



ALINE SILVA FREITAS

**ANTIOXIDANT ENZYMES EXPRESSION IN SEEDS AND
SEEDLINGS SUBMITTED TO STRESS CONDITIONS**

**LAVRAS - MG
2020**

ALINE SILVA FREITAS

**ANTIOXIDANT ENZYMES EXPRESSION IN SEEDS AND SEEDLINGS
SUBMITTED TO STRESS CONDITIONS**

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.

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Freitas, Aline SILVA.

Antioxidant enzymes expression in seeds and seedlings
submitted to stress conditions / Aline SILVA Freitas. - 2020.
94 p. : il.

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

Coorientador(a): Heloísa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Abiotic stress. 2. ROS 3. 1-cys-peroxirredoxin. 4.
Antioxidant enzyme. I. Von Pinho, Èdila Vilela de Resende. II. Dos
Santos, Heloísa Oliveira. III. Título.

ALINE SILVA FREITAS

**EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM SEMENTES E PLÂNTULAS
SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

**ANTIOXIDANT ENZYMES EXPRESSION IN SEEDS AND SEEDLINGS
SUBMITTED TO STRESS CONDITIONS**

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 21 de dezembro de 2020.

Dr. Anderson Cleiton José UFLA

Dra. Renata Silva Mann UFS

Dr. Renzo Garcia Von Pinho UFLA

Dra. Heloísa Oliveira dos Santos UFLA

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2020**

*A Deus.
Aos meus pais, Nilson e Patrícia.
Ao meu irmão Lucas.
À minha avó Nilza
Com todo o amor,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas vezes em que cansada e desiludida, recorri em uma prece e fui atendida.

À minha mãe, Patrícia, ao meu pai, Nilson e ao meu irmão, Lucas, pelo apoio, amor, atenção e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do doutorado. Aos professores do Departamento de Agricultura pela contribuição para a minha formação profissional, em especial os professores do Departamento de sementes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001. Ao INCT-Café (Instituto Brasileiro de Ciência e Tecnologia do Café) e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio na condução do projeto.

À professora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela orientação, confiança, paciência e exemplo de excelência profissional.

À minha coorientadora e grande amiga, professora Heloisa Oliveira dos Santos, pelas inúmeras vezes que me socorreu em meio as aflições com o doutorado e da vida, pela amizade, companheirismo, parceria, carinho e ‘puxões de orelha.’

À professora Raquel Maria Pires, que se tornou uma grande amiga e parceira, a quem tenho grande gratidão por ter me auxiliado em uma das maiores experiências da minha vida, a realização do Doutorado Sanduíche.

À Iowa State University (ISU) e à empresa DH-Facility, por me receberem e financiarem meu Doutorado Sanduíche.

Ao professor Thomas Lubberstedt e à pesquisadora Úrsula Frei, por todo o auxílio, confiança, conselho e paciência. Tornaram-se minha família e orientação em Ames e na ISU.

À Dona Dalva, Geraldo, Jaque, Vivi e Iris, por sempre me receberem com um sorriso e alegrarem os meus dias no laboratório de sementes.

Aos demais participantes da banca, Anderson Cleiton José, Renata Silva Mann e Renzo Garcia Von Pinho, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos.

A todos os orientados da professora Édila e Heloísa, que me ajudaram na condução do experimento. Agradeço infinitamente pela disposição de cada um, sem vocês, isso jamais seria possível.

Ao Pós Doutorando Vander, pela ajuda e orientações nas análises estatísticas.

Ao Doutorando Antônio, pelo auxílio com as análises no espectrofotômetro e meta-análise.

Aos colegas do departamento de sementes da UFLA e do NESem, pelos momentos de descontração, auxílios, sugestões e grandes aprendizados.

À Bianca, Gabi e Pâmela, por toda a amizade e apoio em todos os momentos da minha vida. À Família Saia Justa, por toda a ajuda, paciência, convivência e carinho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Meu eterno agradecimento!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O aumento populacional e as mudanças climáticas, são realidades mundiais que colocam em risco a segurança alimentar. Para tentar contornar esses desafios, nos programas de melhoramento tem-se investido no desenvolvimento de cultivares altamente produtivas capazes de se adaptarem a diferentes condições ambientais. Neste contexto, as análises proteômicas das enzimas antioxidantes tornam-se uma ferramenta importante para a seleção de genótipos superiores, quanto à tolerância a fatores abióticos. Essas enzimas fazem parte de um eficiente sistema antioxidante que é capaz de remover as espécies reativas de oxigênio, que são produzidas em compartimentos celulares como resultado dos diferentes tipos de estresse em plantas. Para estudar as relações das enzimas antioxidantes com a capacidade das sementes e plântulas adquirirem tolerância aos diferentes tipos de estresse abiótico, foi realizado o presente trabalho. Foram utilizadas sementes de arroz e milho submetidas ou não ao estresse hídrico e de soja e café submetidas ou não a secagem. Para verificar a qualidade fisiológica dessas sementes foram realizados os seguintes testes: primeira contagem da germinação, germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas. As análises proteômicas foram feitas em sementes e em plântulas oriundas dessas sementes, após o teste de germinação. A expressão das enzimas SOD, POX, CAT e APX foram obtidas pela técnica de eletroforese em gel e da enzima 1-cys-prx pela técnica de *western blotting*. Foram quantificadas a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas SOD, CAT e APX, por meio de espectrofotometria. Foi realizada uma meta-análise com os dados de proteômica visando identificar o método de identificação de proteínas eficiente. Pelos resultados das análises enzimáticas foi possível verificar diferenças entre os tratamentos as quais não foram identificadas por meio dos testes fisiológicos. A enzima 1-cys-prx é um importante indicador de estresse em sementes de arroz e café. Conclui-se que as enzimas antioxidantes e a quantificação de lipoperóxidos são bons marcadores para indicarem a perda de qualidade das sementes sobre condições de estresse.

Palavras-chave: Estresse abiótico. EROS. Enzimas antioxidantes. 1-cys-peroxirredoxina.

ABSTRACT

Population growth and climate change are global realities that put food security at risk. In order to overcome these challenges, breeding programs are investing in the development of highly yield cultivars capable of adapting to different environmental conditions. Proteomic analysis of antioxidant enzymes becomes an important tool for selecting superior genotypes regarding tolerance to abiotic factors. These enzymes are part of an efficient antioxidant system that is able to remove reactive oxygen species, which are produced in cell compartments as a result to different types species that plants can suffer. The present work was performed to study the relationship between antioxidant enzymes and the ability of seeds and seedlings to get tolerance to different types of abiotic stresses. Seeds of rice and corn seeds were submitted or not to water stress while soybean and coffee seed were submitted or not to drying. The following tests were carried out to verify the physiological quality of the seeds: first germination count, germination, accelerated aging, emergence and seedling emergence speed index. Proteomic analyzes were performed on seeds and seedlings from all seeds after the germination test. Expression of SOD, POX, CAT, and APX enzymes were obtained by electrophoresis technique. Western blotting technique was used for accessing the expression of 1-cys-prx enzyme. The activity of the lipid peroxidation, SOD, CAT, and APX enzymes was quantified by spectrophotometry. Proteomic data was submitted to a meta-analysis in order to identify the most efficient protein identification method. The enzymatic analyses pinpointed differences among treatments, which were not identified by the physiological tests. The 1-cys-prx enzyme is an important stress indicator in rice and coffee seeds. Lipoperoxides quantification and antioxidant enzymes are good markers for indicating seed quality loss under stress conditions.

Keywords: Abiotic stress. ROS, antioxidant enzyme. 1-cys- peroxirredoxin.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1	INTRODUÇÃO.....	12
	REFERÊNCIAS.....	14
	CAPÍTULO 2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO COMPLEXO ANTIOXIDANTE EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE ARROZ E MILHO SUBMETIDOS AO ESTRESSE HÍDRICO	16
1	INTRODUÇÃO.....	18
2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1	Material genético	20
2.2	Avaliação da qualidade das sementes	21
2.3	Análises proteômicas pela técnica de eletroforese	22
2.4	Análises proteômicas por meio de <i>Western Blotting</i>	23
2.5	Quantificação da peroxidação lipídica.....	24
2.6	Análises proteômicas pelo espectrofotômetro	25
2.7	Análises estatísticas.....	26
3	RESULTADOS	27
3.1	Arroz	27
3.2	Milho	31
4	DISCUSSÃO	37
4.1	Arroz	37
4.2	Milho	39
5	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	CAPÍTULO 3 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE SOJA E CAFÉ SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR SECAGEM	47
1	INTRODUÇÃO.....	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Material genético	51
2.2	Avaliação da qualidade das sementes	52
2.3	Análises proteômicas pela técnica de eletroforese	53

2.4	Análises proteômicas por meio de <i>Western Blotting</i>	54
2.5	Quantificação da peroxidação lipídica.....	55
2.6	Análises proteômicas pelo espectrofotômetro	55
2.7	Análises estatísticas.....	56
3	RESULTADOS	57
3.1	Soja.....	57
3.2	Café	61
4	DISCUSSÃO	67
4.1	Soja.....	67
4.2	Café	68
5	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
CAPÍTULO 4 PROTEOMIC ANALYSIS BY ELECTROPHORESIS AND SPECTROPHOTOMETRY FOR STRESS ASSESSMENT BY WATER RESTRICTION AND DRYING CONDITIONS IN DIFFERENT CROPS: A META-ANALYSIS		
		76
1	INTRODUCTION	78
2	MATERIAL AND METHODS	80
3	RESULTS	84
4	DISCUSSION	89
4	CONCLUSION	91
	REFERENCES	92

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade altamente dependente de fatores climáticos, como temperatura, pluviosidade, umidade do solo e radiação solar (AMORIM *et al.*, 2011). Mudanças desses fatores podem alterar a produtividade de várias culturas. Modelos matemáticos propostos para simular os impactos das mudanças climáticas no Brasil, sobre culturas como o trigo, milho, soja, café, feijão e arroz, apresentam previsões de perdas econômicas anuais (PELLEGRINO *et al.*, 2007).

Para tentar mitigar esses problemas e garantir a segurança alimentar são necessárias medidas como: o aumento da produção por área, a diversificação da oferta interna de alimentos, a busca por sistemas inteligentes de irrigação, o mapeamento dos impactos das mudanças climáticas, o uso da ciência de dados na agricultura, e o melhoramento genético para a geração de variedades mais tolerantes aos diferentes estresses biótico (doenças, pragas e plantas invasoras) e abióticos (a seca, o frio, altas temperaturas, inundação) (PBMC, 2013; 2014).

Nos atuais programas de melhoramento os estudos de proteômica são importantes para o entendimento das relações genótipo x ambiente, já que as proteínas estão envolvidas na formação do fenótipo das plantas em resposta as condições ambientais (KOSOVÁ *et al.*, 2019). O desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e perpetuação das plantas são dirigidos pelo genótipo e o ambiente, que influenciam os contínuos desligamento da base genética e programação epigenética do seu metabolismo, fisiologia e morfologia (VAN RUYSKENSVELDE *et al.*, 2018). Assim, as plantas possuem mecanismos que permitem que elas adquiram vantagens no seu metabolismo e crescimento em ambientes altamente variáveis (MHAMD; VAN BREUSEGEM, 2018).

A maioria das mudanças ambientais necessita de ajustes ligados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecido como estresse oxidativo, que pode ser produzido por condições de estresse como excesso de luz, frio, calor, seca, invasão de microrganismos patogênicos e oxidação de poluentes atmosféricos (NOCTOR *et al.*, 2015).

As EROs são produzidas em quase todas as células e são reconhecidas como importantes sinalizadoras em vários processos biológicos necessários durante o desenvolvimento e crescimento das plantas (MITTLER *et al.*, 2017). Em eventos relacionados ao estresse biótico e abiótico, as EROs desempenham sua função sinalizadora e quando em excesso, tem efeito

tóxico nas plantas provocando danos nos ácidos nucleicos, lipídeos, metabólitos e proteínas, que podem levar a morte celular (VAN RUYSKENSVELDE *et al.*, 2018; MITTLER, 2017).

Os níveis das espécies reativas de oxigênio são determinados pelo controle do balanço entre produção e quebra, que é ativado pela sofisticada e complexa via dos sistemas antioxidantes (MITTLER *et al.*, 2011; NOCTOR *et al.*, 2018). Esse sistema compreende em enzimático e não enzimático que estão envolvidos na redução ou desintoxicação das EROs. O sistema enzimático, conhecido como enzimas *scavengers* de EROs, inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutatona peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e as peroxirredoxinas (Prx) (FOYER; NOCTOR, 2005; DIETZ *et al.*, 2006).

O aumento de algumas enzimas antioxidantes tem sido observado em plantas associado a alteração oxidativa induzida por vários tipos de condições de estresse. A manutenção de alta capacidade antioxidante para eliminar as EROs tóxicas, tem sido associada ao aumento da tolerância das plantas aos estresses ambientais. Os mecanismos de controle das EROs e a expressão de enzimas *scavengers* têm sido estudados em várias espécies, por meio de técnicas como: o *southern blot*, *northern blot*, *western blot*, RT-PCR, gel bidimensional, eletroforese, a transgenia (DIAS *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2012; HASANUZZAMAN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

Os estudos proteômicos dessas enzimas antioxidantes podem auxiliar nos trabalhos que visam o desenvolvimento de linhagens e cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico e ao estresse por secagem, por meio da classificação do padrão de acúmulo dessas enzimas e análise dos mecanismos que estão associados à tolerância ao estresse abiótico (DIAS *et al.*, 2010). Além disso, o estudo dessas enzimas em sementes facilita no processo de seleção de matérias tolerantes, visto que o melhorista pode fazer a seleção baseada no marcador em sementes sem necessidade de levar a campo, grande quantidade de material. Desta forma, consegue-se reduzir tempo, dinheiro e espaço durante o processo de seleção de cultivares tolerantes.

No presente trabalho objetivou-se verificar a expressão de algumas enzimas antioxidantes em sementes e plântulas de arroz, café, milho e soja submetidas às condições de estresse abiótico.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.; GASPAROTO, M.C.G.; BERGAMIN FILHO, A. **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre epidemias de doenças de plantas.** Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. p. 75-86.
- DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; FLOH, E.I.S. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 22, n. 1, p. 23-33, 2010.
- DIETZ, K.J.; JACOB, S.; OELZE, M.L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V.; DE MIRANDA, S.M. N.; FINKEMEIER, I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 57, n. 8, p. 1697-1709, 2006.
- CHEN, H.H.; CHU, P.; ZHOU, Y.L.; DING, Y.; LI, Y.; LIU, J.; HUANG, S.Z. Ectopic expression of NnPER1, a *Nelumbo nucifera* 1-cysteine peroxiredoxin antioxidant, enhances seed longevity and stress tolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 88, n. 4, p. 608-619, 2016.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, [S.l.], v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M.; ROYCHOWDHURY, R.; FUJITA, M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 14, n. 5, p. 9643-9684, 2013.
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; KLÍMA, M.; PRÁŠIL, I.T. Breeding drought-resistant crops: G×E interactions, proteomics and pQTLs. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 70, n. 10, p. 2605-2608, 2019.
- MHAMDI, A.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen species in plant development. **Development**, [S.l.], v. 145, n. 15, p. dev164376, 2018.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.A.D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.
- MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.
- NOCTOR, G.; REICHHELD, J.P.; FOYER, C.H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *In: Seminars in Cell & Developmental Biology Academic Press*, [S.l.], v. 80, p. 3-12, 2018.
- NOCTOR, G.; LELARGE-TROUVERIE, C.; MHAMDI, A. The metabolomics of oxidative stress. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 112, p. 33-53, 2015.

PELLEGRINO, G.Q.; ASSAD, E.D.; MARIN, F.R. Mudanças climáticas globais e a agricultura no Brasil. **Revista Multiciência**, [S.l.], v. 8, p. 139-162, 2007.

PBMC. Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. **Contribuição do Grupo de Trabalho 2 ao Primeiro Relatório de Avaliação Nacional do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas**. Sumário Executivo do GT2. Rio de Janeiro: PBMC, 2013. 28 p.

PBMC. Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. **Contribuição do Grupo de Trabalho 3 ao Primeiro Relatório de Avaliação Nacional do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas**. Sumário Executivo do GT3. Rio de Janeiro: PBMC, 2014.

SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, [S.l.], p.1-26, 2012.

SUZUKI, N.; MILLER, G.; MORALES, J.; SHULAEV, V.; TORRES, M. A.; MITTLER, R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, [S.l.], v. 14, n. 6, p. 691-699, 2011.

VAN RUYSKENSVELDE, V.; VAN BREUSEGEM, F.; VAN DER KELEN, K. Post-transcriptional regulation of the oxidative stress response in plants. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.l.], v. 122, p. 181-192, 2018.

CAPÍTULO 2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO COMPLEXO ANTIOXIDANTE EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE ARROZ E MILHO SUBMETIDOS AO ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO

O aumento da atividade de algumas enzimas antioxidantes tem sido observado em plantas, em resposta a alteração oxidativa induzida por diversos tipos de condições de estresse. A eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS), por meio das enzimas antioxidantes, está associada ao aumento da tolerância das plantas a estresses ambientais. Diante do exposto, no presente trabalho, buscou-se avaliar a qualidade fisiológica e a atividade de enzimas antioxidantes em sementes e plântulas de milho e arroz submetidas à restrição hídrica. Para tanto, foram utilizadas sementes de arroz da linhagem CMG 1509 e sementes de milho da linhagem 91, sob duas condições: sem restrição hídrica e com restrição hídrica. A qualidade fisiológica dessas sementes foi verificada pelos testes: taxa de germinação, primeira contagem de germinação, teste de envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência e taxa de emergência. Sementes e plântulas oriundas do teste de germinação foram utilizadas como material vegetal para as análises proteômicas. A expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX) foram avaliadas por meio da técnica de eletroforese. Pela técnica de *Western Blotting* avaliou-se a expressão da enzima 1-cys-prx e pelo espectrofotômetro quantificou-se a peroxidação lipídica e expressão das enzimas SOD, CAT e APX. Os resultados dos testes fisiológicos para as sementes de arroz e milho foram considerados estatisticamente não significativos, exceto para o teste de primeira contagem de germinação em milho. Foram verificadas variações no padrão de expressão das enzimas SOD, CAT, POX e APX para as duas espécies. A enzima 1-cys-prx foi expressa tanto em sementes quanto em plântulas de arroz, 14 dias após a semeadura, e em milho, aos 7 dias após a semeadura. Houve diferenças nos valores de peroxidação lipídica e da enzima SOD em sementes e plântulas de arroz e milho sob condição ou não de restrição hídrica. Concluiu-se que apesar de as sementes apresentarem alta qualidade fisiológica, a restrição hídrica durante o processo de produção das sementes de milho e arroz causa alterações na peroxidação lipídica e na expressão de enzimas antioxidantes.

Palavras chave: Restrição hídrica. EROs. Enzimas antioxidantes. *Zea mays*. *Oryza sativa*.

ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN RICE AND CORN SEEDS AND SEEDLINGS UNDER WATER STRESS

ABSTRACT

The increase of some antioxidant enzymes activity in plants has occurred in response to oxidative changes induced by several types of stress. Elimination of reactive oxygen species (EROS) by antioxidant enzymes is associated to the increasing tolerance by plants to environmental stresses. In this work, we evaluated the physiological quality and the activity of antioxidant enzymes in corn and rice seeds and seedlings submitted to water restriction. Seeds of rice (line CMG 1509) and corn (line 91) were used under two conditions: without water restriction and with water restriction. The physiological quality of the seeds was verified by germination rate test, first germination count, accelerated aging test, emergence speed index and emergence rate. Seeds and seedlings from the germination test were used as plant material for the proteomic analysis. The expression of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), and ascorbate peroxidase (APX) enzymes was evaluated using electrophoresis. Western Blotting technique was used to evaluate the expression of 1-cys-prx enzyme. The lipid peroxidation and the expression of the enzymes SOD, CAT, and APX were quantified by spectrophotometer. The results of physiological tests in rice and corn seeds were statistically not significant, except for the first germination count test in corn. Variations in the expression pattern of SOD, CAT, POX, and APX enzymes were verified for the both species. The 1-cys-prx enzyme was expressed in both rice seeds and seedlings, 14 days after sowing and in corn at 7 days after sowing. There was a difference on the lipid peroxidation and SOD enzyme in seeds and seedlings of rice and corn under or without water restriction. There was also a difference in the lipid peroxidation and SOD enzyme expression in rice and corn seeds and seedlings under or without water restriction. Although the seeds have high physiological quality, water restriction during the process of production of corn and rice seeds causes changes in lipid peroxidation and antioxidant enzymes expression.

Keywords: Water restriction. ROS. Antioxidant enzymes. *Zea mays*. *Oryza sativa*.

1 INTRODUÇÃO

Os estresses abiótico e biótico que afetam a agricultura em diversas regiões têm as mudanças climáticas como a sua principal causa. A interferência na agricultura é decorrente de diversos fatores como: variações de pluviosidade, de temperaturas, níveis de CO₂ e Ozônio atmosférico, além da incidência de plantas daninhas, pragas e doenças. Essas alterações impactam negativamente a produção de alimentos, comprometendo a segurança alimentar mundial.

O déficit de água e os extremos de temperaturas por exemplo, influenciam negativamente nas fases de crescimento e reprodução das plantas e, conseqüentemente na morfofisiologia, produção de sementes e produtividade (RAZA *et al.*, 2019; ZANDALINAS *et al.*, 2018). Para as culturas do milho e do arroz a ocorrência do déficit hídrico é crucial durante o período de florescimento e maturação dos grãos, podendo comprometer toda a produção (BOUMAN; TUONG, 2001; BERLATO *et al.*, 2005).

Em arroz, foi verificado que a restrição hídrica pode provocar a redução do rendimento médio de grãos em 21% na fase vegetativa e 50% na fase reprodutiva (SARVESTANI *et al.*, 2008). Já em milho, observa-se o atraso na emissão do estigma e também o aumento da porcentagem de aborto de zigotos depois da fertilização (BERNINI *et al.*, 2016).

Sabe-se que o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência das plantas são influenciadas pelo genótipo e ambiente. Sob condições de estresse as plantas têm o seu metabolismo e crescimento alteradas. Nestas condições estão envolvidas enzimas antioxidantes, conhecidas como *scavengers*, que estão associadas à remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs), que são geradas em diversos compartimentos celulares (citoplasma, mitocôndria, peroxissomos) como resultado dos estresses abióticos e bióticos aos quais as plantas são submetidas (MITTLER *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2018). Essas EROs são altamente reativas e, quando em excesso, podem ser tóxicas às plantas por provocarem danos em proteínas, lipídeos, carboidratos, e até mesmo no DNA (WASZCZAK *et al.*, 2018; NOCTOR *et al.*, 2018).

O sistema de defesa antioxidante enzimático, dentre os quais pode-se citar: a superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); ascorbato peroxidase (APX); glutathione redutase (GR); peroxidase (POX) e peroxirredoxina (PRX) e não enzimático como o ácido ascórbico, glutathione e componentes fenólicos, atuam no controle da oxigenação descontrolada e na proteção contra os danos oxidativos nas células através da remoção das EROS (GILL; TUTEJA, 2010).

Relacionado ao sistema antioxidante enzimático destacam-se as peroxirredoxinas da subclasse 1-Cys-PRX, por se tratar de enzimas codificadas por genes de cópia única e com presença específica em sementes, estando localizada no embrião e na camada de aleurona (STACY *et al.*, 1999; HASLEKAS *et al.*, 2003; PULIDO *et al.*, 2009). Além disso, elas atuam inibindo a germinação e conferem tolerância para as plantas sobre condições desfavoráveis (LEE *et al.*, 2000; HASLEKÁS *et al.*, 2003). Porém, os estudos da atividade dessa enzima em plantas são limitados quando comparados às demais enzimas do complexo antioxidantes devido a maior dificuldade em sua detecção.

Diante disso, os estudos relacionados a expressão de proteínas envolvendo os mecanismos de defesa antioxidantes, durante o processo de estresse hídrico, configuram ferramentas fundamentais para o entendimento dos mecanismos de defesa em sementes e plântulas submetidas aos estresses abióticos (LEE *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2017). Também deve-se ressaltar que estudos desta natureza podem fornecer informações que auxiliam na seleção de cultivares mais adaptadas às condições de estresse.

Assim, objetivou-se nesta pesquisa, avaliar a atividade das enzimas do complexo antioxidante em sementes de arroz e milho submetidas à restrição hídrica durante o processo de produção das sementes e suas plântulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Sementes da linhagem elite CMG 1509 de arroz, oriundas do programa de melhoramento de arroz de terras altas do convênio entre a Universidade Federal de Lavras (UFLA), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e Embrapa Arroz e Feijão foram produzidas em duas localidades, uma sob restrição hídrica e outra sem restrição hídrica. Essa linhagem foi escolhida por ser tolerante ao estresse hídrico, de acordo com avaliações agronômicas. A localidade para conduzir o experimento com restrição hídrica foi escolhida por ser um ambiente já caracterizado como seco, com alta restrição hídrica, sendo ideal para o trabalho.

O experimento sem restrição hídrica foi conduzido sob irrigação suplementar durante todo o desenvolvimento da cultura, mantendo as condições hídricas ideais de cultivo (600 a 700 mm) na unidade experimental situada no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da Universidade Federal de Lavras-UFLA localizada na cidade de Lavras a uma altitude de 954 m, 21°12'11" de latitude sul e 44°58'47" de longitude oeste. O clima é classificado como subtropical úmido, temperatura média de 19,4 °C e a precipitação média anual de 1529,7 mm.

Já o experimento com restrição hídrica foi conduzido na unidade experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no município de Poço Redondo, Sergipe, a 188 m de altitude, 09° 48' 18" de latitude Sul e 37° 41' 04" de latitude oeste. O município está inserido no polígono das secas, com um clima do tipo megatérmico semiárido, temperatura média anual de 25,2 °C, precipitação pluviométrica média no ano de 605,2 mm e período chuvoso de março a julho com chuvas mal distribuídas.

A restrição hídrica foi induzida na fase reprodutiva R3, logo antes da emissão das panículas, cerca de 50 dias após a semeadura. A indução ao estresse foi confirmada por meio de leituras diárias de tensiômetros instalados na área de produção. A irrigação foi efetuada quando a média das leituras dos tensiômetros estava em torno de -25 kPa, considerada condição de deficiência hídrica para a cultura do arroz (STONE *et al.*, 1986).

Os dois experimentos foram implantados em delineamento de blocos completos casualizados com três repetições. Em ambos, as parcelas experimentais foram constituídas por quatro linhas de 4,0 m e densidade de semeadura de 80 sementes/metro, sendo as duas centrais

consideradas como parcela útil. Os demais tratamentos culturais empregados nos experimentos foram os mesmos recomendados para a cultura do arroz nas regiões de avaliação.

Para a produção de sementes de milho foram utilizadas sementes da linhagem 91, provenientes do programa de melhoramento da empresa Geneseeds Recursos Genéticos LTDA., e caracterizada como tolerante ao estresse hídrico. Dois experimentos foram implantados, sendo que no primeiro, as plantas foram cultivadas em vasos sob condições de restrição hídrica e, no segundo, em quarenta vasos cultivados sem estresse hídrico. Em vasos de 30L foram colocados substrato composto por areia e terra na proporção de 1:1 sendo o experimento instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e cada parcela constituída por 10 vasos (DINIZ *et al.*, 2015).

Nos substratos dos vasos contendo as plantas submetidas à deficiência hídrica a capacidade de retenção de água do solo foi mantida em 40% após a fertilização dos óvulos. Nos substratos dos vasos contendo as plantas não submetidas à deficiência hídrica a capacidade de retenção do solo foi mantida em 70%. Em ambas as condições, a reposição da água foi feita diariamente, com base no peso inicial de cada vaso com substratos. Os demais tratamentos culturais empregados nos experimentos foram os mesmos recomendados pela cultura do milho.

2.2 Avaliação da qualidade das sementes

As análises para a avaliação da qualidade das sementes de arroz e milho foram realizadas no Laboratório Central de Sementes da UFLA.

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

O teste de germinação foi realizado de forma semelhante para as sementes de arroz e milho. Foram utilizadas 200 sementes de cada espécie, divididas em quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada em papel do tipo germitest, umedecidas com água em quantidade igual a 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida, as sementes foram mantidas em germinador, regulado à temperatura de 25 °C.

As avaliações foram realizadas aos 5 (primeira contagem da germinação) e 14 dias após a semeadura, para arroz e aos 4 (primeira contagem da germinação) e 7 dias após a semeadura, para o milho. O número de plântulas normais foi computado de acordo com as prescrições contidas nas Regras para Análise de Sementes para cada cultura (BRASIL, 2009).

Ressalta-se que as plântulas normais no final do teste de germinação foram armazenadas em freezer -80° para posterior análise enzimática.

Para o teste de envelhecimento acelerado foi utilizado o método de câmaras do tipo *gerbox* onde 200 sementes de cada espécie (arroz e milho), divididas em 4 repetições de 50 sementes, foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes foram mantidas no interior de uma câmara de germinação com temperatura de 41 °C, por um período de 48 horas para as sementes de arroz e 96 horas para as sementes milho. Depois desse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação conforme metodologia descrita acima, determinando-se a porcentagem de plântulas normais ao 5° dia para arroz e 9° dia para milho, após a sementeira (MARCOS FILHO, 1999; VIEIRA; CARVALHO, 1994).

Para a realização do teste de emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE), as sementes foram semeadas em bandejas de plástico (20 cm x 22 cm x 12 cm) contendo areia como substrato, em quatro repetições de 25 sementes. A contagem de plântulas emergidas foi realizada diariamente até aos 11 dias para o arroz e até aos 14 dias para o milho, após a sementeira. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi determinado segundo método de Maguire (1962).

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, para cada espécie.

2.3 Análises proteômicas pela técnica de eletroforese

Análise das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC. 1.11.1.7) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foram feitas por meio da técnica de eletroforese (ALFENAS *et al.*, 2006).

Para a análise dessas enzimas as sementes e as plântulas oriundas do teste de germinação foram maceradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em mortar de porcelana e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

Para a extração das enzimas CAT, SOD e APX utilizou-se o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + 0,1% de beta-mercaptoetanol e para a enzima POX o tampão utilizado foi o fosfato de potássio, todos na proporção de 300µL por 100mg de sementes e de plântulas. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema descontinuo de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi realizada a 150V por 5 horas. Vale ressaltar que para a enzima APX foram adicionados 2mM de ácido ascórbico ao tampão de corrida e feita uma pré-corrida de 30 minutos antes da aplicação o sobrenadante contendo as amostras proteicas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas CAT, SOD e POX conforme Alfenas *et al.* (2006), com modificações. Já para a enzima APX, o gel foi equilibrado em 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e 2 mM de ácido ascórbico, por duas vezes durante 15 minutos cada. A incubação do gel foi feita por 20min em 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 4mM de ácido ascórbico e 2mM de H₂O₂ e lavado durante 1 minuto em 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0). Sua revelação foi em solução contendo 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,8), 22mM TEMED e 0,1mM NBT e mantido sob agitação até o aparecimento das bandas.

Para cada enzima foram analisados três géis, representando as três repetições biológicas, as quais foram utilizadas também como uma repetição para a quantificação das enzimas pelo software Image J (SCHNEIDER *et al.*, 2012). As avaliações foram feitas em função da intensidade das bandas, com resultados expressos em área (mm²).

2.4 Análises proteômicas por meio de *Western Blotting*

A avaliação da enzima 1-Cys-Prx, foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. Inicialmente foi feita a extração de proteína total, utilizando 150 mg de tecido, sementes e plântulas, de cada tratamento, que foram maceradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em mortar de porcelana.

O tampão de extração foi preparado usando duas soluções, A e B. A solução A foi composta por 888 mg trizma HCl, 530 mg de trizma base e 625 µl de triton X-100 completados em um volume de 100ml de água ultrapura. Já a solução B continha 32ml da solução A, 45g de ureia, 15,2g thiuréia, 3,6g de CHAPS completados em um volume de 100ml com água ultrapura.

As amostras foram homogeneizadas em 800 µl de tampão de extração (600µl da solução B, 1 µl de inibidor de protease, 14 µl de DTT(1M), 4,6 µl de DNase, 20 µl de RNase (20mg/ml), completando o volume final com água ultrapura). A incubação das amostras foi feita em gelo durante 15 minutos e após esse período as amostras foram centrifugadas por 10

minutos à 14000 rpm à 4 °C. Depois da centrifugação o sobrenadante foi pipetado em novo tubo e as amostras armazenadas a -20 °C.

Para determinar a concentração da proteína total extraída, foi utilizado o método Bradford (1976) com quantificação no espectrofotômetro BioTek Eon™.

Depois da extração e quantificação das proteínas, foram aplicados 60µg de proteína de cada amostra em um gel de poliacrilamida (SDS 12%) e realizada a corrida em cuba de eletroforese por aproximadamente 1 hora e 30 minutos à 100 volts. Finalizada a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana Immobilon-P, utilizando o kit de transferência BioRad. Para certificar que ocorreu a transferência das proteínas, a membrana foi corada com Ponceau e lavada com TBST 1x (Tris 500mM + NaCl 1,5M; pH 7,5).

O bloqueio da proteína foi feito utilizando-se BSA 3% durante 1 hora e a incubação do anticorpo anti-1-Cys-Prx (Abcam - ab16830), diluído conforme especificações do fabricante, feita overnight. Após esse período a membrana foi lavada novamente em TBST 1x e incubada por 1 hora e 30 minutos com o anticorpo secundário (HRP Horse Anti-Mouse IgG, ligado a peroxidase, da empresa Vector Laboratories). A detecção do anticorpo foi feita por meio de filmes fotográficos utilizando-se soluções fixadoras e reveladoras. A quantificação da proteína foi realizada por meio do programa Image J, com a análise da intensidade e mensuração das isoformas obtidas nos filmes (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

O mesmo protocolo de incubação foi realizado para a imunodeteção do anticorpo primário anti- GAPDH (Abcam – ab37168), usado como controle endógeno.

2.5 Quantificação da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Amostras de 0,2 g de sementes e plântulas foram maceradas em nitrogênio líquido acrescido de 20% de PVP (m/v) e homogeneizadas em 1,5 mL ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). Foram retiradas duas amostras de cada tratamento e as análises realizadas em triplicata.

O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Alíquotas (125 µl) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (250 µl), contendo ácido tiobarbitúrico (TBA - 0,5%) e TCA (10%). Incubou-se as amostras em banho maria a 95 °C durante 30 minutos e a reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo. As leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm.

Ressalta-se que foram retiradas três amostras das sementes colhidas de cada tratamento, constituindo as repetições biológicas, e para as plântulas, cada repetição do teste de germinação foi utilizada como repetição biológica de cada tratamento.

2.6 Análises proteômicas pelo espectrofotômetro

O extrato foi obtido pela maceração do material em nitrogênio líquido, amostras de 0,1 g de sementes ou plântulas de acordo com cada tratamento. Foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375 µl de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), 15 µL de EDTA 0,2mM (pH 7,0), 75 µl ácido ascórbico 10mM e 1035 µl de água destilada. O extrato foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20°C até a realização das análises enzimáticas da SOD, CAT e APX (BIEMELT *et al.*, 1998). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT). Foram adicionados 6 µl do extrato enzimático a 194 µl do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM e riboflavina 0,2 mM (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

Para a atividade da enzima CAT foi utilizado uma alíquota de 3 µl do extrato enzimático e na sequência adicionados 177 µl de meio de incubação contendo: 90 µl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 78 µl de água destilada e 9 µl de peróxido de hidrogênio 12,5 mM. Após, foi feita a incubação a 28 °C, de acordo com Havir e McHale (1990).

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando-se uma alíquota de 3 µL do extrato enzimático em que foi adicionado 177 µl de meio de incubação contendo: 90 µl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 9 µl de ácido ascórbico 10 mM e 9 µl de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981).

Ressalta-se que para as análises proteômicas foram retiradas três amostras das sementes colhidas de cada tratamento, constituindo as repetições biológicas e para as plântulas, cada repetição do teste de germinação foi utilizada como repetição biológica de cada tratamento.

2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas, dos dados dos testes fisiológicos, dados proteômicos e os da quantificação da peroxidação lipídica foram realizadas por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2014). A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando necessário, foram realizadas as transformações dos dados.

Os experimentos para a cultura do arroz foram implantados em delineamento de blocos completos casualizados com três repetições. Em ambos, as parcelas experimentais foram constituídas por quatro linhas de 4,0 m e densidade de semeadura de 80 sementes/metro, sendo as duas centrais consideradas como parcela útil. Já para cultura do milho, cada um dos dois experimentos foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e cada parcela constituída por 10 vasos.

3 RESULTADOS

3.1 Arroz

De acordo com as análises de variância, não houve diferença estatística significativa para os resultados obtidos nos testes de germinação e nos os testes vigor (primeira contagem da germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência) quando foram avaliadas as sementes de arroz produzidas (TABELA 1).

Tabela 1 - Resultados médios de primeira contagem da germinação (PC), germinação (GERM), envelhecimento acelerado (ENV), emergência (EMERG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de arroz produzidas ou não sob a restrição hídrica.

TRATAMENTOS	PC	GERM	ENV	EMERG	IVE
Com estresse	60.0 a	86.0 a	87.0 a	85.0 a	9.02 a
Sem estresse	66.0 a	93.0 a	90.0 a	87.0 a	8.36 a
CV	4.15	2.84	1.57	4.98	9.52

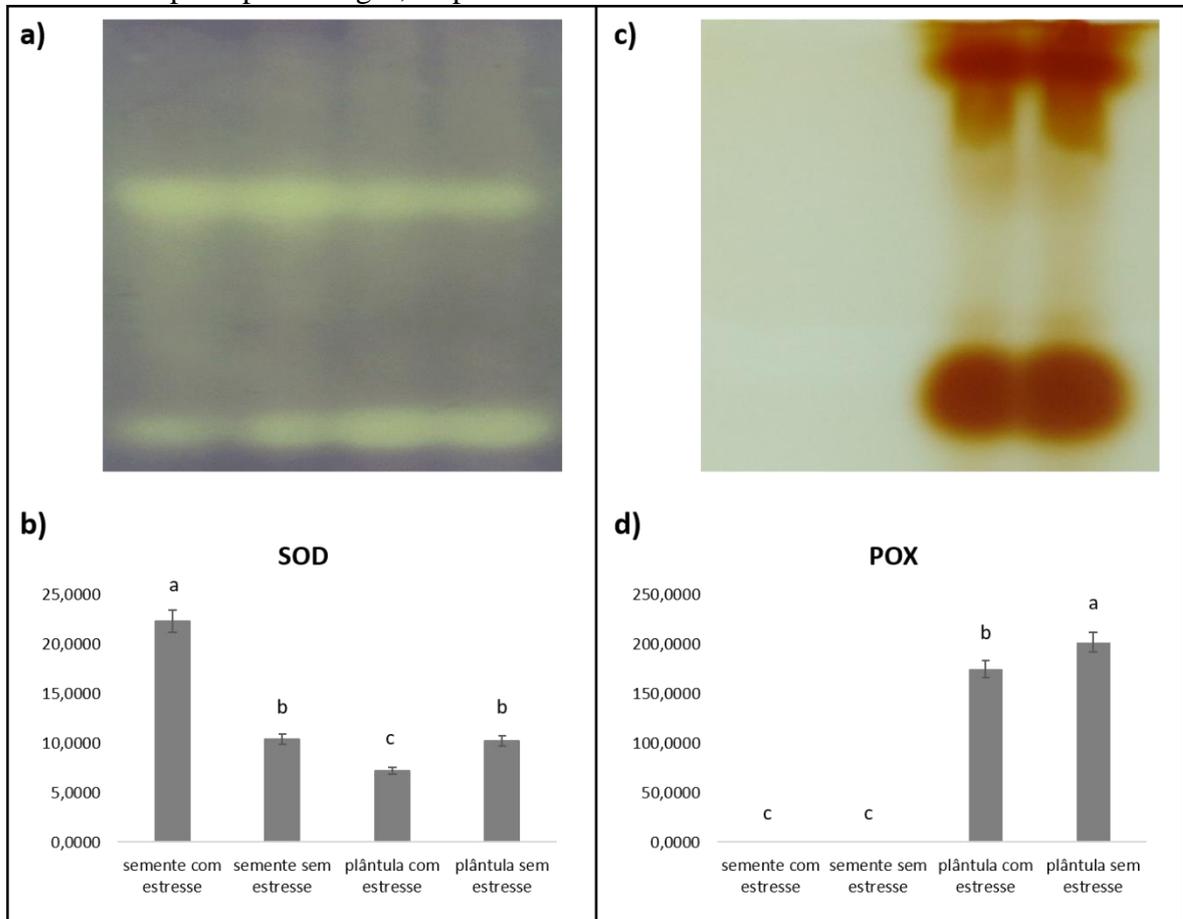
*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Em relação as atividades das enzimas SOD, POX, CAT e APX, sob condições de restrição hídrica ou não, foram observados diferentes padrões em sementes e plântulas de arroz submetidas ou não ao estresse. Para a superóxido dismutase verificou-se que em sementes produzidas sob estresse hídrico houve maior atividade da enzima em comparação àquelas que não passaram pelo estresse (FIGURA 1a e 1b). Porém, quando se avalia as plântulas, a atividade da SOD foi maior em plântulas oriundas de sementes que não foram submetidas ao estresse.

Quanto à POX, não foi detectada atividade em sementes de arroz, independentemente de serem produzidas ou não sobre condição de restrição hídrica (FIGURA 1c e 1d). Porém, em plântulas, verificou-se atividade da peroxidase, sendo essa, menor em plântulas oriundas de sementes que passaram pela restrição hídrica.

Figura 1 – Atividade das enzimas SOD e POX em sementes e plântulas de arroz em condições de restrição hídrica e sem. a) e b) padrão de expressão da SOD e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d), padrão de expressão da e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.



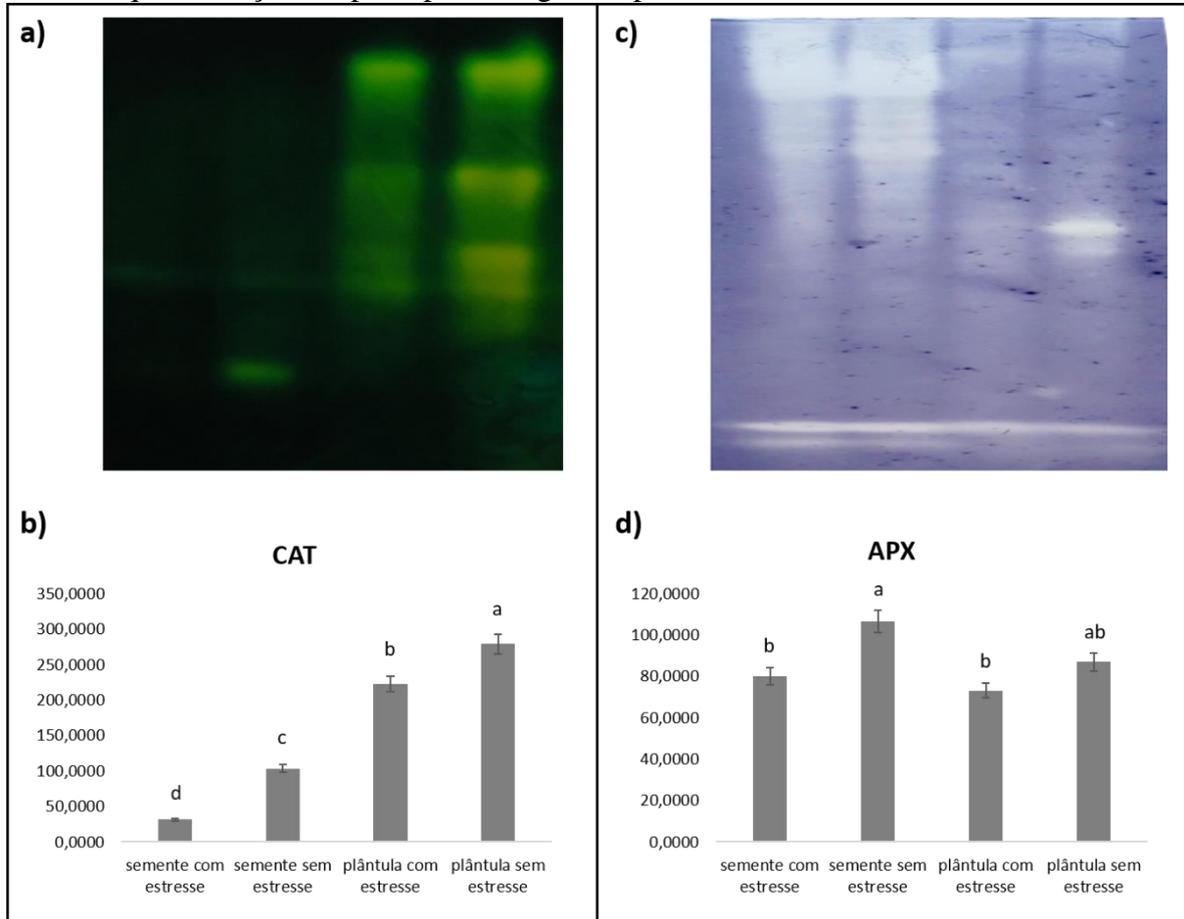
Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Em relação às enzimas catalase e ascorbato peroxidase, tanto em sementes quanto em plântulas, maior atividade foi observada em plântulas provenientes de sementes produzidas sob restrição hídrica, e maior observada em sementes produzidas sob restrição hídrica, padrões estes também observados para a SOD (FIGURA 2a e 2b). Verifica-se também que a enzima CAT apresenta uma isoforma com o padrão de banda mais forte em sementes com estresse (FIGURA 2c e 2d). Além disso, observou-se também maior atividade da enzima catalase em plântulas do que em sementes.

Para a enzima APX observa-se duas isoformas em plântulas oriundas de sementes que foram produzidas sem estresse hídrico, que não aparecem na condição com estresse.

Figura 2 – Atividade das enzimas CAT e APX em sementes e plântulas de arroz em condições de restrição hídrica e sem. a) e b) padrão de expressão da CAT e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da APX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.

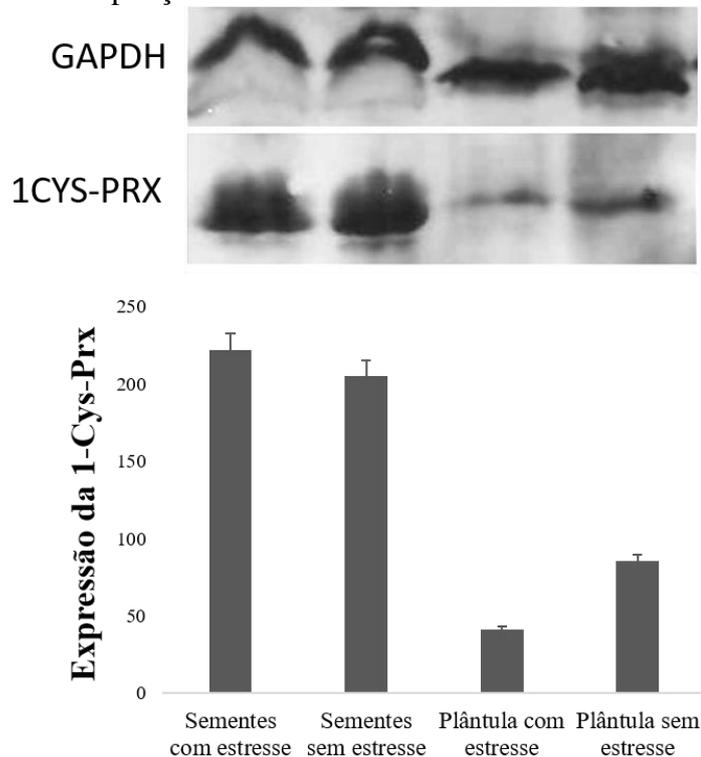


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Pelo resultado da imunodeteção utilizando o anticorpo anti α -hPrx6-SO₂H, foi observada a presença da 1-cys Prx em sementes e plântulas de arroz submetidas ou não, à restrição hídrica (FIGURA 3). Na quantificação por meio do ImageJ verificou-se que as sementes produzidas sob restrição hídrica têm uma maior quantidade dessa enzima quando comparadas com as sem restrição. Porém, em plântulas provenientes de sementes produzidas sob restrição hídrica a expressão dessa enzima é reduzida. Assim, a expressão dessa enzima em nível de plântula possui padrão diferente ao observado em sementes.

Figura 3 – Imunodeteccção da 1-cys-Prx em sementes e plântulas de arroz em condições de estresse e sem estresse hídrico. Barras representam o desvio padrão proveniente da média de duas repetições.

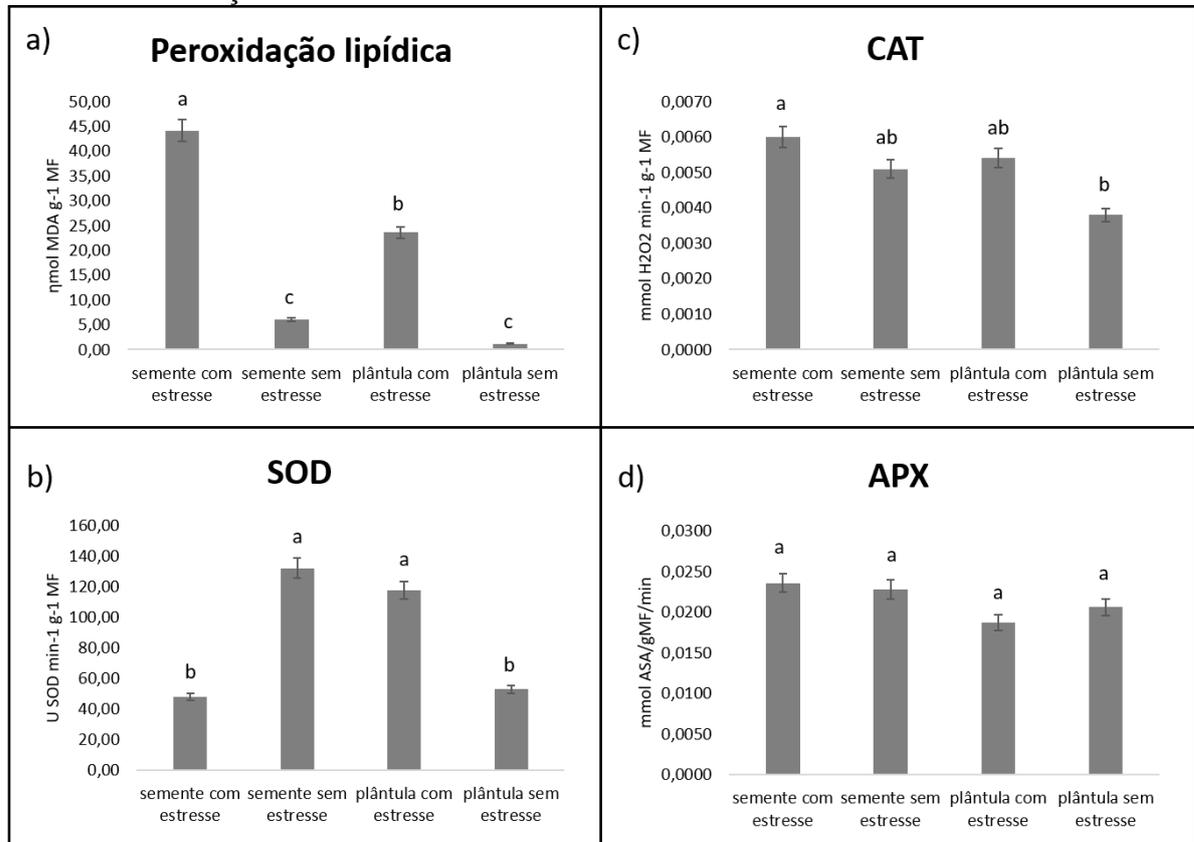


Fonte: Da autora (2020).

Por meio da quantificação da peroxidação lipídica, observou-se diferença estatística em sementes submetidas à restrição hídrica e em plântulas provenientes dessas sementes, em que a maior atividade foi verificada em sementes e plântulas submetidas à restrição hídrica (FIGURA 4a).

Em relação a enzima SOD, maior atividade, foi observada em sementes não submetidas ao estresse e em plântulas oriundas de sementes que foram submetidas ao estresse (FIGURA 4b). Para APX, foi possível observar atividade semelhante, independentemente da condição exposição à restrição hídrica, para as sementes e plântulas (FIGURA 4c). Quanto à catalase, foi verificada diferença estatística para a atividade da CAT quando se compara semente com estresse (maior atividade) e plântula oriunda de sementes sem estresse (menor atividade) (FIGURA 4d).

Figura 4 – Quantificação da Peroxidação lipídica e atividade das enzimas SOD, CAT e APX, por meio do espectrofotômetro, em sementes e plântulas de arroz submetidas ou não à restrição hídrica.



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

3.2 Milho

Ao analisar os dados referentes a qualidade fisiológica de sementes de milho produzidas ou não sob condições de estresse hídrico, não houve diferenças significativas para os testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência (TABELA 2). Houve diferença significativa para o teste de primeira contagem da germinação.

Tabela 2 - Resultados médios de primeira contagem da germinação (PC), germinação (GERM), envelhecimento acelerado (ENV), emergência (EMERG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de milho produzidas ou não sob a restrição hídrica.

TRATAMENTOS	PC	GERM	ENV	EMERG	IVE
Com estresse	61.0 b	99.00 a	94.0 a	99.0 a	15.54 a
Sem estresse	86.0 a	98.00 a	99.0 a	99.0 a	15.37 a
CV	3.07	1.23	2.51	0.68	2.40

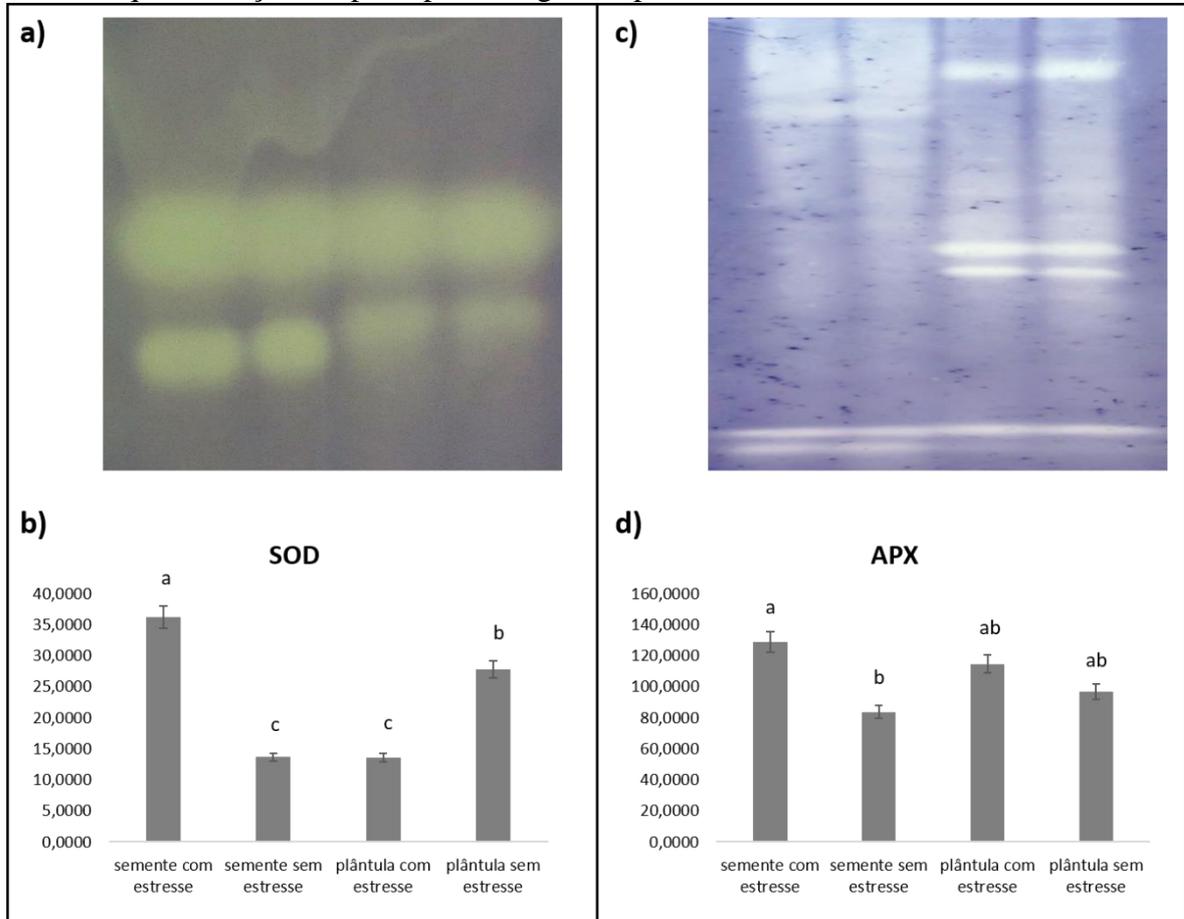
*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

No teste de primeira contagem foi verificada em sementes produzidas sob restrição hídrica, menor porcentagem de germinação (61%) em comparação com aquelas produzidas sem restrição hídrica (86%) (TABELA 2). Diante disso, é possível inferir que a condição de restrição hídrica durante o processo de produção de sementes de milho pode retardar a germinação dessas sementes.

Quanto à análise dos resultados da atividade de enzimas verifica-se um padrão semelhante para as enzimas SOD e APX em sementes (FIGURA 5). Essas enzimas têm maior atividade em sementes produzidas sob restrição hídrica em relação àquelas produzidas sem a restrição hídrica. Esse padrão é diferente em plântulas provenientes dessas sementes para a superóxido dismutase, ou seja, em plântulas sem o estresse hídrico houve maior atividade da SOD. Já para a ascorbato peroxidase, não houve diferença estatística entre os tratamentos, com e sem estresse hídrico.

Figura 5 – Atividade das enzimas SOD e APX em sementes e plântulas de milho em condições de restrição hídrica e sem. a) e b) padrão de expressão da SOD e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da APX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.



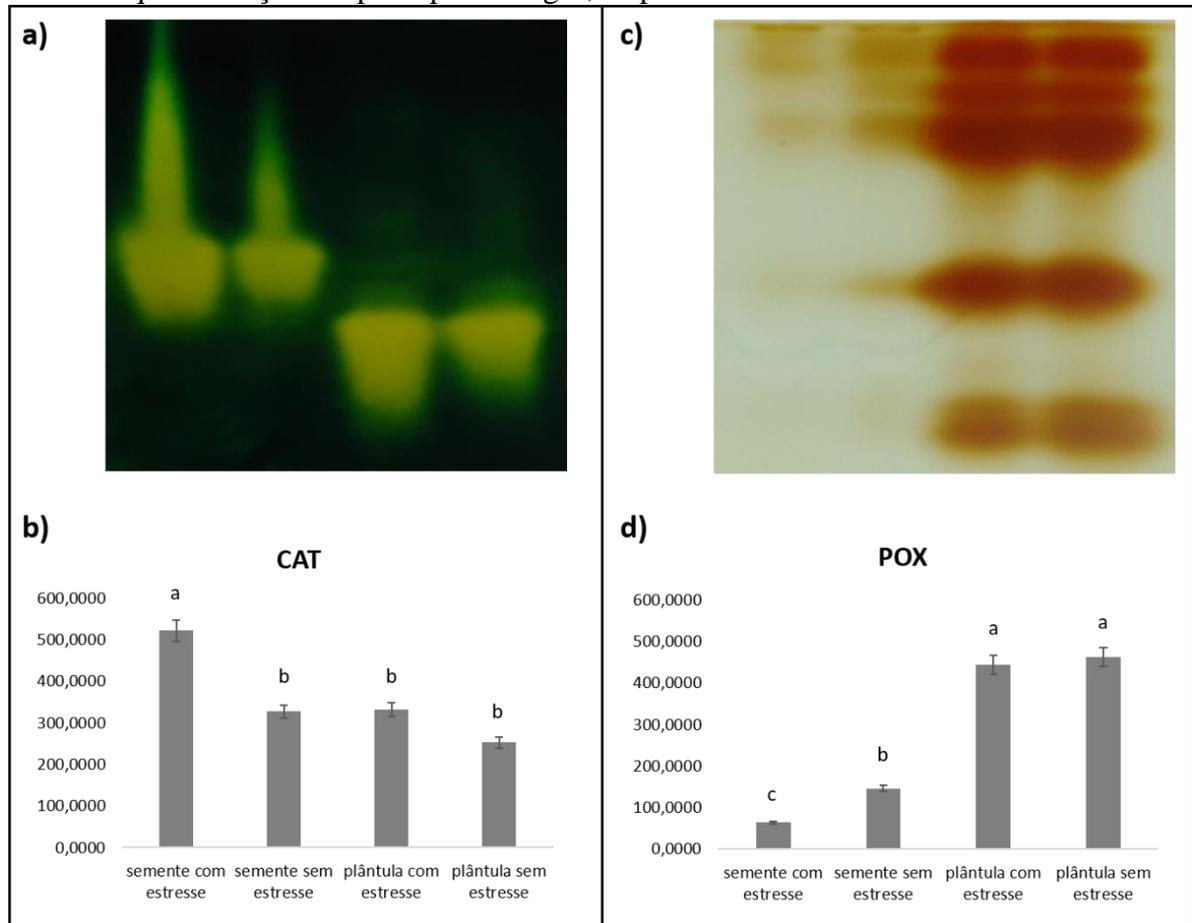
Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Os padrões observados para CAT (FIGURA 6a e 6b) em sementes são semelhantes aos observados para a SOD e a APX, maior atividade em sementes submetidas à restrição hídrica. Já em plântulas não houve diferença entre os dois tratamentos (com e sem restrição hídrica), assemelhando-se ao que foi verificado em plântulas para a enzima APX.

Em sementes, a POX tem menor atividade do que em plântulas (FIGURA 6c e 6d). Além disso, sementes que não foram produzidas sob condições de restrição hídrica possuem maior atividade da peroxidase em comparação com as produzidas sob restrição hídrica. Já em plântulas, a atividade da POX foi semelhante, independente do tratamento. Esse mesmo padrão foi verificado para a APX e CAT.

Figura 6 – Atividade das enzimas CAT e POX em sementes e plântulas de milho em condições de restrição hídrica e sem a) e b) padrão de expressão da CAT e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da POX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.



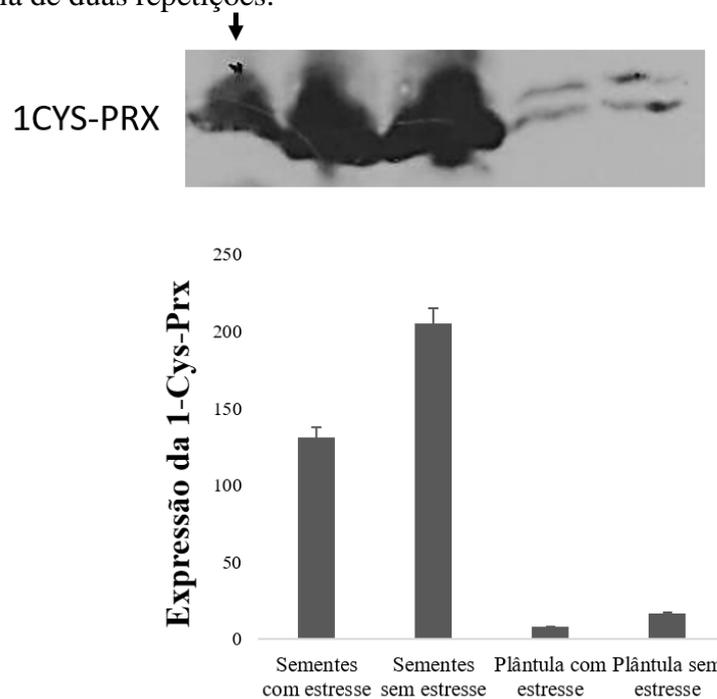
Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Em relação A avaliação da expressão da enzima 1-cys-prx em milho por meio da técnica de *Western Blotting* (FIGURA 7), foi verificada a expressão dessa em sementes de milho produzidas ou não em condições de restrição hídrica e em plântulas oriundas destas sementes. A maior expressão foi observada em sementes não submetidas à restrição hídrica e a menor em plântulas provenientes de sementes também não submetidas à restrição hídrica durante o processo de produção. Não foi possível detectar o anticorpo anti-GAPDH (ab37168) da empresa Abcam, utilizado como controle endógeno, em sementes e plântulas de milho.

Em sementes que não foram submetidas ao déficit hídrico verifica-se uma menor atividade da 1-cys-prx em comparação com a observada naquelas que estavam sob estresse. Além disso, foram verificadas duas isoformas para essa enzima em plântulas independente do estresse.

Figura 7 – Imunodeteção da 1-cys-Prx em sementes e plântulas de milho em condições de estresse e sem estresse hídrico. As barras representam o desvio padrão proveniente da média de duas repetições.



*seta indica controle positivo utilizando sementes de arroz.

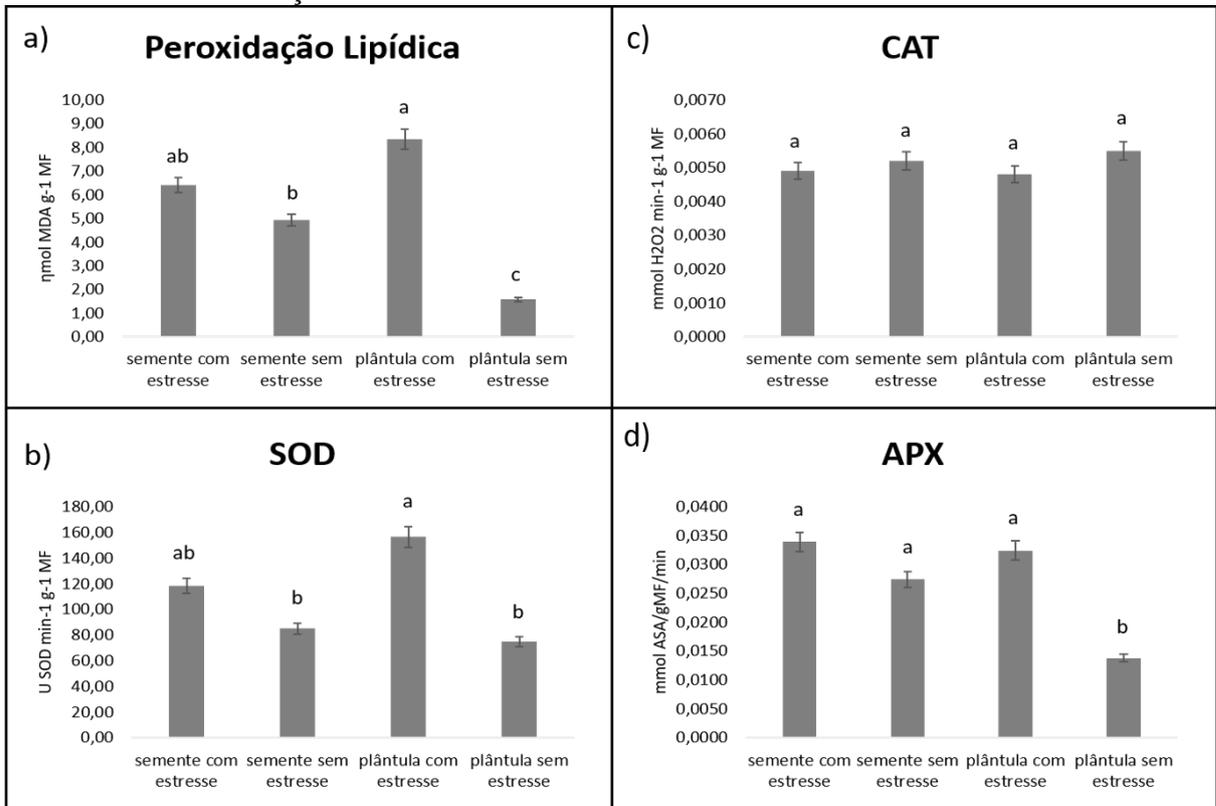
Fonte: Da autora (2020).

Por meio da análise de variância dos dados de peroxidação lipídica, observa-se em sementes com estresse maior peroxidação lipídica que a observada em sementes produzidas sem restrição hídrica, e isso foi observado também em plântulas provenientes dessas sementes (FIGURA 8a).

A atividade da SOD foi estatisticamente semelhante entre os tratamentos, no entanto, em plântulas oriundas dessas sementes, foi maior em sementes produzidas sob restrição hídrica (FIGURA 8b).

As atividades da CAT e APX verificadas por meio de espectrofotometria foi estatisticamente igual em sementes submetidas ou não à restrição hídrica (FIGURA 8c e 8d). Já em plântulas esse padrão de atividade manteve-se para a CAT, porém para a APX, em plântulas obtidas de sementes produzidas sob restrição hídrica houve maior atividade do que naquelas que não produzidas sob a restrição hídrica.

Figura 8 – Quantificação da Peroxidação lipídica e atividade das enzimas SOD, CAT e APX, por meio do espectrofotômetro, em sementes e plântulas de milho submetidas ou não à restrição hídrica.



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

4 DISCUSSÃO

4.1 Arroz

Por meio dos resultados dos testes para determinar a qualidade fisiológica de sementes de arroz foi observado que a restrição hídrica a qual as sementes foram expostas durante a produção, não interferiu nos valores de germinação e vigor das sementes.

O período de desenvolvimento mais crítico à restrição hídrica para a planta de arroz é o da reprodução. A falta de água pode causar a esterilidade devido a má formação do grão de pólen ou má formação das espiguetas, tendo como efeito a redução da produtividade (JIN *et al.*, 2013). Apesar de Rodrigues *et al.* (2018) terem verificado a redução de produtividade para sementes de arroz produzida em condições de deficiência hídrica, os testes de vigor indicaram que o estresse hídrico submetido para a produção dessas sementes não afetou na sua qualidade fisiológica. Esse mesmo padrão foi verificado nesta pesquisa.

No presente trabalho foi observada, por meio da técnica de eletroforese, maior atividade da enzima superóxido dismutase em sementes que foram produzidas sob restrição hídrica. Rodrigues *et al.* (2018) em estudos de fenotipagem e expressão de proteínas em linhagens de arroz de terras altas sob condição de deficiência hídrica, identificaram a linhagem CMG 1509, a mesma utilizada neste experimento, como tolerante a restrição hídrica. Além disso, verificaram redução da produtividade de grãos e maior atividade da enzima SOD, avaliada também por meio da técnica de eletroforese em sementes submetidas à restrição hídrica. Observa-se geralmente, que os genótipos tolerantes tendem a manter o equilíbrio celular através do controle da concentração de EROS, possuindo uma maior atividade e produção de isoenzimas antioxidantes, que minimizam as perdas de rendimento da planta (SHARMA *et al.*, 2012).

A superóxido dismutase é conhecida como sendo a primeira enzima atuante no processo de eliminação das EROS. A mesma atua na degradação do superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CARNEIRO *et al.*, 2011). Apesar de o H_2O_2 ser considerado pouco reativo, pois não afeta diretamente os vários componentes celulares, sua eliminação é necessária pois esse pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis (MITTLER *et al.*, 2011). Enzimas como a catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e as peroxirredoxinas atuam, posteriormente a atividade da SOD, uma vez que estão envolvidas na eliminação do peróxido de hidrogênio gerado.

A não detecção da POX verificada em sementes pode ser justificada pela presença da CAT e da APX, que por possuírem a mesma função de converter o H₂O₂ em água e gás oxigênio, podem ter sido suficientes para retomar o equilíbrio homeostático da célula (GILL; TUTEJA, 2010). Mesmo quando as plantas não são submetidas aos estresses bióticos ou abióticos essas possuem atividade antioxidantes durante seu metabolismo, já que a produção de EROS é verificada durante a respiração e fotossíntese (NOCTOR, 2007). Esse fato pode justificar a maior atividade das enzimas antioxidante nos tratamentos sem estresse verificados nesse trabalho.

Apesar de a restrição hídrica não ter alterado a qualidade fisiológica das sementes de arroz produzidas sob restrição hídrica, houve variações das atividades de algumas enzimas, a exemplos da redução da atividade de CAT e APX nesta condição.

A menor atividade da enzima catalase foi também observada em sementes de linhagens de arroz de terras altas produzidas sob condição de restrição hídrica comparado com o controle (RODRIGUES *et al.*, 2018). Essa redução pode estar associada à inibição ou alteração da CAT e APX causada por proteases induzidas pelos peroxissomos ou devido a maior eficiência de outras enzimas envolvidas, como as peroxirredoxinas, que apresentam a mesma função de remoção de peróxido de hidrogênio (ABEDI; PAKNIYAT, 2010).

Já a atividade observada para a 1-Cys-Prx acompanha o mesmo padrão verificado para a enzima SOD e justifica a menor atividade das enzimas POX, CAT, APX principalmente para as sementes. Pode-se inferir que a SOD degradou o superóxido produzido em excesso em sementes produzidas em condições de déficit hídrico e que a 1-cys-prx foi a principal enzima a remover o peróxido de hidrogênio gerado pela SOD. A inversão do padrão de expressão para as plântulas oriundas dessas sementes provavelmente ocorreu porque a SOD e CAT foram capazes de fazer com que a planta retomasse seu equilíbrio homeostático na fase de plântula.

A técnica de western blotting (WB) vem sendo utilizada para verificar a atividade da enzima peroxirredoxina em culturas como *Arabidopsis*, arroz, cevada, soja, trigo, utilizando anticorpos produzidos pelos grupos de pesquisas ou por empresas particulares (LEE *et al.*, 2000; HASLEKAS, *et al.*, 2003). Para avaliar a atividade da 1-Cys-Prx em sementes e plântulas de arroz sob condições ou não de estresse hídrico foi utilizado o mesmo anticorpo (Abcam - ab16830) que identificou essa enzima em *Brassica rapa* (KIM *et al.*, 2011).

Os padrões para os níveis da enzima 1-cys- prx encontrados nesse trabalho seguiram os mesmos padrões de acumulação dos transcritos dessa enzima encontrado em cevada e arroz (LEE *et al.*, 2000; STANCY *et al.*, 1999; AALEN 1994). Lee *et al.* (2000), verificaram que o

nível do mRNA do gene para 1-cys-Prx foi diminuindo rapidamente depois da germinação das sementes e manteve reduzido até 15 dias após a embebição.

A enzima 1-cys-prx é tida como exclusiva de sementes, de caráter monogênico e acumulada na camada de aleurona e embrião (HASLEKAS *et al.*, 20013). A presença da 1-Cys-Prx em plântulas de arroz oriundas de sementes produzidas ou não sob restrição hídrica, confirma o que foi verificado por Lee *et al.* (2000). Tanto em nível de transcritos quanto de proteína a 1-cys-prx é detectada em sementes e plântulas, sendo observada diminuição significativa depois de 15 dias após a sementeira. Diante disso, os resultados deste trabalho demonstraram que a expressão da 1-cys-prx pode ser considerada quase que exclusivamente de sementes, sendo detectada em sementes e plântulas de arroz 14 dias após a sementeira.

Os altos valores para peroxidação lipídica verificados em sementes e plântulas submetidas ao estresse, confirmam que o déficit hídrico causou estresse durante a produção dessas sementes e este permaneceu nas plântulas oriundas das mesmas. O aumento na peroxidação lipídica pode provocar danos nas membranas e geram subprodutos tóxicos, como as espécies reativas de oxigênio (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010).

As enzimas SOD, CAT e APX são as principais enzimas, do eficiente mecanismo de defesa das plantas, que atuam na eliminação das EROs. Os resultados da quantificação dessas enzimas verificadas por meio de espectrofotometria, confirmam que esse mecanismo é eficiente. A atividade não diferenciada entre todos os tratamentos para as enzimas CAT e APX são indícios de que a quantidade de enzima SOD, foi o suficiente para combater os danos provocados pelo estresse hídrico.

De forma geral, por meio da quantificação da peroxidação lipídica, pode-se inferir que a restrição hídrica pode ter provocado danos em nível de membrana. Devido ao sistema antioxidante enzimático atuante, verificado pelos resultados apresentados. Esse dano não foi suficiente para reduzir a qualidade fisiológica das sementes, nem o desenvolvimento das plântulas.

4.2 Milho

Pelo resultado do teste da primeira contagem de germinação das sementes de milho é possível inferir que a condição de restrição hídrica durante o processo de produção de sementes de milho pode reduzir a germinação dessas sementes até 4 dias após a sementeira. Santos *et al.* (2016) avaliaram os efeitos do estresse hídrico em milho observaram que o déficit hídrico reduz o crescimento inicial das plântulas.

Diniz *et al.* (2015), ao avaliarem a qualidade fisiológica e os padrões proteicos em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de milho produzidas sob restrição hídrica e estresse salino, verificaram, pelo teste de germinação, que as sementes produzidas com ou sem estresse hídrico apresentaram ótima germinação quando colhidas no estágio de ML5. Na presente pesquisa independentemente de estar condicionado ou não ao estresse hídrico foram verificados altos valores de germinação.

Pelos resultados dos testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência, foi possível verificar alta qualidade fisiológica das sementes de milho submetidas ou não ao estresse hídrico. Trabalhos anteriores (ABREU *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016; VILELA *et al.*, 2019) também verificaram que a linhagem 91 de milho apresenta alto vigor sendo considerada uma linhagem tolerante ao estresse hídrico.

Pelos resultados da avaliação proteômica obtidos pela técnica de eletroforese foram observadas variações no padrão de expressão das enzimas SOD, APX, CAT e POX em sementes. Abreu *et al.* (2017) ao estudarem a expressão de enzimas quanto a tolerância a seca, em sementes de diferentes linhagens de milho produzidas em quatro populações de plantio, não verificaram expressão diferenciada da enzima SOD em sementes provenientes de plantas cultivadas em diferentes populações de plantio, porém, foi observado que sementes da linhagem 91 tem menor expressão da SOD e sementes da linhagem 44, classificadas como não tolerante à restrição hídrica, maior expressão da enzima CAT.

Quanto à expressão da SOD, CAT e APX na presente pesquisa, foi observada maior atividade dessas enzimas em sementes que foram produzidas sob condição de restrição hídrica o que pode estar associada à função desempenhada por elas na destoxificação celular. A SOD atua inicialmente, na transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, que é convertido em hidrogênio e água, pela ação das enzimas CAT, APX e POX (MALLICK *et al.*, 2000; NOCTOR; FOYER, 2018).

A atividade semelhante das enzimas CAT, APX e POX, submetidas ou não à restrição hídrica, é indicativo da presença de um sistema antioxidante de defesa ao estresse, provocado pela restrição hídrica, o qual é mantido na fase de plântula por meio das enzimas catalase e ascorbato peroxidase.

A maior atividade da POX em plântulas do que em sementes, independente da condição de estresse, pode ser explicada pela maior taxa de respiração das plântulas, o que implica em maior produção de EROs e conseqüentemente maior atividade das enzimas do complexo antioxidante, como as peroxidases e catalases (SILVA NETA *et al.*, 2014).

Em relação à enzima 1-cys-prx em milho, foi verificado que essa peroxirredoxina é expressa em sementes de milho produzidas ou não em condições de restrição hídrica e em menor quantidade em plântulas oriundas dessas sementes 7 dias após a semeadura. Esse resultado, assim como os encontrados para a cultura do arroz, confirma que a 1-cys-prx não está presente exclusivamente nas sementes, ela pode ser encontrada em plântulas, alguns dias após a semeadura.

A maior atividade encontrada para a 1-cys-prx em sementes e plântulas submetidas à restrição hídrica diferem dos resultados encontrados nos estudos com plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* com superexpressão de a 1-Cys Prx, os quais sugerem que a proteção contra agentes oxidantes é a função essencial da enzima 1-Cys Prx (LEE *et al.*, 2000; HASLEKAS *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos para a quantificação da peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX em milho foram semelhantes ao encontrados para a cultura do arroz. De modo geral, a quantificação da peroxidação lipídica sugere que o estresse hídrico pode ter induzido danos em nível de membrana e esse dano foi controlado pelas enzimas antioxidantes avaliadas, sendo a enzima SOD com maior expressão. Além disso, os resultados para a qualidade fisiológica tanto em arroz, quando em milho, confirmam a eficiência do sistema, visto que a condição de restrição hídrica submetida nesse trabalho não foi suficiente para reduzir a qualidade fisiológica das sementes e o desenvolvimento das plântulas.

Pode-se inferir que na família Poaceae, quando submetida à restrição hídrica, ocorre maior peroxidação lipídica e que o sistema de defesa antioxidante das enzimas SOD, CAT e APX atua de forma eficiente para manter o equilíbrio homeostático das células.

O uso dos métodos de eletroforese e espectrofotometria foi eficiente para verificar a atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX em sementes e plântulas de arroz e milho. A espectrofotometria foi essencial para quantificar a atividade das enzimas e a eletroforese para identificar os padrões isoenzimáticos e a presença de isoformas.

5 CONCLUSÕES

As enzimas SOD, CAT, POX e APX têm atividade em sementes e plântulas de milho e arroz quando submetidas à restrição hídrica, e apresentam diferentes padrões isoenzimáticos. Porém, essa diferença não foi observada na qualidade fisiológica das sementes milho e arroz.

A enzima 1-Cys-Prx tem atividade em sementes quanto em plântulas de arroz aos 14 dias após a semeadura. Já em milho, essa tem atividade em sementes e plântulas aos 7 dias após a semeadura.

REFERÊNCIAS

- AALEN, R.B.; OPSAHL-FERSTAD, H.G.C.; OLSEN, O.A. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. **Plant J**, [S.l.], v. 5, p. 385-396, 1994.
- ABEDI, T.; PAKNIYAT, H. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Journal of Genetics and Plant Breeding**, Slezská, v. 46, n. 1, p. 27-34, 2010.
- ABREU, V.M. *et al.* Heat-resistant protein expression during germination of maize seeds under water stress. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, 2016.
- ABREU, V.M.; VON PINHO, E.V D.R.; DE CARVALHO, M.R.; NAVES, G.M.D.F.; VON PINHO, R.G.; DOS SANTOS, H. O. Indirect selection for drought tolerance in maize through agronomic and seeds traits. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 287-296, 2017.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- BERNINI, C.S.; GUIMARÃES, P. DE S.; GARCIA, L.A.C.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Caracteres fisiológicos e agrônômicos em progênies interpopulacionais de milho selecionadas sob condições de déficit hídrico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [S.l.], v. 15, p. 39-52, 2016.
- BERLATO, M.A.; FARENZENA, H.; FONTANA, D.C. Associação entre El Niño Oscilação Sul e a produtividade de milho no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.l.], v. 40, p. 423-432, 2005.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. 2009.
- BOUMAN, B.A.M.; TUONG, T.P. Field water management to save water and increase its productivity in irrigated. lowland rice. **Agricultural Water Management**. [S.l.], v. 49, n. 1, p. 1130, 2001.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. [30] Microsomal lipid peroxidation. *In: Methods in Enzymology*. Academic Press, 1978. p. 302-310.

CARNEIRO, M.M.L.C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P.O.D.; TEIXEIRA, S.B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M.A.; MORAES, D.M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v. 33, n. 4, p. 755-764, 2011.

DINIZ, R.P.; VON PINHO, E.V.D.R.; DOS SANTOS, H.O.; VON PINHO, R.G.; VEIGA, P. D.O.A.; CARVALHO, M.L.M. Physiological quality and protein patterns of corn seeds produced under water and salt stresses. **African Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 10, n. 42, p. 3962-3967, 2015.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.l.], v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

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

GUPTA, D.K.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J. (Eds.). Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. [S.l.]: Springer International Publishing, 2018.

HASLEKÅS, C.; VIKEN, M.K.; GRINI, P.E.; NYGAARD, V.; NORDGARD, S.H.; MEZA, T.J.; AALEN, R.B. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 133, n. 3, p. 1148-1157, 2003.

HASLEKÅS, C.; VIKEN, M.K.; GRINI, P.E.; NYGAARD, V.; NORDGARD, S.H.; MEZA, T.J.; JIN, Y. *et al.* Rice male development under drought stress: phenotypic changes and stage-dependent transcriptomic reprogramming. **Molecular Plant**, [S.l.], v. 6, p. 1630-1645, 2013

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana glauca*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 283, n. 2, p. 491-495, 1990.

JIN, Y; YANG, H.; WEI, Z.; MA, H.; GE, X. Rice male development under drought stress: phenotypic changes and stage-dependent transcriptomic reprogramming. **Molecular Plant**, [S.l.], v. 6, p. 1630-1645, 2013.

KIM, S.Y.; PAENG, S.K.; NAWKAR, G.M.; MAIBAM, P.; LEE, E.S.; KIM, K.S.; LEE, J. H. The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions. **Plant Science**, [S.l.], v. 181, n. 2, p. 119-124, 2011.

LEE, K.O.; JANG, H.H.; JUNG, B.G.; CHI, Y.H.; LEE, J.Y.; CHOI, Y O.; LEE, S.Y. Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. **FEBS Letters**, [S.l.], v. 486, n.2, p. 103-106, 2000.

LEE, J.; LEI, Z.; WATSON, B.S.; SUMNER, L.W. Subcellular Proteomics of Medicago Truncatula. **Front Plant Sci.**, [S.l.], v. 4, p. 112–131, 2013.

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

MARCOS FILHO, J. **Teste de envelhecimento acelerado**. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. V. 1. p. 1-24.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response to alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 9, p. 490-498, 2004.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.A.D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, [S.l.], v.16, n.6, p. 300-309, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 125-134, 2007.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.P.; FOYER, C.H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol.*, n. 80, p. 3-12, 2018

PANDEY, K.; DANGI, R.; PRAJAPATI, U; KUMAR, S; MAURYA, N.K.; SINGH, A.V.; PANDEY, A.K.; SINGH, J.; RAJAN, R. Advance breeding and biotechnological approaches for crop improvement: **A review**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 837-41, 2019.

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

RAZA, A.; RAZZAQ, A.; MEHMOOD, S.S.; ZOU, X.; ZHANG, X.; L.V, Y.; XU, J. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: a review. **Plants**, [S.l.], v. 8, n. 2), p. 34, 2019.

RODRIGUES, C.S. **Fenotipagem e expressão de proteínas de linhagens de arroz de terras altas para tolerância à deficiência hídrica**. 2018. 72 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2018.

SANTOS, M.C. **Expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico em sementes e em tecidos de plântulas de milho**. 2016. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.

SARVESTANI, Z.T. *et al.* Study of water stress effects in different growth stages on yield and yield components of different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 11, n.10, p. 1303-1309, 2008.

SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, [S.l.], v. 2012, p. 1-26, 2012.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, [S.l.], v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHWEMBER, A.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 15, p. 4423-4436, 2010.

SILVA NETA, I.C. Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho. 2014. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.

STACY, R.A.; NORDENG, T.W.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; AALEN, R.B. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 19, p. 1–8, 1999.

STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A.; DA SILVA, S.C. **Tensão da água do solo e produtividade do arroz**. Embrapa Arroz e Feijão-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 1986.

TAN, C.T.; LIM, Y.S.; LAU, S.E. Proteomics in commercial crops: an overview. **J. Protozool.**, [S.l.], n. 169, p. 176–188. 2017.

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

VILELA, D.R. **Características agronômicas e expressão de enzimas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho**. 2019. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

ZANDALINAS, S.I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiol. Plant.**, [S.l.], v. 162, p. 2–12. 2018.

WASZCZAK, C.; CARMODY, M.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species in plant signaling. **Annual Review of Plant Biology**, [S.l.], v. 69, p. 209-236, 2018.

CAPÍTULO 3 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE SOJA E CAFÉ SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR SECAGEM

RESUMO

A tolerância das plantas ao estresse abiótico é uma característica complexa associada a vários fatores, como a expressão de enzimas antioxidantes. Essas enzimas desempenham importante papel na remoção das espécies reativas de oxigênio em células e compartimentos subcelulares das plantas. Diante disso, neste trabalho, objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica e a expressão de enzimas antioxidantes em sementes e plântulas de soja e café submetidas à secagem. Foram utilizadas sementes de soja da cultivar SYN 13671 submetidas a dois tratamentos de secagem: com estresse, secagem em secador estacionário à temperatura constante de 42 °C até as sementes atingirem 13% do teor de água, e sem estresse, secagem à sombra até atingirem 13%. Sementes de *Coffea arabica* da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 com teor inicial de água de 46%, foi submetida ao processo de secagem. Esse foi feito de forma natural, em terreiro, por meio do qual foram obtidos dois lotes: o lote com teor de água das sementes com 40% (sem estresse) e um segundo, com 10% de teor de água (com estresse), com tempo para a secagem de 2 e 16 dias respectivamente. A qualidade fisiológica das sementes de soja e café foi avaliada por meio dos seguintes testes: primeira contagem de germinação, germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência (IVE). As análises proteômicas foram realizadas utilizando-se as sementes e as plântulas oriundas das sementes submetidas ao teste de germinação. Com a técnica de eletroforese foi analisada a expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX). A expressão da enzima 1-cys-prx foi determinada pela técnica de *Western Blotting*. Já a quantificação da peroxidação lipídica e atividade das enzimas SOD, CAT e APX foram realizadas por meio de espectrofotometria. Os resultados dos testes fisiológicos realizados em sementes de soja e café foram não significativos estatisticamente, exceto para os de germinação, que foi menor em sementes submetidas ao estresse. A expressão das enzimas CAT e POX em sementes de soja submetidas ao estresse foram maiores e a da SOD e APX foram semelhantes, independente da condição de estresse. A expressão da 1-cys-prx em soja foi verificada tanto nas sementes quanto nas plântulas, com maior expressão nos tratamentos sem estresse. Os resultados de atividade obtidos por meio da espectrofotometria não foram significativos entre os tratamentos. Em café, para a SOD houve maior expressão em sementes sem estresse e para a POX o padrão foi inverso. Para a CAT houve maior expressão no tratamento semente com estresse e não foi observada expressão em plântulas. Já para a APX houve expressão semelhante em sementes submetidas ou não ao estresse e maior em plântulas oriundas de sementes com estresse. A expressão da 1-cys-prx foi maior em sementes do que em plântulas, e maior naquelas submetidas ao estresse. A peroxidação lipídica foi maior nas sementes submetidas ao estresse e o mesmo foi observado para a enzima SOD. Não foi verificada atividade das enzimas CAT e APX em sementes, apenas em plântulas. Não houve diferença estatística nos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade de sementes de soja submetidas ou não ao estresse. A secagem de sementes de café até o teor de água de 10% não afetou a qualidade fisiológica dessas sementes. Houve variações dos padrões enzimáticos para as enzimas SOD, CAT, POX e APX em sementes e plântulas de café. A 1-cys-prx em café foi um marcador eficiente na detecção do estresse por secagem e sua expressão foi maior em sementes do que em plântulas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Glycine max*. Expressão de enzimas. Secagem.

ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN SOYBEAN AND COFFEE SEEDS AND SEEDLINGS SUBMITTED TO DRYING STRESS

ABSTRACT

Plant tolerance to abiotic stress is a complex characteristic associated to several factors, such as antioxidant enzymes expression. These enzymes play an important role in removing reactive oxygen species in cells and subcellular compartments in plants. This work aimed to evaluate the physiological quality and the expression of antioxidant enzymes in soybean and coffee seeds and seedlings submitted to drying. Seeds of the soybean cultivar SYN 13671 were subjected to two drying conditions: with stress, drying in a stationary dryer at the constant temperature of 42 °C until reaching 13% of water content, and without stress, shade-drying until reaching 13% of water content. Seeds of the *Coffea arabica* cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 with 46% water content were submitted to a conventional drying process in a terrace. Two coffee lots were obtained: the first one with 40% water content (without stress) and the second one, with 10% water content (with stress), with a drying time of 2 and 16 days, respectively. The physiological quality of the soybean and coffee seeds was assessed using the following tests: first germination count, germination, accelerated aging, emergence and emergence speed index (IVE). Proteomic analyses were performed using seeds and seedlings from those seeds submitted to the germination test. The expression of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), and ascorbate peroxidase (APX) enzymes was obtained by electrophoresis. The expression of 1-cys-prx enzyme was determined by the Western Blotting technique. The quantification of lipid peroxidation and SOD, CAT, and APX activity were obtained using spectrophotometry. The results of all the soybean and coffee seeds physiological tests were not statistically significant, except for the germination tests, which were lower in seeds under stress. The expression of CAT and POX enzymes was higher in soybean seeds submitted to stress. For SOD and APX, the expression was similar regardless of the stress condition. The expression of 1-cys-prx in soybean was verified in both seeds and seedlings, with greater expression in treatments without stress. The results obtained through spectrophotometry were not significant. There was greater SOD expression in coffee seeds without stress, while for POX the pattern was the opposite. For CAT there was a greater expression in seeds under stress, no expression was observed in seedlings. For APX, there was no difference between seeds submitted or not to stress. Though a higher APX expression in seedlings from seeds with stress. The 1-cys-prx expression was higher in seeds than in seedlings, and the expression was higher in the ones under stress. Lipid peroxidation and SOD expression were higher in seeds under stress. Activity of CAT and APX enzymes were observed in seedlings but not in seeds. There was no statistical difference in the tests used to assess the quality of soybean seeds. Drying of coffee seeds to 10% water content did not affect the physiological quality of these seeds. There were variations in enzymatic patterns for SOD, CAT, POX, and APX enzymes in coffee seeds and seedlings. The 1-cys-prx enzyme in coffee was an efficient marker in drying stress detection and its expression was higher in seeds than in seedlings.

Keywords: *Coffea arabica*. *Glycine max*. Enzyme expression. Drying.

1 INTRODUÇÃO

A secagem é uma etapa importante durante o processo de produção de sementes, por meio da qual objetiva-se a redução do teor de água das sementes adequados para o armazenamento, sem danos à sua qualidade. Além disso, preserva a semente de alterações físicas e químicas que podem ocorrer com o alto teor de água com o objetivo de manter a qualidade inicial das sementes (BAUDET *et. al.*, 1999).

Apesar de todas as vantagens, a operação de secagem pode ser arriscada se feita de forma inadequada, podendo levar a danos irreversíveis e à perda da qualidade das sementes (CARVALHO *et. al.*, 1994). Além disso, pode provocar danos como desestruturação de membranas, desnaturação de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio, redução da permeabilidade das membranas, aumento da respiração, fissuras e aumento da predisposição a agentes patogênicos (NETO *et. al.*, 2010).

No caso do *Coffea arabica* L., que toleram parcialmente a perda de água (10 a 15% de teor de água) e são sensíveis ao armazenamento em temperaturas abaixo de 0 °C (ELLIS *et. al.*, 1990), a secagem pode ser prejudicial, com redução da qualidade fisiológica (ROSA *et. al.*, 2005). Essa perda de qualidade pode prejudicar a obtenção de mudas vigorosas, o que interfere na implantação na lavoura de café (ARAÚJO *et. al.*, 2008).

Durante o processo de secagem sob condições desfavoráveis pode ocorrer a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS são produtos do metabolismo celular que regulam o crescimento e desenvolvimento vegetal, porém quando em excesso podem ser tóxicas para as células, sendo necessária sua remoção (NOCTOR *et. al.*, 2015).

O sistema antioxidante enzimático presente nas espécies vegetais desempenha o importante papel de combater às EROS e está estritamente relacionado com a sinalização e adaptação celular diante as condições ambientais adversas. Enzimas como SOD, POX, CAT, APX e 1-cys-Prx são as principais deste complexo sistema. Essas removem principalmente superóxido e peróxido de hidrogênio que são produzidos em diferentes compartimentos celulares (mitocôndria, peroxissomos, citoplasma, membrana plasmática).

Dentre as enzimas antioxidantes a atividade da 1-cys-Prx merece importante atenção quando o material de estudo é a semente. Essa enzima tem sido relatada em algumas espécies, arroz, cevada, trigo, *Arabidopsis*, tabaco e soja, como específica de sementes, com expressão na camada de aleurona, de caráter monogênico e esta relacionada com o controle de danos provocados por estresse ambientais (AALEN *et. al.*, 1994; HASLEKAS *et. al.*, 1998; STACY

et. al., 1999; LEE *et. al.*, 2000; LEWIS *et. al.*, 2000; PULIDO *et. al.*, 2009; NISHIZAWA; KOMATSU, 2011).

Neste contexto, objetivou-se verificar a qualidade fisiológica e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, peroxidase, catalase, ascorbato peroxidase e 1-cys-peroxirredoxina em sementes e plântulas de soja e café submetidas às diferentes condições de secagem, buscando-se uma condição com, e outra sem estresse.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuai Amarelo IAC 62, produzidas na fazenda Bom Jardim, localizada na cidade de Bom Sucesso, foram utilizadas nesta pesquisa, realizada no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras.

Frutos de café foram colhidos no estágio de maturação cereja e após a colheita foram descascados mecanicamente. As sementes foram degomadas naturalmente e, nesse processo, permaneceram em um tanque sem água por cerca de 20 horas. Após a demogagem as sementes foram pré-secadas à sombra para remover a água superficial, por um período de 24 horas.

O lote inicial de sementes tinha um teor inicial de água de 46%. Para o processo de secagem, as sementes foram espalhadas uniformemente no terraço de cimento e movimentadas a cada hora. Durante a tarde, as sementes ainda quentes, foram alinhadas e cobertas com lona, para proteger do sereno da noite. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagem contínua em balança de precisão de 0,001 g e a determinação do teor de água realizada pelo método de estufa, até que as sementes atingissem os níveis de água de interesse (40 e 10%). Para obter o teor de água considerado sob condições de estresse (10%) e não estresse (40%), a semente permaneceu no terraço por 16 e 2 dias, respectivamente.

Após os períodos de secagem, as sementes foram armazenadas em sacos de ráfia e acondicionadas em sacos plásticos, mantidos em câmara fria com temperatura média de 10-12 °C e umidade relativa de 60 °C, até o momento da análise.

Sementes da cultivar SYN 13671 IPRO foram colhidas na fase R8 de maturação e pré-secas à sombra para retirada da água superficial. Uma parte dessas sementes foram secas à sombra até atingir o teor de água de 13%. A outra parte foi seca em secador estacionário a uma temperatura constante de 45 °C até atingir também o teor de água de 13%. As sementes secas à sombra foram consideradas como tratamento sem estresse e aquelas secas em secador estacionário em alta temperatura (45 °C) consideradas como tratamento com estresse.

O teor de água das sementes de soja durante o período de secagem foi monitorado pelo determinador de umidade e após atingir 13% a umidade foi verificada pelo método de estufa à 105 °C por 24 horas. Utilizou-se duas subamostras de cada material, de acordo com as Regras

para Sementes Análise -RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média (base úmida).

Ressalta-se que foi escolhido submeter as sementes de café e soja ao estresse por secagem por as mesmas apresentarem grandes problemas durante esse processo.

2.2 Avaliação da qualidade das sementes

As análises para a avaliação da qualidade das sementes de soja e café foram realizadas no Laboratório Central de Sementes da UFLA.

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

O teste de germinação foi realizado de forma semelhante para as sementes de soja e café. Foram utilizadas 200 sementes de cada espécie, divididas em quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada em papel do tipo germitest, umedecidas com água em quantidade igual a 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida, as sementes foram mantidas em germinador, regulado à temperatura de 25 °C.

As avaliações foram realizadas aos 5 (primeira contagem da germinação) e 8 dias após a semeadura, para soja e aos 15 (primeira contagem da germinação) e 30 dias após a semeadura, para o café. O número de plântulas normais foi computado de acordo com as prescrições contidas nas Regras para Análise de Sementes para cada cultura (BRASIL, 2009).

Ressalta-se que as plântulas normais no final do teste de germinação foram armazenadas em freezer -80° para posterior análise enzimática.

Para o teste de envelhecimento acelerado foi utilizado o método de câmaras do tipo *gerbox* onde 200 sementes de cada espécie (arroz e milho), divididas em 4 repetições de 50 sementes, foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes foram mantidas no interior de uma câmara de germinação com temperatura de 41 °C, por um período de 48 horas para as sementes de soja e para as sementes de café a uma temperatura de 42 °C, durante 42 horas para as sementes milho. Depois desse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação conforme metodologia descrita acima, determinando-se a porcentagem de plântulas normais ao 5° dia para soja e 15° dia para café, após a semeadura (MARCOS FILHO, 1999).

Para a realização do teste de emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE), as sementes foram semeadas em bandejas de plástico (20 cm x 22 cm x 12 cm) contendo areia como substrato, em quatro repetições de 25 sementes. A contagem de plântulas emergidas foi realizada diariamente até aos 9 dias para a soja e até aos 60 dias para o café, após a semeadura. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi determinado segundo método de Maguire (1962).

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, para cada espécie.

2.3 Análises proteômicas pela técnica de eletroforese

Análise das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC. 1.11.1.7) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foram feitas por meio da técnica de eletroforese (ALFENAS *et al.*, 2006).

Para a análise dessas enzimas as sementes e as plântulas oriundas do teste de germinação foram maceradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em mortar de porcelana e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

Para a extração das enzimas CAT, SOD e APX utilizou-se o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + 0,1% de beta-mercaptoetanol e para a enzima POX o tampão utilizado foi o fosfato de potássio, todos na proporção de 300µL por 100mg de sementes e de plântulas. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema descontínuo de géis de poliácridamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi realizada a 150V por 5 horas. Vale ressaltar que para a enzima APX foram adicionados 2mM de ácido ascórbico ao tampão de corrida e feita uma pré-corrída de 30 minutos antes da aplicação o sobrenadante contendo as amostras proteicas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas CAT, SOD e POX conforme Alfenas *et al.* (2006), com modificações. Já para a enzima APX, o gel foi equilibrado em 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e 2 mM de ácido ascórbico, por duas vezes durante 15 minutos cada. A incubação do gel foi feita por 20min em 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 4mM de ácido ascórbico e 2mM de H₂O₂ e lavado durante 1 minuto em 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0). Sua revelação foi em solução contendo 50mM de

tampão fosfato de sódio (pH 7,8), 22mM TEMED e 0,1mM NBT e mantido sob agitação até o aparecimento das bandas.

Para cada enzima foram analisados três géis, representando as três repetições biológicas, as quais foram utilizadas também como uma repetição para a quantificação das enzimas pelo software Image J (SCHNEIDER *et al.*, 2012). As avaliações foram feitas em função da intensidade das bandas, com resultados expressos em área (mm²).

2.4 Análises proteômicas por meio de *Western Blotting*

A avaliação da enzima 1-Cys-Prx, foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. Inicialmente foi feita a extração de proteína total, utilizando 150 mg de tecido, sementes e plântulas, de cada tratamento, que foram maceradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em mortar de porcelana.

O tampão de extração foi preparado usando duas soluções, A e B. A solução A foi composta por 888 mg trizma HCl, 530 mg de trizma base e 625 µl de triton X-100 completados em um volume de 100ml de água ultrapura. Já a solução B continha 32ml da solução A, 45g de ureia, 15,2g thiuréia, 3,6 g de CHAPS completados em um volume de 100 ml com água ultrapura.

As amostras foram homogeneizadas em 800 µl de tampão de extração (600µl da solução B, 1 µl de inibidor de protease, 14 µl de DTT(1M), 4,6 µl de DNase, 20 µl de RNase (20mg/ml), completando o volume final com água ultrapura). A incubação das amostras foi feita em gelo durante 15 minutos e após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14000 rpm à 4 °C. Depois da centrifugação o sobrenadante foi pipetado em novo tubo e as amostras armazenadas a -20 °C.

Para determinar a concentração da proteína total extraída, foi utilizado o método Bradford (1976) com quantificação no espectrofotômetro BioTek Eon™.

Depois da extração e quantificação das proteínas, foram aplicados 60µg de proteína de cada amostra em um gel de poliacrilamida (SDS 12%) e realizada a corrida em cuba de eletroforese por aproximadamente 1 hora e 30 minutos à 100volts. Finalizada a corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana Immobilon-P, utilizando o kit de transferência BioRad. Para certificar que ocorreu a transferência das proteínas, a membrana foi corada com Ponceau e lavada com TBST 1x (Tris 500mM + NaCl 1,5M; pH 7,5).

O bloqueio da proteína foi feito utilizando-se BSA 3% durante 1 hora e a incubação do anticorpo anti-1-Cys-Prx (Abcam - ab16830), diluído conforme especificações do fabricante,

feita overnight. Após esse período a membrana foi lavada novamente em TBST 1x e incubada por 1 hora e 30 minutos com o anticorpo secundário (HRP Horse Anti-Mouse IgG, ligado a peroxidase, da empresa Vector laboratories). A detecção do anticorpo foi feita por meio de filmes fotográficos utilizando-se soluções fixadoras e reveladoras. A quantificação da proteína foi realizada por meio do programa Image J, com a análise da intensidade e mensuração das isoformas obtidas nos filmes (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

O mesmo protocolo de incubação foi realizado para a imunodeteção do anticorpo primário anti- GAPDH (Abcam – ab37168), usado como controle endógeno.

2.5 Quantificação da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Amostras de 0,2 g de sementes e plântulas foram maceradas em nitrogênio líquido acrescido de 20% de PVP (m/v) e homogeneizadas em 1,5 mL ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). Foram retiradas duas amostras de cada tratamento e as análises realizadas em triplicata.

O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Alíquotas (125 µl) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (250 µl), contendo ácido tiobarbitúrico (TBA - 0,5%) e TCA (10%). Incubou-se as amostras em banho maria a 95 °C durante 30 minutos e a reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo. As leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm.

Ressalta-se que foram retiradas três amostras das sementes colhidas de cada tratamento, constituindo as repetições biológicas e para as plântulas, cada repetição do teste de germinação foi utilizada como repetição biológica de cada tratamento.

2.6 Análises proteômicas pelo espectrofotômetro

O extrato foi obtido pela maceração do material em nitrogênio líquido, amostras de 0,1 g de sementes ou plântulas de acordo com cada tratamento. Foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375 µl de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), 15 µL de EDTA 0,2mM (pH 7,0), 75 µl ácido ascórbico 10mM e 1035 µl de água destilada. O extrato foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20 °C até a realização das análises enzimáticas da SOD, CAT e APX (BIEMELT *et al.*, 1998). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT). Foram adicionados 6 µl do extrato enzimático a 194 µl do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM e riboflavina 0,2 mM (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

Para a atividade da enzima CAT foi utilizado uma alíquota de 3 µl do extrato enzimático e na sequência adicionados 177 µl de meio de incubação contendo: 90 µl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 78 µl de água destilada e 9 µl de peróxido de hidrogênio 12,5 mM. Após, foi feita a incubação a 28 °C, de acordo com Havir e McHale (1990).

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando-se uma alíquota de 3 µL do extrato enzimático em que foi adicionado 177 µl de meio de incubação contendo: 90 µl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 9 µl de ácido ascórbico 10 mM e 9 µl de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981).

Ressalta-se que para as análises proteômicas foram retiradas três amostras das sementes colhidas de cada tratamento, constituindo as repetições biológicas e para as plântulas, cada repetição do teste de germinação foi utilizada como repetição biológica de cada tratamento.

2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas os dados dos testes fisiológicos, dados proteômicos e da quantificação da peroxidação lipídica foram realizadas por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2014). A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi verificada a normalidades dos dados. Quando necessário, foram realizadas as transformações dos dados.

3 RESULTADOS

3.1 Soja

Os resultados dos testes para a avaliação da qualidade fisiológicas das sementes de soja submetidas ou não ao estresse na secagem foram estatisticamente não significativos, exceto os do teste de germinação (TABELA 1). Em sementes submetidas a secagem em alta temperatura foi observada porcentagem de germinação de 94% enquanto a das não submetidas ao estresse foi de 100%.

Tabela 1 - Resultados médios de primeira contagem da germinação, germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência de sementes de soja produzidas ou não sob a restrição hídrica

TRATAMENTOS	PC	GERM	ENV	EMERG	IVE
Com estresse	95.0 a	94.0 b	96.0 a	99.0 a	7.00 a
Sem estresse	99.0 a	100.0 a	98.0 a	100.0 a	7.25 a
CV	2.06	1.19	2.07	1.79	4.96

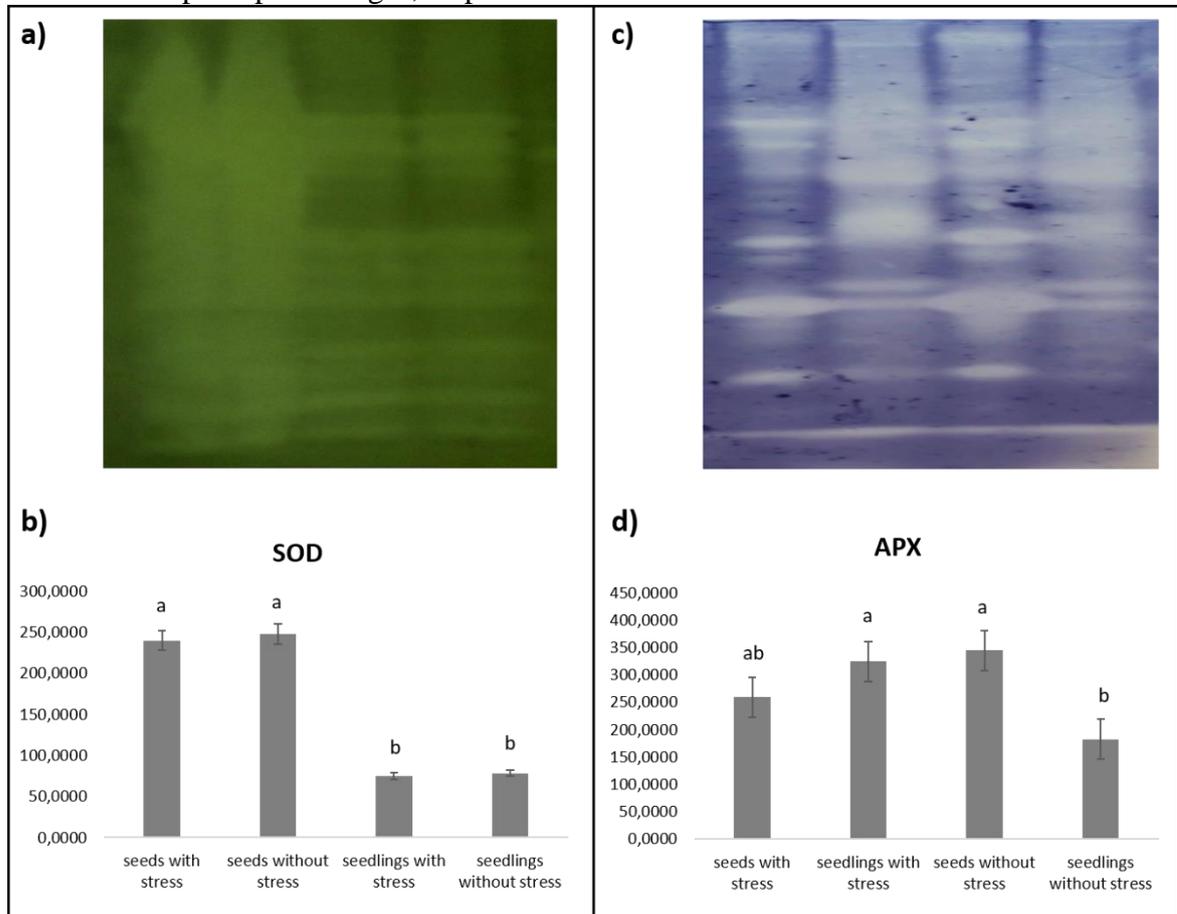
*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

Em relação a expressão das enzimas antioxidantes, em sementes e plântulas, observa-se para a enzima SOD padrões semelhantes em sementes independentemente do tratamento. Maior expressão foi observada em sementes do que nas plântulas. Em plântulas de soja a atividade foi semelhante independentemente dos tratamentos aos quais as sementes foram submetidas para os tratamentos com e sem estresse (FIGURA 1a e 1b).

A expressão da em enzima APX revelada a partir do gel de eletroforese, foi semelhante em sementes, assim como verificado para a SOD, tendo diferenciado apenas em plântulas, oriundas de sementes submetidas à secagem com 42 °C, nas quais houve maior expressão enzimática (FIGURA 1c e 1d).

Figura 1 – Atividade das enzimas SOD e APX em sementes e plântulas de soja em condições de secagem e sem a) e b) padrão de expressão da SOD e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da APX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.

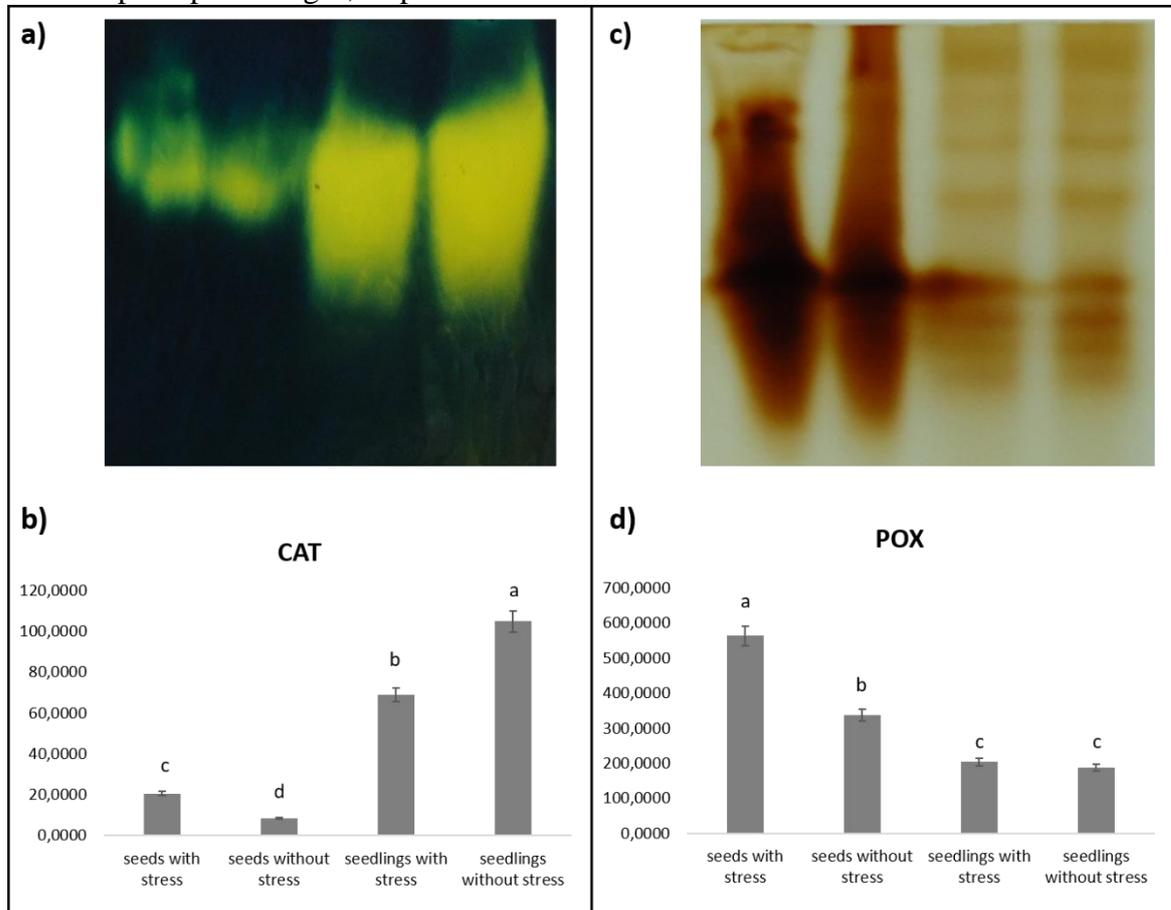


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: da autora (2020).

Já para a enzima CAT foi observado um padrão de expressão inverso ao da enzima SOD, quando se compare estes padrões em sementes e plântulas, com menor expressão em sementes do que nas plântulas. Além disso, em sementes observou-se maior expressão da CAT no tratamento com estresse e em plântulas maior expressão naquelas oriundas de sementes que não foram submetidas ao estresse por secagem (FIGURA 2a e 2b).

A expressão da enzima POX em sementes, bem como observado para a SOD, foi maior do que em plântulas. Em sementes sob condição de estresse por secagem houve maior expressão da POX do que aquelas não submetidas ao estresse. Já a atividade da POX em plântulas foi semelhante independente do tratamento (FIGURA 2c e 2b).

Figura 2 – Atividade das enzimas CAT e POX em sementes e plântulas de soja em condições de secagem e sem a) e b) padrão de expressão da CAT e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da POX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.

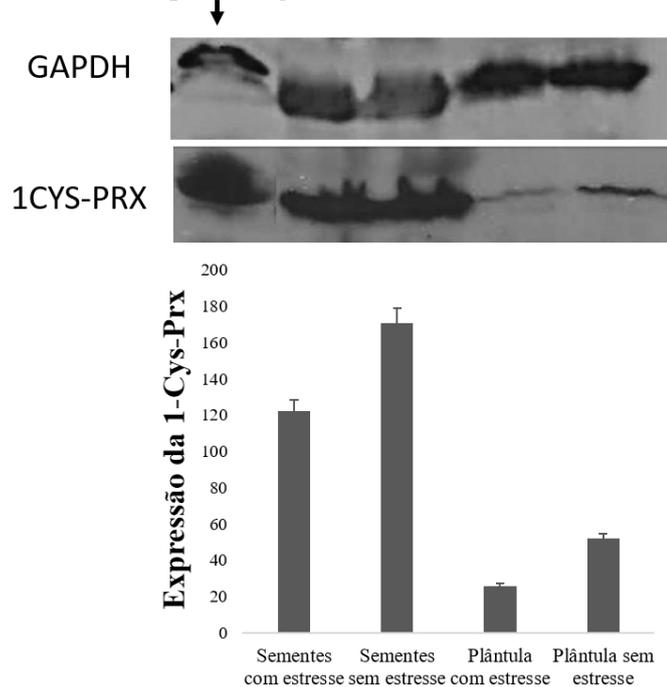


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

A expressão para a 1-cys-Prx observada no presente trabalho, tanto em sementes quanto em plântulas foi maior nos tratamentos que não sofreram o estresse por secagem (FIGURA 3). Além disso, houve maior expressão dessa enzima em sementes do que em plântulas, independente da condição de estresse.

Figura 3 – Imunodeteção da 1-cys-Prx em sementes e plântulas de soja em condições de estresse e sem estresse por secagem.



*seta indica controle positivo utilizando sementes de arroz.

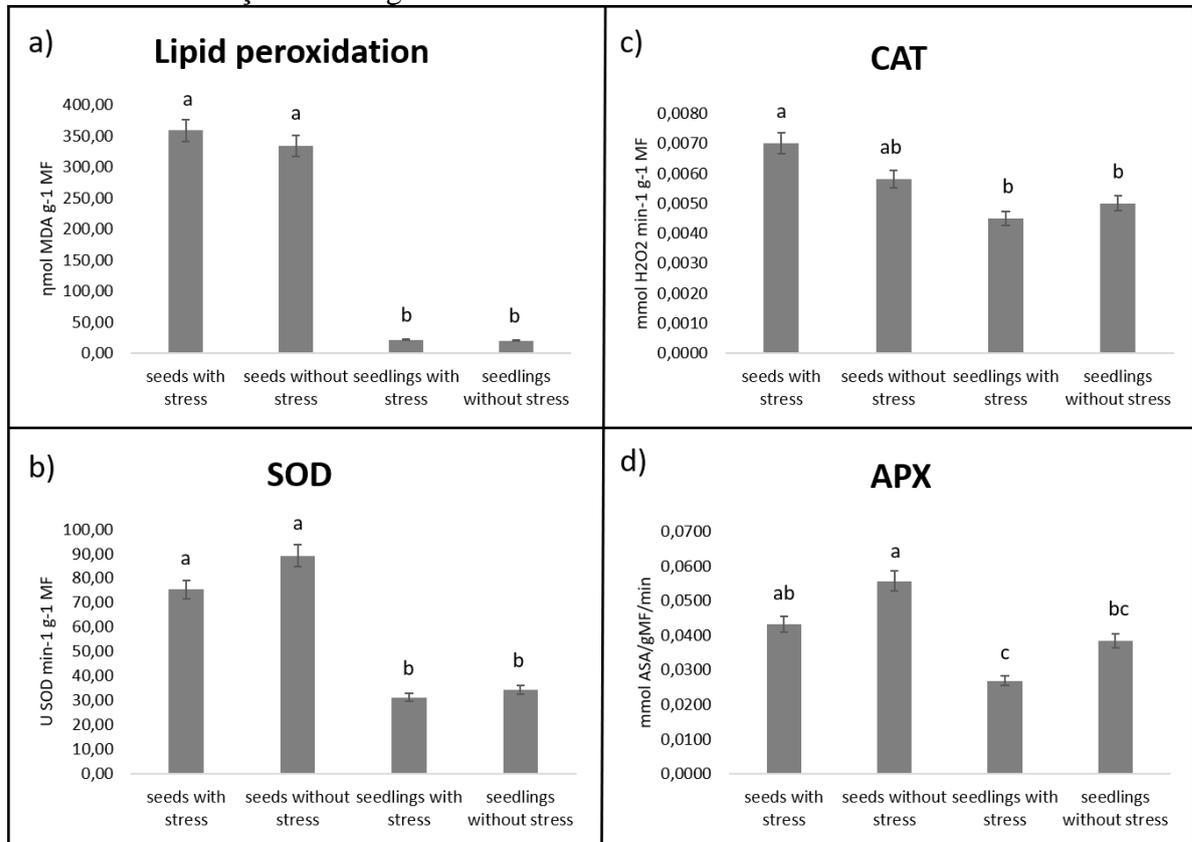
Fonte: Da autora (2020).

Em relação aos resultados de quantificação da peroxidação lipídica houve maiores valores em sementes do que em plântulas, porém não foi verificada diferença destes valores entre os dois tratamentos tanto em sementes e plântulas (FIGURA 4a).

Em relação à quantificação da enzima SOD realizada por meio da espectrofotometria foi observado resultado semelhante ao observado pela revelação do gel de eletroforese para essa enzima. Houve maior quantidade da SOD em sementes do que em plântulas, porém tanto em sementes quanto em plântulas não houve diferença estatística entre os tratamentos independente da condição de estresse (FIGURA 4b).

A atividade da CAT foi estatisticamente semelhante em sementes e esta independentemente da condição de estresse por secagem, o que ocorreu também em plântulas, com menor atividade em plântulas do que em sementes (FIGURA 4c). Em relação aos resultados para a quantificação da enzima APX menores valores foram observados em plântulas submetidas ao estresse as quais não se diferenciaram das observadas em plântulas não submetidas ao estresse (FIGURA 4d). Os maiores valores foram observados em sementes não submetidas ao estresse os quais não diferiram daqueles observados em sementes com estresse.

Figure 4 – Quantificação da Peroxidação lipídica e atividade das enzimas SOD, CAT e APX, por meio do espectrofotômetro, em sementes e plântulas de soja submetidas ou não à condição de secagem.



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

3.2 Café

Dentre os testes para avaliar a qualidade fisiológica das sementes de café, o de germinação foi o único estatisticamente significativo (TABELA 2). Em sementes que tiveram o teor de água reduzido (a 10%), verifica-se menor porcentagem de germinação (78%) em relação aquelas secadas até 40% de teor de água (90%). De maneira geral foi obserada alta qualidade fisiológica das sementes de café.

Tabela 2 - Resultados médios de primeira contagem da germinação, germinação, envelhecimento acelerado, emergência e índice de velocidade de emergência de sementes de café produzidas ou não sob a restrição hídrica.

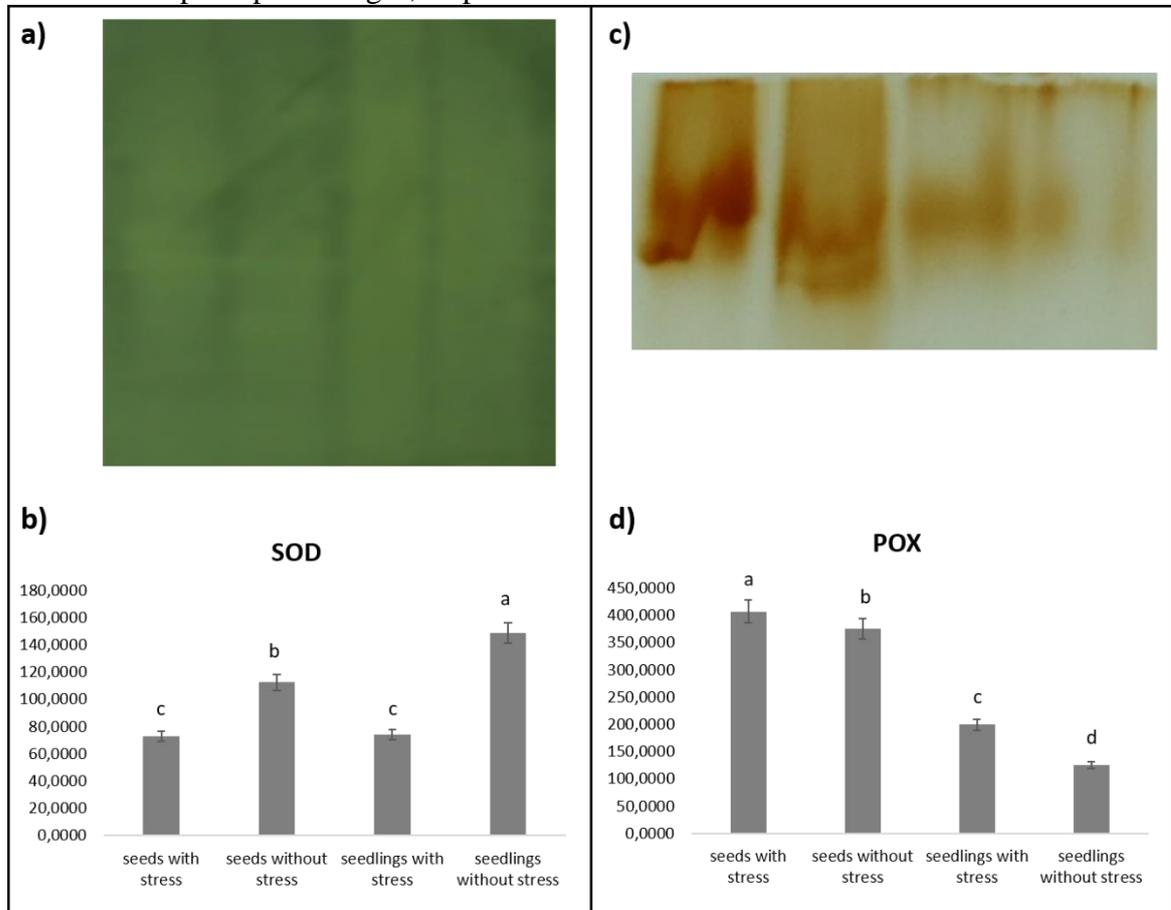
TRATAMENTOS	PC	GERM	ENV	EMERG	IVE
Com estresse	94.0 a	78.0 b	94.0 a	48.0 a	0.32 a
Sem estresse	96.0 a	90.0 a	95.0 a	37.0 a	0.24 b
CV	3.60	0.80	4.65	6.49	11.69

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

Em relação às análises proteômicas obtidas pela eletroforese em gel Native-PAGE, verifica-se maior expressão da SOD em sementes e plântulas submetidas ao tratamento sem estresse (FIGURA 5a e 5b), com maior expressão em plântulas sem estresse. Já para a enzima POX os resultados foram contrários, ou seja, em sementes e as plântulas dos tratamentos com estresse houve maior expressão dessa enzima, com maior expressão em sementes com estresse e menor em plântulas sem estresse (FIGURA 5a e 5b).

Figura 5 – Atividade das enzimas SOD e POX em sementes e plântulas de café em condições de secagem e sem a) e b) padrão de expressão da SOD e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da POX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.



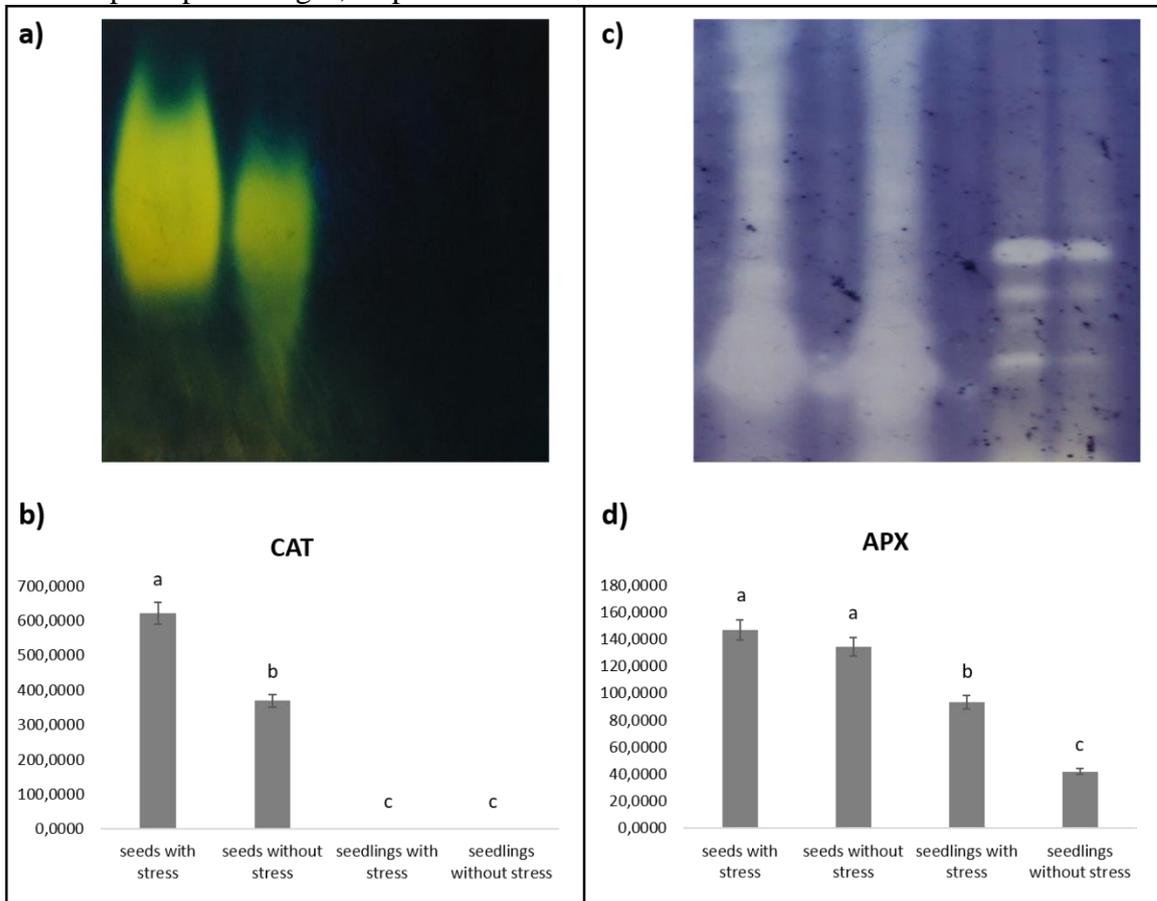
Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Para a enzima CAT não foi verificada expressão em plântulas independentemente do tratamento de secagem o qual as sementes foram submetidas. Já para as sementes, a expressão seguiu o padrão observado para a POX, maior no tratamento submetido ao estresse por secagem.

A expressão da APX foi semelhante em sementes independentemente de terem sido expostas ou não pelo estresse de secagem. Em plântulas, a APX teve o mesmo padrão de expressão observado para a POX, maior em plântulas oriundas de sementes que foram submetidas ao estresse por secagem.

Figura 6 – Atividade das enzimas CAT e APX em sementes e plântulas de café em condições de secagem e sem a) e b) padrão de expressão da CAT e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente. c) e d) padrão de expressão da APX e quantificação em pixel pelo ImageJ, respectivamente.

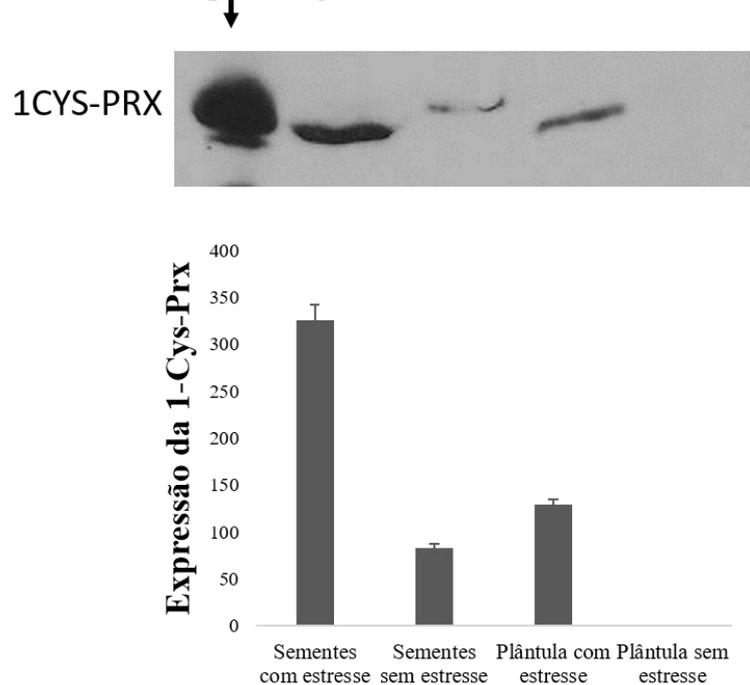


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

A expressão da enzima 1-cys-Prx foi verificada em sementes de café, e aquelas que foram submetidas ao estresse houve maior expressão em comparação à das não submetidas ao estresse. Já em plântulas oriundas dessas sementes, foi verificada expressão apenas naquelas derivadas de sementes secadas até 10% de teor de água. Em plântulas provenientes de sementes secadas até 40% de teor de água a 1-cy-Prx não foi observada (FIGURA 7).

Figura 7 – Imunodeteção da 1-cys-Prx em sementes e plântulas de café em condições de estresse e sem estresse por secagem.



*seta indica controle positivo utilizando sementes de arroz.

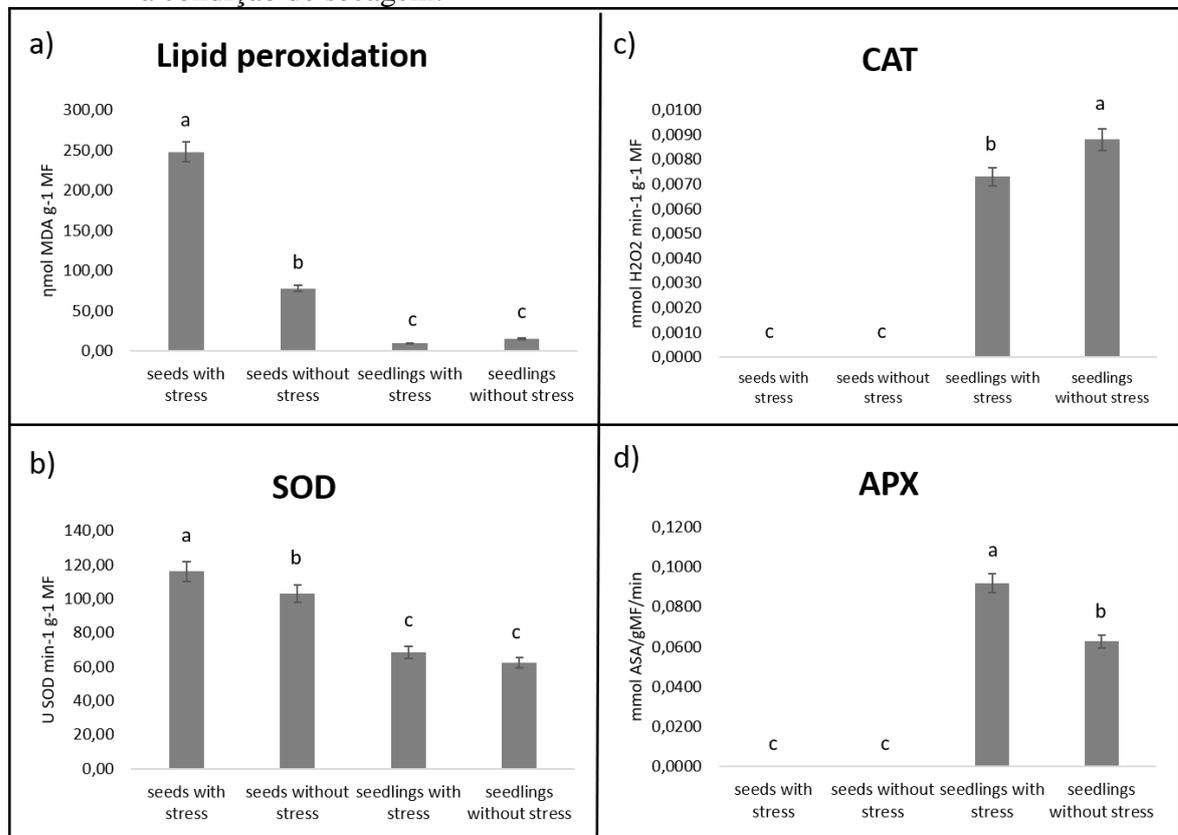
Fonte: Da autora (2020).

Quanto a peroxidação lipídica, essa foi maior em sementes sobre estresse por secagem, em comparação em sementes sem estresse. Já nas plântulas, a atividade foi menor do que em sementes e estatisticamente semelhante para os dois tratamentos (FIGURA 8a).

Nos resultados de proteômica obtidos por espectrofotometria para a enzima SOD observa-se maior atividade em sementes com estresse do que nas sementes sem estresse. Em plântulas foi estatisticamente semelhante independente do tratamento (FIGURA 8b).

Para as enzimas CAT e APX não foi detectada atividade em sementes em ambos os tratamentos. Em plântulas, para a catalase houve maior quantidade no tratamento sem estresse e para a ascorbato peroxidase maior quantidade foi verificada em plântulas oriundas de sementes que foram submetidas ao estresse por secagem.

Figura 8 – Quantificação da Peroxidação lipídica e atividade das enzimas SOD, CAT e APX, por meio do espectrofotômetro, em sementes e plântulas de café submetidas ou não à condição de secagem.



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

4 DISCUSSÃO

4.1 Soja

No presente trabalho, a qualidade fisiológica observada tanto pelo teste de germinação quanto pelos testes de vigor foi alta para os dois tratamentos. Verificar a qualidade fisiológica de sementes de soja é essencial para seu lançamento no mercado, para garantir o estabelecimento uniforme da cultura no campo e para obter rendimentos elevados. As sementes submetidas a secagem em alta temperatura apesar de terem germinação inferior, ainda são consideradas de alta qualidade e indicado como padrão para comercialização (MAPA, 2005).

Em algumas pesquisas têm sido utilizados também marcadores moleculares para a seleção de cultivares de soja com maior qualidade fisiológica e mais tolerantes as condições de estresse ambientais como a secagem, utilizando os resultados de expressão de genes, por meio de análises proteômicas e transcriptômicas (VEIGA *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2019).

Na presente pesquisa, a expressão das enzimas antioxidantes verificadas por meio da revelação de géis de eletroforese, mostrou-se importante para a diferenciação dos tratamentos avaliados. A atividade das enzimas CAT e POX, por exemplo, em sementes foi maior sob condição de estresse. Em algumas pesquisas tem-se observado que a maior expressão dessas enzimas está associada com a maior produção de EROs, que são produtos do estresse oxidativo provocado por condições de estresse como a secagem (NOCTOR *et al.*, 2015).

Outra enzima envolvida na remoção de EROS é a SOD. A mesma desempenha importante função na resposta ao estresse oxidativo em plantas, por ser a primeira enzima atuante e fazer a redução do superóxido. Na presente pesquisa a expressão das enzimas SOD e APX não foram estatisticamente significativas entre os tratamentos com e sem estresse por secagem. Rosa *et al.* (2005) avaliaram diferentes temperaturas de secagem em sementes de milho e também não verificaram diferenças para a superóxido dismutase nas diferentes temperaturas utilizadas.

Considerada específica de tecidos vegetais, as APXs são hemoproteínas que catalisam a redução do H₂O₂ formado pela ação da SOD, usando ascorbato como fonte de poder redutor (SHARMA *et al.*, 2012). Desta forma, as enzimas SOD e APX desempenham suas funções em conjunto. As enzimas APX, a CAT, POX e a 1-cys-prx têm a função de reduzir o peróxido de hidrogênio que é da dismutação do superóxido.

Nishizawa e Komatsu (2011) caracterizaram a enzima 1-cys-Prx em sementes e plântulas de soja. Foram identificados dois genes, o GmPer1a e o GmPer1b, sendo o gene GmPer1a expresso apenas em sementes e o GmPer1b expresso em sementes e plântulas. No presente trabalho foi verificada a presença da 1-cys-Prx em sementes e plântulas, porém em nível de proteína. Esses mesmos autores também identificaram a 1-cys-Prx por meio da técnica de *western blotting* e para o tratamento que foi submetido ao estresse por inundação, encontraram maior atividade dessa enzima. Esse padrão foi inverso ao verificado no presente trabalho, podendo ser justificado pelo tipo de estresse que foi aplicado (secagem) e também pela especificidade do anticorpo utilizado no trabalho acima citado, que era específico para o gene GmPer1a.

A maior atividade da 1-cys-Prx em sementes do que em plântulas é indicativo de que essa enzima é sintetizada e acumulada nas sementes e degradada durante a germinação e crescimento das plântulas. Mesmo padrão foi verificado em trabalhos anteriores com diferentes espécies: cevada (STACY *et al.*, 1999), arroz (LEE *et al.*, 2000) e soja (NISHIZAWA; KOMATSU, 2011).

Em relação aos resultados obtidos para peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes utilizando-se a espectrofotometria, as maiores atividades dessas também foi observada em sementes quando comparada às observadas em plântulas a exemplo do observado e discutido para a condição de estresse. Tanto para os dados de peroxidação lipídica, SOD, APX e CAT não foi possível observar diferenças significativas em relação ao método de secagem utilizado, tanto em sementes quanto em plântulas.

De maneira geral, foi observado que o tratamento utilizado para a imposição de estresse de secagem em sementes de soja não foi o ideal para diferenciar a expressão das enzimas que atuam no sistema antioxidante. Provavelmente isso tenha ocorrido porque as sementes se apresentavam com alta qualidade fisiológica após exposições às condições de secagem adotadas nesta pesquisa.

4.2 Café

Métodos corretos de secagem e armazenamento devem ser realizados para garantir a produção de mudas de qualidade, já que esses dois processos são as principais causas da redução da viabilidade e vigor de sementes (GUIMARÃES *et al.*, 2002; BRAZ; ROSSETO, 2008).

Por meio da análise dos padrões das enzimas antioxidantes obtidas em eletroforese foi possível observar diferenças entre os tratamentos avaliados, diferenças essas não observadas

nos testes de vigor utilizados nesta pesquisa. Assim, essa é uma ferramenta para auxiliar o entendimento dos mecanismos que estão envolvidos na tolerância a dessecação em sementes (COELHO *et al.*, 2017).

Quando as sementes são submetidas às condições de estresse, como a secagem, substâncias como as espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas em excesso, tornando-se tóxicas para as células. Para superar essa condição as plantas desenvolveram um eficiente sistema enzimático antioxidante que é capaz de remover essas substâncias tóxicas (MHAMDI; VAN BREUSEGEM, 2018)

O aumento da expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT, POX e APX tem sido associado à maior tolerância das plantas aos vários tipos de condições ambientais (WASZCZAK *et al.*, 2018; ČERNÝ *et al.*, 2018; RATAJCZAK *et al.*, 2019). Esse aumento foi verificado no presente trabalho para as enzimas POX e CAT nas sementes que foram submetidas ao estresse por secagem. Santos *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2019), também observaram aumento da enzima CAT em sementes que foram submetidas à secagem.

Coelho *et al.* (2015), ao avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café submetidas a secagem rápida e lenta, também observaram o aumento da expressão da POX associado a redução do teor de água das sementes. As enzimas POX, CAT e APX agem sobre o mesmo substrato, o peróxido de hidrogênio, que é produto da dismutação do superóxido realizada pela SOD.

A enzima SOD é a primeira do sistema antioxidante a atuar na eliminação das EROS. A menor atividade dessa enzima em sementes que passaram pelo estresse de secagem, observada nessa pesquisa, também foi verificada por Coelho *et al.* (2015), quando observaram que a atividade da SOD reduziu em sementes com menores teores de água.

Diferentemente das demais enzimas antioxidantes que apresentam um íon metálico ou um grupo heme como sítio ativo, a classe das peroxirredoxinas não requerem um cofator redox para seu sítio ativo, essas regulam processos biológicos por alterarem sua estrutura proteica durante a degradação de peróxidos (WOOD *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2018). As enzimas do grupo 1-Cys-Prxs, têm sido consideradas específicas de sementes (expressas na camada de aleurona e embrião) e codificadas por gene de cópia única, com exceção do arroz e soja (STACY *et al.*, 1996; HASLEKAS *et al.*, 1998; NISHIZAWA; KOMATSU, 2011; KIM *et al.*, 2011).

Ribeiro *et al.* (2020), avaliando a qualidade fisiológica e a expressão da 1-cys-prx em sementes de *C. arábica* submetidas à secagem e ao armazenamento, observaram que a 1-cys-prx é um bom marcador para identificação da perda da qualidade dessas sementes observaram

ainda que a secagem induziu a expressão dessa enzima e que as sementes secadas até 20 e 10% de teor de água tiveram maior expressão dessa Prx em relação às secadas até 40% de teor de água. Esses resultados corroboram com o verificado no presente trabalho, porque em sementes sob condições de estresse verificou-se maior expressão da 1-cys-prx.

A atividade da 1-cys-px em plântulas de café, provenientes de sementes secadas até 10% de teor de água, contradiz o que vem sendo descrito na literatura, de que essa enzima é específica em sementes, mas está de acordo quando se relaciona a atividade dessa com a atividade antioxidante no combate as EROs.

O processo de peroxidação lipídica é decorrente da ação de radicais livres que atuam sobre lipídeos insaturados das membranas celulares, que podem destruir sua estrutura, provocar a perda dos mecanismos de troca metabólicas, e até levar a morte celular (LIMA *et al.*, 2001). Desta forma, a quantificação da peroxidação lipídica pode estar relacionada aos danos às membranas celulares que são consequência das condições ambientais adversas (ROCHA *et al.*, 2018). No presente trabalho, a maior peroxidação lipídica verificada nas sementes de café sobre condição de estresse, pode indicar estresse por secagem e danos nas membranas celulares.

Esse dano observado pela quantificação da lipoperoxidação em sementes tem a SOD como a principal enzima do sistema antioxidante. Além disso, pelo fato de a SOD ter atividade semelhante entre os tratamentos de plântulas e a ausência da atividade da CAT e APX em sementes, pode-se inferir que a enzima SOD foi eficiente no controle do estresse.

As EROs são produzidas nos caminhos metabólicos de quase todas as células e são reconhecidas como importantes sinalizadoras em vários processos biológicos necessários para o desenvolvimento e crescimento das plantas (MITTLER *et al.*, 2017). Seus níveis são determinados pelo controle do balanço entre produção e quebra que é ativado pela sofisticada e complexa via dos sistemas antioxidantes (MITTLER *et al.*, 2011; NOCTOR *et al.*, 2015). Dessa forma, pode-se inferir que as enzimas CAT e APX estavam ativas nas plântulas para manterem a homeostase celular.

5 CONCLUSÕES

A secagem de sementes de soja adotada nesta pesquisa, não altera as atividades das enzimas SOD e APX e nem a qualidade fisiológica das sementes. A enzima 1-cys-prx está presente em menor quantidade em sementes de soja submetidas à secagem à 42 °C e em plântulas oriundas dessas sementes.

Em sementes de café secadas até 10% de teor de água há maior peroxidação de lipídeos e menor porcentagem de germinação.

Há variações dos padrões enzimáticos das enzimas SOD, CAT, POX e APX em sementes e plântulas de café.

A 1-cys-prx em café é um marcador eficiente na detecção do estresse por secagem e tem maior expressão em sementes do que em plântulas.

REFERÊNCIAS

- AALEN, R.B.; OPSAHL-FERSTAD, H.G.; LINNESTAD, C.; OLSEN, O.A. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. **Plant J**, [S.l.], v.5, p. 385–396, 1994.
- ARAÚJO, R.F. *et al.* Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolado e não despolado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p.71-78, 2008.
- BAUDET, L.M.L.; VILLELA, F.A.; CAVARIANI, C. Princípios de secagem. **Seed News**, Pelotas-RS, n. 10, p. 20-27, 1999.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- CARVALHO, N.M. **A secagem de sementes**. Jaboticabal : FUNEP, 1994. 165 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.
- BRAZ, M.R.S.; ROSSETTO, C.A.V. Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1849-1856, 2008.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. [30] Microsomal lipid peroxidation. *In: Methods in enzymology*. Academic Press, 1978. p. 302-310.
- CARVALHO, E.R.; MAVAIEIE, D.P.D.R.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, M.V.D.; VIEIRA, A.R. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [S.l.], v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.
- ČERNÝ, M.; HABÁNOVÁ, H.; BERKA, M.; LUKLOVA, M.; BRZOBOHATÝ, B. Hydrogen peroxide: its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 19, n. 9, p. 2812, 2018.
- COELHO, S.V.B. *et al.* Tolerance of coffee arabica L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, n. 3, p. 312-321, 2017.
- COELHO, S.V.B. *et al.* Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.
- COSTA, M.C. **Estudos fisiológicos e proteômicos relacionados à dessecação de sementes de café durante o armazenamento**. 2019. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. **Coffee. Journal of Experimental Botany**, [S.l.], n. 41v. 230, p. 1167-1174, 1990.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GUIMARÃES, R.M. *et al.* Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128–139, 2002

HASLEKÅS, C.; STACY, R.A.; NYGAARD, V.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A.; AALEN, R. B. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 36, n. 6, p. 833-845, 1998.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana sylvestris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 283, n. 2, p. 491-495, 1990.

KIM, S.Y.; PAENG, S.K.; NAWKAR, G.M.; MAIBAM, P.; LEE, E.S.; KIM, K.S.; LEE, J. H. The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions. **Plant Science**, [S.l.], v. 181, n. 2, p. 119-124, 2011.

LEE, E.S.; KANG, C.H.; PARK, J.H.; LEE, S.Y. Physiological significance of plant peroxiredoxins and the structure-related and multifunctional biochemistry of peroxiredoxin 1. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.l.], v. 28, n. 7, p. 625-639, 2018.

LEE, K.O.; JANG, H.H.; JUNG, B.G.; CHI, Y.H.; LEE J.Y.; CHOI, Y, LEE JR. L.C.; CHO, M.J.; LEE, S.Y. Rice 1Cys-peroxiredoxin overexpressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. **FEBS Lett**, [S.l.], v. 486, p. 103–106, 2000.

LEWIS, M.L.; MIKI, K.; UEDA, T. FePer 1, a gene encoding an evolutionarily conserved 1-Cys peroxiredoxin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), is expressed in a seed-specific manner and induced during seed germination. **Gene**, [S.l.], v. 246, p. 81-91, 2000.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 9 de 02 de junho de 2005**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/legislacao>. Acesso em: 20 abr. 2019.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, [S.l.], v. 1, p. 1-24, 1999.

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

MHAMDI, A; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen species in plant development. **Development**, [S.l.], v. 145, n. 15, p. dev164376, 2018.

MORENO, K.A.; PIRES, R.M.; CASTRO, M.L.; VASCONSELLOS, R.C.C., SANTOS, H. O.; PINHO, E.V.R.V. Gene Expression Related to Physiological Quality of Soybean Seeds. **Journal of Agricultural Science**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 370-380, 2019.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.A.D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NETO, F.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; DE PÁDUA, G.P. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Embrapa Soja. Artigo em periódico indexado (ALICE), 2010.

NISHIZAWA, K; KOMATSU, S. Characteristics of soybean 1-Cys peroxiredoxin and its behavior in seedlings under flooding stress. **Plant Biotechnology**, [S.l.], v. 28, n. 1, p. 83-88, 2011.

NOCTOR, G.; LELARGE-TROUVERIE, C.; MHAMDI, A. The metabolomics of oxidative stress. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 112, p. 33-53, 2015.

PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F.J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 57, n. 1, p. 132-145, 2009.

RATAJCZAK, E.; MAŁECKA, A.; CIERESZKO, I.; STASZAK, A.M. Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 20, n. 7, p. 1568, 2019.

RIBEIRO, T.L. **Qualidade fisiológica e expressão de peroxirredoxinas em sementes de coffea arabica submetidas à secagem e ao armazenamento**. 2020. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

ROCHA, G.A.; ROMANATTI, P.V.; OLIVEIRA, F.M.; CUNHA NETO, A.R.; PEREIRA, F.J.; POLO, M. Ecophysiology of the tree species *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) submitted to flooding. **CERNE**, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 323-333, 2018.

ROSA, S.D.V.F.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SANTOS, F.C. *et al.* Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25–31, 2014

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, [S.l.], v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, [S.l.], v. 2012, p. 1-26, 2012.

STACY, R.A.; MUNTHE, E.; STEINUM, T.; SHARMA, B.; AALEN, R.B. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 31, n. 6, p. 1205-1216, 1996.

STACY, R.A.; NORDENG, T.W.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; AALEN, R.B. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, *PER1*, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **Plant Journal**, [S.l.], v.19, p. 1-8, 1999.

VEIGA, A.D.; ROSA, S.D.V.F.D.; SILVA, P.D.A.; OLIVEIRA, J.A.D.; ALVIM, P.D.O.; DINIZ, K.A. Tolerância de sementes de soja à dessecação. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 773-780, 2007.

WASZCZAK, C.; CARMODY, M.; KANGASJÄRVI, J.. Reactive oxygen species in plant signaling. **Annual Review of Plant Biology**, [S.l.], v. 69, p. 209-236, 2018.

WOOD, Z.A.; SCHRODER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Science**, [S.l.], v. 28, p. 32–40, 2003.

CAPÍTULO 4 PROTEOMIC ANALYSIS BY ELECTROPHORESIS AND SPECTROPHOTOMETRY FOR STRESS ASSESSMENT BY WATER RESTRICTION AND DRYING CONDITIONS IN DIFFERENT CROPS: A META-ANALYSIS

ABSTRACT

Proteomic analysis has been increasingly used in research to elucidate mechanisms in the processes of plant tolerance to biotic and abiotic stresses. Several approaches can be used to verify protein's properties, functions, expression levels, protein interactions, regulatory mechanisms and post-translational modifications. However, these techniques have different characteristics, methodologies, and applications. The objective of this work was to identify, by meta-analysis technique, which tool is the most suitable for evaluating protein expression in seeds subjected to water stress and different drying conditions, in some crops. Experiments were carried out with four crops: rice, corn, coffee, and soybean. Rice and corn were subjected to water stress, and coffee and soybean to drying stress. The plant material were seeds (submitted or not to the described stresses) and seedlings from these seeds submitted to the germination test. We collected expression data of SOD, CAT, APX, and POX antioxidant enzymes using electrophoresis and lipid peroxidation quantification, SOD, CAT, and APX enzymes activity by spectrophotometry. The results of these analyses were used to assess the significance of electrophoresis and spectrophotometry through meta-analysis. 64 cases were used to compose the meta-analysis. It was possible observe that spectrophotometry allows to evaluate the effect of stresses. Using this technique, lipid peroxidation, water stress, and seeds moderators were significant. The meta-analysis results suggested the spectrophotometry as the most recommended technique in stress studies in the plant models we used. Water stress was responsible for causing lipid peroxidation, which was observed only in seeds.

Keywords: Lipid peroxidation. Antioxidant enzymes. Water restriction. Drying.

ANÁLISES PROTEÔMICAS PELAS TÉCNICAS DE ELETROFORESE E ESPECTROFOTOMETRIA PARA A AVALIAÇÃO DE ESTRESSE POR RESTRIÇÃO HÍDRICA E CONDIÇÕES DE SECAGEM EM DIFERENTES CULTURAS: UMA META – ANÁLISE

RESUMO

Análises proteômicas vêm sendo cada vez mais utilizadas em pesquisas para elucidação de mecanismos no processo de tolerância das plantas aos estresses bióticos e abióticos. Diversas técnicas podem ser utilizadas para verificar as propriedades das proteínas, funções, níveis de expressão, interações proteicas, mecanismos regulatórios e modificações pós-traducionais. Porém, essas técnicas apresentam características, metodologias e aplicações diferentes. Desse modo, objetivou-se identificar, por meio da técnica de meta análise, qual ferramenta é a mais indicada para avaliar a expressão de proteínas em sementes submetidas ao estresse hídrico e condições de secagem, em algumas culturas. Para tanto, foram realizados experimentos com quatro culturas: arroz, milho, café e soja. Arroz e milho foram submetidos à condição de estresse hídrico e café e soja ao estresse durante a secagem. Como material vegetal foram utilizadas sementes (submetidas ou não à condição de estresse) e plântulas oriundas destas sementes submetidas ao teste de germinação. Os dados coletados foram: a expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX e POX obtidos pela técnica de eletroforese e a quantificação da peroxidação lipídica e a atividade das enzimas SOD, CAT e APX, obtidas pela técnica de espectrofotometria. Os resultados dessas análises foram utilizados para avaliar a significância destas duas técnicas, eletroforese e espectrofotometria, por meio da meta-análise. Foram analisados ao todo 64 casos utilizados para compor a meta-análise. Diante dos resultados, foi possível observar que por meio da espectrofotometria é possível avaliar o efeito dos estresses. Para esta técnica os moderadores peroxidação lipídica, estresse hídrico e sementes foram significativos. Por meio da análise de meta análise conclui-se que, dentre as técnicas avaliadas, a espectrofotometria é recomendada em estudos de estresse nos modelos vegetais estudados. Verifica-se ainda, que o estresse hídrico foi o responsável por causar peroxidação lipídica, a qual foi evidenciada apenas nas sementes.

Palavras chave: Peroxidação lipídica. Enzimas antioxidantes. Restrição hídrica. Secagem.

1 INTRODUCTION

The phenotype, from a molecular point of view, can be determined in terms of mRNA and proteins, which is associated with the genome and influenced by the environment. The sequence of the gene cannot be regarded in isolation to indicate its function, thus the mRNA analysis becomes informative only. Therefore, proteins are most associated with the function of the gene, as it is the final product of the regulation of genetic activity (KOSOVÁ, et.al., 2019). In this sense, proteomic studies are major tools in plant breeding programs, since it provides molecular information on the genetic variability that is actually being expressed in the genome under a certain environmental condition (PENNINGTON; DUNN, 2001; VAN BREUSEGEM, 2018).

Proteomics has been widely used for identification and verification of the activity of proteins related to plant resistance mechanisms to pests and diseases and to those related to plant tolerance to environmental changes (GUISSONI; CARDOSO, 2019). The proteome description provides not only information on the group of proteins that are being expressed from a genome, but also the gene-expression data under specific conditions and its location in the cell (DOWLING, V. A.; SHEEHAN, 2006).

Through different techniques for proteomic analysis, it is possible to study the proteins properties, functions, levels of expression, protein interactions, regulatory mechanisms and post-translational modifications (BLACKSTOCK; WEIR, 1999). Among the techniques, the electrophoresis and molecular absorption spectrophotometry have been extensively used in plants, however they present different characteristics (PARK, et.al., 2004; NEISON, et.al., 2010; OLIVEIRA, et.al., 2015).

Electrophoresis is a technique in use since 1925 due to its efficiency in separating macromolecules, proteins and nucleic acids, requiring a relatively low number of equipment. The technique basically consists on the separation of these macromolecules present in a sample through the influence of an electric field. It has been used to focus enzymes, proteins and nucleic acids in seeds, in the identification of fungi, clones, cultivars, lineages, in physiological and biochemical studies and in the relationship between pathogen and host (DA SILVA et.al., 2000; VIEIRA et.al., 2009; SILVA et al., 2019).

There are different variations of electrophoresis, and the choice depends on the desirable precision. It may vary in the pore size of the gel, the type of extraction buffer and the tank, the temperature, the ionic strength, the running direction (horizontal or vertical) and the equipment.

In the electrophoresis method known as Native-PAGE the separation of the protein is based on its charge and size. This allows the analysis of the natural conformation of proteins, the interactions of subunits and biological activity (VAVRICKA, 2009). However, the gel interpretation can be difficult because some proteins, due to their preserved charge, can move towards any electrode, also, due to the protein-protein interaction, some proteins can be separated in a complex with multiple subunits, altering the molecular weight of the protein. Yet, the Native-PAGE method allows the separation of proteins in their active site and can reveal proteins with the same molecular weight (RIVOAL, et.al., 2002)

Molecular absorption spectrophotometry is based on the transmittance or absorbance of a solution, being used to quantify organic, inorganic and biological substances, in addition to evaluate functional groups, concentration of metals and molecular structures (HARRIS et.al., 2005). Characteristics such as the nature of the solvent, pH of the solution, temperature and the presence of substances can affect the absorption spectrum of a substance (HOLLER et.al., 2009).

Prior to any analysis on the spectrophotometer, it is required to determine the correct absorbance, which must be done at a wavelength that corresponds to the maximum absorption of the analyzed substance (HOLLER et.al., 2009). The wavelengths of the spectrophotometer corresponding to the visible light region range from 400 to 780 nm and the ultraviolet range from 200 to 400 nm. The antioxidant enzymes CAT and APX, for instance, are evaluated in ultraviolet light in the lengths of 240 and 290 nm respectively, and SOD in the length of 560 nm of the visible light spectrum.

The meta-analysis is a quantitative scientific synthesis that allows the data to be analyzed in a general way, even though the cases observed may present individual behaviors that will whether or not corroborate with the result obtained in the global effect. It was introduced in the 1970s, has ever since established evidence-based practices, and solves issues that have, apparently, contradictory results (GUREVITCH et.al., 2018).

Considering the available data for the evaluation of antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX and POX) and lipid peroxidation obtained by the Native-PAGE electrophoresis method and by molecular absorption spectrophotometry, this work aimed to identify, using the meta analysis technique, which tool is the most suitable for checking abiotic stress. As well as the main cause of the conditions under which the seeds were submitted.

2 MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in the seed analysis laboratory of the Universidade Federal de Lavras, using four crops: rice, corn, coffee and soybean. These underwent two stress conditions: water restriction, for rice and corn and drying, for coffee and soybean. The plant material used were seeds (submitted or not to the stress condition) and seedlings from the germination test of these seeds (TABLE 1).

The activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT, APX and POX were evaluated by the electrophoresis technique while the quantification of lipid peroxidation, SOD, CAT and APX enzyme activities by spectrophotometry (TABLE 1). The results of these analyzes were used to assess the significance of the electrophoresis and spectrophotometry techniques, through meta-analysis.

For carrying out the meta-analysis, each result was used as a study case (see table 1) and the effect size was calculated for each studied case as well as the standardized mean difference (d) obtained from the equation:

$$d = (X1 - X2) / S_{within} \quad (1)$$

The variation (Vd) of d was calculated from:

$$Vd = [(n1+n2) / n1n2] + [d^2/2(n1+n2)]$$

n1 as the control error and n2 as the treatment error.

Negative values for d indicates a reduction in the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation analyzed under stressed conditions in relation to the control and positive values indicates an increase in activity in relation to the control.

Table 1 – Identification of the study number with the technique, analysis, crop, tissue and stress type and the moderators used. (to be continued).

MODERATORS					
Study	Technique	Analysis	Crop	Tissue	Stress Type
1	Spectrophotometry	lipid peroxidation	maize	seeds	water restriction
2	Spectrophotometry	lipid peroxidation	maize	seedlings	water restriction
3	Spectrophotometry	lipid peroxidation	rice	seeds	water restriction
4	Spectrophotometry	lipid peroxidation	rice	seedlings	water restriction
5	Spectrophotometry	lipid peroxidation	coffee	seeds	drying
6	Spectrophotometry	lipid peroxidation	coffee	seedlings	drying
7	Spectrophotometry	lipid peroxidation	soybean	seeds	drying
8	Spectrophotometry	lipid peroxidation	soybean	seedlings	drying
9	Spectrophotometry	SOD	maize	seeds	water restriction
10	Spectrophotometry	SOD	maize	seedlings	water restriction
11	Spectrophotometry	SOD	rice	seeds	water restriction
12	Spectrophotometry	SOD	rice	seedlings	water restriction
13	Spectrophotometry	SOD	coffee	seeds	drying
14	Spectrophotometry	SOD	coffee	seedlings	drying
15	Spectrophotometry	SOD	soybean	seeds	drying
16	Spectrophotometry	SOD	soybean	seedlings	drying
17	Spectrophotometry	CAT	maize	seeds	water restriction
18	Spectrophotometry	CAT	maize	seedlings	water restriction
19	Spectrophotometry	CAT	rice	seeds	water restriction
20	Spectrophotometry	CAT	rice	seedlings	hidrico
21	Spectrophotometry	CAT	coffee	seeds	drying
22	Spectrophotometry	CAT	coffee	seedlings	drying
23	Spectrophotometry	CAT	soybean	seeds	drying
24	Spectrophotometry	CAT	soybean	seedlings	drying
25	Spectrophotometry	APX	maize	seeds	water restriction
26	Spectrophotometry	APX	maize	seedlings	water restriction
27	Spectrophotometry	APX	rice	Seeds	water restriction
28	Spectrophotometry	APX	rice	Seedlings	water restriction
29	Spectrophotometry	APX	coffee	Seeds	drying
30	Spectrophotometry	APX	coffee	Seedlings	drying
31	Spectrophotometry	APX	soybean	Seeds	drying
32	Spectrophotometry	APX	soybean	Seedlings	drying
33	Electrophoresis	POX	maize	Seeds	water restriction
34	Electrophoresis	POX	maize	Seedlings	water restriction
35	Electrophoresis	POX	rice	Seeds	water restriction
36	Electrophoresis	POX	rice	Seedlings	water restriction
37	Electrophoresis	POX	coffee	Seeds	drying
38	Electrophoresis	POX	coffee	Seedlings	drying

Table 1 – Identification of the study number with the technique, analysis, crop, tissue and stress type and the moderators used. (conclusion)

Study	MODERATORS				
	Technique	Analysis	Crop	Tissue	Stress Type
39	Electrophoresis	POX	soybean	Seeds	drying
40	Electrophoresis	POX	soybean	Seedlings	drying
41	Electrophoresis	SOD	maize	Seeds	water restriction
42	Electrophoresis	SOD	maize	Seedlings	water restriction
43	Electrophoresis	SOD	rice	Seeds	water restriction
44	Electrophoresis	SOD	rice	Seedlings	water restriction
45	Electrophoresis	SOD	coffee	Seeds	drying
46	Electrophoresis	SOD	coffee	Seedlings	drying
47	Electrophoresis	SOD	soybean	Seeds	drying
48	Electrophoresis	SOD	soybean	Seedlings	drying
49	Electrophoresis	CAT	maize	Seeds	water restriction
50	Electrophoresis	CAT	maize	Seedlings	water restriction
51	Electrophoresis	CAT	rice	Seeds	water restriction
52	Electrophoresis	CAT	rice	Seedlings	water restriction
53	Electrophoresis	CAT	coffee	Seeds	drying
54	Electrophoresis	CAT	coffee	Seedlings	drying
55	Electrophoresis	CAT	soybean	Seeds	drying
56	Electrophoresis	CAT	soybean	Seedlings	drying
57	Electrophoresis	APX	maize	Seeds	water restriction
58	Electrophoresis	APX	maize	Seedlings	water restriction
59	Electrophoresis	APX	rice	Seeds	water restriction
60	Electrophoresis	APX	rice	Seedlings	water restriction
61	Electrophoresis	APX	coffee	Seeds	drying
62	Electrophoresis	APX	coffee	Seedlings	drying
63	Electrophoresis	APX	soybean	Seeds	drying
64	Electrophoresis	APX	soybean	Seedlings	drying

Source: The author (2020).

The overall effect size was calculated using random-effects models for each variable response. These models were used because they assign the distribution of the effect size to the real differences between the studied cases and do not assume that the sampling error is the only source of differences between them.

The maximum and minimum values were calculated in order to determine whether the effect size was significant as well as the p-value (GUREVITCH et al., 2018; CUNHA NETO et al., 2020). In addition, it was assessed the heterogeneity to identify moderators that would explain the potential difference between cases. The publication bias was verified using the

normal QQ test, and the funnel plot symmetry test. The analyses were performed using the software Comprehensive Meta-Analysis V2.

3 RESULTS

Using the electrophoresis and spectrophotometer to quantify lipid peroxidation and the activity of antioxidant enzymes, 64 cases were analyzed to compose the meta-analysis. Based on the results, it was possible to observe that the electrophoresis technique was not statistically significant for the quantification of the indicative parameters of stress (TABLE 1). According to the Table 1, it is possible to check that the p-value of the global effect (0.926) is greater than the significance level of $p < 0.05$.

Table 1 - Values of each case found for the electrophoresis technique of the global effect, minimum and maximum limit value obtained through the meta-analysis.

Electrophoresis				
Study	St diff in means	Lower Limit	Upper Limit	p-Value
33	-6,76	-10,90	-2,61	0,001
34	-2,48	-4,62	-0,35	0,022
35	0,00	-1,60	1,60	1,000
36	-3,64	-6,25	-1,03	0,006
37	-15,60	-24,58	-6,63	0,001
38	1,62	-0,22	3,46	0,085
39	21,32	9,15	33,48	0,001
40	12,00	5,02	18,97	0,001
41	34,54	14,93	54,15	0,001
42	-17,34	-27,28	-7,40	0,001
43	25,30	10,89	39,71	0,001
44	-5,64	-9,20	-2,07	0,002
45	-2,02	-3,29	-0,05	0,044
46	-9,25	-14,72	-3,77	0,001
47	-1,47	-3,28	0,32	0,109
48	-2,69	-4,90	-0,48	0,017
49	7,51	2,97	12,05	0,001
50	7,97	3,18	12,76	0,001
51	-14,54	-22,92	-6,16	0,001
52	-6,07	-9,86	-2,28	0,002
53	8,11	3,25	12,98	0,001
54	0,00	-1,60	1,60	1,000
55	49,96	21,64	78,27	0,001
56	-2,02	-3,98	-0,05	0,044
57	3,87	1,16	6,59	0,005
58	1,39	-0,39	3,17	0,126
59	-0,27	-1,88	1,32	0,734
60	-4,57	-7,62	-1,53	0,003
61	0,26	-1,34	1,87	0,747
62	8,90	3,61	14,18	0,001
63	-3,32	-5,78	-0,85	0,008
64	6,29	2,39	10,20	0,001
Global effect	-0,07	-1,55	1,41	0,926

Source: The author (2020).

Different from what was observed in the meta-analysis for electrophoresis technique in gel, the results obtained by the spectrophotometer were statistically significant in quantifying the indicative parameters of stress (TABLE 2).

Table 2 - Values of each case found for the spectrophotometry technique of the global effect, minimum and maximum limit value obtained through the meta-analysis.

Spectrophotometry				
Study	St diff in means	Lower Limit	Upper Limit	p-Value
1	104,65	45,41	163,88	0,001
2	10,01	4,12	15,90	0,001
3	80,27	34,82	125,71	0,001
4	12,83	5,40	20,27	0,001
5	12,23	5,13	19,34	0,001
6	-5,34	-8,76	-1,92	0,002
7	1,09	-0,62	2,81	0,211
8	0,53	-1,09	2,16	0,521
9	7,35	2,89	11,81	0,001
10	6,09	2,29	9,88	0,002
11	-14,77	-23,28	-6,26	0,001
12	11,83	4,94	18,71	0,001
13	14,35	6,07	22,62	0,001
14	11,54	4,82	18,27	0,001
15	-7,68	-12,31	-3,05	0,001
16	-0,25	-1,86	1,34	0,753
17	-0,58	-2,22	1,04	0,481
18	-2,74	-4,97	-0,51	0,016
19	1,98	0,03	3,94	0,046
20	4,52	1,50	7,54	0,003
21	0,00	-1,60	1,60	1,000
22	-5,88	-9,57	-2,19	0,002
23	3,15	0,75	5,54	0,010
24	-1,11	-2,83	0,60	0,203
25	2,78	0,54	5,03	0,015
26	8,05	3,22	12,88	0,001
27	0,40	-1,21	2,02	0,622
28	-2,96	-5,28	-0,64	0,012
29	0,00	-1,60	1,60	1,000
30	12,11	5,07	19,15	0,001
31	-2,72	-4,94	-0,50	0,016
32	-10,84	-17,18	-4,50	0,001
Global effect	1,60	0,20	3,00	0,025

Source: The author (2020).

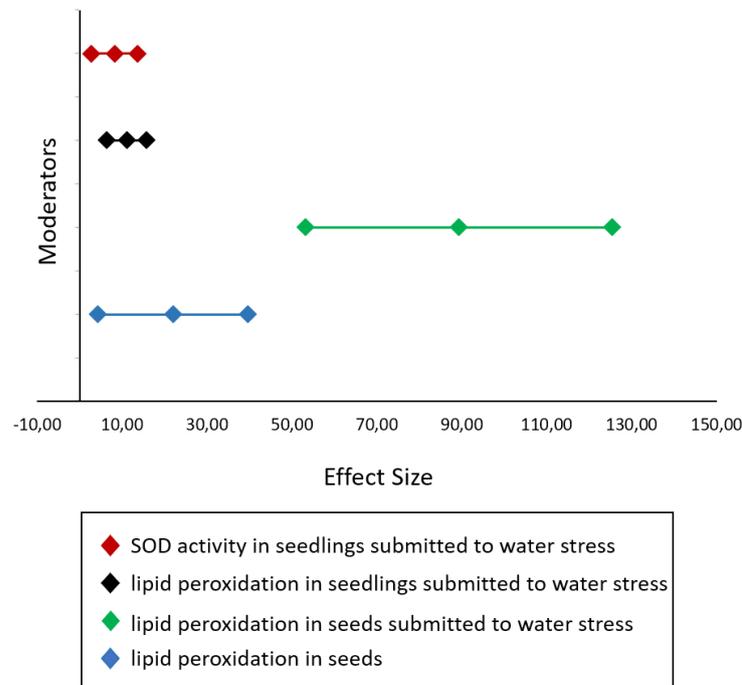
After the data obtained from the spectrophotometer, the analyzes of their moderators was realized. The moderators selected were the lipid peroxidation, enzymes from the antioxidant system, seeds, seedlings, hydric stress, and stress by drying.

Analyzing the effect of the stresses in comparison to the lipid peroxidation and to the enzymes from the antioxidant system, it can be observed that the data were significant only to the lipid peroxidation, suggesting that the conditions of water restriction and the high temperature drying induced the stress, however, how have not had a significant impact for the enzymes from the antioxidant system, probably the treatments under stress conditions were not sufficient for the expression of these enzymes.

Individualizing the data in the different conditions, it can be observed that the hydric stress in seeds and seedling was significative to lipidic peroxidation, differently, the stress by drying did not perform significative statical results (FIGURE 1). Besides that, in the different conditions individually, the was not significative effect for seeds and seedlings. Was possible to verify this effect only to SOD in seedling exposed to water restriction (FIGURE 1).

It can be observed that only the data ascertained for lipid peroxidation in seeds were significant when analyzing the grouping of moderators made by seeds and seedlings (FIGURE 1). For enzymes from antioxidant system, as well as seeds, and seedlings, there was no significative difference.

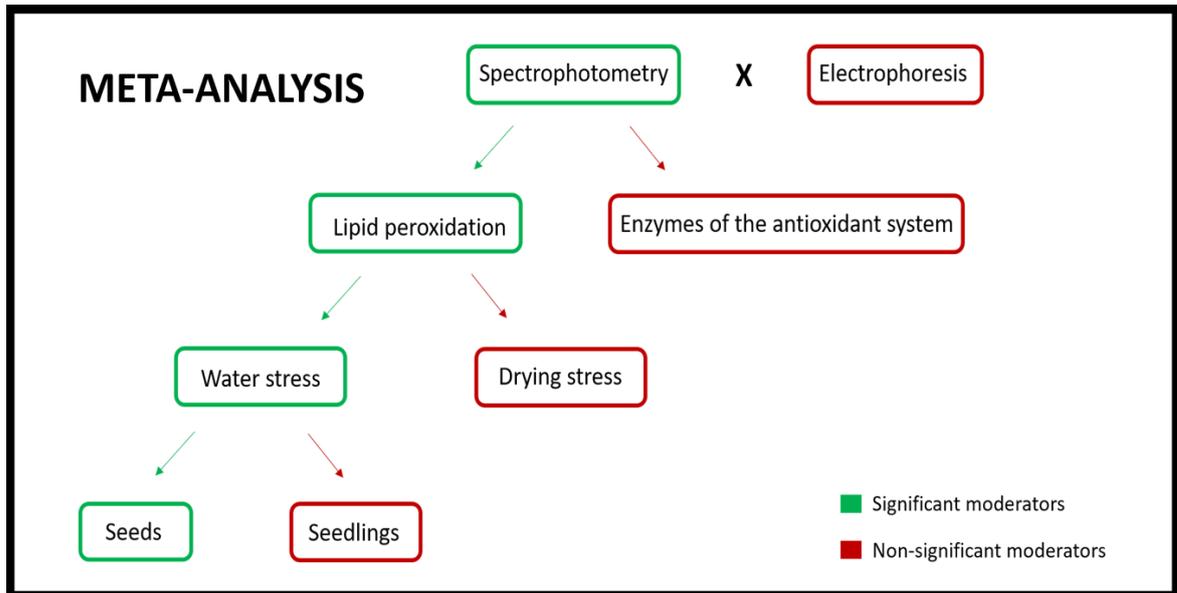
Figure 1 – SOD activity in seedlings submitted to water stress; lipid peroxidation in seedlings submitted to water stress; lipid peroxidation in seeds submitted to water stress and lipid peroxidation in seeds, assessed by means of meta-analysis.



Source: The author (2020)

According to the meta-analyzes results, it can be observed that the spectrophotometry technique, is capable to indicate the effect of the stresses and also to indicate which moderators were significative (FIGURE 2).

Figure 2 – Flowchart of the significance result of the parameters analyzed by the meta-analysis test.



Source: The author (2020).

4 DISCUSSION

Studies related to the oxidative process in seeds and seedlings, including their causes and consequences, are increasing. These papers have been fostering a better comprehension about the process of development, germination, dormancy, seeds deterioration, genes expression under abiotic stress conditions, among others.

Losing one or more electrons from a substance to another and in cellular compounds as proteins, nucleotides and lipids is named oxidation. This is resultant from the action of free radicals (reactive oxygen and nitrogen species), that may have toxic effect on vegetal tissues (ZINTA et.al., 2016; ALVES et.al., 2010).

To combat these free radicals, enzymes are produced to reduce the oxidative damages. To evaluate the free radicals and proteins there are some techniques used to qualify and quantify these molecules (ALVES et.al., 2010).

However, the use of only one technique, not always will result in credible results, due to the numerous types of free radicals (superoxide, hydrogen peroxide, singlet oxygen, among others). The various existing protocols present contradictory results which difficult the comprehension about the effect of the antioxidant activity (ALVES et.al., 2010), as well was observed in this paper, where the techniques used presented different results.

This difference observed can be related to the specificity from each technique. Electrophoresis using gel, by providing results semiquantitative, by meta-analyses did not demonstrate significance. However, must be highlighted, that according to the objectives, treatments used, protocols adopted, among others, the results of the technique of electrophoresis can be significative in other studies. In several studies has been observed efficiency of this technique in differentiate treatments, many times to complement information's obtained from the physiological tests which evaluate the seeds quality.

Os estudos sobre novas técnicas para avaliar a atividade antioxidante tem aumentado nas rotinas experimentais. Studies about news techniques to evaluate the antioxidant activity has increased in the experimental routine and the spectrophotometry technique is one of the most used, due to their greater reliability, as well as observed in this present work.

The quantification of the lipidic peroxidation by the spectrophotometer analyses was significative, with this result indicating oxidative damages. The reaction of free radicals in cell membranes and lipoproteins, for example, begins with a process named by lipid peroxidation

or lipoperoxidation, whose quantification are used as indicator of oxidative stress (LIMA; ABDALLA, 2001; ROCHA et al., 2018).

Different environmental conditions which the plants are exposed directly influence their development. Among the stresses, that related to the water restriction is one that most affect the growth and productivity of plants (NOORKA; TABASUM, 2015). In this paper, the analyses of quantification parameters of the system of enzymatic defense and lipoproteins, the stress caused by water restriction was significative. The responses of plants to water restriction, in general, vary according the tissue, development stage, specie, intensity, stress period and genotype, expressing in levels physiologicals, morphological, biochemicals and molecular (SOUROUR et. al., 2017).

The non-significative result for drying parameter consent with their function of preserving seeds from physical and chemical alterations that may occur at high humidity situation, allowing the maintenance of initial quality of seeds and a harvest close to the period of physiologic maturity. This physical process of dehydration of seeds is very important and awaken interests of researches in developing new technologies for drying (LEITE, et.al., 2019).

Comparing the achievements meta analytical for the parameter lipidic peroxidation in seeds and seedlings, the same was significative only for seeds. Even the parameters analyzed have been no significative for seedlings, the presence of stress, may cause disorders, which have consequence, that induce higher absorption or retention of water, typifying a possible induction or tolerance (ROCHA et.al., 2018; CUNHA NETO et.al., 2020).

To analyze seeds tolerance to a stress condition is necessary to verify their physiological quality, mainly about their vigor (SOUZA GRZYBOWSKI et.al., 2019). For that, researches related to proteomic analyzes must be associated to the physiological quality and vigor, being important the correct choice of the most suitable test be used.

The results observed in this paper by the meta analyzes, revealed that it can be used by an additional tool to complement the process of determination of efficiency of some techniques and molecular markers. Accordingly, this tool becomes an enabler for the process of material selection using molecular markers realized by breeding programs.

4 CONCLUSION

Using the meta-analyses technique, the most applicable tool to evaluate the oxidative process in seeds and seedlings under stresses conditions of water restriction and drying, is the spectrophotometry.

In the oxidative process, under stress condition, the lipidic peroxidation is more significative than the enzymes expression and also more significative in seeds than seedlings.

REFERENCES

- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, [S.l.], v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.
- CUNHA NETO, A.R. da *et al.* Negative effects on photosynthesis and chloroplast pigments exposed to lead and aluminum: a meta-analysis. **Cerne**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 232-237, 2020.
- DA SILVA, E.A.A.; VON PINHO, E.V.D.R.; VIEIRA, M.D.G.G.C.; DE CARVALHO, M. L. M. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos I. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 35, n. 9, p.1725-1732, 2000.
- DOWLING, V.A.; SHEEHAN, D. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. **Proteomics**, [S.l.], v. 6, n. 20, p. 5597-5604, 2006.
- GUISSONI, A.C.P.; DE PAULA CARDOSO, D.D.D. Proteômica: uma ferramenta analítica. *Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia*, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 62-75, 2019.
- GUREVITCH, J.; KORICHEVA, J.; NAKAGAWA, S.; STEWART, G. Meta-analysis and the science of research synthesis. **Nature**, [S.l.], v. 555, n. 7695, p. 175-182, 2018.
- HARRIS, C.D. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- HOLLER, J.F.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios da análise instrumental. Aplicação da espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. p. 381-412.
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; KLÍMA, M.; PRÁŠIL, I.T. Breeding drought-resistant crops: G× E interactions, proteomics and pQTLs. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 70, n. 10, p. 2605-2608, 2019.
- LEITE, D.D.D.F.; QUEIROZ, A.J.D.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.D.; LIMA, L.S.L. Modelagem matemática da cinética de secagem das sementes germinadas de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). **Revista Ciência Agronômica**, [S.l.], v. 50, n. 3, 361-369, 2019.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- NEILSON, K.A.; GAMMULLA, C.G.; MIRZAEI, M.; IMIN, N.; HAYNES, P.A. Proteomic analysis of temperature stress in plants. **Proteomics**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 828-845, 2010.
- NOORKA, I.R.; TABASUM, S. Dose-response behaviour of water scarcity towards genetical and morphological traits in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Pak J. Bot.**, [S.l.], v. 47, p. 1225-1230, 2015.

OLIVEIRA, E.D.; TRENTIN, T.D.C.; CAMARGO, F.; PINTO, Y.D.P.; MARTINS, D.B. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 11 n. 22, 2015.

PARK, O.M.K. Proteomic studies in plants. **BMB Reports**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 133-138, 2004.

PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. **Proteomics: from protein sequence to function**. New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Publishers, 2001. V.1.

ROCHA, G.A.; ROMANATTI, P.V.; OLIVEIRA, F.M.; CUNHA NETO, A.R.; PEREIRA, F.J.; POLO, M. Ecophysiology of the tree species *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) submitted to flooding. **Cerne**, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 323-333, 2018.

RIVOAL, J.; SMITH, C.R.; MORAES, T.F.; TURPIN, D.H.; PLAXTON, W.C. A method for activity staining after native polyacrylamide gel electrophoresis using a coupled enzyme assay and fluorescence detection: application to the analysis of several glycolytic enzymes. **Analytical biochemistry**, [S.l.], v. 300, n.1, p. 94-99, 2002.

SOUROUR, A.; AFEF, O.; MOUNIR, R.; MONGI, B.Y. A review: morphological, physiological, biochemical and molecular plant responses to water deficit stress. **Int J Eng Sci**, [S.l.], v. 6, p. 1-4, 2017.

SOUZA GRZYBOWSKI, C.R.; DA SILVA, R.C.; DE CARVALHO, T.C.; PANOBIANCO, M. Efeito do potencial osmótico na interação genótipo e vigor de sementes de milho. Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 12, n. 3, 2019.

VAN RUYSKENSVELDE, V.; VAN BREUSEGEM, F.; VAN DER KELEN, K. Post-transcriptional regulation of the oxidative stress response in plants. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.l.], v. 122, p. 181-192, 2018.

VIEIRA, E.S.N.; VON PINHO, E.V.D.R.; CARVALHO, M.D.G.G.; SILVA, P.A.D. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 86-94, 2009.

ZINTA, G.; KHAN, A.; ABDELGAWAD, H.; VERMA, V.; SRIVASTAVA, A.K. Unveiling the redox control of plant reproductive development during abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 7, p. 700, 2016.