



FRANCIELE CAIXETA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NAS
INTERAÇÕES ENTRE SEMENTES DE
MILHO E *Aspergillus flavus*, *Fusarium
verticillioides* e *Penicillium spp.***

**LAVRAS – MG
2012**

FRANCIELE CAIXETA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NAS INTERAÇÕES
ENTRE SEMENTES DE MILHO E *Aspergillus flavus*, *Fusarium
verticillioides* e *Penicillium spp.***

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

Orientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

**LAVRAS- MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Caixeta, Franciele.

Expressão diferencial de genes nas interações entre sementes de milho e *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* spp. / Franciele Caixeta. – Lavras : UFLA, 2012.

104 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. Biblioteca subtrativa supressiva. 2. Genes diferencialmente expressos. 3. *Zea mays*. 4. qRT-PCR. 5. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

FRANCIELE CAIXETA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NAS INTERAÇÕES
ENTRE SEMENTES DE MILHO E *Aspergillus flavus*, *Fusarium
verticillioides* e *Penicillium spp.***

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

APROVADA em 16 de agosto de 2012

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dr. Antonio Chalfun Júnior	UFLA
Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dra. Lilian Padilha	EMBRAPA

Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

**LAVRAS - MG
2012**

A Deus.

*Aos meus pais, José Balbino e Marta, que me proporcionaram esta
conquista.*

Aos meus irmãos Bruno e Diego, pelo companheirismo e pela cumplicidade.

*Ao vovô Antônio (in memoriam), à vovó Maria (in memoriam), ao vovô
Getúlio (in memoriam) e à vovó Leontina, meus maiores exemplos de vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde, oportunidade e força para perseverar diante de todos os obstáculos para chegar até aqui.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Ao Professor Dr. Renato Mendes Guimarães, pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança durante a realização do trabalho.

Aos demais professores e funcionários do Setor de Sementes, pela amizade, dedicação e por todas as sugestões preciosas durante a execução deste trabalho.

À secretária de Pós-graduação Marli, pela atenção e pela presteza a mim dispensada durante o curso de Doutorado.

Ao Professor Antonio Chalfun Júnior e aos amigos do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, em especial ao Rafael, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Denize, à Hebe e aos demais estagiários do Laboratório de Sementes, pela amizade, pelo compromisso, pela dedicação e pela fundamental ajuda na execução do trabalho.

Aos meus colegas de Pós-graduação e aos meus amigos do Laboratório de Sementes, pela união, pelos auxílios nas disciplinas e na condução do experimento, em especial, Aline Clemente e Ísis, pelo companheirismo em todas as horas.

À Aline Clemente e à Flávia, pela amizade e pela substancial ajuda na parte final do trabalho.

A minha família: aos meus pais, José Balbino e Marta, e aos meus irmãos Bruno e Diego, aos primos, às primas, aos tios e tias, pelo apoio, pelo incentivo, pela compreensão, pela dedicação e pelo carinho.

As minhas “irmãs lavrenses”: Néia, Déia, Aline, Marlúcia, Pauline e Amanda, pelo carinho incondicional, pelo convívio, pelo incentivo, pelo amor e pela amizade.

Aos meus amigos Bárbara, João Paulo e Vivi, pelo apoio, pelo incentivo, pelos conselhos e por me emprestarem suas famílias nos momentos de saudade.

Aos meus amigos do Rugby, por me ensinarem a força de uma equipe e pelos momentos de alegria.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

RESUMO GERAL

As sementes são importante meio para a sobrevivência e para a veiculação de patógenos, que produzem toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Dessa forma, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias de detecção rápidas e seguras de patógenos em sementes. O objetivo deste trabalho foi detectar genes diferencialmente expressos associados à presença de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* em lotes de sementes de milho, aplicando-se a metodologia de biblioteca subtrativa e análise de expressão por qRT-PCR. Utilizaram-se sementes de híbrido simples de milho, safra 2009/2010. Primeiramente, foi feito um estudo para se determinar o melhor tempo de inoculação dos fungos nas sementes. Para esse estudo, as colônias fúngicas foram isoladas de sementes de vários lotes de milho no teste de sanidade. Dessas colônias, foi obtido 1mL de suspensão de esporos que foi adicionada na placa com BDA+manitol no potencial hídrico -1 MPa. Após o crescimento das colônias, foram distribuídas sementes em camada única e levemente prensadas sob o meio, permanecendo no substrato por diferentes tempos de exposição (0, 24, 48, 72, 96 e 120h). As sementes foram retiradas do meio, secadas sobre papel de filtro e submetidas aos testes de germinação, 1ª contagem de germinação, teste de sanidade e teste de tetrazólio. Pelos resultados, pode-se concluir que a infecção é crescente e a qualidade fisiológica decrescente na faixa de 48 a 96h de inoculação das sementes com os fungos *A. flavus* e *F. verticillioides*. Para sementes inoculadas com *Penicillium spp.* a infecção é crescente à medida que se aumenta o tempo de inoculação, porém a qualidade fisiológica não é alterada pelo patógeno. Com esses resultados, para o segundo ensaio, as sementes foram então inoculadas por 48 e 96 horas e foram realizados os testes fisiológicos: germinação, 1ª contagem de germinação, sanidade, Tetrazólio e IVG. De acordo com os resultados obtidos nos testes fisiológicos selecionou os tratamentos: testemunha(T), 96 sem fungo (96), 96 com *F. verticillioides* (F), 96 com *Penicillium spp.* (P), 96 com *A. flavus* (A) para construção das bibliotecas subtrativas. Seis bibliotecas de cDNA foram construídas a partir dos mRNAs; Biblioteca 1- TF; Biblioteca 2- TP; Biblioteca 3- TA; Biblioteca 4- 96F; Biblioteca 5- 96P; Biblioteca 6- 96A. Os genes diferencialmente expressos encontrados em cada biblioteca foram clonados e sequenciados. As sequências foram analisadas em bancos de dados. Primers a partir desses genes encontrados foram sintetizados e fez-se a verificação, através de qRT-PCR. A maioria dos genes diferencialmente expressos encontrados relaciona-se a situações de estresse da semente como o gene Poliubiquitina, gene clone 3516, proteína SPATULA, o gene GPC, proteína hipotética, proteína hipotética do milho e o gene da catalase. Já os genes asparto aminotransferase, zinc finger, antranilato sintase, cisteína proteinase e SOD4, apesar de identificados como genes diferencialmente expressos pela biblioteca subtrativa não apresentaram diferença na expressão entre sementes de milho secas, embebidas e infectadas com os fungos *F.*

verticillioides, *A. flavus* e *Penicillium spp*, verificadas por qRT-PCR. A metodologia de biblioteca subtrativa supressiva é eficiente para detecção de genes diferencialmente expressos quando os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp*. estão presentes em sementes de milho. A técnica de qRT-PCR validou todas as bibliotecas construídas (TF, TP, TA, 96P e 96A), com exceção da biblioteca 96F.

Palavras chave: Biblioteca subtrativa supressiva. genes diferencialmente expressos. semente de milho.

ABSTRACT

The seeds are an important means for the survival and propagation of pathogens that produce toxins harmful to human and animal health. Thus, it becomes important to develop methodologies for rapid and reliable detection of pathogens in seeds. The aim of this study was to detect differentially expressed genes associated with the presence of *F. verticillioides*, *A. flavus* and *Penicillium spp.* Batch corn seed, applying the methodology of subtractive library and expression analysis by qRT-PCR. Used a simple hybrid seeds of maize, 2009/2010 harvest. First a study was done to determine the best time of inoculation of fungi on seeds. For this study the fungal colonies were isolated from seeds of various lots of corn sanity check. These colonies was obtained 1 mL spore suspension was added to the plate with PDA + mannitol in water potential -1 MPa. After growth the colonies were distributed in a single layer seeds and lightly pressed under the medium, remaining in the substrate for different exposure times (0, 24, 48, 72, 96 and 120h). The seeds were removed from the medium, dried on filter paper and subjected to germination, first count, sanity and tetrazolium test. From the results, it can be concluded that infection is increasing and decreasing vigor in the range of 48 to 96 hours of seed inoculation with the fungus *A. flavus* and *F. verticillioides*. To seed inoculated with *Penicillium spp.* infection is increasing as it increases the time of inoculation, but the physiological quality is not altered by the pathogen. With these results for the second test, the seeds were then inoculated for 48 and 96 hours and physiological tests were performed: germination, first count, sanity, and Tetrazolium IVG. According to the results obtained in physiological tests selected treatments: control (T), 96 without fungus (96), 96 with *F. verticillioides* (F), 96 with *Penicillium spp.* (P), 96 with *A. flavus* (A) for constructing the subtractive libraries. Six cDNA libraries were constructed from mRNAs; Library 1 - TF; Library 2 - TP; Library 3 - TA; Library 4 - 96F; Library 5 - 96P; Library 6 - 96A. Os differentially expressed genes were found in each library cloned and sequenced. The sequences were analyzed in databases. From these Primers were synthesized genes found and made to verification by qRT-PCR. The majority of differentially expressed genes found are related to stress as the seed polyubiquitin gene, gene clone 3516, SPATULA protein, the gene GPC, hypothetical protein, hypothetical protein from corn and catalase gene. Already asparto aminotransferase genes, zinc finger, anthranilate synthase, cysteine proteinase and SOD4, although identified as differentially expressed genes by subtractive library showed no difference in expression between dry corn seeds, imbibed and infected with the fungus *F. verticillioides*, *A. flavus* and *Penicillium spp.*, verified by qRT-PCR. The method of suppressive subtractive library is efficient for detecção of genes differentially expressed when the fungus *F. verticillioides*, *A. flavus* and *Penicillium spp.* are present in maize seeds. The technique of qRT-PCR validated all libraries built (TF, TP, TA, 96P and 96A), with the exception of the library 96F.

Keywords: Suppressive subtractive library. differentially expressed genes.
seed corn.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução geral e revisão de literatura	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Fungos associados a sementes de milho	17
2.2	Métodos de inoculação em sementes	19
2.3	Genes diferencialmente expressos	21
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 2: Inoculação de <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Penicillium spp.</i> em sementes de milho por restrição hídrica	31
1	INTRODUÇÃO	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Obtenção dos isolados	35
2.2	Inoculação das sementes	36
2.3	Avaliação da Qualidade	37
2.4	Delineamento experimental e análise estatística	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	CAPÍTULO 3: Expressão diferencial de genes nas interações entre sementes de milho e <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Penicillium spp.</i>	46
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Inoculação das sementes	51
2.2	Avaliação da Qualidade	52
2.3	Delineamento experimental e análise estatística	54
2.4	Obtenção das sequências diferencialmente expressas	54
2.4.1	Extração de RNA total	54
2.4.2	Purificação do mRNA	57
2.4.3	Hibridização subtrativa (SSH)	58
2.4.3.1	Síntese da primeira fita de cDNA	59
2.4.3.2	Síntese da segunda fita de cDNA	59
2.4.3.3	Digestão dos cDNAs com a enzima de restrição Rsa I	60
2.4.3.4	Ligação dos adaptadores ao cDNA	61
2.4.3.5	Primeira Reação de Hibridização	61
2.4.3.6	Segunda Reação de Hibridização	62
2.4.3.7	Primeira Amplificação	622

2.4.3.8	Segunda Amplificação	63
2.4.4	Clonagem das bibliotecas subtrativa.....	64
2.4.5	Transformação	65
2.4.6	Miniprep (QIAprep Spin Miniprep kit)	65
2.4.7	Sequenciamento	66
2.4.8	Análises das sequências de cDNA em bancos de dados	66
2.4.9	Análises da expressão dos fragmentos por qRT-PCR	67
2.4.9.1	Tratamento das amostra de RNA total com DNase.....	67
2.4.9.2	Síntese de cDNA	68
2.4.9.3	Ensaio de qRT-PCR.....	68
2.5	Análise dos dados	70
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1	Análises dos testes fisiológicos das sementes de milho.....	70
3.2	Bibliotecas subtrativas supressivas	73
3.3	Análises de qRT-PCR.....	86
4	CONCLUSÕES	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	REFERÊNCIAS.....	99

CAPÍTULO 1

Introdução geral e revisão de literatura

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), em razão de seu potencial produtivo, de sua composição química e de seu valor nutritivo, é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Por causa da sua multiplicidade de aplicações, tanto na alimentação humana quanto animal, tem relevante papel socioeconômico, além de ser matéria prima básica para diversificados complexos agroindustriais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

A qualidade sanitária e fisiológica das sementes de milho influencia a produtividade dessa cultura, em função do papel que elas desempenham tanto no estabelecimento da lavoura quanto na disseminação de doenças, interferindo, dessa forma, nos índices de produtividade.

A maioria das doenças que incide na cultura do milho tem seus agentes causais transmitidos pelas sementes sendo estas importantes e eficientes veículos de disseminação de patógenos. Alguns desses patógenos, sendo introduzidos no local, podem sobreviver no solo, aumentando o potencial de inóculo já existente, infectando as plântulas dos cultivos posteriores (PINTO, 1998).

Sementes de milho podem ser infectadas por fungos, durante o seu desenvolvimento, após a colheita, no armazenamento. Assim, as sementes são importantes meios para a sobrevivência e veiculação de patógenos, inclusive para fungos de armazenamento, responsáveis pela sua deterioração (LUCCA FILHO, 1984). Patógenos que, frequentemente, infectam as sementes de milho no armazenamento produzem toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Dessa forma, torna-se muito importante o desenvolvimento de metodologias rápidas e seguras de detecção desses patógenos nas sementes. Elas podem agilizar a tomada de decisões relativas à destinação e à distribuição geográfica dos lotes, bem como, o descarte ou o tratamento com agentes erradicantes e/ou protetores.

É nesse sentido que a informação básica relativa à expressão de genes específicos da interação semente/patógeno se vincula às ações de

defesa agropecuária. Elas propiciam o desenvolvimento de metodologias rápidas e seguras para identificação desses fungos em sementes de milho, por intermédio da marcação ou da identificação de proteínas específicas dessa interação.

A identificação de genes expressos especificamente, quando da infestação de sementes de milho por fungos de armazenamento, é de fundamental importância no entendimento dos mecanismos que governam essa infecção, para que sejam desenvolvidos métodos de detecção precoce da presença desses microrganismos em lotes de sementes. Os métodos de detecção seguros e rápidos são fundamentais para a tomada de decisão quanto à forma de armazenamento ou, em casos específicos, quanto ao descarte de lotes.

Com a construção da biblioteca subtrativa e, posteriormente, com o isolamento e a quantificação da expressão de genes durante a infestação, será possível identificar proteínas relacionadas ao processo, que podem ser utilizadas como marcadores da presença dos fungos, ou mesmo de um início do processo de deterioração. A partir daí, será possível desenvolver métodos rápidos e práticos de identificação de lotes com possível contaminação ou em estádios avançados de deterioração por meio de análises simples e robustas, por exemplo, como tiras imunocromatográficas, que podem ser utilizadas como ferramentas de apoio à fiscalização.

No presente trabalho, teve-se como objetivo, no primeiro ensaio, avaliar a técnica de restrição hídrica de infecção e o desempenho de sementes de milho submetidas a diferentes tempos de inoculação com *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* Já no segundo ensaio, o objetivo foi detectar genes diferencialmente expressos associados à presença de *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp.* em lotes de sementes de milho, aplicando-se a metodologia de biblioteca subtrativa e análise de expressão por qTR-PCR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos associados a sementes de milho

A preservação da qualidade das sementes durante o armazenamento é um dos principais fatores do processo de produção e de comercialização. Os esforços despendidos na fase de produção podem não ser efetivos se não houver a preservação da qualidade da semente, no mínimo, até a época da semeadura (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

A sanidade das sementes de milho é um dos principais fatores que condiciona o seu desempenho no campo, o estabelecimento de bons estandes e, conseqüentemente, boa produtividade. O armazenamento das sementes para fins agrícolas, geralmente, é utilizado para a manutenção de estoques no período da entressafra ou para a provisão de quantidades suficientes para atender à demanda de comercialização. Muitas vezes, é necessário o armazenamento por longos períodos, para garantir estoques em anos que sucedem frustrações de safras, quando as sementes produzidas estão aquém do padrão exigido, ou para a conservação de germoplasma (BERJAK, 1987; WETZEL, 1987). No entanto, as mesmas condições de armazenamento que permitem a manutenção da viabilidade das sementes, podem também favorecer a sobrevivência de muitos patógenos importantes para a cultura.

Entre os agentes patogênicos que podem associar-se às sementes, os fungos formam o maior grupo, seguido das bactérias e, em menor proporção, dos vírus e dos nematóides (MACHADO, 2000).

Os fungos são elementos microbianos encontrados em todos os ambientes. Existem milhares de espécies de fungos, e dentre eles, algumas espécies atacam ou apenas sobrevivem em produtos agrícolas. Os fungos *A.flavus*, *Penicillium spp.* e *F. verticillioide* considerando fungos de armazenamento, quando presentes em sementes causam maior deterioração e, conseqüentemente, perda da qualidade fisiológica. Quando esses fungos estão presentes em grãos, as micotoxinas produzidas por eles, causam efeitos tóxicos quando ingeridas por animais e humanos. Dessa maneira, a presença do fungo é importante nas sementes pelos danos econômicos que acarreta, e

também nos grãos pelo perigo do consumo de micotoxina (MACHADO, 1998).

A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento desses fungos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com umidade relativa de 90-100% para desenvolverem. (MILLER, 1995; SINHA; SINHA, 1991).

O fungo *F. verticillioides* é um dos principais patógenos associados a sementes de milho no Brasil, que além de predominar na fitopatologia do milho, causa podridão da base do colmo (PBC) e podridão-da-espiga (PINTO, 1998; WHITE, 1999). Em adição à redução do estande, *F. verticillioides* produz micotoxinas cancerígenas, com efeito comprovado, tanto para animais como para o homem (RHEEDER et al., 1992). Para seu controle, deve-se procurar eliminar ou reduzir o inóculo nas suas principais fontes, ou seja, em sementes e restos culturais.

F. verticillioides é relatado em todos os locais de cultivo do milho, principalmente nas regiões quentes e secas. Várias espécies cultivadas são hospedeiras deste fungo, como *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Oryza sativa* (arroz), *Hordeum vulgare* (cevada), *Triticum aestivum* (trigo), *Vigna unguiculata* (feijão-macassar), *Glycine max* (soja), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Gossypium hirsutum* (algodão) etc. (AGROFIT, 2011).

Os fungos de armazenamento *Aspergillus* e *Penicillium* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores e equipamentos. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e em grãos, causando danos no embrião, descoloração, alterações nutricionais, perda da

matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (MILLER, 1995; SINHA; SINHA, 1991).

A. flavus é um dos patógenos de sementes mais comum, que causa deterioração das sementes e quando presentes em grãos são perigosos devido à sua capacidade de produzir toxinas do tipo aflatoxina, causadoras de diversos sintomas em aves e mamíferos. Na realidade, *A. flavus* é um complexo de formas, subespécies e variedades, difíceis de serem identificadas (AGROFIT, 2011).

Penicillium spp. pode ser responsável por perda em produtos agrícolas. É um agente popularmente chamado de mofos e bolores que ocorrem em diferentes substratos (KIMATI et al., 1978). É um patógenos fraco que em certas ocasiões incide sobre órgãos de reserva, como sementes e frutos. Em ambos os casos, pode produzir micotoxinas nas sementes. *Penicillium spp.* é o agente causal dos bolores de coloração azul ou verde em frutos cítricos e podem causar podridões de frutos muito comuns nas condições de pós-colheita (KIMATI et al., 1978).

2.2 Métodos de inoculação em sementes

A disponibilidade de sementes infectadas é essencial para a condução de diversos estudos no âmbito da patologia de sementes como epidemiologia de doenças transmitidas por sementes, metodologia de detecção de patógenos, teste de eficiência de tratamento de sementes, entre outros (MACHADO, 1988).

Grande parte dos métodos utilizados para inocular fungos em sementes disponibiliza umidade suficiente para inicializar o processo de embebição e de germinação das sementes. Esse fenômeno normalmente promove modificações físicas e/ou fisiológicas que dificultam a identificação dos fungos durante a avaliação, além de não assegurar a infecção pelo patógeno em níveis desejados (TEIXEIRA et al., 2005).

Por esses métodos, os fungos ficam aderidos ao tegumento das sementes e a infecção não é assegurada. Outro fator limitante seria o tempo de exposição das sementes à colônia, pois elas podem iniciar a germinação, conforme a espécie avaliada (MACHADO et al., 2001a).

A modificação do potencial osmótico do substrato do meio de cultura é utilizado para controlar a germinação de sementes em testes de sanidade, técnica denominada de restrição hídrica (COUTINHO et al., 2001; MACHADO et al., 2008), e tem recebido atenção nos últimos anos, devido as suas vantagens em comparação aos métodos convencionais de detecção (FARIAS; DELPONTE; DALMAGRO, 2003; MACHADO et al., 2004a).

A metodologia de condicionamento osmótico ou restrição hídrica (HEYDECKER; HIGGINS; GULLIVER, 1973; HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975), originalmente desenvolvida visando à melhoria da qualidade fisiológica de sementes, foi adaptada na Universidade Federal de Lavras, em estudos envolvendo ensaios de inoculação de sementes com patógenos (TEIXEIRA, 2005). Nesse método, o potencial hídrico do meio agarizado, sobre o qual desenvolverá a colônia do patógeno, é controlado pela adição de solutos, por exemplo, polietileno glicol (PEG), manitol, KCl, NaCl, NaOH, MgSO₄, MgCl₂, K₃PO₄, KH₂PO₄, glicerol, sacarose (PILL, 1994).

O uso da técnica de restrição hídrica, em substratos utilizados para inocular fungos em sementes, tem sido eficaz no controle da germinação das sementes sem afetar o desenvolvimento dos fungos (COSTA, 2003; MACHADO et al., 2004a). Nesse processo, a germinação das sementes pode ser inibida ou retardada, o que possibilita a exposição destas à colônia do patógeno por períodos mais prolongados e variáveis, obtendo-se como consequência, maiores percentuais de infecção (TEIXEIRA et al., 2005). No método de inoculação, o tempo de contato das sementes com o patógeno é de grande importância para obter sementes com diferentes níveis de inóculo.

Machado et al. (2001 b) afirmaram que a técnica de restrição hídrica do meio de inoculação é viável para infectar sementes com alguns fungos de

importância econômica, uma vez que as sementes podem ficar em contato com o fungo por um maior período de tempo, sem contudo, iniciar o processo de germinação e, ainda, com a vantagem de tais sementes, posteriormente, serem secadas e armazenadas por algum período de tempo.

Machado et al. (2001a) mostraram que a incorporação de manitol ao meio BDA possibilita um maior tempo de exposição das sementes de milho aos fungos *D. maydis*, *F. verticillioide* e *C. acremonium*, propiciando um maior número de plântulas doentes oriundas de sementes inoculadas e são alcançados maiores índices de infecção das sementes em potenciais hídricos na faixa de -0,8 a -1,2MPa.

Segundo Machado et al., (2004a), a utilização da restrição hídrica como meio de se obter sementes infectadas apresenta vantagens sobre outros métodos por não depender de aspectos como sazonalidade e de operações morosas que nem sempre proporcionam resultados satisfatórios.

2.3 Genes diferencialmente expressos

A transcrição de um filamento de DNA, utilizando a sequência de um gene como molde, é a etapa da expressão gênica mais estudada com o objetivo de qualificar e de quantificar um gene ou conjuntos de genes diferencialmente expressos por célula, tecido ou organismo numa dada condição.

A coleção completa de mRNAs transcritos em célula, tecido ou órgão em um momento particular é denominada de transcriptoma e o estudo dos mRNAs transcritos é denominado transcritômico (DALE; SCHANTZ, 2002). O estudo do transcriptoma de célula ou tecido representa o primeiro passo na caracterização funcional de genes de interesse e identificação de locos coregulados. As metodologias utilizadas para estabelecer perfis transcricionais geralmente baseiam-se na geração de populações de cDNA a partir da população de mRNA expressa.

O primeiro grupo de técnicas de análise de transcriptomas baseia-se nas várias formas de acessar a quantidade de um transcrito específico em dada amostra em um determinado momento. Entre as técnicas que compõem este grupo destacam-se os “Northern Blots” (ALWINE; KEMP; STARK, 1977) Ensaio de Proteção de Ribonuclease (“Ribonuclease Protection Assay” ou RPA - WINTER et al.,1985), Transcrição Reversa (“Reverse Transcription” ou RT) seguida de PCR em Tempo Real (“Real Time RT-PCR” - TaqMan – GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996) e Ensaio de Extensão de Iniciador (“Primer Extension Assay” – BOORSTEIN; CRAIG, 1989).

O segundo grupo de técnicas se ocupa com a análise global de transcritos. Entre as técnicas compreendidas nesse grupo, é possível citar a Análise Serial da Expressão Gênica (“Serial Analysis of Gene Expression” ou SAGE - VELCULESCU et al., 1995), Seqüenciamento de Assinaturas Massivamente Paralelo (“Massively Parallel Signature Sequencing” ou MPSS - BRENNER et al., 2000) e Piroseqüenciamento (WEBER et al.,2007).

Um terceiro grupo de técnicas abrange a comparação de diferentes transcriptomas e a ciência envolvendo essas técnicas pode ser chamada de transcritômica comparativa. Nesse grupo, destacam-se as técnicas “Differential Display” (LIANG; PARDEE, 1992), “RNA fingerprinting” (WELSH et al., 1992), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado baseado em cDNA (cDNA-AFLP - BACHEM et al., 1996), “GeneFishing” (KIM et al., 2004), Hibridização Subtrativa (BAUTZ; REILLY, 1966; DIATCHENKO et al., 1996) e Microarranjos de DNA (SCHENA et al., 1995). Tais técnicas permitem isolar transcritos que sejam expressos em um dado tecido, fase do desenvolvimento ou condição, como, por exemplo, situação de doença sistêmica na planta, utilizando amostra controle como referência para comparação.

Entre os métodos apresentados acima, a hibridização subtrativa é o único capaz de enriquecer população de cDNAs com transcritos

diferencialmente expressos. O método foi primeiramente utilizado por Bautz e Reilly (1966) para purificar o mRNA do fago T4. A amostra que possui os transcritos de interesse é chamada testadora (“tester”) e aquela utilizada como controle é chamada referência (“driver”). Embora haja variações no método, a teoria básica da subtração é a mesma: ambas as amostras de mRNA são convertidas a cDNA, os quais são postos para hibridizar; as sequências híbridas são removidas e as restantes, não-hibridizadas, representam os genes que foram expressos na amostra testadora, mas não foram na referência. Logo, esses são os transcritos diferencialmente expressos entre as amostras (DALE; SCHANTZ, 2002; JI; CAI, 2004).

As metodologias tradicionais de hibridização subtrativa são de uso limitado, porque elas requerem grandes quantidades de mRNA inicial e produzem ínfima quantidade de cDNA ao final do processo, dificultando sua clonagem. A Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) (DIATCHENKO et al., 1996), um método baseado em PCR, contornou as limitações das técnicas anteriores, resultando em um enriquecimento de 1000 vezes na quantidade de transcritos diferencialmente expressos, sendo assim adequado à identificação de transcritos raros (JI; CAI, 2004)

Na SSH, o cDNA é sintetizado a partir de mRNA obtido das duas amostras que se pretende comparar: a testadora e a referência. A amostra testadora é subdividida em duas partes, sendo cada uma delas ligada a um adaptador diferente (a sequência deste adaptador é complementar aos iniciadores que serão utilizados posteriormente para amplificação por PCR). Duas hibridizações são então realizadas. Na primeira, um excesso de cDNA referência é adicionado a cada amostra do testador. As amostras são então desnaturadas por calor para complementarem-se, gerando as moléculas tipo ‘a’, ‘b’, ‘c’ e ‘d’ em cada amostra (Figura 1). As moléculas tipo ‘a’ são significativamente enriquecidas com sequências diferencialmente expressas, enquanto os cDNAs que não são diferencialmente expressos formam as moléculas tipo ‘c’ mediante complementação com o cDNA referência (DIATCHENKO et al., 1996).

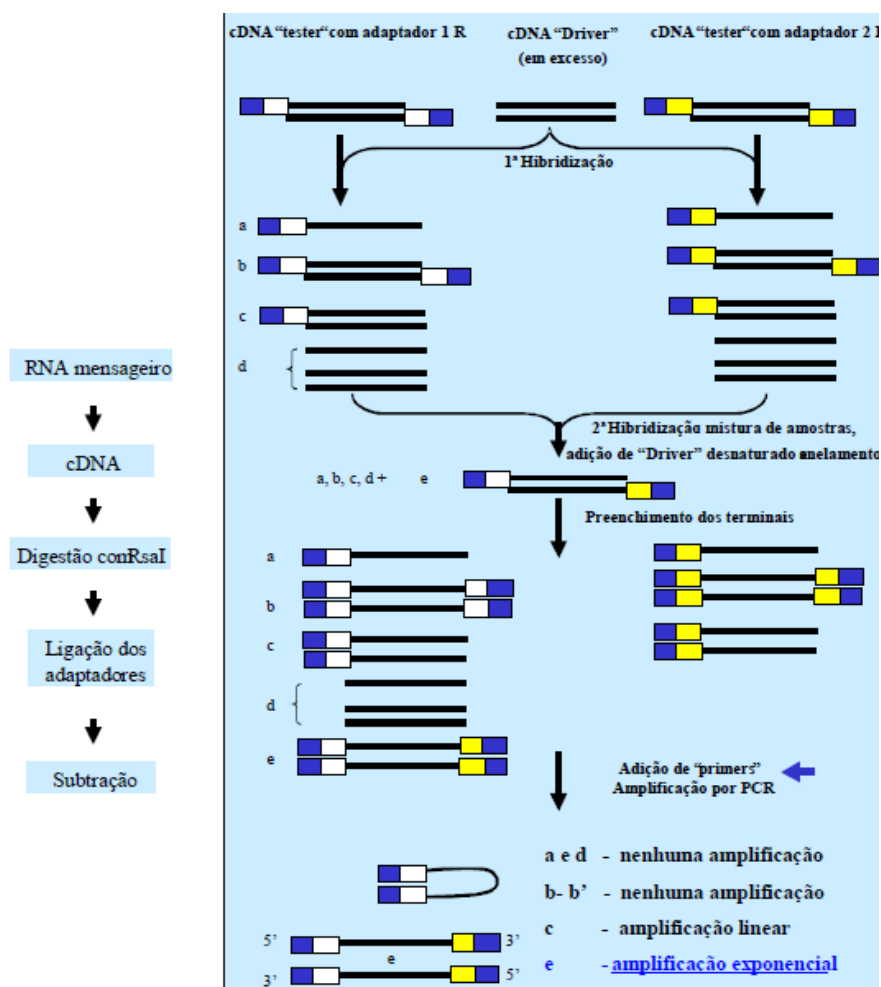


Figura 1. Diagrama esquemático da metodologia da SSH. Linhas sólidas representam os cDNAs digeridos com Rsa I. Caixas azuis representam a parte externa do adaptador 1 e 2R, que são idênticas e complementares ao iniciador da primeira PCR. Caixas brancas representam a parte interna do adaptador 1 e são complementares ao iniciador interno 1 da segunda PCR. Caixas amarelas representam a parte interna do adaptador 2R e são complementares ao iniciador interno 2R da segunda PCR (DIATCHENKO et al., 1996).

Na segunda hibridização, as duas amostras da primeira hibridização são misturadas sem serem desnaturadas. Agora, somente os cDNA testadores unifilamentares subtraídos e equalizados podem se reassociar, formando novo tipo de híbridos: as moléculas tipo 'e'. Esses novos híbridos serão amplificados por PCR, gerando a população de cDNAs enriquecida com

sequências diferencialmente expressas. As moléculas tipo 'a' e 'd' não podem ser amplificadas, por não possuírem o sítio de complementação dos iniciadores. Devido ao efeito de supressão da PCR, a maioria das moléculas tipo 'b' forma estrutura em grampo, que previne sua amplificação. As moléculas tipo 'c' possuem somente um sítio de complementação de primer, e são amplificadas linearmente. As moléculas tipo 'e' amplificadas podem ser diretamente inseridas em vetor T/A, o qual é adaptado para produtos de PCR, para a clonagem e obtenção de biblioteca subtrativa (DIATCHENKO et al., 1996).

A hibridização subtrativa tem sido muito empregada na identificação de transcritos ativados em situação de doença (DALE e SCHANTZ, 2002). Vários trabalhos têm sido publicados utilizando a SSH para identificar, com sucesso, transcritos diferencialmente expressos (AKOPIAN e WOOD, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2002; HEIN et al., 2004; DEGENHARDT et al., 2005; WANG et al., 2007; ZOUARI et al., 2007). Em alguns desses trabalhos, os cDNA clonados são impressos em micro ou macroarranjos e hibridizados com cDNAs-alvo adequados para a confirmação da expressão diferencial (YANG et al., 1999; ZENGH et al., 2004; RISHI et al., 2004; LI et al., 2007).

REFERÊNCIAS

AKOPIAN, A. N.; WOOD, J. Construction and screening of a subtractive cDNA library. In: HUNT, S.; LIVESEY, F. (Ed.). **Functional genomics: a practical approach**. New York: Oxford, 2000. p. 272.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5350-5354, Dec. 1977.

BACHEM, C. et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger-printing based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 745-753, May. 1996.

BAUTZ, E. K.; REILLY, E. Gene-specific messenger RNA: isolation by the deletion method. **Science**, Washington, v. 151, n. 21, p. 328, Jan. 1966.

BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: **Proceedings, An advanced International Course on Seed Pathology**, Passo Fundo, RS. EMBRAPA/ ABRATES, p. 93-112, 1987.

BOORSTEIN, W. R.; CRAIG, E.A. Primer extension analysis of RNA. **Methods of Enzymology**, New York, v. 180, p. 347-69, 1989.

BRASIL AGROFIT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** - Coordenação-Geral de Agrotóxicos Afins/DFIA/DA. Disponível em:
http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
Acesso em: 10 jan. 2012.

BRENNER, S. et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 6, p. 630-634, June 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 1-424.

COSTA, M. L. N et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência agrotecnologia**, Lavras. v. 27, n. 5, p.1023-1030, set./out. 2003.

COUTINHO, W.M et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao

teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

DALE, J. W.; VON SCHANTZ, M. **From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology**. New York: Wiley, 2002. p. 1-360.

DEGENHARDT, J. et al. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 173, p. 326-335, 2005.

DIATCHENKO, L.Y.F.C. Supression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated of tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America, v. 93, p. 6025-6030, 1996.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. **Agrishow Agropecuária**, Guaíba, 2000. p. 1-360.

FARIAS, C.R.J.; DELPONTE, E.M.; DALMAGRO, T. et al. Inibição de germinação de sementes de trigo e milho em teste de sanidade em substrato papel. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 141-144, 2003.

FERNÁNDEZ, C. et al. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligocapped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 171-180, Jul. 2002.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, Nova York, v. 6, p. 995-1001, Oct. 1996.

HEIN, I. et al. Characterization of early transcriptional changes involving multiple signaling pathways in the Mla13 barley interaction with powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. hordei). **Planta**, Berlin, v. 218, n. 5, p. 803-813, Mar. 2004.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R.L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v. 246, p. 42-44, 1973.

HEYDECKER, W., HIGGINS, J.; TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Cambridge, v.3, p.881-8, 1975.

- JI, W.; CAI, L. Suppression Subtractive Hybridization PCR. In: WEISSENSTEINER, T.; GRIFFIN, H. G.; GRIFFIN, A. (Ed.). **PCR Technology: Current Innovations**, 2. ed., 2004. p. 287-298.
- KIM, Y. J. et al. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. **Biotechniques**, Natick, v. 36, n. 3, p. 424-434, Mar. 2004.
- LI, H. Y. Isolation and characterization of induced genes under drought stress at the flowering stage in maize (*Zea mays*). **DNA Sequence - The Journal of Sequencing and Mapping**, China, v. 18, n. 6, p. 445-460, 2007.
- LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n. 14, p. 967-971, Aug. 1992.
- LUCCA FILHO, O. A. Diagnóstico da patologia de sementes de milho no Rio Grande do Sul. **Situação e perspectivas da patologia de sementes no Brasil**. Anais. Piracicaba: CENA/USP/CNEN, Brasília: ABRATES, p.102-104, 1984.
- MELTON, D. A. et al. Efficient In Vitro Synthesis of Biologically Active RNA and RNA Hybridization Probes From Plasmids Containing a Bacteriophage SP6 Promoter. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 18, p. 7035-7056, Sep. 1984.
- MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras, Editora UFLA, 2000. 138 p.
- MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, v. 23, n. 2, p.88-94, 2001a.
- MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de sementes**, Viçosa, v. 23, n. 2, p.95-101, 2001b.
- MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, v. 26, p62-67, 2004a.
- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 1-107 p.

MACHADO J. C. Use of osmotic solutes to control seed germination of rice and common bean in seed health *Blotter tests*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 36, p. 66-75, 2008.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal Stored Products Research**, Missouri, v. 31, n.1, p. 1-16, 1995.

PILL, W. G. Low water potential and pressing germination treatments to improve seed quality. In: Barsa, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York, p. 319-359, 1994.

PINTO, N. F. J. A. Seleção de fungicidas para o tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 24, p. 22-25, 1998.

RHEEDER, J. P. et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, East Lansing, v. 82, p.353-357. 1992.

RISHI, A. S. et al. Identification and analysis of safener-inducible expressed sequence tags in *Populus* using a cDNA microarray. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 6, p. 296–306, Dez. 2004.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *A. flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal Stored Products Research**, Missouri, v. 27, n. 1, p. 65-68. 1991.

SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. **Science**, Washington, v. 270, n. 20, p. 467-470, Oct. 1995.

TEIXEIRA, H. et al. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 30, p. 109-114, 2005.

VELCULESCU, V. E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 20, p. 484-487, Oct. 1995.

WANG, Y. et al. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 1, p. 78-89, Jan. 2007.

WETZEL, M. M. V. S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargil, 1987, p. 260-275.

WEBER, A. P. M. et al. Sampling the arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing. **Plant Physiology**, Washington, v.144, n. 1, p. 32-42, May. 2007.

WELSH, J. et al. Arbitrarily primed PCR fringerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 19, p. 4965-4970, Oct. 1992.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3rd ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1999.

WINTER, E. et al. Method to Detect and Characterize Point Mutations in Transcribed Genes: Amplification and Overexpression of the Mutant c-Ki-ras Allele in Human Tumor Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, n. 22, 7575-7579, Nov. 1985.

YANG, G. P. et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1517-1523, Mar. 1999.

ZHENG, J. et al. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 6, p.807-823, Aug. 2004.

ZOUARI, N. et al. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. **Gene**, Amsterdam, v. 404, n. 1-2, p. 61-69, Dez. 2007.

CAPÍTULO 2

**Inoculação de *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium*
spp. em sementes de milho por restrição hídrica**

RESUMO

A disponibilidade de sementes com diferentes níveis de infecção por fungos ou para outros patógenos transmissíveis por essa via é extremamente importante para diversos estudos em patologia de sementes. A técnica de restrição hídrica tem sido eficazmente utilizada na inoculação artificial de fungos em sementes. No presente trabalho, teve-se como objetivo avaliar a técnica de restrição hídrica de infecção e o desempenho de sementes de milho submetidas a diferentes tempos de inoculação com *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* As colônias fúngicas foram isoladas de sementes de vários lotes de milho a partir do teste de sanidade. A partir dessas colônias foi feita suspensão de esporos e adicionado 1 mL dessa suspensão por placa com DDA mais manitol no potencial hídrico -1 MPa. Após o crescimento das colônias, foram distribuídas sementes em camada única e levemente prensadas sob o meio, permanecendo no substrato por diferentes períodos de contaminação, 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. As sementes foram retiradas do meio secadas sobre papel de filtro e submetidas aos testes de germinação, 1ª contagem de germinação, % de sementes contaminadas e % de sementes viáveis. Pelos resultados, pode-se concluir que a infecção é crescente e a qualidade fisiológica decrescente na faixa de 48 à 96h de inoculação para sementes inoculadas com os fungos *A. flavus* e *F. verticillioides*. Para sementes inoculadas com o fungo *Penicillium spp.*, a infecção é crescente à medida que se aumenta o tempo de inoculação e a qualidade fisiológica permanece sem alterações significativas.

Palavras chave: *Zea mays L.* germinação. restrição hídrica.

ABSTRACT

The availability of seeds with different levels of infection by fungi or other pathogens transmitted by this route is extremely important for many studies in seed pathology. The water restriction technique has been effectively used in the artificial inoculation of fungi on seeds. In the present work was to evaluate the technique of water restriction infection and performance of maize seeds subjected to different times of inoculation with *A. flavus*, *F. verticillioides* and *Penicillium spp.* The fungal colonies were isolated from several batches of seed corn from sanity. From these colonies was made spore suspension and 1 ml of this suspension per plate with ADD more mannitol in water potential of -1 MPa. After growth the colonies were distributed seed layer and gently pressed only in the medium remained in the substrate for different periods of infection, 0, 24, 48, 72, 96 and 120h. The seeds were removed from half dried on filter paper and subjected to germination, first germination count, % contaminated seed and viable seed. The results can be concluded that the infection is increasing quality and decreasing the physiological range of 48 to 96 hours of inoculation for seeds inoculated with the fungi *A. flavus* and *F. verticillioides*. For seeds inoculated with the fungus *Penicillium spp.* infection is increasing with increasing time of inoculation and physiological quality remains without significant changes.

Key words: *Zea mays L.* germination. water restriction.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), em razão de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Por causa da sua multiplicidade de aplicações, tanto na alimentação humana como animal, tem relevante papel socioeconômico, além de ser matéria prima básica para diversificados complexos agroindustriais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

A qualidade das sementes é fator importante em programas de produção agrícola, visto que as características agronômicas das cultivares obtidas pelas pesquisas chegam aos agricultores pelas sementes. Essas sementes podem ser analisadas sob os aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos (SILVA, 2000).

Entre os diversos fatores que afetam a qualidade das sementes de milho, os microrganismos são considerados como dos mais importantes por estarem relacionados com a baixa germinação e baixo vigor, além de acelerarem o processo de deterioração durante o armazenamento. A maioria dos fitopatógenos é capaz de sobreviver nas sementes por longos períodos de tempo e ser disseminada, causando sérios prejuízos aos agricultores (COUTINHO et al. 2007).

Sementes de milho podem ser infectadas por vários fungos durante o seu desenvolvimento e também, após a colheita, no armazenamento. Alguns fungos infectam as sementes ainda no campo, requerendo para o seu crescimento, umidade relativa em torno de 90-95%. Enquanto outros fungos de armazenamento são capazes de sobreviver em ambiente com baixa umidade, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes (TANAKA, 2001).

Entre os fungos de campo veiculados pelas sementes de milho, no Brasil, *F. verticillioides* Sac. Nirenberg (*Fusarium moniliforme* Sheldon) é o mais frequente. Já os fungos *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* são os mais comuns em armazenamento.

Em diversos estudos sobre a associação de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* com sementes de milho, há necessidade de obtenção de sementes infectadas, inclusive com graus de incidência diferenciados. Os métodos de inoculação de fungos são importantes em estudos, visando à detecção e ao controle de patógenos, aos estudos epidemiológicos das doenças, às demonstrações que fazem uso de sementes com patógenos e aos estudos fisiológicos relacionados à resistência de variedades a esses microrganismos (COUTINHO et al. 2007).

Tem sido crescente o interesse pela utilização da técnica de inoculação, utilizando-se a restrição hídrica, seja em meio de cultura agarizado ou substrato de papel. Essa técnica tem objetivo de inibir ou retardar a germinação das sementes, facilitando as operações de avaliações de flora fúngica em testes de sanidade (MACHADO et al., 2004b). No presente trabalho, teve-se como objetivo avaliar a técnica de restrição hídrica de infecção e o desempenho de sementes de milho submetidas a diferentes tempos de inoculação com *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Sementes e no Laboratório de Patologia de Sementes dos departamentos de Agricultura e de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Foram realizados três ensaios com sementes de híbrido simples de milho, safra 2009/2010 (Santa Helena), infectadas com isolados de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*

2.1 Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de diferentes lotes de sementes de milho, pelo método “*Blotter test*”. Colônias dos fungos em estudo, após identificação, foram transferidas para placas de Petri, contendo BDA (Batata

Dextrose Ágar) e incubadas em BOD a 25 °C por sete dias. Após obtenção das culturas puras, essas culturas foram preservadas em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado.

2.2 Inoculação das sementes

Sementes de milho foram inoculadas, separadamente com os fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium* pelo método de restrição hídrica em substrato agarizado (MACHADO, 2001a). Utilizou-se potencial hídrico de – 1 MPa pela adição de manitol ao meio BDA (Batata Dextrose Ágar) a 2%. Para obtenção do inóculo placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo BDA a – 1 MPa foram inoculadas, separadamente, com 1 mL de suspensão de conídios, proveniente de culturas puras dos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium*. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara de germinação tipo BOD com temperatura ajustada para 25 °C e regime de luz de 12 horas, durante sete dias para desenvolvimento das colônias dos fungos.

Após desenvolvimento das colônias fúngicas, 800 sementes de milho, previamente desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 1%, lavadas e secas foram distribuídas uniformemente, em camadas simples, sobre as colônias e mantidas em incubação em câmara de germinação tipo BOD, com temperatura previamente regulada a 25±1 °C e fotoperíodo de 12 horas, por 24, 48, 96 e 120 horas. Após cada período de exposição, as sementes foram colocadas para secar por 24 horas em condições ambientais de laboratório e acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria (10°C e 70% UR) até realização das avaliações. Como testemunha utilizaram-se sementes desinfestadas e não inoculadas. A testemunha não foi colocada no meio BDA, pois esse meio pode funcionar como *priming*.

As sementes expostas aos tratamentos de restrição hídrica, inoculadas e as sementes não inoculadas foram submetidas à avaliação da qualidade sanitária pelo *Blotter test* com congelamento, enquanto a

qualidade fisiológica foi determinada pelas testes de germinação, primeira contagem do teste de germinação e teste de Tetrazólio, conforme descrito a seguir.

2.3 Avaliação da Qualidade

-Teste de Germinação

O teste de germinação foi conduzido a partir da utilização de 200 sementes (quatro repetição de 50 sementes) distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) na forma de rolo, umedecido com água destilada 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador regulado à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

- Primeira Contagem de Germinação

A primeira contagem do teste de germinação foi realizada em conjunto com o teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais, aos quatro dias após semeadura, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

-Teste de Tetrazólio

Quatro subamostras de 25 sementes foram acondicionadas em rolos de papel germitest umedecidos com água por período de 18 horas à temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as sementes foram seccionadas no sentido longitudinal e imersas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto (Tetrazólio) a 0,5% por período de seis horas à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para coloração na ausência de luz. Após este período, as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

-Qualidade Sanitária das sementes

A qualidade sanitária das sementes foi avaliada pelo “*Blotter test*” com congelamento. Antes de submeter as sementes ao teste de sanidade, elas foram tratadas com hipoclorito de sódio a 1% durante um minuto, para eliminar a contaminação superficial das sementes pelos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* Foram distribuídas 200 sementes (oito repetições de 25), para cada período de exposição e de espécie de fungo inoculado, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. As placas, contendo as sementes, foram incubadas por 24 horas à temperatura de 20 ± 2 °C, transferidas para freezer por mais 24 horas e posteriormente incubadas à temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Ao final desse período, as sementes foram examinadas ao microscópio estereoscópio, verificando, morfológicamente, a incidência dos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* Os resultados foram expressos em porcentagem.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo seis tempos de inoculação (0, 24, 48, 72, 96 e 120) para cada fungo (*Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*). Foi realizada análise de variância dos dados e os resultados foram apresentados por meio de análises de regressão para os tempos de inoculação para cada fungo estudado (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados do teste de germinação (Figura 1), foi observado que para sementes inoculadas com os fungos, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*, o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo gerou redução linear no percentual de germinação, de 91% para 74% e de

91% para 84%, respectivamente. Provavelmente, esse fato ocorreu porque a presença desses fungos nas sementes aumenta deterioração das mesmas e conseqüentemente perda da qualidade fisiológica.

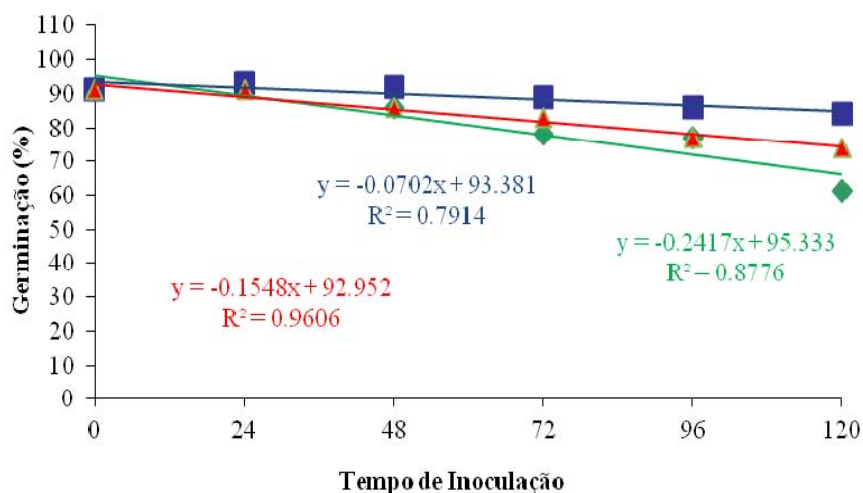


Figura 1: Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho avaliadas pelo teste de germinação após serem submetidas a diferentes tempos de inoculação com (◆) *A. flavus*, (▲) *F. verticillioides* e (■) *Penicillium spp.*

Goulart e Fialho (1998) verificaram que a presença de *F. moniliforme*, em altas incidências nas sementes de milho pode provocar redução do poder germinativo, bem como produzir toxinas para mamíferos e aves. Em trabalho realizado com sementes de feijão, Costa et al. (2003) observaram diminuição da germinação à medida que se aumentou o tempo de permanência das sementes em contato com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Machado et al. (2001 a), em trabalho realizado com sementes de milho, observaram pelos resultados dos testes de germinação e emergência das plântulas, que os tratamentos que permitiram maior período de contato das sementes com a colônia de *F. verticillioides* apresentaram maiores percentuais de plantas com lesões causadas por este patógeno.

Para sementes inoculadas com *A. flavus*, percebe-se que houve queda maior na porcentagem de germinação a partir de 72h, de 91% para 78%. Teixeira et al. (2005), em trabalho realizado com sementes de milho,

observaram que *A. strictum* reduziu a germinação de sementes de milho, quando essas sementes foram submetidas à microbiolização com o patógeno por períodos acima de 72 horas.

Pelos resultados da primeira contagem da germinação, apresentados na figura 2, observam-se resultados similares aos obtidos no teste de germinação. Sementes inoculadas com os fungos *F. verticillioides* e *A. flavus* reduziram significativamente a porcentagem de plantas germinadas à medida que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao patógeno, diminuindo de 88% para 63% a porcentagem de plantas germinadas para o *F. verticillioides* e de 88% para 54% para o *A. flavus*. Já para sementes inoculadas com *Penicillium spp.* nota-se que ocorreu decréscimo não significativo, 88% para 84%, de sementes germinadas à medida que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao patógeno. Pode-se inferir que os fungos *F. verticillioides* e *A. flavus* foram mais patogênicos do que o *Penicillium spp.*, uma vez que causaram diminuição significativa no vigor do lote de sementes.

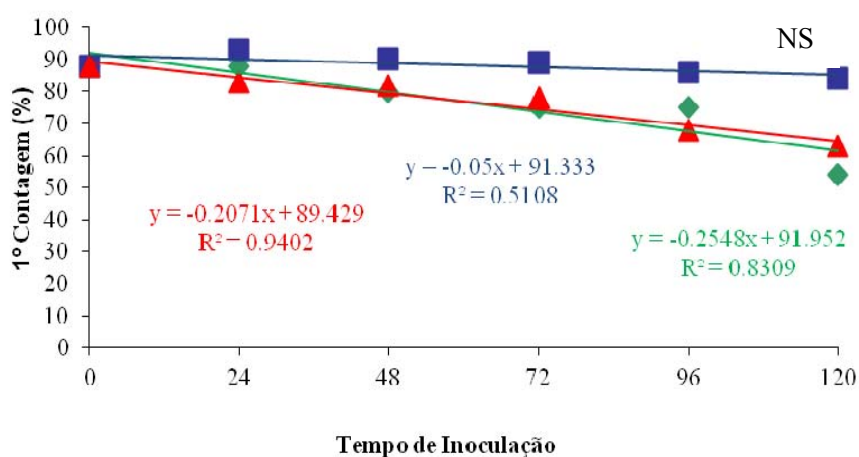


Figura 2: Porcentagem de sementes de milho germinadas aviladas pelo teste de primeira contagem de germinação após serem submetidas a diferentes tempos de inoculação com (◆) *A. flavus*, (▲) *F. verticillioides* e (■) *Penicillium spp.*

Lucca Filho (1984) afirma que espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* podem contribuir para a redução do poder germinativo, além disso, *F. verticillioides* pode inibir o desenvolvimento de raízes das plântulas devido ao fato de o fungo sintetizar toxina no endosperma da semente de milho (MACHADO, 2000).

Na figura 3, referente a viabilidade, observa-se que em sementes inoculadas com *A. flavus* e *F. verticillioides* houve perdas na qualidade de acordo com o aumento do tempo de exposição das sementes ao patógeno. Verificou-se aumento de 23% de sementes inviáveis para o *A. flavus* e de 16% para *F. verticillioides* ao final dos 120 dias de inoculação, indicando assim, como nos testes de germinação e de primeira contagem, que esses são fungos que causam mais danos às sementes do que o *Penicillium spp.* Uma deterioração ainda maior é esperada se essas sementes fossem armazenadas, por esses serem fungos de armazenamento.

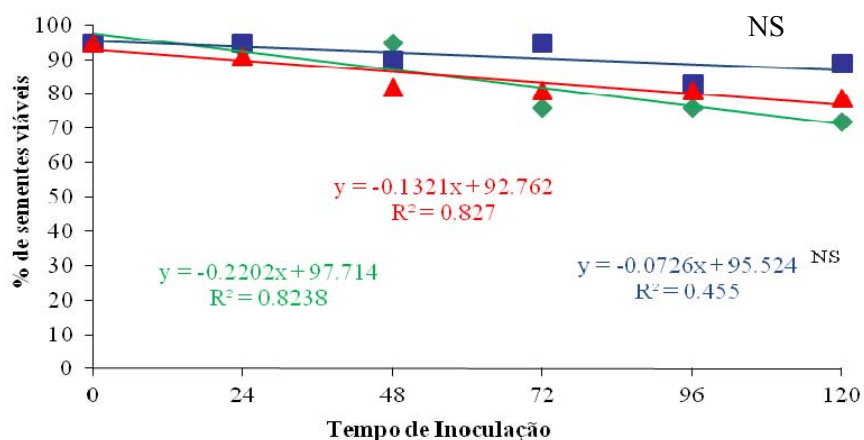
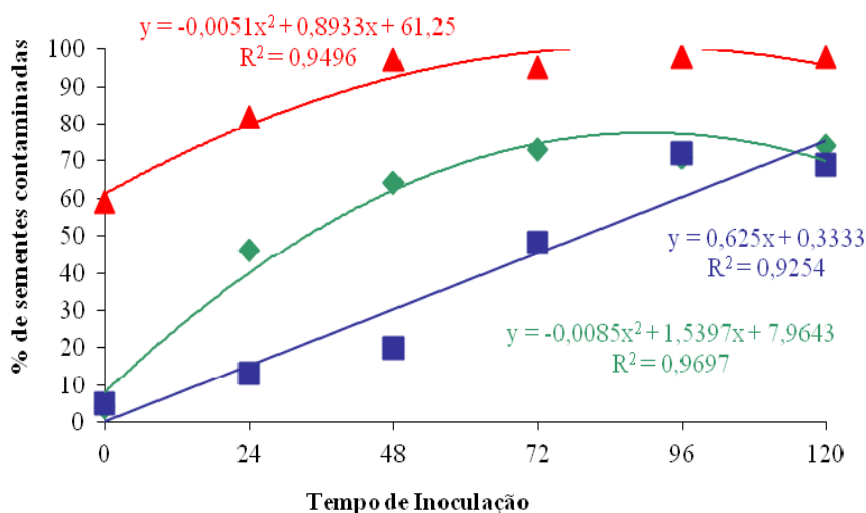


Figura 3: Porcentagem de sementes de milho viáveis avaliadas pelo teste de tetrazólio após serem submetidas a diferentes tempos de inoculação com (◆) *A. flavus*, (▲) *F. verticillioides* e (■) *Penicillium spp.*

Em sementes inoculadas com *Penicillium spp.*, não houve diferença significativa na viabilidade em relação aos diferentes tempos de contato das sementes com o patógeno.

Na figura 4, observa-se que a incidência do fungo *F. verticillioides* em sementes de milho, inoculadas com o referido patógeno em diferentes tempos de inoculação, foi elevada em todos os tratamentos e sendo crescente com aumento do tempo de exposição das sementes ao patógeno, indo de 59% a 98%. Como o *F. verticillioides* também é um fungo de campo, as sementes já apresentavam porcentagem de infecção antes mesmo da inoculação. Como esse patógeno apresenta crescimento rápido e penetra facilmente nos tecidos protetores das sementes, após o período de exposição das sementes ao fungo observou um índice de 98% de infecção das sementes.



F

figura 4: Porcentagem de sementes de milho contaminadas avaliadas de acordo com o teste de sanidade após serem submetidas a diferentes tempos de inoculação com (♦) *A. flavus*, (▲) *F. verticillioides* e (■) *Penicillium spp.*

Para sementes inoculadas com *A. flavus*, percebem-se resultados similares aos obtidos por sementes inoculadas com *F. verticillioides*, porém com menor expressão do *A. flavus* inicialmente, apenas 4%. Pela análise desses resultados, verifica-se que o tempo de exposição das sementes aos fungos *A. flavus* e *F. verticillioides* não precisa ser prolongado para além de 96 horas, em que se percebe-se uma estabilização de sementes contaminadas. Já nas sementes inoculadas com *Penicillium spp.* a infecção é

crescente à medida que se aumentou o tempo de exposição, passando de 5% a 69% de infecção ao final das 120 horas de exposição das sementes ao patógeno.

Observa-se, no teste de sanidade, desenvolvimento significativo dos fungos. Segundo Coutinho (2001) e Machado et al. (2008), o maior crescimento micelial dos fungos em meio com manitol pode estar relacionado à utilização desse soluto como fonte adicional de energia ou ao melhor ajuste osmótico da célula fúngica pela absorção dos solutos, permitindo maior turgor para a extensão celular.

4 CONCLUSÕES

A técnica de restrição hídrica é eficiente para infecção das sementes de milho ao longo do tempo, sendo 48 e 96 horas de inoculação para os fungos *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente.

A técnica de restrição hídrica só foi eficiente para o *Penicillium spp.* a partir de 120 horas de exposição ao fungo.

A infecção é crescente e a qualidade fisiológica de sementes de milho é decrescente na faixa de 48 a 96 horas de inoculação para sementes inoculadas com os fungos *A. flavus* e *F. verticillioides*.

Em sementes inoculadas com o fungo *Penicillium spp.*, a infecção é crescente à medida que se aumenta o tempo de inoculação e a qualidade fisiológica das sementes de milho permaneceram sem alterações significativas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para Análises de Sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência agrotecnologia**, Lavras. v..27, n. 5, p.1023-1030, set./out., 2003.
- COUTINHO, W.M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.
- COUTINHO W. M. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, Dec. 2007.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agrishow Agropecuária, 360 p. 2000.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- GOULART, A.C.P.; FIALHO, W.F.B. Ocorrência de fungos em sementes de milho “BR 201” produzidas na região de Dourados, MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.79, 1998.
- LUCCA FILHO, O. A. Diagnóstico da patologia de sementes de milho no Rio Grande do Sul. Piracicaba, **Situação e perspectivas da patologia de sementes no Brasil**. Anais. Piracicaba: CENA/USP/CNEN, Brasília: ABRATES, 1984. p.102-104.
- MACHADO, J. C.; **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138p.
- MACHADO, J.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 23, n. 2, p.88-94, 2001a.
- MACHADO, J. C. et al. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 25, n.2, p. 77-81, 2004b.

MACHADO J. C. et al. Use of osmotic solutes to control seed germination of rice and common bean in seed health *Blotter tests*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 36, p. 66-75, 2008.

SILVA, E. A. A. et al. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, Set. 2000.

TANAKA, M. A. S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, Mar. 2001.

TEIXEIRA, H. et al. A. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 109-114, 2005.

CAPÍTULO 3

**Expressão diferencial de genes nas interações entre sementes de milho e
Aspergillus flavus, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium spp.***

RESUMO

A presença de fungos nas sementes e grãos tem importância especial, devido aos danos econômicos que acarretam perda de qualidade fisiológica nas sementes e por prejuízos, à saúde humana e animal por consumo de grãos infectados. O objetivo deste trabalho foi detectar genes diferencialmente expressos associados à presença de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* em lotes de sementes de milho, aplicando-se a metodologia de biblioteca subtrativa supressiva (SSH) e análise de expressão por qRT-PCR. Sementes de híbrido simples de milho da Santa Helena Sementes - safra 2009/2010 foram inoculadas por períodos de 48 e 96 horas pelo método de restrição hídrica, e em sequência, submetidas aos testes de qualidade: germinação, 1ª contagem de germinação, sanidade, Tetrazólio e IVG. Com os resultados obtidos nos testes fisiológicos selecionaram-se os tratamentos: testemunha(T), 96 sem fungo (96), 96 com *Fusarium* (F96), 96 com *Penicillium* (P96), 96 com *Aspergillus* (A96) para construção das bibliotecas. O RNA foi extraído e purificado em mRNA para construção das bibliotecas subtrativas de supressão pelo kit PCR – Select TM cDNA subtraction (CLONTECH). Seis bibliotecas de cDNA foram construídas a partir dos mRNAs: Biblioteca 1- TF; Biblioteca 2- TP; Biblioteca 3- TA; Biblioteca 4- 96F; Biblioteca 5- 96P; Biblioteca 6- 96A. Os genes diferencialmente expressos encontrados em cada biblioteca foram clonados e sequenciados. Os contigs foram montados com o uso do DNA base e comparados com as sequências disponíveis no NCBI, analisando-se a similaridade das sequências pelo BLASTn. As sequências encontradas foram utilizadas para identificar os genes correspondentes a cada EST analisados. Os genes de interesse foram selecionados para cada tratamento e através do programa Primer Express 3.0 foram desenhados os primers e enviados para síntese. Confirmaram-se os genes diferencialmente expressos encontrados nas bibliotecas construídas através qRT-PCR. A maioria dos genes diferencialmente expressos encontrados relaciona-se às situações de estresse da semente, como o gene Poliubiquitina, gene clone 3516, proteína SPATULA, o gene GPC, proteína hipotética, proteína hipotética do milho e o gene da catalase. Já os genes asparto aminotransferase, zinc finger, antranilato sintase, cisteína proteinase e SOD4, apesar de identificados como genes diferencialmente expressos pela biblioteca não apresentaram diferença na expressão entre sementes de milho secas, embebidas e infectadas com os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp.*, verificadas por qRT-PCR. A metodologia de biblioteca subtrativa supressiva é eficiente para detecção de genes diferencialmente expressos quando os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp.* estão presentes em sementes de milho. A técnica de qRT-PCR validou todas as bibliotecas construídas (TF, TP, TA, 96P e 96A), com exceção da biblioteca 96F.

Palavras chave: Biblioteca subtrativa supressiva. genes diferencialmente expressos. semente de milho.

ABSTRACT

The presence of fungi on seeds and grains has special importance due to the economic damage that causes loss of vigor in semmentes and damage to human and animal health through consumption of infected kernels. The aim of this study was to detect differentially expressed genes associated with the presence of *A. flavus* F. *verticillioides* and *Penicillium* spp. Batch corn seed, applying the methodology of suppressive subtractive library (SSH) and expression analysis by qRT-PCR. Simple hybrid seed corn of St. Helena Seeds - 2009/2010 harvest were inoculated for 48 and 96 hours by the method of water restriction and sequentially subjected to quality tests: germination, first count, sanity, and Tetrazolium IVG . With the results obtained in physiological tests were selected treatments: control (T), 96 without fungus (96), 96 with *Fusarium* (F96), 96 with *Penicillium* (P96), 96 co *Aspergillus* (A96) for the construction of libraries. The RNA was extracted and purified mRNA for construction of suppression subtractive libraries by PCR kit - Select cDNA subtration TM (CLONTECH). Six cDNA libraries were constructed from mRNAs: Library 1 - TF; Library 2 - TP; Library 3 - TA; Library 4 - 96F; Library 5 - 96P; Library 6 - 96A. The differentially expressed genes found in each library were cloned and sequenced. The contigs were assembled using DNA baser and compared with the sequences available in NCBI analyzing the similarity of the sequences by BLASTn. The sequences found were used to identify the genes corresponding to each EST analyzed. The genes of interest were selected for each treatment and through the Primer Express 3.0 program primers were designed and sent to synthesis. It was confirmed differentially expressed genes found in libraries constructed using qRT-PCR. The majority of differentially expressed genes found are related to stress as the seed polyubiquitin gene, gene clone 3516, SPATULA protein, the gene GPC, hypothetical protein, hypothetical protein from corn and catalase gene. Already asparto aminotransferase genes, zinc finger, anthranilate synthase, cysteine proteinase and SOD4, although genes identified as differentially expressed by the library showed no difference in expression between maize seeds dried, soaked and infected with the fungus *F. verticillioides*, *A. flavus* and *Penicillium* spp, verified by qRT-PCR. The method of suppressive subtractive library is efficient for detecção of genes differentially expressed when the fungus *F. verticillioides*, *A. flavus* and *Penicillium* spp. are present in maize seeds. The technique of qRT-PCR validated all libraries built (TF, TP, TA, 96P and 96A), with the exception of the library 96F.

Keywords: Suppressive subtractive library. differentially expressed genes. seed corn.

1 INTRODUÇÃO

Sementes de milho podem ser infectadas por vários fungos, durante o seu desenvolvimento e, também, após a colheita, no armazenamento. Assim, as sementes são importante meio para a sobrevivência e veiculação de patógenos, inclusive para fungos de armazenamento, responsáveis pela sua deterioração (LUCCA FILHO, 1987). A presença de fungos em sementes e em grãos tem importância especial, devido aos danos econômicos que acarreta deterioração e perda da qualidade fisiológica nas sementes e por prejuízos à saúde humana e animal por consumo de grãos infectados com esses fungos por causa das micotoxinas que eles produzem. Dessa forma, torna-se muito importante, o desenvolvimento de metodologia de detecção rápida e segura desses patógenos, em sementes e em grãos, para agilizar a tomada de decisões relativas à destinação e à distribuição geográfica dos lotes, bem como o descarte ou o tratamento com agentes erradicantes e/ou protetores.

É nesse sentido que a informação básica relativa à expressão de genes específicos da interação semente/patógeno se vincula às ações de defesa agropecuária, na medida em que propicia o desenvolvimento de metodologias rápidas e seguras para identificação da infestação desses fungos em sementes de milho, por intermédio da marcação ou da identificação de proteínas específicas dessa interação.

A identificação de genes expressos especificamente ou de forma aumentada, quando da infecção de sementes de milho por fungos de armazenamento, é de substancial importância para o entendimento dos mecanismos que governam essa infecção, para que sejam desenvolvidos métodos de detecção precoce da presença desses microrganismos em lotes de sementes. Lana, Carneiro e Souza (2004) identificaram a partir da construção da biblioteca subtrativa supressiva (SSH), clones para serem utilizados em análises de expressão gênica, fornecendo informações importantes para a elucidação dos mecanismos de resistência ao Mosaico

Comum do Milho. Os métodos de detecção de patógenos seguros e rápidos são fundamentais para a tomada de decisão quanto à forma de armazenamento ou, em casos específicos, ao descarte de lotes.

SSH tem como objetivo identificar e enriquecer fragmentos de mRNA raros e diferencialmente expressos. A hibridização subtrativa provém metodologia direcionada para selecionar unicamente as espécies singulares de cDNA, removendo as sequências em comum que são expressas (JIANG et al., 2000). A técnica envolve a hibridização de uma primeira fita de cDNA gerada a partir de um mRNA “tester” (um dos RNAs pesquisados ligados aos adaptadores) com um mRNA obtido de um Driver (outro dos RNAs pesquisados, não ligados aos adaptadores). Após a obtenção das espécies de mRNA de interesse, utiliza-se a enzima que catalisa a reação de obtenção de um DNA a partir de moléculas de RNA, para que as mesmas sejam copiadas em moléculas de fita simples de cDNA. Em etapas subsequentes, é possível obter moléculas de DNA dupla-fita, que podem ser clonadas em um vetor específico (VEDOY; BENGTON; SOGAYAR, 1999; WHITFIELD et al., 2002).

A hibridização subtrativa vem sendo muito empregada na identificação de transcritos ativados em situação de doença (DALE; SCHANTZ, 2002). Vários trabalhos têm sido publicados utilizando a hibridização subtrativa supressiva para identificar, com sucesso, transcritos diferencialmente expressos (AKOPIAN; WOOD, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2002; HEIN et al., 2004; DEGENHARDT et al., 2005; WANG et al., 2007; ZOUARI et al., 2007). Em alguns desses trabalhos, os cDNA clonados são impressos em micro ou macroarranjos e hibridizados com cDNAs-alvo adequados para a confirmação da expressão diferencial (YANG et al., 1999; ZHENG et al., 2004; RISHI et al., 2004; LI et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi detectar genes diferencialmente expressos associados à presença de *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp.* em lotes de sementes de milho, aplicando-se a metodologia de biblioteca subtrativa supressiva e análise de expressão por qRT-PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Sementes, no Laboratório de Fisiologia de Plantas e no Laboratório de Patologia de Sementes dos departamentos de Agricultura e de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Foram realizados três ensaios com sementes de híbrido simples de milho, safra 2009/2010, infectadas com isolados de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*

2.1 Inoculação das sementes

Os isolados foram obtidos a partir de diferentes lotes de sementes de milho, pelo método “*Blotter test*”. Colônias dos fungos em estudo, após identificação, foram transferidas para placas de Petri, contendo BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubadas em BOD a 25 °C por sete dias. Após obtenção das culturas puras, estas foram preservadas em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado.

As sementes de milho, previamente desinfestadas, foram inoculadas, separadamente, com os fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium*, pelo método de restrição hídrica em substrato agarizado (MACHADO, 2001a). Utilizou-se potencial hídrico de – 1 MPa pela adição de manitol ao meio BDA (Batata Dextrose Ágar) a 2%. Para obtenção do inóculo, placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo BDA a – 1 MPa foram inoculadas, separadamente, com 1 mL de suspensão de conídios, proveniente de culturas puras dos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* Em seguida, as placas foram colocadas em câmara de germinação tipo BOD com temperatura ajustada para 25 °C e regime de luz de 12 horas, onde permaneceram sete dias para desenvolvimento das colônias dos fungos.

Após o desenvolvimento das colônias fúngicas, 800 sementes de milho, previamente desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 1%, lavadas e secas foram distribuídas uniformemente, em camadas simples,

sobre as colônias e mantidas em incubação em câmara de germinação tipo BOD, com temperatura previamente regulada a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, por período de 48 e 96 horas. Utilizaram-se também sementes em contato com meio BDA por 48 e 96 horas na ausência de fungos e sementes secas (testemunha). Após cada período de exposição, as sementes foram colocadas para secar por 24 horas em condições ambientais e acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria e seca até realização das avaliações.

Devido à contaminação natural das sementes pelos fungos *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*, as sementes que não foram inoculadas com fungos, ou seja, sementes secas, 48 e 96 horas no meio sem o fungo foram tratadas com o fungicida Derosal Plus (200 a 300 mL para cada 100kg de sementes) a fim de obter sementes não inoculadas com baixa incidência desses fungos.

As sementes expostas aos tratamentos de restrição hídrica, inoculadas (48 e 96 horas) e as sementes não inoculadas (48 e 96 horas no meio sem o fungo e as sementes secas), foram submetidas à avaliação da qualidade sanitária pelo *Blotter test* com congelamento, enquanto a qualidade fisiológica foi determinada pelos testes de germinação, primeira contagem de germinação, sementes viáveis pelo teste de Tetrazólio e índice de velocidade de germinação (IVG).

2.2 Avaliação da Qualidade

-Qualidade Sanitária das sementes

Antes de submeter as sementes ao teste de sanidade, elas foram tratadas com hipoclorito de sódio a 1% durante um minuto, para eliminar a contaminação superficial das sementes pelos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* A sanidade das sementes foi determinada pelo “*Blotter test*”.

Foram distribuídas 200 sementes (oito repetições de 25), para cada período de exposição e espécie de fungo inoculado, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. As placas, contendo as sementes, foram deixadas em câmara por 24 horas à temperatura de 20 ± 2 °C, transferidas para freezer por mais 24 horas e posteriormente colocadas novamente em câmara à temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, por mais 5 dias. Ao final desse período, as sementes foram examinadas ao microscópio estereoscópio, verificando a incidência dos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.* Os resultados foram expressos em porcentagem.

-Teste de Germinação

O teste de germinação foi conduzido com 200 sementes (quatro repetição de 50 sementes) distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com água destilada 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador regulado à temperatura de $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

- Primeira Contagem de Germinação

A primeira contagem do teste de germinação foi realizada em conjunto com o teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais aos quatro dias após semeadura de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

-Teste de Tetrazólio

Quatro subamostras de 25 sementes foram acondicionadas em rolos de papel umedecidos com água por período de 18 horas à temperatura de 21° C. Posteriormente, as sementes foram seccionadas no sentido longitudinal e imersas em solução de 2,3,5 trifetil cloreto (Tetrazólio) a 0,5% por período de 6 horas a temperatura de 30° C para coloração na ausência de luz. Após

esse período, as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

-IVG

Foi conduzido juntamente com o teste de germinação, fazendo-se a contagem do número de sementes germinadas do primeiro ao décimo quarto dia e, assim, calculando o número de sementes germinadas por dia. O IVG foi calculado pela fórmula de Maguire (1962) e, assim, calculando o número de sementes germinadas por dia.

2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo dois tempos de inoculação (48 e 96 horas) para cada fungo (*A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*), sementes em contato com o meio sem o fungo por 48 e 96 horas e sementes secas (testemunha). Foi realizada análise de variância dos dados e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para cada fungo estudado (FERREIRA, 2008).

2.4 Obtenção das sequências diferencialmente expressas

Para construção das bibliotecas, utilizaram-se os resultados obtidos nos testes fisiológicos e selecionaram-se os seguintes tratamentos: sementes secas (T), 96 horas de embebição em meio BDA mais manitol sem fungo (96), 96 horas de embebição em meio BDA mais manitol com *F. verticillioides* (F96); com *Penicillium spp.* (P96) e com *A. flavus* (A96). Sendo os tratamentos T e 96 as testemunhas, ou seja, os “*driver*” e os demais 96F, 96P e 96A os “*tester*”.

2.4.1 Extração de RNA total

Inicialmente, as vidrarias usadas para extração foram tratadas com a solução de limpeza (0,1M de NaOH, 1mM de EDTA e 1 L de água ultra pura) e água com DEPC – 0,01% (1 mL de DEPC para 999 mL de água ultra pura) e posteriormente autoclavados.

De cinco a oito sementes, de cada tratamento, foram maceradas em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo. O reagente usado foi o PureLink Plant RNA (INVITROGEN), segundo recomendações do fabricante com algumas modificações.

Em microtubo de 2,0 mL foram adicionados 100mg do tecido macerado e 0,5mL do Pure Link Plant RNA Reagent gelado (4°C). Agitaram-se os microtubis em vórtex por 20 seg. e os mantiveram em repouso na posição horizontal por 5 min., para melhor homogeneização do material. Em seguida, o material foi centrifugado (16000 xg por 15 minutos) em temperatura ambiente. Após centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo e adicionou 0,1mL de NaCl (5M) e 0,3mL de clorofórmio, centrifugando novamente as amostras (16000 x g/10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado igual volume de isopropanol e o microtubo foi mantido em repouso por 10 minutos, em temperatura ambiente. Realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Removeu-se o sobrenadante, e ao *pellet* foi adicionado 1mL de etanol 75% centrifugando (16000 x g /1 minuto). O sobrenadante foi removido e o *pellet* secado por 10 min, o qual foi ressuscitado em 30 µL de água com DEPC 0,1% e armazenado a -80°C.

A quantificação do RNA total foi feita em Nanodrop, medindo-se absorbância a 260 e 280nm, observando-se a razão de comprimento de onda 260/280, cujos valores se encontram na faixa de 1,8 a 2,1 o que indica extração de alta qualidade.

Análise da integridade das bandas de RNA foi feita em gel de agarose (1,5%), contendo 60 mL de tampão TBE 1X. Foram utilizados 2 µL de cada amostra para corrida e estas foram coradas com 2 µL de corante

Dye, correu-se o gel por 30 minutos a 90 V, usando-se tampão de corrida TBE 1X. Ao final da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (15 minutos) e avaliado no fotodocumentador.

O RNA total extraído de todos os tratamentos: T, 96, 96F, 96P e 96A foram visualizadas em gel de agarose a 1,5 % com tampão TAE [1X] (figura 1). Todas as amostras foram tratadas com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA provenientes do protocolo de extração. Para cada amostra, 2 μ L do RNA total foi aplicado com 2 μ L de DYE. O gel foi corado por 15 minutos em solução de brometo de etídeo. Como observado, na figura 1, a presença no gel de duas bandas nítidas representando os RNAs ribossômicos 28S e 18S de célula vegetal mostra a integridade das bandas, ou seja, a qualidade dos RNAs. As amostras que apresentaram apenas arraste, como observado para amostra 11 na figura abaixo, estavam degradadas e foram descartadas.

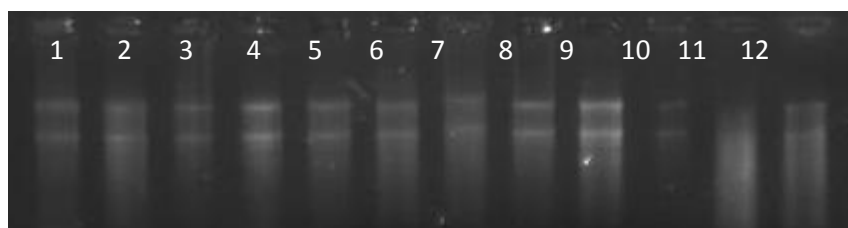


Figura 1. Eletroferograma em gel de agarose (1,5%) para verificar a qualidade dos RNA total das amostras: T - 1 e 2; 96 - 3 e 4; 96F - 5 e 6; 96P - 7, 8 e 10; 96A - 9, 11 e 12.

Para verificar a quantidade de RNA total, foram verificados os valores de absorvância pelo Nanodrop. As amostras com quantidades inferiores a 100 ng/ μ L e com valores de absorvância fora do intervalo 1,8 e 2,2 foram descartadas.

As amostras 10 e 11 foram descartadas por não atenderem os padrões de qualidade desejados. Juntou-se as demais repetições de cada tratamento de RNA total que apresentaram integridade para purificar em mRNA.

2.4.2 Purificação do mRNA

As amostras com qualidade e quantidade de RNA total foram utilizadas para obtenção mRNA. Pipetou-se o RNA total para um tubo de 1,5 mL livre de RNase e adicionou-se 250 μ L de água livre de RNase, 250 μ L de 2X solução de ligação e agitou-se brevemente. Adicionou-se 15 μ L do tampão oligo (dT) e agitou-se novamente. As amostras foram incubadas por 3 minutos em banho-maria, e mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas por 2 minutos a 16000 x g. O sobrenadante foi removido, deixando-se, aproximadamente, 50 μ L do mesmo para não perder a resina oligo (dT).

Ressuspendeu-se o *pellet* em 500 μ L de solução de lavagem por pipetagem. Colocou-se a suspensão dentro do filtro da coluna GenElute com o tubo acoplado e centrifugou por 2 minutos em rotação máxima. O líquido foi removido e novamente adicionou-se 500 μ L de solução de lavagem, centrifugando-a por 2 minutos em rotação máxima e transferiu-se a coluna para um novo tubo. Pipetou-se 80 μ L de solução de eluição quente (70°C) dentro da coluna, aqueceu-se o conjunto em banho maria por 3 minutos, sendo, em seguida, centrifugados por 1 min em rotação máxima. Para garantir a produtividade máxima, adicionou-se mais 80 μ L de solução de eluição quente e repetiu-se a etapa anterior. Descartou-se a coluna e, nessa etapa, as moléculas de poly (A)⁺ mRNA estão na solução de eluição no tubo coletor.

O mRNA foi concentrado pela adição de 1 μ L de glicogênio, 100 μ L de tampão de acetato de sódio 3M com pH 5,2, 3 volumes de etanol absoluto gelado e precipitado *overnight* a -20°C. Após precipitação, foi feita centrifugação de 20 min a 16000 x g. Um *pellet* visível foi formado. Cuidadosamente, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com etanol 70% centrifugando por 5 min a 16000 x g. Removeu-se o sobrenadante, o

pellet foi seco por 20 minutos, ressuspendido em 6 µL de água livre de RNase e armazenado a -70°C por no máximo quatro dias.

Esperava-se que o RNAm fosse de apenas de 3% a 5% do RNA total. Sendo assim, as amostras de mRNA foram concentradas com uso de glicogênio, de acordo com o protocolo do fabricante, para obter concentração de 2 µg em volume máximo de 4 µL para iniciar o kit de SSH.

Os mRNA obtidos foram utilizados na construção de seis bibliotecas subtrativas supressivas, em que os tratamentos T e 96 foram usados como “*driver*” (testemunhas) e os tratamentos 96F, 96P e 96A como os “*tester*”.

2.4.3 Híbridização subtrativa (SSH)

Para o preparo das bibliotecas subtrativas de supressão utilizou-se o kit PCR – Select™ cDNA subtraction (CLONTECH), segundo as instruções do fabricante.

Seis bibliotecas de cDNA foram construídas a partir dos mRNAs. As bibliotecas foram: sementes não inoculadas – sementes inoculadas com *F. verticillioides* por 96h (Biblioteca 1: TF); sementes não inoculadas – sementes inoculadas com *Penicillium spp.* por 96h (Biblioteca 2: TP); sementes não inoculadas – sementes inoculadas com *A. flavus* por 96h (Biblioteca 3: TA); sementes mantidas em contato com o meio BDA+manitol por 96 h sem presença de fungo - sementes inoculadas com *F. verticillioides* por 96h (Biblioteca 4: 96F); sementes mantidas em contato com o meio BDA+manitol por 96 h sem presença de fungo - sementes inoculadas com *Penicillium spp.* por 96h (Biblioteca 5: 96P); sementes mantidas em contato com o meio BDA+manitol por 96 h sem presença de fungo - sementes inoculadas com *A. flavus* por 96h (Biblioteca 6: 96A).

Os passos subsequentes à extração de RNA consistiram na síntese de cDNA fita simples e dupla, e digestão com a enzima RsaI (que reconhece um sítio de restrição no oligonucleotídeo poli T utilizado na transcrição

reversa e eventualmente em alguma porção do cDNA do fungo). Os fragmentos de cDNA gerados na digestão foram analisados em gel de agarose. Após a digestão, foram ligados adaptadores (1 e 2R) ao cDNA “tester” digerido e realizadas as hibridizações subtrativas e o PCR supressivo. Ao final, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose, sendo visualizados fragmentos de cDNA de diferentes tamanhos. Alguns desses genes foram posteriormente clonados e sequenciados.

2.4.3.1 Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira etapa da construção da biblioteca subtrativa consistiu na síntese de cDNA fita simples, a partir de 2 µg de mRNA. Para síntese do cDNA fita simples foram misturados 1 µL de cDNA Synthesis Primer (10 µL mol.L⁻¹) e água estéril para o volume final de 5 µL. Após incubação a 70°C por 2 minutos, em termociclador, e logo após 2 minutos no gelo, foram acrescentados a cada mistura, 2 µL de tampão da primeira fita [5x], 1 µL de Mix dNTP, 1 µL de água estéril e 1 µL de AMV Transcriptase reversa.

A reação, com volume final de 10 µL, foi incubada a 42 °C por 1 hora e 30 minutos, em termociclador, depois, tal reação foi colocada por 2 minutos em gelo para interromper a síntese da primeira fita de cDNA e, então, procedeu-se imediatamente a síntese da segunda fita de cDNA.

2.4.3.2 Síntese da segunda fita de cDNA

Imediatamente após a síntese dos cDNAs fita simples foram adicionados ao tubo: água deionizada 48,4 µL, 16 µL tampão de síntese da fita dupla 5X, 1,6 µL dNTP (10mM), 4 µL Cocktail 20X completando-se o volume final de 80 µL. Decorridas duas horas de incubação a 16 °C acrescentou-se 2 µL (6U) de T4 DNA polimerase. As amostras permaneceram a 16° C por mais 30 minutos. A seguir, a reação de síntese de DNA fita dupla foi interrompida adicionando-se 4 µL de EDTA/Glicogênio

20X. Em seguida, 100 µL de fenol: clorofórmio: isoamílico (25:24:1) foi adicionado, misturado e centrifugado (16000 x g /10min) a temperatura ambiente. O mesmo se repetiu com 100 µL de clorofórmio: isoamílico (24:1). Por fim, o cDNA foi precipitado com 40 µL acetato de amônio 4 M e 300 µL de etanol 95%. As amostras foram centrifugadas a 16000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado foi coberto com 0,5 mL de etanol 80%. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 16000 x g à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado e depois de seco, o precipitado foi ressuscitado em 50µL de água deionizada.

2.4.3.3 Digestão dos cDNAs com a enzima de restrição Rsa I

Os cDNA de ambas as amostras “*tester*” (tratamentos) e “*driver*” (testemunhas) foram digeridos com a enzima de restrição RsaI, com o objetivo de reduzir a complexidade dos fragmentos de cDNA fita dupla, apresentando extremidades abruptas, necessários para a ligação dos adaptadores e para gerar mais representações de cada cDNA para subtração.

Adicionou-se ao cDNA fita dupla 43,5 µL, tampão de restrição da enzima (10X) 5 µL, RsaI (10U/µL) 1,5 µL, obtendo volume final 50 µL. A digestão foi incubada a 37 °C por 1 hora e 30 minutos e 5 µL da reação foram separados para a análise da eficiência da digestão em gel de agarose 1,5% (m/v). Ao restante da reação, adicionou-se 2,5 µL do mix EDTA/Glicogênio 20X. Em seguida, foram adicionados 50 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugou-se a 16000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após remover o sobrenadante para um novo tubo, repetiu-se esse passo com 50 µL de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1.

A precipitação foi obtida adicionando-se 25 µL de NH₄O e 187,5 µL de etanol 95%, centrifugação 16000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. A lavagem foi feita com 200 µL de etanol 80% e centrifugação 16000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi

removido e o *pellet* foi seco em capela de fluxo laminar por 20 minutos, ressuspendido em 5,5 μL de água estéril e armazenado a -20°C .

2.4.3.4 Ligação dos adaptadores ao cDNA

Para a ligação dos adaptadores, alíquota de 1 μL das amostras de cDNA obtidas no item 2.2.3.4 (digeridas com Rsa I) foram diluídas com 5 μL de água esterilizada. Os adaptadores 1 e 2R foram ligados somente ao DNA-”tester”, ou seja, às moléculas obtidas na condição que se desejava obter genes diferencialmente expressos. Cada adaptador foi ligado em um tubo diferente. No tubo 1, ligação do adaptador 1, adicionou-se: Água deionizada 3 μL , Tampão de ligação 2 μL , T4 DNA ligase 1 μL , cDNA “tester” diluído 2 μL , Adaptador 1 2 μL , obtendo volume final 6 μL . A ligação do adaptador 2 foi feita no tubo 2 adicionando: Água deionizada 3 μL , Tampão de ligação 2 μL , T4 DNA ligase 1 μL , cDNA “tester” diluído 2 μL , Adaptador 2 2 μL , obtendo volume final 6 μL .

Os tubos foram mantidos a 16 $^{\circ}\text{C}$ por 18 horas. A ligação foi interrompida acrescentando-se 1 μL do mix EDTA/Glicogênio 20x e a ligase foi inativada por aquecimento a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Em seguida, as amostras “tester” 1 (ligada ao adaptador 1) e a “tester” 2 (ligada ao adaptador 2R), foram utilizados na primeira reação de hibridação.

2.4.3.5 Primeira Reação de Hibridização

À alíquota de 1,5 μL de cada tubo de “tester” (ligado ao adaptador 1 e ao 2R) foram adicionados: cDNA “driver” digerido com RsaI (desnaturado) 1,5 μL , tampão de hibridização 4X 1 μL , obtendo volume final 4 μL , estas desnaturadas a 98 $^{\circ}\text{C}$ por 1,5 minutos e mantidas por 8 horas a 68 $^{\circ}\text{C}$. Após esse período, os produtos da reação foram imediatamente utilizados para a segunda reação de hibridação. Nessa etapa, após a desnaturação, ocorrem o anelamento entre as sequências de cDNA fita simples presentes

nas amostras cDNAs “*tester*” e “*driver*”. Os cDNAs fita simples remanescentes, disponíveis para a segunda reação de hibridação, representam as sequências menos abundantes presentes nas duas populações. Dessa forma, ocorrem a equalização e o enriquecimento das sequências expressas diferencialmente nas sementes induzidas.

2.4.3.6 Segunda Reação de Hibridização

Os conteúdos dos tubos 1 e 2 provenientes da primeira hibridização foram unidos em um só tubo juntamente com mais 1,5 µL de “*driver*” desnaturado. Decorridas 12 horas de hibridização a 68 °C foram acrescentados 200 µL de tampão de diluição e as amostras foram mantidas por mais 7 minutos a 68 °C. A amostra foi incubada a -20 °C até o momento do uso nas reações de PCR.

2.4.3.7 Primeira Amplificação

Os cDNAs expressos diferencialmente nas sementes presentes no produto da segunda reação de hibridação foram amplificados seletivamente por PCR. Na primeira reação de amplificação, apenas os cDNAs dupla fita apresentaram em cada extremidade as sequências distintas de adaptadores amplificadas exponencialmente. A reação de amplificação foi feita com o produto da segunda reação de hibridação constituído pelo cDNA “*tester*” subtraído. As seguintes misturas de reação foram preparadas. Misturaram-se para amplificação da amostra subtraída: 1 µL de cDNA “*tester*” proveniente da segunda hibridação, 19,5 µL de água esterilizada, 2,5 µL de tampão de PCR, 0,5 µL DE dNTPs Mix, 1 µL de PCR primer 1 e 0,5 de Advantage cDNA Polymerase Mix.

As misturas de reação foram incubadas em termociclador a 75°C por 5 min para a extensão dos adaptadores. Imediatamente, foi realizada a amplificação utilizando-se o programa: 94°C por 25", seguido de 27 ciclos

de 94°C por 10" , 66°C por 30" e 72°C por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, 3 µL de cada produto do PCR foram misturados com 27 µL de água e as amostras, assim diluídas, foram utilizadas na segunda reação de amplificação.

2.4.3.8 Segunda Amplificação

Um segundo PCR (*nested* PCR) foi usado para eliminar um fragmento da sequência dos adaptadores e enriquecer genes diferencialmente expressos. Para as amplificações, utilizaram-se: 1 µL do produto PCR diluído (obtido para cada amostra conforme descrito no item 2.2.3.7) 18,5 µL de água esterilizada, 2,5 µL de tampão de PCR, 1 µL DE *Nested* PCR primer 1, 1 µL de *Nested* PCR primer 2R, dNTP mix e 0,5 µL de Advantage cDNA Polymerase Mix, obtendo volume final 25 µL.

A PCR foi mantida primeiramente por 5 minutos a 68°C para estender os adaptadores seguidos de 18 ciclos de desnaturação a 94°C por 10", 68 °C por 30" e 72 °C por 1,5 minutos em termociclador. Essa etapa possibilitou o enriquecimento das sequência de cDNAs expressas diferencialmente.

Para a visualização do produto da PCR (bandas correspondentes a genes expressos), as amostras e o controle do kit foram aplicadas em gel de poliacrilamida e submetidas à eletroforese (Figura 2).

Foi possível verificar que as bibliotecas geraram produtos de amplificação que variaram de tamanho de 100 pb a 1500 pb. Esses resultados eram esperados porque os cDNAs dupla-fita sintetizados de ambas as amostras foram digeridos com a enzima de restrição Rsa I, que realiza cortes frequente e gera fragmentos em média, de 500 pb. Isso reduz a complexidade dos fragmentos e gera mais representações de cada cDNA, evitando, dessa forma, que ocorra amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. Além disso, a cinética de hibridação de fragmentos desse tamanho é mais homogênea. Essa digestão também evita a formação

de híbridos complexos entre diversos cDNAs diferentes e, ainda, permite que um mesmo gene seja representado por diversos fragmentos na biblioteca, aumentando a probabilidade de ser clonado.

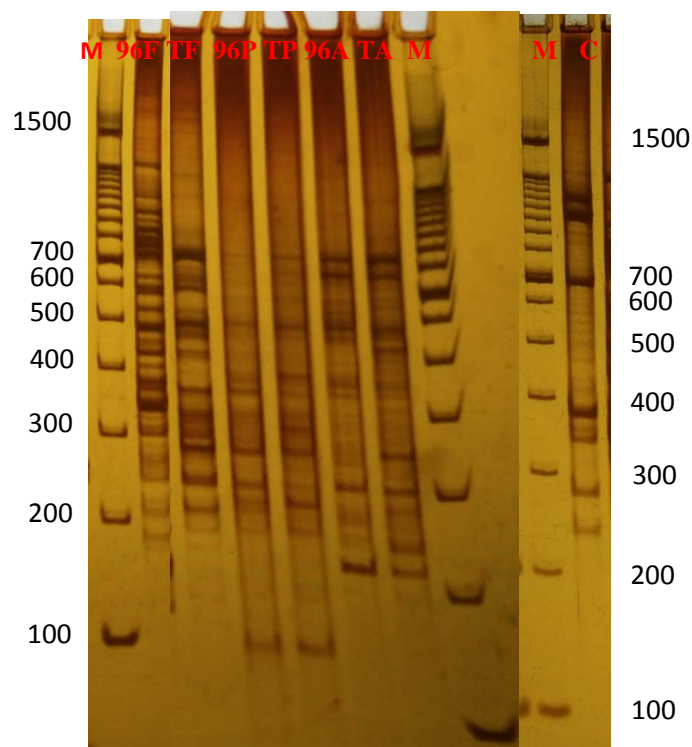


Figura 2 Gel de poliacrilamida de cDNAs obtidos após hibridação subtrativa por supressão, segunda amplificação por PCR, provenientes de sementes de milho. M: marcador 100 pb, TF: biblioteca 1: TP: biblioteca 2, TA: biblioteca 3, 96F: biblioteca 4, 96P: biblioteca 5, 96A: biblioteca 6, C: amostra controle do kit.

2.4.4 Clonagem das bibliotecas subtrativa

O produto final da hibridização de cada biblioteca foi clonado com vetor TOPO TA (Invitrogen TOPO TA Cloning Kit). Para a clonagem, foram adicionados 4 μ L do produto final da hibridação com 1 μ L de solução salina e 1 μ L do vetor. Os tubos foram preparados para cada biblioteca de

cDNA. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos e depois colocadas em gelo até a transformação.

2.4.5 Transformação

Depois da clonagem, as células *E. coli* foram transformadas, pela adição de 2 μ L da reação de clonagem aos tubos contendo 50 μ L of One Shot® Chemically Competent TOPO 10 *E. coli* e misturadas gentilmente. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e transferida para banho maria a 42°C para choque térmico por 40 segundos e, imediatamente, colocadas em gelo novamente. Em seguida, foram acrescentados 250 μ L de meio S.O.C (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 20 mM). Os tubos foram incubados em agitação a 228 x g por 1 hora e meia a 37°C.

Plaqueou-se, 100 e 150 μ L, de cada célula transformada em placas com LB, contendo 50 μ g de kanamicina e 40 mg/mL de x-gal em dimetilformamida. As placas foram mantidas a 37°C “*overnight*”.

2.4.6 Miniprep (QIAprep Spin Miniprep kit)

Todas as colônias brancas das placas foram selecionadas e colocadas em tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido com 10 μ L de kanamicina. Depois, foram incubadas a 37°C em agitação *overnight*. Após a incubação, foi realizada a miniprep para DNA plasmidial.

Os tubos foram centrifugados por 10 min a 5400 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 250 μ L de *buffer* P1 e transferido para um microtubo. Adicionou-se 250 μ L de *buffer* P2 que se misturou por inversão do tubo de 4 a 10 vezes até a solução ficar azul. Adicionou-se mais 300 μ L de *buffer* N3, que se misturou por inversão do tubo de 4 a 10 vezes até a solução ficar branca. Centrifugou-se em seguida por 10 minutos a 17900 x g, o sobrenadante foi transferido para uma coluna

e procedeu-se à nova centrifugação por 60 segundos em rotação máxima, a fim de o fluido passar pelo filtro. Descartou-se o líquido e as colunas foram lavadas com adição de 500 µL de *Buffer* PB com centrifugação em rotação máxima também por 60 segundos. Novamente, o líquido foi descartado e adicionou-se 750 µL de *Buffer* PE seguido de centrifugação por 60 segundos com rotação máxima. Descartou-se o líquido e centrifugou-se mais 1 minuto para se remover todo o *Buffer*.

A coluna foi transferida para um novo tubo. Para eluir o DNA da coluna foi adicionado 32 µL de *buffer* EB e deixou-se em repouso por 4 minutos, procedeu-se depois à centrifugação dos tubos por 2 minutos, descartou-se a coluna e o DNA foi armazenado a -20 °C.

2.4.7 Sequenciamento

Os plasmídios, contendo os fragmentos de interesse, foram enviados para sequenciamento para GENEWIZ Inc.(<http://www.genewiz.com/>), nos USA. Como iniciadores, foram utilizados os primers M13 *Reverse* e *Forward* e as reações de sequenciamento realizadas e analisadas no SEQ sequence e ABI chromatogram.

2.4.8 Análises das sequências de cDNA em bancos de dados

Os “*contigs*” foram montados com o uso do programa DNA Baser Sequence Assembler (<http://www.dnabaser.com/>), sendo os vetores extraídos desses “*contigs*” através da ferramenta VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Os “*contigs*” foram comparados com as sequências disponíveis no banco de dados “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), utilizando o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências encontradas foram utilizadas para identificar os genes correspondentes a cada EST analisado.

Foram selecionados quatro genes de interesse de cada uma das seis bibliotecas para análise da expressão gênica quantitativa.

2.4.9 Análises da expressão dos fragmentos por qRT-PCR

2.4.9.1 Tratamento das amostra de RNA total com DNase

As amostras de RNA total das testemunhas, T e 96, e dos tratamentos 96F, 96P e 96A foram tratadas com DNase DNA free (TURBO DNase – AMBION), seguindo o manual de instruções do fabricante, para eliminar o DNA genômico contaminante das amostras antes da síntese de cDNA.

Para obtenção de RNA livre de DNA foi utilizado 10 µg do RNA total sendo adicionados 1µL de DNase I + 10µL de tampão DNase 10x e completando a reação para 100 µL com água tratada com DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37° C por 30 min. Após esse período, foram adicionados 10 µL de acetato de potássio 2M e os tubos incubados em gelo por 15 minutos, centrifugados por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se etanol 100% equivalente a três vezes o volume do sobrenadante e o tubo foi mantido a -80°C por duas horas. Em seguida, centrifugou-se por 30 minutos a 4°C a 14000 xg. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 400µL de etanol 70%, agitando-se gentilmente o tubo para soltar o *pellet*. Centrifugou-se novamente por 10 minutos a 4°C a 14000 xg. Logo após, o sobrenadante foi descartado e os tubos deixados abertos para secar. Então, o RNA foi ressuspensionado em 20 µL de água DEPC.

Para verificar a pureza do RNA, após o tratamento com DNase, foi realizada PCR convencional, utilizando primers de controle endógeno proteína ubiquitina (UBI) e a álcool desidrogenase (ADH). Foram consideradas livres de DNA, as amostras que não apresentavam amplificação após a PCR. Essas amostras foram quantificadas no Nanodrop (RNA) e para verificar a qualidade do RNA correu-se um gel de agarose

1,5% com tampão TAE 1%, corou com brometo de etídeo (15 minutos) e avaliou as bandas no fotodocumentador.

2.4.9.2 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA, foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA *Reverse* Transcription (Applied Biosystems). Primeiramente, o RNA foi preparado à concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um mix contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 2 µL do primer RT Random Primers 10X, 0,8 µL do mix dNTP (100 mM), 1 µL MultiScribe™ *Reverse* Transcriptase, e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse mix. A síntese do cDNA foi realizada seguindo-se 10 minutos a 25°C para o anelamento dos primers; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 minutos a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

2.4.9.3 Ensaio de qRT-PCR

Selecionaram-se quatro genes que codificam proteínas, em cada uma das seis bibliotecas construídas, totalizando 24 genes a serem avaliados pela qRT-PCR. Os primers foram desenhados usando o programa *Primer Express Software* Version 3.0 (Applied Biosystems) e sintetizados pela SIGMA *Life Science*.

A quantificação da expressão gênica foi realizada no ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems), e utilizou-se o sistema de detecção *SYBR Green*. O cDNA foi obtido das amostras RNA total tratadas com DNase dos tratamentos T, 96, F, P e A, com repetição biológica.

Para cada reação, foi utilizado 1,0 μL de cDNA, 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. A amplificação dos fragmentos foi realizada com um ciclo inicial de 2 minutos a 50°C, desnaturação por 10 minutos a 95°C, seguida 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 Fast Software (Versão 2.1). Controles negativos, amostra de água livre de contaminantes usadas no lugar do cDNA, e curvas de melting foram incluídos em todas as análises.

Todo o experimento de qRT-PCR, para cada gene em estudo, foi conduzido a partir de cDNAs diferentes obtidos de cada amostra, com duas repetições biológicas e com três replicatas técnicas para cada, sendo os resultados normalizados usando CTs (Ciclo Threshold) obtidos pela expressão dos genes de normalizadores proteína ubiquitina (UBI) e a álcool desidrogenase (ADH).

O CT foi determinado pelo número de ciclos, no qual a fluorescência gerada dentro de reação cruza a linha de base (*threshold*). O método que foi usado foi o do CT comparativo.

Como um dos requisitos necessários para a utilização desse método foi realizado um experimento de validação para mostrar as eficiências de amplificação dos genes-alvo e dos controles endógenos. Para isso, foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da diluição do cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 1:5. A concentração de cada primer utilizado foi de 1,5 μM .

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{gene alvo}) - \text{CT}(\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{amostra}) - \Delta\text{CT}(\text{calibrador})$, sendo o calibrador, uma das amostras usada como base para resultados de expressão comparativa. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

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

2.5 Análise dos dados

Os dados das análises fisiológicas foram apresentados em tabelas de médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os dados da expressão relativa foram apresentados na forma de gráficos em barra. A análise dos resultados de expressão de cada gene é realizada de forma comparativa, sendo utilizada como calibrador a amostra com menor expressão para cada gene. Foi realizada a média entre as médias das repetições biológicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises dos testes fisiológicos das sementes de milho

Com base nos resultados observados para o fungo *A. flavus* não houve diferença significativa para o teste de primeira contagem de germinação e tetrazólio entre os tratamentos. Já para o teste de germinação, observa-se que as sementes inoculadas com esse fungo apresentaram menor porcentagem de plantas normais na medida em que aumentou o tempo de inoculação, após 48 e 96h, indicando que o fungo foi prejudicial ao desenvolvimento posterior das plântulas.

No teste de IVG, não foram observadas diferenças entre as sementes inoculadas com e sem o fungo, mas houve diferença em relação à testemunha, isso porque tais sementes não foram embebidas. A embebição das sementes no processo de infecção com o fungo pode ter agido como condicionamento fisiológico para os demais tratamentos. Verifica-se pelo

teste de sanidade que a inoculação foi eficiente, havendo diferenças significativas entre as sementes inoculadas e as não inoculadas, sendo que aquelas que foram inoculadas por 96 horas apresentaram maior % de infecção (Tabela 1). Esses resultados foram confirmados pelo maior número de plântulas “anormais” infeccionadas observadas durante a avaliação do teste de germinação.

Tabela 1. Valores médios (%) de primeira contagem, germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVG), sanidade e sementes viáveis (TZ) de sementes de milho inoculadas ou não com *A. flavus* por 48 e 96 horas.

Tratamentos	1° contagem	G	Sanidade	TZ	IVG
Testemunha	94 A	98 A	0 D	97 A	10,8 B
48 s/fungo	97 A	98 A	1 D	97 A	12,9 A
96 s/fungo	93 A	96 A	10 C	97 A	13,63 A
48 c/fungo	94 A	93 B	69 B	99 A	12,58 A
96 c/fungo	91 A	90 C	78 A	92 A	14,57 A
CV	3,24	2,34	14,19	2,73	7,14

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada teste, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os resultados observados para o fungo *F. verticillioides* foram semelhantes em relação ao fungo anterior, uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos testes de primeira contagem de germinação e tetrazólio. Observou-se que as sementes inoculadas com fungos, por 96 horas, apresentaram menor porcentagem de plântulas normais avaliadas no teste de germinação. Isso permite inferir que o fungo *F. verticillioides* é prejudicial à qualidade do lote de sementes a partir de certo nível de infecção. No teste de IVG não houve diferença significativa entre as sementes inoculadas com o fungo e as sementes que foram embebidas em meio sem o fungo. A diferença significativa observada no teste de IVG em relação a testemunha pode ser atribuída ao fato delas não terem sido embebidas, assim como comentado anteriormente para o *A. flavus*. Verificase pelo teste de sanidade que a inoculação foi altamente eficiente, observando 100% de sementes de milho infectadas, ao serem mantidas por 96 horas em contato com o fungo (Tabela 2).

Goulart e Fialho (1998) verificaram que a presença de *F. moniliforme*, em altas incidências nas sementes de milho, pode provocar redução do poder germinativo, bem como produzir toxinas para mamíferos e aves. Em trabalho realizado com sementes de feijão, Costa et al. (2003) observaram diminuição da germinação à medida que aumentou o tempo de permanência das sementes em contato com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Machado et al. (2001a), em trabalho realizado com sementes de milho, observaram maiores percentuais de plantas com lesões causadas por *F. verticillioides* nos testes de germinação e emergência das plântulas, nos tratamentos em que houve maior período de contato das sementes com a colônia desse fungo.

Tabela 2. Valores médios (%) de primeira contagem, germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVG), sanidade e sementes viáveis (TZ) de sementes de milho inoculadas ou não com *F. verticillioides* por 48 e 96 horas.

Tratamentos	1° contagem	G	Sanidade	TZ	IVG
Testemunha	94 A	98 A	0 C	97 A	10,8 B
48 s/fungo	97 A	98 A	2 C	97 A	12,9 A
96 s/fungo	93 A	95 A	5 C	97 A	13,6 A
48 c/fungo	95 A	96 A	90 B	98 A	12,5 A
96 c/fungo	92 A	91 B	100 A	99 A	13,5 A
CV	3,73	2,37	14,67	2,59	5,02

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada teste, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em relação ao fungo *Penicillium spp.*, verificou-se que apenas o teste de primeira contagem não foi significativo entre os tratamentos. Esse fungo parece ser mais agressivo em relação aos anteriores, uma vez que houve efeito imediato da inoculação na viabilidade das sementes inoculadas. Apesar de observada no teste de sanidade diferença significativa entre os tratamentos inoculados e não inoculados, a porcentagem de sementes contaminadas foi de 24% apenas. Mesmo com essa menor porcentagem de contaminação, observou-se, pelo teste de germinação, as maiores médias de plântulas normais em sementes não inoculadas. No teste de tetrazólio,

verificou-se o maior número de sementes não viáveis nas sementes inoculadas por 96 horas. Observou-se, no teste de IVG, que as sementes inoculadas com o fungo por 48 e 96 horas tiveram menor vigor (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios (%) de primeira contagem, germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVG), sanidade e sementes viáveis (TZ) de sementes de milho inoculadas ou não com *Penicillium sp* por 48 e 96 horas .

Tratamentos	1° contagem	G	Sanidade	TZ	IVG
Testemunha	94 A	98 A	0 B	97 A	10,8 B
48 s/fungo	97 A	98 A	0 B	97 A	12,9 A
96 s/fungo	93 A	95 A	0 B	97 A	13,6 A
48 c/fungo	97 A	93 B	24 A	98 A	10,9 B
96 c/fungo	91 A	91 B	27 A	93 B	10,7 B
CV	3,71	2,12	27	2,45	5,73

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada teste, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Lucca Filho (1984) afirma que espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* podem contribuir para a redução do poder germinativo, sendo essa redução mais acentuada ao longo do armazenamento das sementes. *F. moniliforme* também pode inibir o desenvolvimento de raízes das plântulas devido ao fato de o fungo sintetizar toxina no endosperma da semente de milho (MACHADO, 2000).

3.2 Bibliotecas subtrativas supressivas

Biblioteca 1 (TF)

Na biblioteca 1, foi analisada a expressão diferencial entre sementes secas de milho e sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides* em meio de restrição hídrica. Genes codificadores de proteínas relacionadas com a tolerância a estresse e relacionados com o início da germinação eram esperados nessa biblioteca.

Observa-se que muitas proteínas hipotéticas, proteínas estas que correspondem a genes com funções desconhecidas, foram encontradas nessa biblioteca (tabela 4). Isso sugere que essas proteínas possam desempenhar papéis importantes na resposta ao estresse. No entanto, mais estudos são necessários para descrever essas proteínas e caracterizar sua função. Também foram encontrados alguns clones do genoma do milho que podem ou não estarem relacionados com a presença de fungo nas sementes.

Apenas dois genes codificadores de proteínas foram encontrados, parcialmente, o que dificulta compreensão ampla do mecanismo de resposta ao estresse que ocorre nas plantas testadas. Entretanto, para esses genes, encontram-se algumas informações na literatura, discutidos a seguir.

Tabela 4 Lista dos ESTs da biblioteca TF que tiveram similaridade com as sequências depositadas no NCBI. O número de acesso das sequências encontradas pelo BLAST, a quantidade de ESTs semelhante à mesma sequência (N°), E-value e nome da sequência listada são apresentados.

N° de acesso	N°	E-value	Nome
S94464.1	1	0.0	Polyubiquitin [<i>maize</i> , Genomic, 3841 nt]
XM_002458486.1	8	0.0	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA
EU958272.1	2	2e-146	<i>Zea mays</i> clone 1682540 hypothetical protein mRNA
X63429.1	2	0.0	<i>P.miliaceum</i> mRNA for aspartate aminotransferase (pcAAT2)
EU965717.1	2	0.0	<i>Zea mays</i> clone 288248 protein translation factor SUI1 mRNA, complete cds
AY664416.1	3	0.0	<i>Zea mays</i> cultivar Mo17 locus bz, complete sequence
NM_001154149.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> metallothionein-like protein type 2 (LOC100281230), mRNA >
DQ244216.1	1	3e-104	<i>Zea mays</i> clone 3516 mRNA sequence

Poliubiquitina

Transcritos poliubiquitina acumulam nas células vegetais e animais após um choque de calor. A maioria das espécies tem pouco dos vários genes da poliubiquitina. Dentro de uma espécie, os genes podem diferir em

sequência de nucleótidos e/ou número de repetições de 228 nucleotídeos que codificam o monômero ubiquitina (LIU et al., 1996).

De acordo com Christensen, Sharrock e Quail (1992), a utilização de sondas de oligonucleótidos específicos transcrição mostra que Ubi-1 e Ubi-2 são expressos constitutivamente a 25 °C, mas são indutíveis para níveis mais elevados a temperaturas elevadas em plântulas de milho. Ambos os genes contêm um intron na região 5' não traduzida que é ineficientemente processado na sequência de uma breve choque térmico, grave. Com isso, maior expressão desse gene em sementes de milho seja esperada em situação de estresse.

Aspartato aminotransferase (PcAAT2)

As isozimas citosólicas e mitocondriais de aspartato aminotransferase têm função no ciclo fotossintético em plantas tipo C4 e são expressos em níveis elevados em células mesofílicas e células da bainha do feixe, respectivamente (TANIGUCHI et al., 1992).

Biblioteca 2 (TP)

Nessa biblioteca, estudou-se a expressão diferencial entre sementes secas de milho e sementes de milho inoculadas com *Penicillium spp.*, por meio de restrição hídrica, também foram analisados os genes codificadores de proteínas relacionadas com a tolerância a estresse e relacionados com o início da germinação (Tabela 5).

Foram identificados também nessa biblioteca 2, assim como na biblioteca 1, os genes aspartato aminotransferase e poliubiquitina como genes diferencialmente expressos em sementes inoculadas com fungo quando hibridizadas com sementes sem fungos. Infere-se, então, que independente do fungo estudado, seja *F. verticillioides* ou *Penicillium spp.* o gene aspartato e poliubiquitina tem expressão diferenciada na sementes de

milho na presença de pelo menos um desses fungos. Observaram-se também alguns clones do genoma do milho e proteína hipotética.

Tabela 5 Lista dos ESTs da biblioteca TP que tiveram similaridade com as sequências depositadas no NCBI. O número de acesso das sequências encontradas pelo BLAST, a quantidade de ESTs semelhante à mesma sequência (N°), E-value e nome da sequência listada são apresentados.

N° de acesso	N°	E-value	Nome
X63429.1	2	0.0	<i>P.miliaceum</i> mRNA for aspartate aminotransferase (pcAAT2)
AY787873.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> zinc finger protein (znfl) mRNA, complete cds
AY105581.2	1	3e-155	<i>Zea mays</i> PCO150618 mRNA sequence
EU947831.1	1	3e-175	<i>Zea mays</i> clone 361523 mRNA sequence
EU958272.1	1	4e-148	<i>Zea mays</i> clone 1682540 hypothetical protein mRNA
AY107449.2	1	0.0	<i>Zea mays</i> PCO136884 mRNA sequence
S94464.1	1	0.0	polyubiquitin [maize, Genomic, 3841 nt]
EU946611.1	1	1e-97	<i>Zea mays</i> clone 319000 mRNA sequence
BT016854.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> clone Contig687 mRNA sequence
BT084617.1	1	1e-124	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFb0146E13 mRNA, complete cds
EU965717.1	1	8e-111	<i>Zea mays</i> clone 288248 protein translation factor SUI1 mRNA
NM_001153580.1	1	1e89	<i>Zea mays</i> protein SPATULA (LOC100280662), mRNA gb EU953163.1 <i>Zea mays</i> clone 1387693 protein SPATULA mRNA, complete cds
EU961250.1	1	1e-109	<i>Zea mays</i> clone 233823 mRNA sequence
AY105939.1	1	2e-163	<i>Zea mays</i> PCO150588 mRNA sequence
BT024006.1	1	2e-152	<i>Zea mays</i> clone EL01N0311H08 mRNA sequence

Zinc finger (znfl)

Esse é um gene que codifica proteínas hidrófilas e está relacionado à desidratação. Estudos mostram a relação da expressão desse gene em *Arabidopsis* AtDi19 codifica um novo tipo de Cys2/His2 proteína dedo de zinco-implicado em ABA-independente da desidratação, estresse salinidade alta e via de sinalização de luz (MILLA; TOWNSEND; CUSHMAN, 2006).

Proteína SPATULA (SPT)

Espátula é um fator de transcrição bHLH, que promove o crescimento de tecidos resultantes das margens do carpelo, incluindo o septo e o canal de transmissão. Esse gene também está envolvido na repressão germinação de sementes recém-colhidas e na expansão dos cotilédones inibindo, folha e pétala (GROSZMANN *et al.*, 2010).

Biblioteca 3 (TA)

A expressão diferencial entre sementes secas de milho e sementes de milho inoculadas com *Aspergillus flavus* por meio de restrição hídrica foi verificada na biblioteca 3 (Tabela 6). Identificou-se novamente como genes diferencialmente expressos os genes aspartato aminotransferase e ADH na biblioteca 3, aumentando as evidências de que tais genes podem ser estudados, através da expressão, para identificar a presença de fungos nas sementes.

Proteínas hipotéticas e clones do genoma do milho também foram encontrados nessa biblioteca. A identificação dos mesmos genes nas diferentes bibliotecas é um fator positivo, pois comprova que realmente são genes diferencialmente expressos, entretanto, isso dificulta a marcação de um gene específico para cada espécie de fungo.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPC)

Gene citosólico, de desenvolvimento de semente de milho, que é codificado por pequena família de multi-gene consistindo de gpc 1, gpc2, gpc3 e Gpc4. As proteínas GPC3/4 são sintetizadas nas raízes durante condições anóxicas e é conhecido por ser um dos polipéptidos das vias anaeróbias (MANJUNATH; SACHS, 1997).

Gene Fer1

É um gene relacionado ao sistema de captação de alta afinidade de ferro, permitindo a permeabilidade desse elemento. Eichhorn et al. (2006) verificaram que durante o desenvolvimento patogênico, a expressão *fer1* foi confinada a fase de proliferação de hifas no interior da planta. Esses dados evidenciam a importância do sistema de captação de alta afinidade de ferro através de permeabilidade e de oxidação de ferro para o desenvolvimento biotrófico no patossistema *Ustilago maydis*/milho.

Tabela 6 Lista dos ESTs da biblioteca TA que tiveram similaridade com as sequências depositadas no NCBI. O número de acesso das sequências encontradas pelo BLAST, a quantidade de ESTs semelhante à mesma sequência (N°), E-value e nome da sequência listada são apresentados.

N° de acesso	N°	E-value	Nome
L13431.1	4	0.0	<i>Zea mays</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, partial CDs
EU948432.1	1	2e-174	<i>Zea mays</i> clone 375733 mRNA sequence
BT017267.1	2	0.0	<i>Zea mays</i> clone EL01N0310G10.c mRNA sequence
X63429.1	2	0.0	<i>P.miliaceum</i> mRNA for aspartate aminotransferase (<i>pcAAT2</i>)
EU955397.1	2	2e-74	<i>Zea mays</i> clone 1530817 mRNA sequence
AY112407.1	2	1e-100	<i>Zea mays</i> CL3918_1 mRNA sequence
EU953492.1	1	3e-142	<i>Zea mays</i> clone 1424191 mRNA sequence
EU948823.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> clone 386492 mRNA sequence
X83076.1	1	1e-144	<i>Z.mays</i> Fer1 gene
NM_001157595.1	3	0.0	<i>Zea mays</i> LOC100284700 (<i>pco142662</i>), mRNA >gb EU969379.1 <i>Zea mays</i> clone 329471 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 mRNA, complete cds
NM_001111939.1	1	2e-124	<i>Zea mays</i> alcohol dehydrogenase 1 (<i>adh1</i>), mRNA >emb X00580.1 Maize Adh1-F mRNA for alcohol dehydrogenase
XM_002461117.1	4	0.0	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA
AY103601.1	1	2e-152	<i>Zea mays</i> PCO144994 mRNA sequence
AY112180.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> CL40542_1 mRNA sequence
EU977079.1	1	1e-54	<i>Zea mays</i> clone 998432 mRNA sequence

U. maydis é o único fungo patogênico em que a oxidação e a permeabilidade de ferro são necessárias para a virulência. A esse respeito, *U. maydis* é semelhante ao fungo patogênico *C. albicans*, em que duas permeases de alta afinidade de ferro, Ca FTR1 e Ca FTR2, foram identificados e um destes, Ca FTR2, mostrou-se essencial para a patogenicidade em um modelo do rato para infecção sistêmica (RAMANAN; WANG, 2000). Curiosamente, o sistema de captação de sideróforo de *C. albicans* foi subseqüentemente demonstrado que desempenha um papel na invasão epitelial e penetração (HEYMANN et al., 2002). No ser humano, o patógeno *Aspergillus fumigatus*, causa a biossíntese de sideróforos também é essencial para a virulência, enquanto o sistema de assimilação redutora de ferro não é necessário (SCHRETTL et al., 2004). Sendo assim, esse gene pode ser considerado um bom marcador para identificação específica do gênero *Aspergillus* em sementes de milho.

Proteassoma

O proteassoma é a principal enzima proteolítica que funciona no sistema de ubiquitina-proteassoma. O proteassoma 26S tem complexos de subunidades de multi-protease constituídos por subunidades 20S compostos de numerados de quatro a sete anéis com dois anéis exteriores, contendo subunidades alfa e dois anéis centrais compostos de subunidades beta, e os tampões de 19S 6 ATPase e 11 ATPase não-subunidades (SATO et al., 2009).

Biblioteca 4 (96F)

Na biblioteca 4, a expressão diferencial entre sementes de milho mantidas em meio BDA mais manitol por 96 horas e sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides* por meio de restrição hídrica, foram analisadas, e genes codificadores de proteínas relacionadas com a tolerância a estresse eram esperados nessa biblioteca (Tabela 7).

Nas bibliotecas 4, 5 e 6 não se esperavam genes codificadores de proteínas relacionados à germinação, pois a testemunha (“*driver*”) teve as mesmas condições de embebição dos tratamentos (“*tester*”) para tentar anular essa diferença.

Tabela 7 Lista dos ESTs da biblioteca 96F que tiveram similaridade com as sequências depositadas no NCBI. O número de acesso das sequências encontradas pelo BLAST, a quantidade de ESTs semelhante à mesma sequência (N°), E-value e nome da sequência listada são apresentados.

N° de acesso	N°	E-value	Nome
EU958272.1	27	2e-145	<i>Zea mays</i> clone 1682540 hypothetical protein mRNA
NM_001159139.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> anthranilate synthase component II (LOC100286252), mRNA >gb EU976443.1 <i>Zea mays</i> clone 894529 anthranilate synthase component II mRNA, complete cds
XM_002460685.1	7	0.0	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA
NM_001111910.1	3	4e-147	<i>Zea mays</i> vacuolar proton pump homolog1 (vpp1), mRNA >emb AJ715528.1 <i>Zea mays</i> mRNA for vacuolar H ⁺ -translocating inorganic pyrophosphatase (vpp1 gene)
DQ430734.1	3	0.0	Uncultured eukaryote clone biogas-DE-e11 18S ribosomal RNA gene
BT065851.1	1	1e-101	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFc0140D23 mRNA, complete cds
EU338354.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> cultivar W22 bz gene locus, complete sequence
AY110412.1	1	3e-113	<i>Zea mays</i> CL56178_1 mRNA sequence
AC190571.5	1	9e-156	<i>Zea mays</i> BAC clone CH201-151G9 from chromosome 5, complete sequence

Destaca-se para essa biblioteca a grande expressão de proteínas hipotéticas, sendo que, dentro dos 45 ESTs, 27 foram proteínas hipotéticas do milho e 7 proteínas hipotéticas do sorgo. Isso indica a grande possibilidade dessas proteínas, com funções ainda desconhecidas, estarem relacionadas à presença do fungo nas sementes de milho. Também observou

- se nessa biblioteca alguns clones do genoma do milho e a identificação de um gene de cultura não eucariótica, o gene 18S ribossomal biogás-DEe11.

Antranilato sintase

Antranilato é um metabolito de defesa, cujo acúmulo é promovido pelo gene ZmPep1 (ortólogo de Arabidopsis elicitor peptide 1). Huffaker et al. (2011) concluíram em seu trabalho que os peptídeos pertencentes à família Pep têm função conservada entre as espécies de plantas como reguladores endógenos de imunidade inata e podem ter potencial para melhorar a resistência a doenças em culturas.

H⁺ pirofosfatase de translocação (H⁺-ADPG)

Yue et al. (2008) clonaram um cDNA que codifica um putativo H⁺ pirofosfatase de translocação (H⁺-ADPG) a partir de *Zea mays* por SSH acoplado com silício em abordagem de clonagem. Concluiu-se com os ensaios de qRT-PCR que a expressão do gene foi regulada sobre as raízes de plântulas de milho sob estresses de desidratação, frio e altas concentrações salinas. Esses resultados sugerem que o produto desse gene pode desempenhar um papel importante na tolerância ao estresse abiótico de *Z. mays*.

Biblioteca 5 (96P)

A expressão diferencial entre sementes de milho mantidas em meio BDA mais manitol por 96 horas e sementes de milho inoculadas com *Penicillium spp.*, por meio de restrição hídrica, foram analisadas na biblioteca 5, e genes codificadores de proteínas relacionadas com a tolerância a estresse eram esperados nessa biblioteca (Tabela 8).

Tabela 8 Lista dos ESTs da biblioteca 96P que tiveram similaridade com as sequências depositadas no NCBI. O número de acesso das sequências encontradas pelo BLAST, a quantidade de ESTs semelhante à mesma sequência (N°), E-value e nome da sequência listada são apresentados.

N° de acesso	N°	E-value	Nome
DQ244216.1	2	2e-120	<i>Zea mays</i> clone 3516 mRNA sequence
JN375330.1	1	0.0	<i>P. dactylifera</i> mitochondrion, complete.
XM_002440165.1	3	2e-140	<i>S. bicolor</i> hypothetical protein, mRNA
X82185.1	1	0.0	<i>Z.mays</i> mRNA for cysteine proteinase
AY104121.1	2	4e-154	<i>Zea mays</i> PCO141133 mRNA sequence
EU958272.1	2	3e-149	<i>Zea mays</i> clone 1682540 hypothetical protein mRNA
EU954083.1	1	2e-106	<i>Zea mays</i> clone 1454388 TPR repeat region family protein mRNA
S94464.1	2	0.0	polyubiquitin [maize, Genomic, 3841 nt]
NM_001254879.1	1	1e-153	<i>Zea mays</i> catalase isozyme B (LOC100857004), mRNA >gb EU976806.1 <i>Zea mays</i> clone 990656 catalase isozyme B mRNA, complete CDs
EU966239.1	1	3e-143	<i>Zea mays</i> clone 292774 mRNA sequence
NM_001159242.1	1	4e-55	<i>Zea mays</i> TPD1 (LOC100286355), mRNA >gb EU976983.1 <i>Zea mays</i> clone 995409 TPD1 mRNA, complete CDs
NM_001112426.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> enolase1 (eno1), mRNA >emb X55981.1
AC157319.2	1	0.0	<i>Z. mays</i> clone ZMMBBb-136E2, complete
BT054939.1	1	2e-133	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFc0076N03 mRNA, complete cds
EU946108.1	1	2e-10	<i>Zea mays</i> clone 296978 mRNA sequence
EU965065.1	1	0.0	<i>Z. mays</i> clone 283548 aquaporin PIP1.1 mRNA
AY883559.2	1	0.0	<i>Zea mays</i> cultivar inbred line B73 teosinte glume architecture 1 (tga1) gene
EU965717.1	1	6e-68	<i>Zea mays</i> clone 288248 protein translation factor SUI1 mRNA
EU974540.1	1	8e-137	<i>Zea mays</i> clone 452148 mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 mRNA, complete cds.

Verificaram-se, também, na biblioteca 5, os genes da poliubiquitina, clone do genoma do milho e proteínas hipotéticas, confirmando, mais uma vez, a diferença na expressão desses genes entre sementes infectadas com fungos hibridizadas com sementes sem o fungo. Além desses genes, outros exclusivos para essa biblioteca também foram encontrados como; proteinase cisteína, catalase, enolase, aquaporina e um gene nuclear para produto mitocondrial.

Protease Cisteína (ccp1)

Essa proteína está relacionada aos processos fisio-patogênico, em que sua maior expressão provavelmente está envolvida com a resposta do milho à infecção do fungo. Gramkow e Welzel (2010) concluíram que a expressão de proteases em larvas infectadas resulta na destruição dos tecidos internos em estágios tardios da infecção, podendo ser uma das razões para o aumento da velocidade para matar as larvas de *S. frugiperda*. Os transcritos mais abundantes encontrados foram para proteases celulares, que estão provavelmente envolvidas na resposta do inseto à infecção viral.

Domoto et al. (1995), em estudos sobre essa proteína, observaram a relação da mesma com processo germinativo e concluíram que o mRNA CCP1 se expressa em sementes de milho maduros, embora essa expressão atinja um máximo de 5 dias após o início da germinação.

Catalase

É uma enzima removedora de peróxidos e a diminuição da sua expressão pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O₂ e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana e a produção de produtos de peroxidação de lipídeos secundários. Isso foi observado por Gomes et al. (2000), em pesquisa, na qual a enzima catalase apresentou uma diminuição na intensidade e no número de bandas, a partir das 48 horas de envelhecimento acelerado, para a maioria dos híbridos e para todas as seis linhagens estudadas.

Enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) (Gene eno1)

Enolase é uma enzima essencial na glicólise. Catalisa a interconversão de 2-fosfoglicerato para PEP. A enzima é extensivamente caracterizadas em levedura (LEBIODA et al., 1989) e em vertebrados (GIALLONGO et al., 1986).

Segundo Lal et al. (1998), a atividade da enzima enolase e níveis de transcrição do gene eno1 são induzidos por estresse anaeróbico em raízes de milho.

Aquaporina

A aquaporina representa uma classe de proteínas integrantes da membrana que facilita a difusão passiva da água através da membrana das células. O estresse hídrico apresenta uma forte influência na expressão do gene que codifica a aquaporina (BAIGES et al. 2002), seja na sua indução seja na sua repressão.

Rabello et al. (2007) confirmaram isso em estudos com análise *in silico* de aquaporinas potencialmente envolvidas com o estresse hídrico nas interações café- e citros-*Xylella fastidiosa*.

Gene nuclear para produto mitocondrial

Jia et al. (2006) trabalharam com cDNA completos de milho em análise do perfil de expressão de 2.073 de comprimento total de cDNAs induzida pelo estresse em mudas de milho e identificaram esse gene nuclear para produto mitocondrial como resposta ao estresse hídrico das plântulas.

Biblioteca 6 (96A)

Na biblioteca 6, a expressão diferencial entre sementes de milho mantidas em meio BDA mais manitol por 96 horas e sementes de milho inoculadas com *A. flavus* por meio de restrição hídrica, foram analisadas, e

genes codificadores de proteínas relacionadas com a tolerância a estresse eram esperados nessa biblioteca (Tabela 9).

Tabela 9 Lista dos ESTs da biblioteca 96A que tiveram similaridade com as sequências depositadas no NCBI. O número de acesso das sequências encontradas pelo BLAST, a quantidade de ESTs semelhante à mesma sequência (N°), E-value e nome da sequência listada são apresentados.

N° de acesso	N°	E- value	Nome
JF266576.1	3	0.0	<i>Z. mays</i> cultivar everta Sturt glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpc4) mRNA, comp. CDs
Z29512.1	2	5e-19	<i>Z.mays</i> mRNA for group 3 Lea protein MGL3
EU964153.1.	1	1e-67	<i>Zea mays</i> clone 276247 hypothetical protein mRNA, complete cds
NM_001112 234.1	1	0.0	<i>Zea mays</i> superoxide dismutase 4 (sod4), mRNA
NM_001112 463.1	2	0.0	<i>Zea mays</i> elongation factor alpha2 (elfa2), mRNA
AP007164.1	2	3e-128	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 DNA, C111
NM_001111 858.1	1	2e-99	<i>Z. mays</i> malate synthase1 (mas1), mRNA
EU951811.1	1	7e-152	<i>Zea mays</i> clone 1061026 metallothionein-like protein type 2 mRNA, complete cds
NM_001147 752.1	2	0.0	<i>Zea mays</i> LOC100273311 (pco118382), mRNA >gb BT040760.1 <i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFc0125K04 mRNA, compl. Cds

Evidenciando, mais uma vez, o gene GPC apareceu nessa biblioteca como gene diferencialmente expresso quando se hidridizou sementes sem fungo com sementes com *A. flavus*. Clones do genoma do milho e proteínas hipotéticas também foram identificados nessa biblioteca. Identificou-se ainda alta similaridade com genes do gênero *Aspergillus*, podendo este ser um ESTs específico para identificação desse gênero.

LEA proteína (MGL3)

A sigla LEA (embriogênese tardia abundante) pode ser entendida como proteínas relacionadas com respostas a tolerância a algum estresse em plantas, que se acumulam desordenadamente nos organismos durante o desenvolvimento de tolerância ao estresse, à desidratação e à aclimação ao frio (SINGH et al., 2009).

Apesar de tudo, os mecanismos pelos quais ocorre a proteção não são totalmente compreendidos. De acordo com Amara et al. (2012), são vários os grupos de LEA e há diversidade funcional entre os grupos LEA em milho.

Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que desempenha importante papel na resposta ao estresse oxidativo nas plantas, atuando sobre o radical O^{2-} , formando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Isso ocorre durante o processo de deterioração das sementes (MUNIZ et al., 2007).

Malato sintase

Malato sintase é uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e envolvidas no metabolismo de lipídios. As atividades dessa enzima aumentam durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo de lipídios degradados que são convertidos em sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994).

3.3 Análises de qRT-PCR

A utilização de métodos complementares, tais como métodos quantitativos e semi-quantitativos de PCR, para validar os resultados SSH é uma prática comum em estudos recentes, selecionando um ou mais genes (DEOKAR et al., 2001; PRABU et al., 2010; SAHU; SHAW, 2009).

Para validar a expressão diferencial detectada pela técnica SSH em sementes milho hibridizadas com sementes de milho infectadas com fungo, foi realizado qRT-PCR para seleção de genes codificadores de proteínas a partir de cada biblioteca. Foram selecionados quatro genes de cada biblioteca e através do programa Primer Express 3.0 foram desenhados os primers para serem sintetizados. Os genes codificadores de proteínas selecionados, a biblioteca respectiva e a sequência do primer estão listados na Tabela 10.

Tabela 10 Lista dos genes codificadores de proteínas selecionados de cada biblioteca para análise da expressão gênica em qRT-PCR. São apresentados os genes, as respectivas bibliotecas (B), os primers forwars e *reverse* e tamanho do amplicon (TA).

B	Gene	Primer <i>Forward</i> (5'-3')	Primer <i>Reverse</i> (5'-3')
1	Polyubiquitin	TGGTTTTTCCAGT CAGGGTCTT	CGAGGTACCCTTC ACCTTGTTTC
1	<i>Zea mays</i> clone 1682540 hypothetical protein	GCGACCGAGGTA CTAGGTTGAAT	CCGTCGTGAGAC AGGTTAGTTTTAC
1	<i>Zea mays</i> metallothionein- like protein type 2	GCAGTGTCGTTTG TTGTGTTTTG	GATAGAGCGAGG CATGCTATGC
1	<i>Zea mays</i> clone 3516 mRNA	ATAGGAGGAGCA CAAGAAAGCAA	TCCAACCAACGG GAGAAGAG
2	<i>P.miliaceum</i> Aspartate aminotransferase (pcAAT2)	GCCAACACGCTCT CCATACA	TTGTTGCTGATGG TGGTGAAC
2	<i>Zea mays</i> zinc finger protein (znf1)	TAGCCCGCCTCCG AGAA	CATAGCCAACAT GCAAATCATTIT
2	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFb0146E13	CAGCTGCCAGTTT GTTCTTGAC	CCAGCTTCTGATA AGTTGCTTCTCTA
2	<i>Zea mays</i> protein SPATULA	ACCGACAAAGTT TCCATGCTAGA	CCATGACCAGCA TCTGAAGCT
3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CGGTATTGTTGAG GGTCTGATG	CACCCCTCCAGTC CTTAGATGA
3	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein	GGACAAGAAGGC AGCTGATGA	GAGGATTTACCA CTTTCTTTCTTTTT AGAA
3	<i>Zea mays</i> Fer1	GCCACATAAGGA CGCTGAGTTC	GCCACATAAGGA CGCTGAGTTC
3	<i>Zea mays</i> alcohol dehydrogenase1 (adh1)	CCCACCAGCACA GCAACA	GCACTGGCAACA TTAATGCTATG
4	<i>Zea mays</i> clone 1682540 hypothetical protein	ACCGTCGTGAGA CAGGTTAGTTTT	GGCCGAGGTACT AGGTTGAATTACT AT
4	<i>Zea mays</i> anthranilate synthase component II	GACAGCTTCACCT ACAACCTATGC	TTGGGTTCTTCTCT CTTACATCTTCT

4	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH-12_01_B03_T3	GCAGCCAAGCGT TCATAGC	CACTTGGTGAATT CTGCTTCTCA
4	<i>Zea mays</i> vacuolar proton pump homolog1 (vpp1)	GCCCGGGCAGGT ACTCA	CTTGTGTGTGGCG GTTGGT
5	<i>Zea mays</i> clone 452148 nuclear gene for mitochondrial product	CACCTGCCAATAC TTTGAAACACA	AAAAAAGGTATA AAGAAGCTGAGC TCAAT
5	<i>Z. mays</i> mRNA for cysteine proteinase	GGTGTTCCTTG TTGGATATGG	GATCCAGTAAGG CTTGTCCTTCA
5	<i>Zea mays</i> catalase isozyme B	CCACCGGTGCCTG CTT	GCTGGCTTCTAGG CTGAACCT
5	<i>Zea mays</i> clone 283548 aquaporin	CGTTCTTCGGACT GGCATGT	TCAGAGCCATCCC GTCAAG
6	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGCTGCTGGGAAT GATGTTG	TTGATGGGCCCTC GTCTAAG
6	<i>Zea mays</i> clone 276247 hypothetical protein	CACGGACTACTCC AGGTTCTTCA	GTGCTGGTCTGGT CGTCCTT
6	<i>Zea mays</i> superoxide dismutase4 (sod4)	GCCGCCAGCGTTT CC	ACGCTGATCCCG ATGATCTT
6	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 DNA, SC111	ACCTGACCTCTCA CCCAAAGC	AAGCGCTGCCCA TTTAATTTTC

Amostras de RNA dos tratamentos; T (semente seca), 96 (semente embebida por 96 horas em BDA mais manitol), F (semente inoculada com *F. verticillioides*), A (semente inoculada com *A. flavus*) e P (semente inoculada com *Penicillium spp.*), com repetição biológica, sem DNA contaminante e com integridade confirmada, foram usadas para síntese dos cDNAs. Em média, esses cDNAs apresentaram concentração de 2200 ng/ μ L, sendo esses utilizados nas análises de expressão.

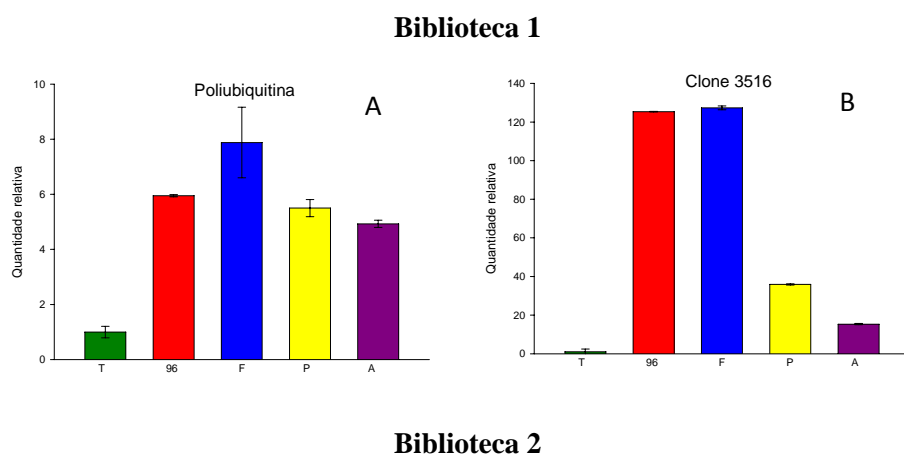
Verificou-se a eficiência de cada par de primer. Fez-se um *pool* de cDNA dos 5 tratamentos (T; 96; F; A; P), mais as repetições biológicas, utilizando 2 μ L de cada amostra (10 μ L no total). Esses 10 μ L foram diluídos em 80 μ L de água formando a diluição de 1:5, as demais diluições serial foram feitas através dessa primeira; 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. A eficiência dos genes endógenos, UBI e ADH, também foram verificadas. Através das curvas de eficiência, escolheu-se a diluição 1:5 como melhor diluição para as análises de expressão. Os genes marcados de cinza na tabela 10 foram aqueles que apresentaram eficiência satisfatória, 10% a mais ou a menos. Os demais genes não marcados apresentaram baixa eficiência e

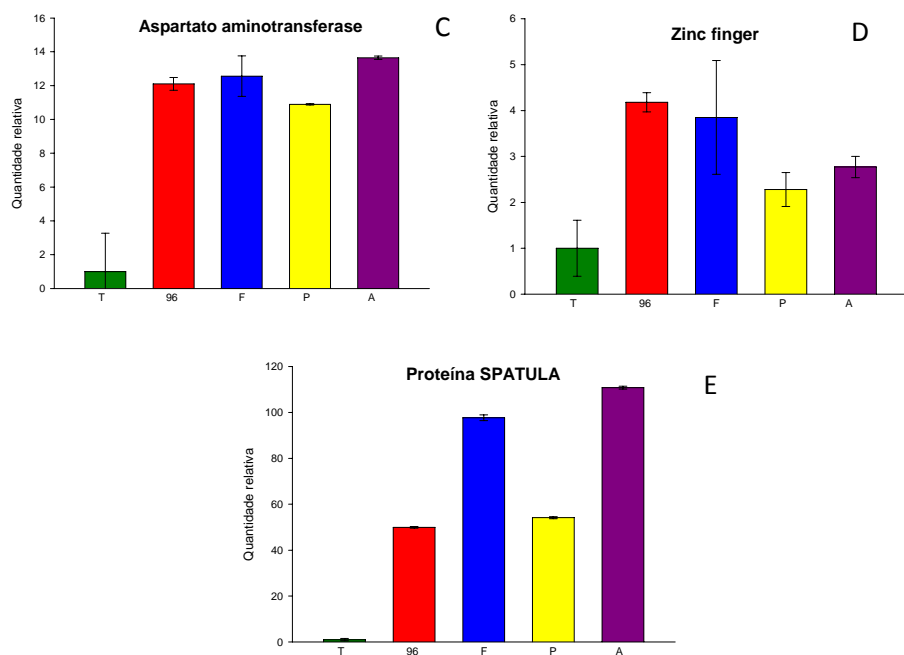
formação de dímeros de primers não sendo estes utilizados para análise da expressão.

Realizaram-se as análises de expressão dos genes em tempo real, utilizando os genes de referência (UBI e ADH) para normalização dos resultados. Em todas as placas, para cada gene, colocou-se a amostra, com triplicata, do gene de referência para excluir a variação entre corrida de placas. Também colocou, para cada gene, controle negativo para verificar a qualidade da água utilizada e a formação de dímeros de primers. Depois de calcular os $\Delta\Delta C_T$ os níveis de expressão foram calculados ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) e os resultados são mostrados na figura 3.

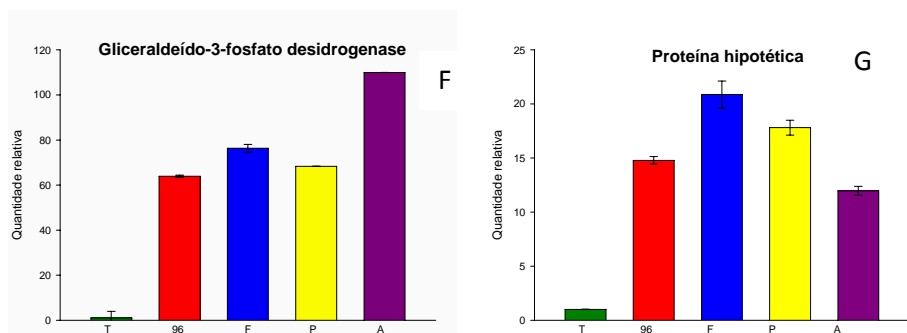
De uma maneira geral, observa-se (figura 3) que a expressão dos genes foi maior nos tratamentos (96, F, P e F) do que na testemunha (T). Isto mostra expressão diferencial entre as amostras, assim como indica o propósito da biblioteca subtrativa de cDNA, validando, então, todas as bibliotecas construídas com exceção da biblioteca 4, em que essa diferença de expressão não foi observada pela análise dos desvios padrão entre as médias estudadas.

Além de confirmar a eficiência da biblioteca subtrativa, a técnica de PCR em tempo real permite uma análise acerca dos diferentes níveis de expressão gênica, avaliando assim, o melhor gene para identificar a presença de cada fungo estudado em sementes de milho.





Biblioteca 3



Biblioteca 4

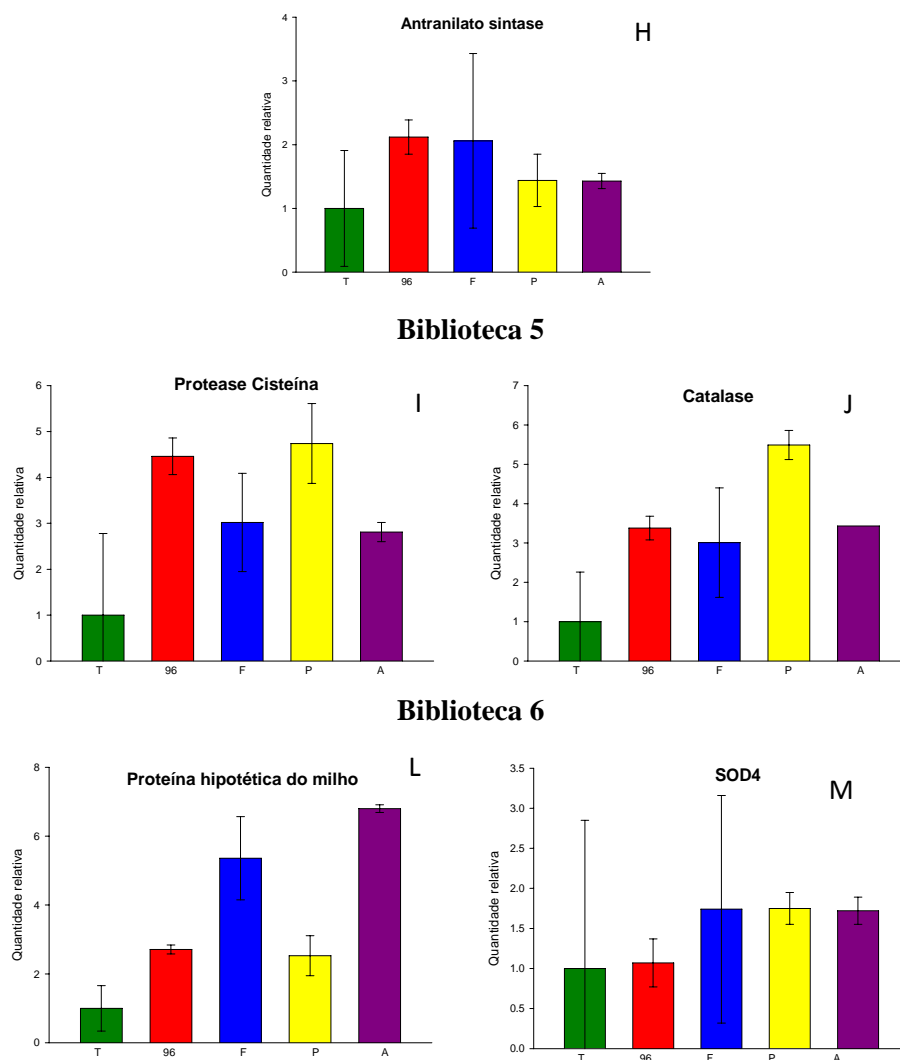


Figura 3 Perfil da expressão relativa por *qRT-PCR* dos genes: poliubiquitina (A) e clone 3516 (B) – Biblioteca 1; aspartato aminotransferase (C), zinc finger (D) e proteína SPATULA (E) - Biblioteca 2; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (F) e proteína hipotética (G) - Biblioteca 3; antranilato sintase (H) - Biblioteca 4; protease cisteína (I) e catalase (J) - Biblioteca 5; proteína hipotética do milho (L) e superóxido desmutase (M) - Biblioteca 6, em sementes: de milho secas (T); embebidas por 96 horas em BDA+manitol (96); inoculadas com *F. verticillioides* (F); inoculadas com *Penicillium spp.* (P); inoculadas com *A. flavus* (A).

A expressão do gene poliubiquitina foi em média seis vezes mais elevada nos tratamentos do que na testemunha. Ainda para esse gene pode-se

observar (Figura 3 - A) que a sua expressão foi de 2 a 2,5 vezes maior para as sementes inoculadas com *Fusarium*, indicando esse gene para identificação desse fungo.

A maior expressão desse gene em sementes inoculadas com *F. verticillioides* relaciona-se ao estresse que o fungo causa às sementes. Em estudo com plantas transgênicas de arroz, Takimoto (1994) observou que a expressão característica do gene Ubi-1 não é regulado sistemicamente, mas sim células individuais respondem de forma independente ao calor ou estresse físico. Esse gene muda a sua expressão tecidual específico em resposta ao estresse. E a expressão Ubi-1 é dependente do ciclo celular.

Para o gene clone 3516 de milho (Figura 3 -B) verificou-se expressão muito alta dos tratamentos 96 e F, 125 e 127 vezes respectivamente, maior que a testemunha. Como o tratamento 96 também é uma semente sem presença de fungo, pode-se inferir que esse gene está relacionado ao processo de embebição das sementes e/ou o início da germinação. Em contrapartida, a expressão gênica desse gene em sementes inoculadas com *Penicillium spp.* e *A. flavus* é de 35 e 15 vezes maior que a testemunha, respectivamente, sendo a expressão muito mais baixa quando comparada com os tratamentos 96 e F. Assim pode-se dizer que a presença dos fungos *Penicillium spp.* e *A. flavus* diminui a expressão desse gene em sementes milho.

O gene aspartato amino transferase apresentou níveis de expressão em média 12 vezes maior nos tratamentos do que na testemunha (Figura 3 - C). Outros autores também observaram maior nível de expressão desse gene em sementes infectadas por patógenos. Souza et al. (2005) observaram diferentes padrões eletroforéticos e atividades isoenzimáticas das esterases, peroxidases e aspartato aminotransferases para plantas de trigo sintomáticas, quando comparadas às plantas assintomáticas da virose causada pelo SBWMV.

Silva et al. (2000), considerando a ativação ou não de isoenzimas frente a patógenos, estudaram a interferência de fungos *A. flavus*, *F.*

verticillioides e *Penicillium spp.* sobre padrões eletroforéticos dessa isoforma, em sementes de milho. Esses autores concluíram que a infecção de sementes com os fungos promoveu diferenças nas expressões das aspartato aminotransferases, e que houve diminuição da intensidade do número de bandas, em virtude da presença desses patógenos.

O fato de o tratamento 96, sementes embebidas em BDA+manitol, também apresentar maior nível de expressão relaciona-se a um possível estresse causado nessas sementes que foram embebidas e tiveram sua germinação inibida pela presença do manitol.

A expressão do gene zinc finger foi em média 3 vezes mais elevada nos tratamentos do que na testemunha. Essa maior expressão, nos tratamentos que passaram por um processo de embebição, é explicada por este ser um gene que codifica proteínas hidrófilas e por estar relacionado à desidratação (Figura 3 -D).

Na literatura, também são encontrados trabalhos que relacionam a maior expressão desse gene com o estresse em sementes. Ferro et al. (2007) estudaram a expressão gênica de cana de açúcar na interação com bactéria, verificando que a tolerância da variedade SP80-0185 de cana-de-açúcar à bactéria fitopatogênica pode estar relacionada com a percepção de sinais extracelulares, visto que ESTs relacionados a vias de transdução de sinais apresentaram expressão gênica induzida na variedade tolerante, os quais codificam para EST com similaridade à H⁺-ATPase da membrana plasmática, fatores de transcrição G-box, OsNAC6, "DNA binding", família MYB e "Zinc Finger".

Verificou-se elevada expressão do gene proteína SPATULA em todos os tratamentos em relação à testemunha, nas sementes embebidas por 96 horas e nas sementes inoculadas com *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (50, 97, 54 e 110 vezes maior que na testemunha, respectivamente). Esses tratamentos tiveram a germinação inibida pela presença de manitol durante a inoculação dos fungos nas sementes pela técnica de restrição hídrica e durante as 96 horas de embebição para o

tratamento 96. De acordo com Groszmann et al. (2010), esse gene está envolvido na repressão germinação de sementes de recém-colhidas, e na expansão dos cotilédones inibindo, folha, e pétala. Com isso, a expressão desse gene não é indicada na identificação da presença desses fungos em sementes de milho (Figura 3 - E).

A expressão do gene GPC foi alta para os tratamentos 96, F, P e A (64, 76, 68 e 110, respectivamente) em relação à expressão da testemunha. Verificou-se expressão em média 40 vezes maior nas sementes inoculadas com *A. flavus* quando comparadas com os demais tratamentos. Isso indica que esse gene pode ser utilizado para identificação da presença do fungo *A. flavus* em sementes de milho. A relação da expressão desse estresse também foi discutida por Russell e Sachs (1989), que ao pesquisarem a expressão diferencial e análise da sequência do milho em genes da família de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, concluíram que o papel das alterações observadas na expressão do gene GPC é discutido em relação ao estresse fisiológico (Figura 3 - F).

A expressão da proteína hipotética foi mais elevada para todos os tratamentos do que para a testemunha. Comparando a expressão do tratamento 96 com os demais tratamentos, observa-se que as sementes inoculadas com *F. verticillioides* e *Penicillium ssp.* obtiveram expressão mais elevada para esse gene, 6 e 3 vezes maior do que o tratamento 96. Em sementes inoculadas com *A. flavus* foi verificado menor expressão do que o tratamento 96, 3 vezes menos. Sendo as proteínas hipotéticas pouco conhecidas, mais estudos são requeridos para esse gene, uma vez que, houve expressão diferenciada entre os tratamentos (Figura 3- G).

O gene antranilato sintase não apresentou diferença na expressão entre os tratamentos e a testemunha pelo desvio das médias observadas (Figura 3-H), com isso a construção desta biblioteca (4) não foi eficiente. Apesar de o antranilato ser um metabólito de defesa e de acordo com Huffaker et al. (2011), essa proteína ter função conservada entre as espécies

de plantas como reguladores endógenos de imunidade inata, neste trabalho isso não se aplicou em relação às sementes com patógeno.

Para expressão do gene cisteína proteinase (Figura 3 – I) não se observou diferença entre as sementes inoculadas com *F. verticillioides* e *A. flavus*, apenas os tratamentos 96 e sementes inoculadas com *Penicillium spp.* obtiveram expressão, em média, 4,5 vezes maior do que a testemunha. Isso pode ser explicado, pois em estudos anteriores esse gene foi identificado com o processo fisio-patogênico, em que sua maior expressão provavelmente está envolvida com a resposta do milho à infecção do fungo. Domoto et al. (1995) também observaram a relação desse gene com processo germinativo e concluíram que o mRNA CCP1 é expresso em sementes de milho maduros, embora a sua expressão atinja um máximo de 5 dias após o início da germinação. Sendo assim a expressão desse gene pode ser usada na identificação de *Penicillium spp.* em sementes de milho.

Verificou-se maior nível da expressão da catalase para os tratamentos 96, P e A (3,4, 5,5 e 3,4, respectivamente) em relação à testemunha com exceção das sementes inoculadas com *Fusarium*, que pelo desvio padrão não tiveram diferença. As sementes inoculadas com *Penicillium* obtiveram níveis de expressão 2 vezes maior do que os demais tratamentos. Isso indica que a expressão desse gene pode ser usada para identificar a presença de *Penicillium spp.* em sementes de milho (Figura 3-J).

Gomes et al. (2000) também observaram a relação expressão da catalase com estresse nas sementes, em que a enzima catalase apresentou diminuição na intensidade e no número de bandas, a partir das 48 horas de envelhecimento acelerado, para a maioria dos híbridos e para todas as seis linhagens estudadas. Souza et al. (2002) também verificaram a baixa atividade da enzima catalase em milho sob estresse com alumínio. Pode-se correlacionar esse estresse causado pelo envelhecimento acelerado e pelo alumínio com o estresse causado pela infecção do fungo, na semente, só que no caso do estresse causado pelo fungo observou se maior expressão da catalase.

A expressão da proteína hipotética do milho foi mais elevada para os tratamentos do que para a testemunha. Os níveis de expressão das sementes inoculadas com *Penicillium ssp.* não diferiram das sementes embebidas por 96 horas sem o fungo pela análise do desvio. Já as sementes inoculadas com *F. verticillioides* e *A. flavus* apresentaram expressão 2,6 e 4,1, respectivamente, maior do que a expressão do tratamento 96. Mais uma vez, afirma-se a importância de estudos mais aprofundados com as proteínas hipotéticas sendo essas proteínas pouco conhecidas e com grandes chances de identificar esses dois últimos fungos que apresentaram expressão diferenciada para esse gene (Figura 3 -L).

Verificou-se, para o gene SOD4, que não houve diferença de expressão para os tratamentos em relação à testemunha, pelos desvios padrão (Figura 3 – M). Isso contradiz outros estudos, que relatam que nas plantas submetidas às condições de estresse, os processos oxidativos são intensificados. As plantas podem reduzir a formação de radicais livres e minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, removendo enzimaticamente o H₂O₂, através de enzimas de varredura de radicais livres como SOD (PURVIS E SHEWFELT, 1993), tendo, assim, expressão aumentada àquelas sementes submetidas ao estresse por causa da infecção do fungo.

4 CONCLUSÕES

A metodologia de biblioteca subtrativa é eficiente para detecção de genes diferencialmente expressos quando os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp.* estão presentes em sementes de milho.

A técnica de qRT-PCR validou todas as bibliotecas construídas (TF, TP, TA, 96P e 96A), com exceção da biblioteca 96F.

O gene Poliubiquitina é promissor para identificação da presença de *F. verticillioides* em lotes de sementes de milho.

O gene clone 3516 é promissor para identificação da presença dos fungos *A. flavus* e *Penicillium spp.*, em lotes de sementes de milho.

A proteína SPATULA é promissora para identificação da presença dos fungos para *F. verticillioides* e *A. flavus*, em lotes de sementes de milho.

O gene GPC é promissor para identificação da presença do fungo *A. flavus*, em lotes de sementes de milho.

O gene que codifica proteína hipotética é promissor para identificação da presença dos fungos *F. verticillioides* e *Penicillium spp.*, em lotes de sementes de milho.

O gene da catalase é promissor para identificação da presença do fungo *Penicillium spp.*, em lotes de sementes de milho.

Os genes asparto aminotransferase, zinc finger, antranilato sintase, cisteína proteinase e SOD4, apesar de identificados como genes diferencialmente expressos pela biblioteca subtrativa não apresentam diferença na expressão entre sementes de milho secas, embebidas e infectadas com os fungos *F. verticillioides*, *A. flavus* e *Penicillium spp.*, sendo estes não promissores para identificação da presença desses fungos, em lotes de sementes de milho.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa, foi possível detectar alguns genes que são diferencialmente expressos em sementes de milho infectadas e não infectadas.

Estes genes também são promissores para identificação de fungos em grãos de milho.

Mais estudos são necessários para descrever até quantas vezes maior ou menor a expressão desses genes podem ser utilizadas para identificação desses fungos em lotes de sementes e grãos de milho.

Os genes em que houve expressão diferenciada entre os tratamentos requerem atenção para estudos futuros, visando à possível construção de kits de detecção rápida desses fungos em lotes de sementes e grãos de milho.

REFERÊNCIAS

- AKOPIAN, A. N.; WOOD, J. Construction and screening of a subtractive cDNA library. In: HUNT, S.; LIVESEY, F. (Ed.). **Functional genomics: a practical approach**. New York: Oxford, 2000. p. 272.
- AMARA, I. et al. Insights into Maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 2, p. 312-329, 2012.
- BAIGES, I. et al. Plant aquaporins. **Plant Physiology**, Waterbury; v. 115, p. 175-182, 2002.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.
- CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675- 689, 1992.
- COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out, 2003.
- DALE, J. W.; VON SCHANTZ, M. **From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology**. New York: Wiley, 2002. 360 p.
- DEGENHARDT, J. et al. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 173, p. 326-335, 2005.
- DEOKAR, A. A. et al. Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) between drought-tolerance and-susceptible genotypes of chickpea under terminal drought stress. **BMC Plant Biology**, London, v.11, n.70, p. 1-20, Apr. 2011.
- DOMOTO, C. et al. Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cysteine proteinases. **Biochimica Biophysica Acta**, Frankfurt, v. 1263, n. 3, p. 241-244, Set. 1995.

EICHHORN, H. et al. Isolation of a novel ABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid. *Journal Experimental Botany*, Oxford, v. 57, p. 2193-2201, 2006.

FERNÁNDEZ, C. et al. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligocapped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide 37 sequences. ***Molecular and Biochemical Parasitology***, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 171-180, Jul. 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. ***Revista Symposium***, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FERRO, M. I. T. et al. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp: *xyli*. ***Summa phytopathol.***, Botucatu, v. 33, n. 2, June 2007.

GIALLONGO, A. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of a full length cDNA for human α -enolase. ***Proc Natl Acad Sci, USA***, v. 83, p. 6741-6745. 1986.

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

GOULART, A. C. P.; FIALHO, W.F.B. Ocorrência de fungos em sementes de milho "BR 201" produzidas na região de Dourados, MS. ***Fitopatologia Brasileira***, Brasília, v. 23, n. 1, p. 79, 1998.

GRAMKOW, A. W. **Patologia dos baculovírus: efeito da ação de enzimas heterólogas e análise da resposta transcricional do hospedeiro durante a infecção viral**. 157 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

GROSZMANN, M. et al. Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. ***Journal Experimental Botany***. v. 61, p. 1495-1508. Feb. 2010.

HEIN, I. et al. Characterization of early transcriptional changes involving multiple signaling pathways in the Mla13 barley interaction with powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). ***Planta***, Berlin, v. 218, n. 5, p. 803-813, Mar. 2004.

HEYMANN, P. et al. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection Immunity**, Washington, v. 70, p. 5246–5255, 2002.

HUFFAKER, A.; DAFOE, N.J.; SCHMELZ, E.A. ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 155, n. 3, p. 1325-1338, Mar. 2011.

JIA, J. et al. Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 710-27, Dec. 2006.

JIANG, H. et al. Rash, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **PNAS**, Washington, v. 97, n. 23, nov. 2000.

LAL, S.K.; LEE, C.; SACHS, M.M.; Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 118, n. 4, p. 1285-93. Dec, 1998.

LANA, U. G. P.; CARNEIRO N. P.; SOUZA I. R. P. **Genes Diferencialmente Expressos em Linhagem de Milho Tropical Resistente ao Mosaico Comum**. Resumo: XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Cuiabá – MT, 2004.

LEBIODA, L. B.; STEC, B.; BREWER, J. M. The structure of yeast enolase at 2.25 angstrom resolution: an 8-fold $\beta + \alpha$ barrel with a novel $\beta\beta\alpha(\beta\alpha)_6$ topology. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 264, p. 3685–3693, 1989.

LI, H. Y. et al. Isolation and characterization of induced genes under drought stress at the flowering stage in maize (*Zea mays*). **DNA Sequence - The Journal of Sequencing and Mapping**, China, v. 18, n. 6, p. 445-460, 2007.

LIU, L. et al. Characterization, chromosomal mapping, and expression of different ubiquitin fusion protein genes in tissues from control and heat-shocked maize seedlings. **Biochemistry and Cell Biology**, Dallas, v. 4, n. 1, p. 9-19, 1996.

LUCCA FILHO, O.A. Testes de sanidade de sementes de milho. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Eds.) **Patologia de sementes**, Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 430-440.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 23, n. 2, p.88-94, 2001 a.

MACHADO, J. C.; **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evolution for seedling emergence vigor. **Crop science**, Cincinnati, v. 2, p. 176-177, 1962.

MANJUNATH, S.; SACHS, M. M. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 97-112, 1997.

MILLA, M. A. R.; TOWNSEND, J.; CUSHMAN, I. C. J. C. The Arabidopsis AtDi19 gene family encodes a novel type of Cys2/His2 zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 13-30, 2006.

MUNIZ, F. R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 195-204, 2007.

PRABU, G. et al. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Netherlands, v. 29, n. 2, p. 291-304, June 2010.

PURVIS, A. C.; SHEWFELT, R. L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiology Plant**, Rockville, v.88, p.712-718. 1993.

RABELLO, F. R. et al. **Análise *in silico* de aquaporinas potencialmente envolvidas com o estresse hídrico nas interações café- e citros-*Xylella fastidiosa***. Trabalho apresentado no Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais. Brasília: Embrapa Café, 2007.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **Science**, Washington, v. 288, p. 1062–1064. 2000.

RISHI, A. S. et al. Identification and analysis of safener-inducible expressed sequence tags in *Populus* using a cDNA microarray. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 6, p. 296–306, Dez. 2004.

RUSSELL, D. A.; SACHS, M. M. Differential Expression and Sequence Analysis of the Maize Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Family. **The Plant Cell**, Rockville, v. 1, p.793-803, Aug. 1989.

SAHU, B. B.; SHAW, B. P. Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. **BMC Plant Biology**, London, v.9, n.69, p. 1-25, June 2009.

SATO, Y. et al. Proteasome subunits are regulated and expressed in comparable concentrations as a functional cluster. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 378, p. 795–798, 2009.

SCHRETTL, M. et al. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, Rockefeller, v. 200, p. 1213–1219, 2004.

SILVA, E.A.A. et al. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas com fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.1725-1732, 2000.

SINGH, J. et al. The use of Group 3 LEA proteins as fusion partners in facilitating recombinant expression of recalcitrant proteins in *E. coli*. **Protein Expression and Purification**, Geneva, v. 67, n. 1, p. 15-22, Sep. 2009.

SOUZA R. et al. Atividade isoenzimática em plantas de trigo infectadas com o vírus SBWMV. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p.845-852, set. 2005.

SOUZA, J.B. et al. Atividade de Enzimas Antioxidantes em Raízes de Milho Sob Toxidez de Alumínio. **XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo** - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis – SC.

TAKIMOTO, I. et al. Non-systemic expression of a stress-responsive maize polyubiquitin gene (Ubi-1) in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 1007-1012. Nov. 1994.

TANIGUCHI, M. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding aspartate aminotransferase isozymes from *Panicum miliaceum L.*, a C4 plant. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 204, n. 2, p. 611-20, Mar. 1992.

VEDOY, C. G.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR M. C. Hunting for differentially expressed genes. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v.32, p.877-884, 1999.

WANG, Y. et al. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 1, p. 78-89, Jan. 2007.

WHITFIELD, C. W. et al. Annotated Expressed Sequence Tags and Cdna Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. **Genome Research**, Nova York, v. 12, p. 555-566, 2002.

YANG, G. P. et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1517-1523, Mar. 1999.

YUE, G. et al. Molecular cloning and characterization of a novel H⁺-translocating pyrophosphatase gene in *Zea mays*. **DNA Sequence - The Journal of Sequencing and Mapping**, China, v.19, n.2, p.79-86. April 2008.

ZHENG, J. et al. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.55, n. 6, p.807-823, Aug. 2004.

ZOUARI, N. et al. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. **Gene**, Amsterdam, v. 404, n. 1-2, p. 61-69, Dez. 2007.