 °C por 24 horas (Figura 3).

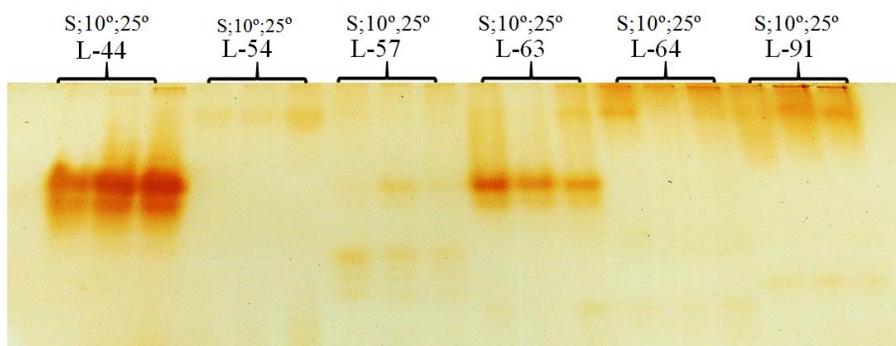


Figura 3 Atividade da enzima peroxidase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h

Quando as sementes foram embebidas por período de 48 horas, na temperatura de 25 °C foi observado em todas as linhagens novas isoformas da peroxidase, com o aumento da expressão em relação à observada em sementes secas e embebidas a 10 °C. Nas sementes embebidas por 48h a 10°C, o padrão de expressão da peroxidase foi semelhante ao observado nas sementes secas (Figura 4). Ressalta-se ainda que das linhagens avaliadas maior expressão da enzima peroxidase foi observada em sementes das linhagens 44 e 63 independentemente do período e da temperatura de embebição. O aumento da atividade da peroxidase em sementes embebidas por 48h a 25 °C pode ser explicado pela alta atividade metabólica no início do processo germinativo, pois aumenta-se o processo respiratório para que mais reservas sejam liberadas para o desenvolvimento do embrião. No entanto, maior respiração implica em maior produção de radicais livres e conseqüentemente maior ativação dos sistemas antioxidantes, como as enzimas peroxidases.

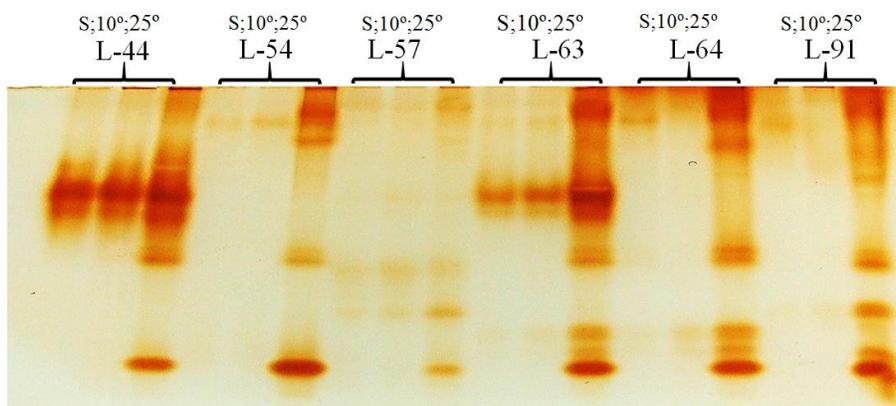


Figura 4 Atividade da enzima peroxidase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h

Kim et al. (2013), isolaram genes relacionados às enzimas antioxidantes intracelular e extracelular em raízes de batata doce e verificaram maior expressão quando essas raízes eram submetidas ao frio, desidratação, salinidade e tratamento com ABA. Eles verificaram que os antioxidantes intracelulares foram mais responsivos a esses estresses abióticos. Quando as raízes foram submetidas à temperatura de 4 °C por 6 horas, observou-se a indução dos genes CuZnSOD (superóxido dismutase), swAPX1 (ascorbato peroxidase), GPX (glutamato peroxidase) e GST (glutamato sintetase), quando comparados ao controle. Já para a CAT (catalase) houve pequena redução na expressão quando as raízes foram submetidas a 4 °C.

A esterase é uma enzima degradativa, que está envolvida em reações de hidrólise de estéres, a qual está diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios de membrana. Nas linhagens estudadas verificou-se atividade dessa enzima em sementes secas (Figura 5). Quando as sementes foram embebidas por 24 h a 10 °C e 25 °C não houve diferença acentuada no padrão de expressão dessa enzima, quando comparado com as sementes secas, com exceção da linhagem 44, com redução da expressão quando as sementes foram embebidas por 24 horas a 10 °C e 25 °C (Figura 5). Quando as sementes

foram embebidas por 48h a 25 °C observou-se novas isoformas, o que evidencia aumento da atividade enzimática. Para as sementes embebidas a 10 °C por 48h, o padrão de expressão da esterase foi semelhante ao das sementes secas (Figura 6).

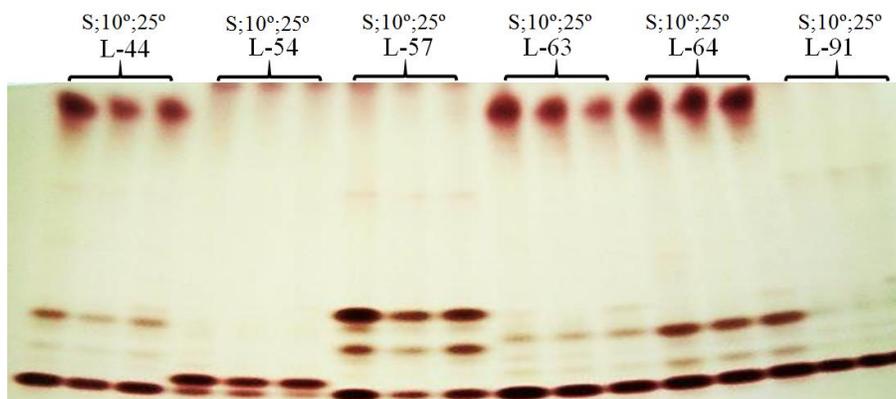


Figura 5 Atividade da enzima esterase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h

Independentemente do período de embebição e da temperatura, maior expressão da enzima esterase foi observada em sementes das linhagens 57 e 64 e menor expressão em sementes da linhagem 91. Ressalta-se que sementes da linhagem 91 foram classificadas como de alta tolerância às baixas temperaturas de germinação.

A esterase atua em ésteres de membrana, e a menor expressão dessa enzima em sementes secas da linhagem 91 pode ser um dos fatores responsáveis pela alta qualidade das sementes dessa linhagem. Quando as sementes foram embebidas a 10 °C, a atividade da esterase permaneceu semelhante à atividade nas sementes secas, retratando uma menor degradação de reservas.

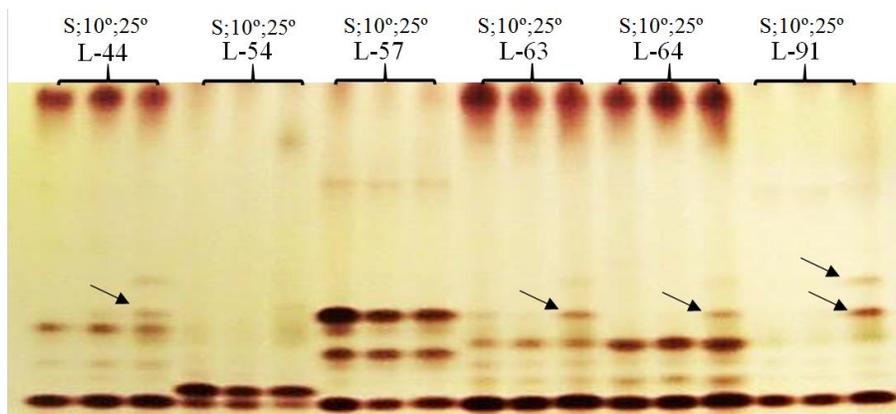


Figura 6 Atividade da enzima esterase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h

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. Para a linhagem 63 houve mudança na expressão da SOD em sementes embebidas por 24h a 25 °C (Figura 7). Para a maioria das linhagens a expressão da SOD foi maior em sementes embebidas por 48h a 25 °C.

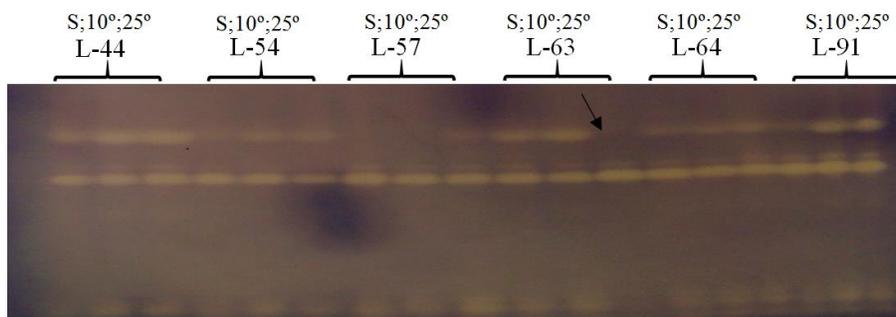


Figura 7 Atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 24h

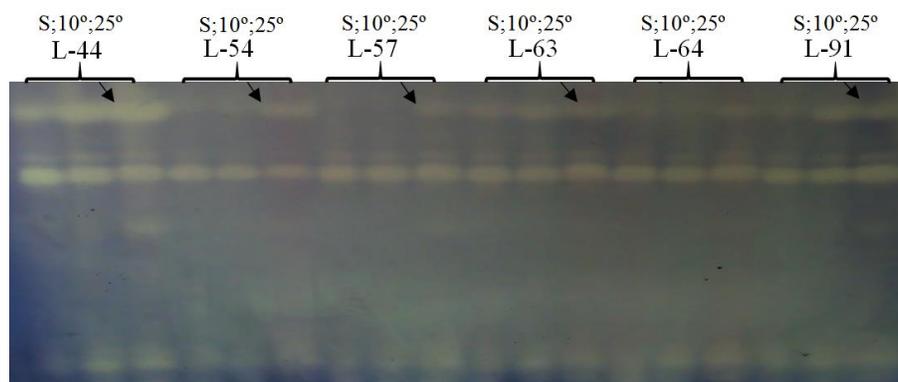


Figura 8 Atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de milho secas (S) e submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 48h

Sabe-se que os danos causados pelas EROS em plantas são muitas vezes neutralizados pela atividade das enzimas antioxidantes incluindo SOD, POD, CAT, e outras (GILL; TUTEJA, 2010). Segundo Guo et al. (2006), após 3 dias de exposição a temperaturas de refrigeração, genótipos de arroz tolerantes a injúria causada por baixas temperaturas apresentaram elevada atividade de SOD, CAT e ascorbato peroxidase (APX).

Quando se compara o nível de expressão da α -amilase em sementes de milho embebidas a 10 °C e a 25 °C por 72 horas pode-se perceber que a baixa temperatura inibe a atividade dessa enzima (Figura 9). Observou-se que quando as sementes de milho foram embebidas por 72h a 25 °C houve expressão dessa enzima em sementes de todas as linhagens, sendo que menor expressão foi observada em sementes da linhagem 91.

Para as sementes embebidas a 10 °C por 72h, a expressão da α -amilase foi menor. Assim, infere-se que baixas temperaturas de embebição podem estar relacionadas à menor síntese das enzimas necessárias à degradação do amido para o crescimento do embrião, o que justifica o retardo no processo germinativo.

Em milho, a enzima alfa 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 (2013) ressalta 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.

Pelo perfil de expressão da enzima α -amilase, de uma maneira geral não houve expressão diferencial das linhagens dentro da mesma temperatura.

A enzima α -amilase tem sua maior atividade após a protrusão radicular, pois é necessária a disponibilização de uma maior quantidade de reservas para promover o crescimento das plântulas, por esse motivo que a expressão dessa enzima em sementes embebidas a 10 °C foi quase inexistente, pois a baixa temperatura atrasa o período de protrusão.

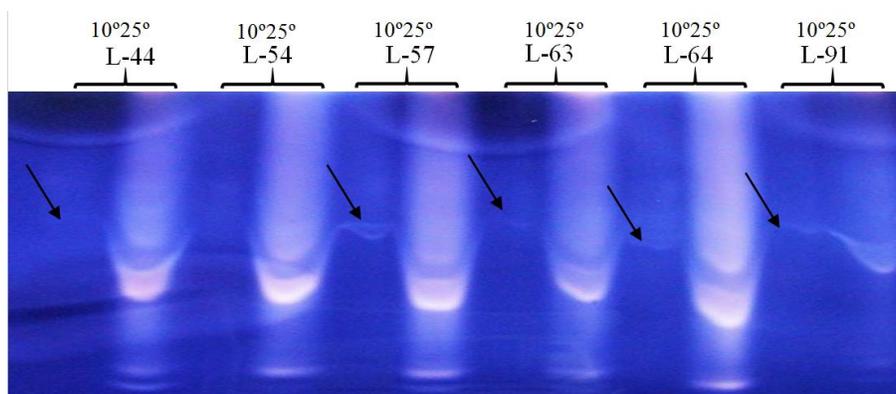


Figura 9 Atividade da enzima α -amilase em sementes de milho submetidas à embebição a 10 °C e 25 °C por 72h

Na Figura 10, está representado o zimograma da expressão de proteínas resistentes ao calor. Padrões similares foram observados em sementes das linhagens 63 e 91. Em sementes da linhagem 44 foi observada menor expressão

de proteínas resistentes ao calor, a qual foi classificada como de baixa tolerância à baixa temperatura de germinação.

Com esse resultado pode-se perceber que muitos genes estão envolvidos na característica de tolerância a baixas temperaturas de germinação.

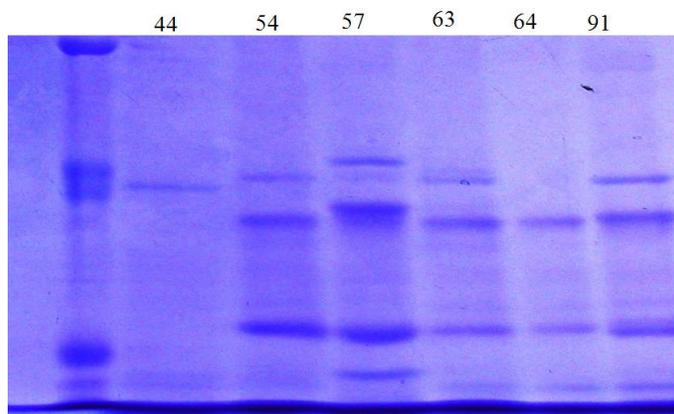


Figura 10 Atividade de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho de seis linhagens

Essa classe de proteínas é responsável pela proteção e estabilização da membrana celular. De acordo com Menezes et al. (2008), padrões de proteínas resistentes ao calor apresentam-se polimórficos e estáveis em sementes de milho com diferentes níveis de qualidade, o que faz dessa classe de proteínas um excelente marcador na identificação de cultivares.

Os mecanismos envolvidos na tolerância ao frio têm sido estudados também por meio da expressão de transcritos em uma gama de espécies, incluindo *Arabidopsis thaliana* (CHEN et al., 2002), trigo (WINFIELD et al., 2010), cevada (GREENUP et al., 2011). A técnica de PCR em tempo real permite resultados mais conclusivos, pois nos permite conhecer a expressão relativa do gene alvo, ou seja, permite quantificar a expressão e assim fazer uma análise mais aprofundada da influência do gene na característica de interesse.

A confiabilidade dos resultados do RT-qPCR se deve a utilização de um gene referência, ou 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.

Pelos resultados da análise da expressão gênica, de uma maneira geral, observa-se, grande variação da expressão dos genes analisados nas sementes secas e embebidas a 10 °C e a 25 °C por 48h, das diferentes linhagens.

No gráfico 1, está representada a expressão relativa do gene oxidase alternativa 1 (AOX1) em relação às sementes da linhagem 63 embebidas a 10 °C. Pode-se observar que esse gene só se expressou nas sementes secas das linhagens 63, 64 e 91, com maior expressão em sementes da linhagem 64. Quando as sementes foram embebidas a 25 °C, só houve expressão desse gene para linhagem 64. Quando a embebição ocorreu a 10 °C, que é a condição de estresse, houve expressão novamente nas sementes das linhagens 63, 64 e 91, sendo maior na linhagem 64, seguida pela linhagem 91 e 63. Esse resultado é muito promissor, pois só houve expressão do gene AOX1 nos materiais tolerantes a baixas temperaturas, o que pode tornar esse gene um importante marcador para identificação de materiais tolerantes a baixas temperaturas de germinação.

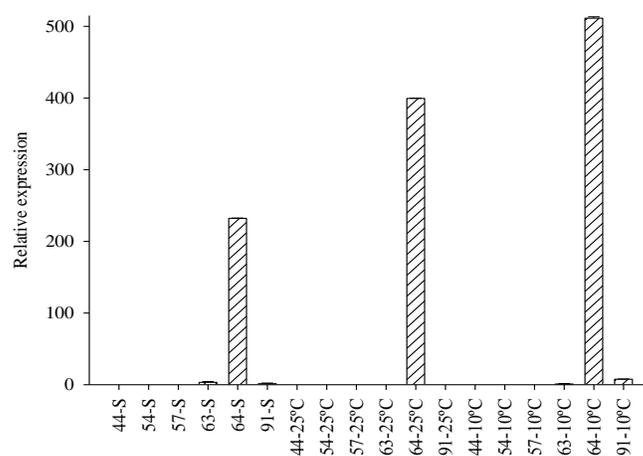


Gráfico 1 Expressão do gene AOX em relação ao tratamento 63-10 °C

O fato desse gene ter sido expresso nas sementes secas das linhagens tolerantes ao frio, faz com que ele tenha um potencial ainda maior para ser um bom marcador na seleção de genótipos tolerantes a baixas temperaturas de germinação, pelo fato de permitir uma aceleração das análises, pois não é preciso embeber as sementes.

A AOX tem sido sugerida como importante marcador funcional para a seleção de plantas resistentes a 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, enquanto que, a codificação dos mais de 60 genes que se expressam na cadeia fosforilativa e no ciclo do ácido tricarboxílico clássico, permanece praticamente inalterada.

Karpova et al. (2002), analisaram a expressão de três genes da oxidase alternativa (AOX) em dois tipos de milho com mutação mitocondrial e verificaram que em mutantes a respiração é afetada e ocorre alterações no crescimento. A partir da análise dos mutantes, esses autores sugerem que danos em mitocôndrias do milho não apenas sinalizam ao núcleo que a função mitocondrial está comprometida, mas também confere informação sobre a localização da lesão, resultando em uma indução diferencial de genes AOX, concluindo assim, que o padrão de indução desses genes em milho pode servir como um marcador seletivo para diversos defeitos mitocondriais.

Mhadhbi et al. (2013), analisaram os níveis de expressão gênica da AOX1 em genótipos de *Medicago truncatula* com diferentes níveis de tolerância ao estresse salino. Os resultados desse trabalho demonstraram uma indução específica da expressão gênica da AOX1 em raízes dos genótipos tolerantes, os genótipos que apresentaram maior expressão da AOX1 tiveram menores alterações bioquímicas, tais como, peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio.

Cardoso, Campos e Arnholdt-Schmitt (2013), sugeriram que a alta diversidade genética de AOX2b em *D. carota* pode ser uma fonte de marcadores funcionais para características agronômicas relacionadas a respostas a estresses ambientais.

No gráfico 2, está representada a expressão relativa do gene ZmMPK-17 em relação às sementes da linhagem 64-S. Quando as sementes foram embebidas a 25 °C, a maior expressão foi verificada na linhagem 64, seguida da 63, 54, 91, 44 e 57. A 10 °C a expressão do gene em todas as linhagens foram semelhantes. Ao contrário do gene AOX1, a expressão do gene ZmMPK-17 não se relacionou com os resultados obtidos pelos testes fisiológicos, que classificaram as linhagens 44, 54 e 57 como menos tolerantes à baixa temperatura de germinação e as linhagens 63, 64 e 91 como tolerantes.

O gene ZmMPK-17 codifica para um tipo de proteína quinase ativada por mitógenos. Essas proteínas convertem estímulos extracelulares em respostas intracelulares e, ao mesmo tempo amplificam o sinal de transmissão. Ao fazer isso, garantem um desempenho adequado e, eventualmente, de sobrevivência, de um determinado organismo, por exemplo, em momentos de estresse. Essas proteínas atuam na sinalização de defesa, garantindo a sobrevivência das espécies.

Talvez nesse trabalho, o tempo de exposição das sementes à baixa temperatura, tenha sido insuficiente para ativar esse mecanismo.

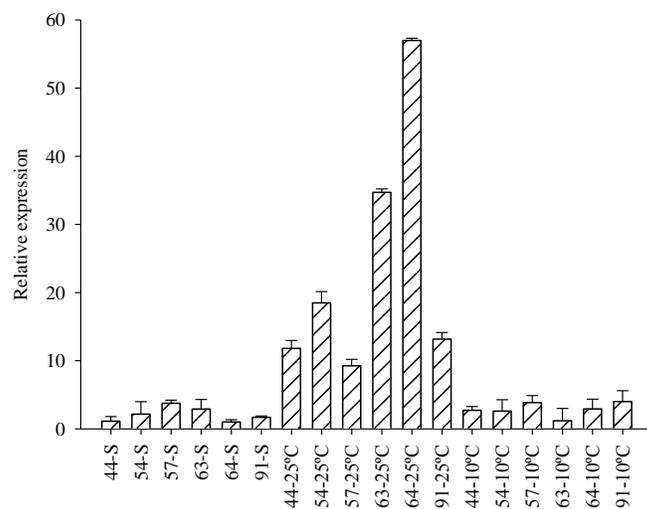


Gráfico 2 Expressão do gene ZmMPK-17 em relação ao tratamento 64-S

No gráfico 3, está representada a expressão relativa do gene ZmAN-13 em relação à amostra 64-25 °C. Em sementes secas observou-se uma maior expressão desse gene em sementes da linhagem 91, seguido da linhagem 57 e 44. Quando as sementes foram embebidas a 25 °C, a expressão de ZmAN-13 foi baixa em todas as linhagens, mas quando as sementes foram embebidas a 10 °C, foi possível separar os materiais tolerantes dos suscetíveis. Pois a expressão do gene foi bem maior nos materiais tolerantes.

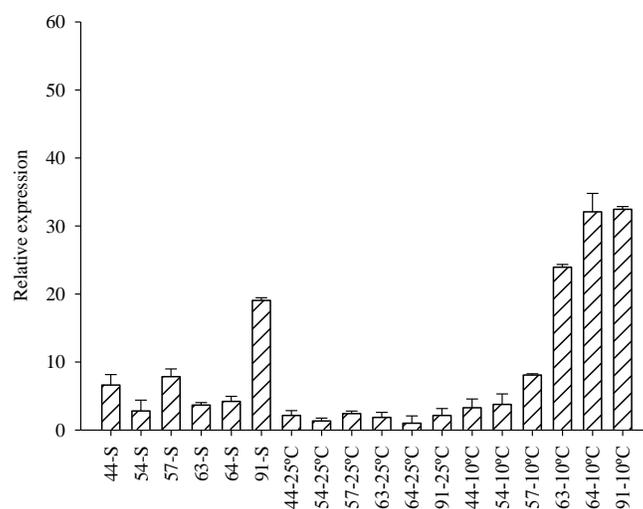


Gráfico 3 Expressão do gene ZmAN-13 em relação ao tratamento 64-25 °C

Assim, o gene ZmAN-13 também pode ser um potencial marcador para seleção de materiais tolerantes ao frio durante a germinação. No entanto, nesse caso, para utilização desse marcador, é necessário que as sementes sejam embebidas a 10 °C, pois baixas temperaturas reduzem a cinética e a termodinâmica das reações metabólicas nos tecidos das plantas (RUELLAND et al., 2009), afetando diretamente a estabilidade de muitas proteínas e regula também a formação de estruturas secundárias de RNA, afetando assim a expressão gênica (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007).

Por isso muitas vezes, é necessário que o tecido seja submetido ao estresse, para que se verifique a expressão do gene-alvo. No caso deste trabalho as sementes foram embebidas por 48 horas a 10° C.

O gene Zm-AN13 pertence à família ZnF-AN1. De acordo com Jin et al. (2007), os genes dessa família presentes no genoma do milho mostraram expressão para um ou múltiplos estresses abióticos e todos são proteínas que contém o domínio ZnF-ANq.

O gene OsSAP1 em arroz, foi o primeiro gene de AN1 descrito em plantas e a sua superexpressão foi relacionada a alta tolerância ao frio, seca e estresse salino em plantas transgênicas (MUKHOPADHYAY; VIJ; TYAGI, 2004). A superexpressão de OsSAP8 em arroz e em tabaco conferiu tolerância aos estresses causados por sal, seca e frio (KANNEGANTI; GUPTA 2008).

Xuan et al. (2011), estudando a expressão do gene Zm-AN13 em plântulas de milho, verificaram que a expressão desse gene aumentou a medida em que se prolongou o tempo de exposição das plântulas à baixa temperatura. Esses mesmos autores estudaram a expressão desse gene em folhas, raiz, caule, pistilo, estame, estilo, bráctea e coleótilo, e verificaram que a expressão foi maior nas folhas. Neste trabalho foi observado que o gene Zm-AN13 pode ser utilizado para estudar as respostas das sementes à exposição a baixas temperaturas de germinação.

No gráfico 4, encontra-se a expressão relativa do gene AOX-2 em relação a amostra 54-10 °C. Pode-se observar que a 10 °C, que a menor expressão desse gene foi em sementes da linhagem 54, que foi a linhagem que apresentou a menor porcentagem de germinação em condições de frio e a maior expressão desse gene foi observada na linhagem 63, seguidas da 44 e 91. Sementes da linhagem 44 apresentam rápida protrusão radicular que pode estar relacionada à expressão desse gene, pois o mesmo atenua a produção de EROS, reduzindo os danos decorrentes da baixa temperatura.

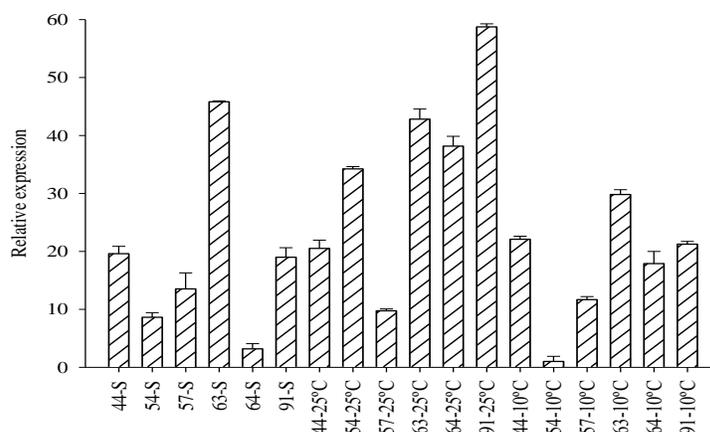


Gráfico 4 Expressão do gene AOX-2 em relação ao tratamento 54-10 °C

As alterações observadas nas análises fisiológicas, de transcriptômica, proteômica e de teor de ácidos graxos quando as sementes das seis linhagens de milho foram submetidas à baixa temperatura de germinação, reforça a complexidade da característica de tolerância ao frio. 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 a baixas temperaturas durante a germinação de sementes e emergência de plântulas, como o estudo do controle genético desses genes neste trabalho.

A expressão de genes que torna possível a separação de linhagens com alta e baixa tolerância a baixas temperaturas de germinação, como os genes AOX-1 e Zm-AN13 estudados neste trabalho, pode auxiliar na obtenção de linhagens de milho tolerantes ao frio. Além disso, as alterações nos teores de ácidos graxos, também podem contribuir para que isso aconteça.

Por essas considerações pode-se sugerir que pesquisas na área de sementes focadas em análises bioquímicas e moleculares, podem trazer grandes benefícios à compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância a estresses abióticos e contribuir para seleção ou desenvolvimento de materiais tolerantes a esses estresses.

5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir com a realização deste trabalho que as linhagens 44, 54 e 57 são mais suscetíveis a baixas temperaturas de germinação, enquanto que as linhagens 63, 64 e 91 são mais tolerantes a essa condição de estresse.

Há alterações no perfil de ácidos graxos nas linhagens à medida que se altera a temperatura e o período de embebição. Sementes das linhagens mais suscetíveis a baixas temperaturas de germinação apresentaram maiores teores de ácidos graxos saturados.

A expressão da enzima alfa amilase em sementes embebidas por 72 horas na temperatura de 10 °C é inferior a expressão quando as sementes são embebidas pelo mesmo período, mas em temperatura de 25 °C.

Não houve expressão diferencial da enzima alfa amilase nas linhagens dentro das mesmas temperaturas de embebição.

Há variação da expressão das proteínas resistentes ao calor em sementes das linhagens avaliadas.

Os genes AOX-1 e ZmAN-13 são potenciais marcadores moleculares para seleção de linhagens de milho, resistentes a baixas temperaturas de germinação.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 2006a. 574 p.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006b. 627 p.

ALLAGULOVA, C. R. et al. The plant dehydrins: structure and putative functions. **Biochemistry**, New York, v. 68, p. 945–951, 2003.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/category/estatisticas/#>>. Acesso em: 14 maio 2013.

BATTAGLIA, M. et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 148, p. 6–24, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Meteorologia. **Normais climatológicas**: 1961-1990. Brasília, 1992. 84 p.

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

CARDOSO, H. G.; CAMPOS, M. D.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. **Intronic polymorphisms in *Daucus carota* AOX2b generate putative genotype specific miRNA**. 2013. Disponível em: <<http://www.eposters.net/pdfs/intronic-polymorphisms-in-daucus-carota-aox2b-generate-putative-genotype-specific-mirna.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2013.

CHEN, W. et al. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 559–574, 2002.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, p. 444–451, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, 2012/2013: oitavo levantamento. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_12_16_15_32_boletim_portugues_maior_2013.pdf>. Acesso em: 14 maio 2013.

CRUZ, J. C.; QUEIROZ, L. R.; PEREIRA FILHO I. A. **Milho**: cultivares para 2012/2013. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>>. Acesso em: 14 maio 2013.

DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007.

DE SANTIS, A. et al. The Activity of the Plant Mitochondrial Inner Membrane Anion Channel (PIMAC) of maize populations divergently selected for cold tolerance level is differentially dependent on the growth temperature of seedlings. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 52, n. 1, p. 193-204, Jan. 2011.

FAROOQ, M. et al. Activation of Antioxidant System by KCl Improves the Chilling Tolerance in Hybrid Maize. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 194, n. 6, p. 438-448, Dec. 2008.

FORSTHOFER, E. L. et al. Desempenho agronômico e econômico do milho em diferentes níveis de manejo e épocas de semeadura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 399-407, 2006.

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

FRASCAROLI, E.; CASARINI, E.; CONTI, S. Response of maize inbred lines to a defoliation treatment inducing tolerance to cold at germination. **Euphytica**, Wageningen, v. 145, n. 3, p. 295-303, Oct. 2005.

FRASCAROLI, E.; LANDI, P. Divergent selection in a maize population for germination at low temperature in controlled environment: study of the direct response, of the trait inheritance and of correlated responses in the field. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 3, p. 733-746, 2013.

FU, J. et al. Isolation and characterization of maize PMP3 genes involved in salt stress tolerance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, Feb. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031101>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

FUNNEKOTTER, B. et al. Acclimation-induced changes in cell membrane composition and influence on cryotolerance of in vitro shoots of native plant species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 114, p. 83-96, 2013.

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.

GIBSON, S. et al. Cloning of a temperature-regulated gene encoding A Chloroplast Omega-3 Desaturase From *Arabidopsis-Thaliana*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 106, n. 4, p. 1615-1621, Dec. 1994.

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

GOMES, M. S. et al. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.

GRAHAM D.; PATTERSON B. D. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 347-372, 1982.

GUO, Z. et al. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 44, p. 828-836, 2006.

HASLEKÁS, C. et al. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, *AtPer1*, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 36, p. 833-845, 1998.

HODGES, D. M. et al. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p. 857-863, May/June 1997.

HOWARTH, C. J.; OUGHAM, H. J. Gene-Expression under temperature stress. **New Phytologist**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 1-26, Sept. 1993.

HUGHES, M. A.; DUNN, M. A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 296, p. 291-305, Mar. 1996

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

KANNEGANTI, V.; GUPTA, A. K. Overexpression of OsiSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 66, p. 445-462, 2008.

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.

KIM, Y. H. et al. Comparative characterization of sweetpotato antioxidant genes from expressed sequence tags of dehydration-treated fibrous roots under different abiotic stress conditions. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, p. 2887–2896, 2013.

KIM, S. Y. et al. The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions. **Plant Science**, Limerick, v. 181, p. 119–124, 2011.

KODAMA, H. et al. Fatty-Acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 107, n. 4, p. 1177-1185, Apr. 1995.

KOLLIPARA, K. P. et al. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 129, n. 3, p. 974-992, July 2002.

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

LI, X. et al. Induction of chilling tolerance in wheat during germination by pre-soaking seed with nitric oxide and gibberellin. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 71, p. 31–40, 2013.

LIU, X. Y. et al. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase enhances thermal tolerance. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 48, n. 9, p. 1096-1107, Sept. 2006.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Sistema de produção: ecofisiologia. In: MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. (Org.). **Cultivo do milho**. 7. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/ecofisiologia.htm>. Acesso em: maio 2012.

MAITI, R. K. Germination and seedling establishment. In: _____. **Sorghum science**. Lebanon: Science, 1996. p. 41–98.

MENEZES, M. et al. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 111-122, 2008.

MHADHBIA, H. et al. Alternative oxidase 1 (Aox1) gene expression in roots of *Medicago truncatula* is a genotype-specific component of salt stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 170, p. 111–114, 2013.

MIKAMI, K.; MURATA, N. Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 527-543, Nov. 2003.

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.

MUKHOPADHYAY, A.; VIJ, S.; TYAGI, A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, 2004.

OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n.1, p. 40-48, 2013.

PAN, J. et al. ZmMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses. **Planta**, Berlin, p. 235, p. 661–676, 2012.

PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F. J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 132–145, 2009.

RASMUSSEN, I. A. Barley seed vigour and mechanical weed control. **Weed Research**, Oxford, v. 40, p. 219-230, 2000.

RUELLAND, E. et al. Cold signalling and cold acclimation in plants. **Advances in Botanical Research**, London, v. 49, p. 35–150, 2009.

SHAHANDASHTI, S. S. K. et al. Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 893-903, Feb. 2013.

SHI, J. et al. A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 29, n. 3, p. 743-757, Mar. 2012.

SOUJEOLE, A. A.; MILLER, F. R. Cold tolerance of sorghum during early developmental stages. In: CONFERENCE ANNUAL CORN SORGHUM RESEARCH, 39., 1984, Chicago. **Proceedings...** Chicago: [s. n.], 1984. p. 18–32.

SPINDELBOCK, J. P. et al. Conditional cold avoidance drives between-population variation in germination behaviour in *Calluna vulgaris*. **Annals of Botany**, London, v. 112, p. 801–810, 2013.

STACY, R. A. P. et al. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, p. 1205–121, 1996.

STACY, R. A. P. et al. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 1–8, 1999.

SUGIE, A. et al. Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic *Arabidopsis*. **Genes and Genet Systems**, Kyoto, v. 81, p. 349-354, 2006.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 126, n. 1, p. 45-51, Jan. 2006.

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

TAKESAWA, T. et al. Over-expression of glutathione *S*-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 9, p. 93–101, 2002.

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.

UEMURA, M.; JOSEPH, R. A.; STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 109, n. 1, p. 15–30, 1995.

ULLMANNOVÁ, K.; STŘEDA, T.; CHLOUPEK, O. Use of barley seed vigour to discriminate drought and cold tolerance in crop years with high seed vigour and low trait variation. **Plant Breeding**, Westport, v. 132, p. 295–298, 2013.

UPCHURCH, R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, p. 967-977, 2008.

WAGNER, A. M.; MOORE, A. L. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defence mechanism. **Bioscience Reports**, Singapore, v. 17, p. 319-333, 1997.

WALLIS, J. G.; BROWSE, J. Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 254-278, May 2002.

WANG, L. et al. Coronatine enhances chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by improving the antioxidative defence system. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Malden, v. 195, p. 377-383, 2009.

WINFIELD, M. O. et al. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, p. 749-771, 2010.

WU, J. et al. Low-temperature damage and subsequent recovery of fab1 mutant Arabidopsis exposed to 28C. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 113, p. 347-356, 1997.

XIA, Z. et al. ZmRFP1, the putative ortholog of SDIR1, encodes a RING-H2 E3 ubiquitin ligase and responds to drought stress in an ABA-dependent manner in maize. **Gene**, Amsterdam, v. 495, p. 146-153, 2012.

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.

YANG, G. et al. Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 127-141, July 2011.

YU, J. et al. Analysis of cold tolerance in sorghum under controlled environment conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 85, p. 21–30, 2004.

YU, Y. et al. Genome-wide analysis and environmental response profiling of the FK506-binding protein gene family in maize (*Zea mays* L.). **Gene**, Amsterdam, v. 498, p. 212–222, 2012.

ZHANG, X. et al. Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase 45 functions in the responses to abscisic acid and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 67, p. 189-198, 2013.

ZHANG, J. et al. Arabidopsis fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 1, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0030355>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

ZHAO, T. 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.