



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



TIAGO ALEXANDRE DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA CALAGEM RESIDUAL NA AQUISIÇÃO DA QUALIDADE  
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE TRIGO PRODUZIDAS EM SISTEMA DE  
SEMEADURA DIRETA**

Botucatu

2017



TIAGO ALEXANDRE DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA CALAGEM RESIDUAL NA AQUISIÇÃO DA QUALIDADE  
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE TRIGO PRODUZIDAS EM SISTEMA DE  
SEMEADURA DIRETA**

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp  
Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutor em  
Agronomia (Agricultura).

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S586i Silva, Tiago Alexandre da, 1988-  
Influência da calagem residual na aquisição da qualidade fisiológica de sementes de trigo produzidas em sistema de semeadura direta / Tiago Alexandre da Silva.- Botucatu :[s.n.], 2017  
119 p. : il., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva  
Inclui bibliografia

1. Trigo - Cultivo. 2. Sementes - Qualidade. 3. Antioxidantes. 3. Expressão gênica. 4. Germinação. 5. Semeadura. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: "INFLUÊNCIA DA CALAGEM RESIDUAL NA AQUISIÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE TRIGO PRODUZIDAS EM SISTEMA DE SEMEADURA DIRETA"**

**AUTOR: TIAGO ALEXANDRE DA SILVA**

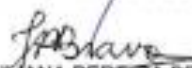
**ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA**


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA  
Dep. de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

  
Voluntário Livre-Docente JOÃO NAKAGAWA  
Dep. de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

  
Prof. Dr. JULIANO CARLOS CALONEGO  
Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

  
Profa. Dra. JULIANA PEREIRA BRAVO  
/ Faculdade de Salete - Lucas do Rio Verde

  
Prof. Dr. PEDRO BENTO DA SILVA  
Bauru/SP / Universidade do Sagrado Coração

Botucatu, 02 de junho de 2017.



À minha vó, Lindinalva Vicente dos Santos, que me ensinou a guardar a fé e acreditar sempre em Deus, mesmo nos momentos mais difíceis.

**DEDICO**

Aos meus pais, Francisco Alexandre da Silva e Marly Vivente, que mesmo distante permaneceram tão presentes; por acreditar sempre em mim. Pelo amor que foi sempre transbordante.

**OFEREÇO**





## **AGRADECIMENTOS**

À Deus. Quando não tinha mais forças, Ele sempre me encorajou; quando não conseguia enxergar a dimensão de tudo que estava vivendo, Ele, como uma luz, brilhava para mostrar os caminhos; por cada levantar, cada respiro, por todas as lutas.

À toda minha família. Por acreditar nos meus sonhos, que mesmo distante, sentia cada palavra de força, de encorajamento. Aos meus pais Francisco e Marly, meus irmãos Ricardo e Henrique Alexandre; aos meus tios, tias, primos e minha querida vó Lindinalva, trago todos no meu coração.

À todas as minhas outras famílias. Aos amigos do Grupo de Oração Restauração e Cenáculo, por sempre mostrarem Deus com um sorriso, palavras, abraços. Aos grupos de Oração Universitários (GOU's) sementes sacramentadas (CECA-UFAL) e frutos (FCA –UNESP - BOTUCATU), levarei todos comigo, como uma resposta de Deus para mim.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, pela oportunidade, toda minha estima. Por todos os anos de aprendizado, honrarei o título de doutor conquistado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa para que o trabalho pudesse ser executado.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva. Pela paciência e colaboração; por confiar no meu potencial nestes 6 anos; por todos os ensinamentos compartilhados, por todas as conversas, pela amizade. Cresci muito com você!

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, por toda contribuição. Pela disponibilidade em todos os momentos; toda minha admiração e carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Costa Crusciol e ao Dr. Antonio Carlos de Almeida Carmeis Filho, pela contribuição para a realização deste trabalho.

À todos os professores do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/ Botucatu pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, em especial Valéria, Eliane, Iara, Amanda e Vera, pela ajuda no decorrer de todos esses anos.

A todos os amigos do laboratório de sementes: Pedro Bento, Thiago Barbosa, Maria Rita, Hélen Siglia, Gírlânio Holanda, Bárbara Panoff, Camila Aquino Tomaz, Gilberto, Maurício, Rubiana Falopa Rossi, Matheus (cid), Denise, Juliana Lima, Juliana Bravo, Júlio, Vitor Oliveira, Daiane Ajala, Leonel G. Pereira Neto, Karina, Victória, Letícia, Fabiola, Andrea Akemi; por toda ajuda durante todos esses anos; impossível esquecer tudo que vivemos. Gratidão a todos.

**Meus Sinceros Agradecimentos!**

"Não pretendo dizer que já alcancei (esta meta) e que cheguei à perfeição. Não. Mas eu me empenho em conquistá-la, uma vez que também eu fui conquistado por Jesus Cristo. Consciente de não a ter ainda conquistado, só procuro isto: prescindindo do passado e atirando-me ao que resta para a frente, persigo o alvo, rumo ao prêmio celeste, ao qual Deus nos chama, em Jesus Cristo. Nós, mais aperfeiçoados que somos, ponhamos nisto o nosso afeto; e se tendes outro sentir, sobre isto Deus vos há de esclarecer. Contudo, seja qual for o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente."

**Filipenses 3, 12- 16**



## RESUMO

A aquisição da qualidade fisiológica de sementes é influenciada por fatores como as condições ambientais e o nível de nutrição da planta mãe. Por exemplo, solos ácidos podem afetar a qualidade fisiológica das sementes produzidas, devido a menor disponibilidade de nutrientes para a planta. O uso de corretivos como a prática da calagem, se torna essencial para a resolução desse problema, onde o calcário, através da hidrólise, libera bases capazes de neutralizar a atividade dos íons acidificantes. No sistema de plantio direto, o calcário é aplicado de forma superficial, podendo ter seu efeito residual atuante por muitos anos, melhorando a estrutura e as propriedades químicas do solo e auxiliando na atividade microbiana. Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de estudar a qualidade fisiológica e a expressão de genes associados a longevidade em sementes de trigo, produzidas em solos com diferentes doses de calcário. As sementes de trigo da cultivar CD116, foram produzidas na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP-Botucatu, na safra agrícola do ano de 2014. Os tratamentos consistiram em sementes produzidas sem calagem, dose recomendada de calcário ( $2000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e o dobro da dose recomendada ( $4000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Avaliou-se a porcentagem de germinação, o vigor (índice de velocidade de germinação e T50), longevidade de sementes e a estado nutricional das sementes. Para o estudo de genes relacionados a longevidade, foram selecionados dois tempos (0 e 60 dias) do teste de longevidade para averiguar o efeito das doses de calcário. A expressão gênica foi realizada usando a técnica de PCR em tempo real, onde o RNA total foi extraído e o cDNA foi utilizado para a quantificação dos genes relacionados a longevidade. A ausência da calcário não influenciou a germinação e o vigor das sementes de trigo, todavia a longevidade foi afetada. Os genes associados com a longevidade apresentaram expressão superior na presença residual de calcário. Este fato pode explicar a baixa longevidade de sementes de trigo procedentes de cultivo sem calagem.

**Palavras-chave:** Longevidade de sementes, expressão gênica, germinação, antioxidantes



## ABSTRACT

Acquisition of the physiological quality of seeds is influenced by factors such as environmental conditions and the level of nutrition of the mother plant. For instance, acidic soils may affect the physiological quality of the seeds produced due to the lower availability of nutrients to the plant. The use of correctives, such as the practice of liming, becomes essential to solve this problem, where limestone, through hydrolysis, releases bases capable of neutralizing the activity of acidifying ions. In the no-tillage system, limestone is applied superficially and can have its residual effect acting for many years, improving the structure and chemical properties of the soil and assisting in microbial activity. Therefore, the present work had the objective of studying the physiological quality and expression of genes associated with longevity in wheat seeds, produced in soils with different limestone doses. The wheat seeds from the cultivar CD116 were produced at the Experimental Farm Lageado, belonging to the Faculty of Agronomic Sciences – UNESP-Botucatu, in the crop season of the year 2014. Treatments consisted of seed produced without liming, recommended limestone dose (2000 kg.ha<sup>-1</sup>) and twice the recommended dose (4000 kg.ha<sup>-1</sup>). Germination percentage, vigor (germination speed index and T50), seed longevity and nutritional status were evaluated. For the study of genes related to longevity, two times (0 and 60 days) of the longevity test were selected to investigate the effect of limestone doses on gene expression. Gene expression was performed using the real-time PCR technique, where total RNA was extracted and cDNA was used for the quantification of genes related to longevity. The absence of limestone did not influence germination and vigor of wheat seeds, however, longevity was affected. Genes associated with longevity showed superior expression in the residual presence of limestone. This fact may explain the poor longevity of wheat seeds produced in soil lacking liming.

**Keywords:** Seed longevity, gene expression, germination, antioxidants





## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - “ <i>Primers</i> ” específicos da região embrionária de sementes de trigo utilizados para análises de PCR em tempo real.....	51
---	----



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Dados diários de precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas de março de 2014 a março de 2015.....	43
FIGURA 2 - Germinação em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário.....	54
FIGURA 3 - Índice de velocidade de germinação em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário.....	55
FIGURA 4 - T50 em sementes produzidas sob diferentes doses de calcário.....	56
FIGURA 5 - Germinação ao longo do teste de longevidade em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário.....	60
FIGURA 6 - Valores de P50 em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário.....	62
FIGURA 7 - Análise de probit das sementes de trigo ao longo do teste de longevidade nas diferentes doses de calcário.....	63
FIGURA 8 - Expressão relativa de ABI3 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	68
FIGURA 9 - Expressão relativa de ABI5 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	69
FIGURA 10 - Expressão relativa de HSFA9 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	71
FIGURA 11 - Expressão relativa de HSFA4 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	72
FIGURA 12 - Expressão relativa de DREB2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	75

FIGURA 13 - Modelo esquemático das vias independente e dependente de ABA na regulação da transcrição de diferentes fatores de transcrição, desempenhando papéis fundamentais no frio, calor e desidratação celular em plantas.....	77
FIGURA 14 - Expressão relativa de LEC1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	78
FIGURA 15 - Expressão relativa de VTE1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	80
FIGURA 16 - Vias de biossíntese de tocoferol e tocotrienol em plantas.....	81
FIGURA 17 - Expressão relativa de APX2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	83
FIGURA 18 - Expressão relativa de SOD1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	85
FIGURA 19 - Expressão relativa de GST na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	86
FIGURA 20 - Representação esquemática da rota da biossíntese da glutathiona.....	87
FIGURA 21 - Expressão relativa de MT na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	89
FIGURA 22 - Expressão relativa de MST2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	90
FIGURA 23 - Expressão relativa de CHL na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	92

FIGURA 24 - Expressão relativa de PIMT2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	94
FIGURA 25 - Expressão relativa de TIP3;1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes /doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	97
FIGURA 26 - Modelo esquemático de vias de sinalização ABA na longevidade de sementes, dormência e tolerância à dessecação mediada por ABI3.....	98
FIGURA 27 - Biossíntese de flavonoides em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	99
FIGURA 28 - Expressão relativa de TT4 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade.....	100



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características químicas do solo da área antes da instalação do experimento em 2002.....	43
TABELA 2 - Características granulométricas do solo da área antes da instalação do experimento em 2002.....	43
TABELA 3 - Características químicas do solo da área antes da instalação do experimento em 2014.....	44
TABELA 4 - Análise nutricional de sementes com 0 dia do teste de longevidade....	58
TABELA 5- Análise nutricional de sementes com 60 dias após a instalação do teste de longevidade.....	59
TABELA 6 - Eficiência dos <i>primers</i> dos genes de referência e candidatos na longevidade de sementes.....	65





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	28
2.1	Cultura do trigo .....	28
2.2	Qualidade de sementes .....	31
2.3	Longevidade de sementes .....	34
2.4	Expressão gênica .....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
3.1	Caracterização da área .....	42
3.2	Caracterização das sementes .....	44
3.2.1.	Teor de água .....	44
3.2.2.	Teste de germinação .....	45
3.2.3.	Índice de velocidade de germinação .....	45
3.2.4.	T50 .....	45
3.3	Estudo da longevidade .....	46
3.4	Análise nutricional de semente .....	46
3.5	Estudo molecular da longevidade em sementes de trigo .....	46
3.5.1	Extração de RNA .....	47
3.5.2	Determinação de quantidade e qualidade do RNA extraído .....	48
3.5.3	Síntese do cDNA .....	49
3.5.4	Desenho dos <i>primers</i> .....	49
3.5.5	Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real .....	52
3.5.6	Análise estatística .....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
4.1	Qualidade fisiológica de sementes de trigo .....	54
4.2	Composição nutricional das sementes .....	57
4.3	Longevidade de sementes de trigo .....	60
4.4	Expressão gênica .....	63
4.4.1	Extração de RNA e eficiência dos <i>primers</i> .....	64
4.4.2	Expressão genica dos fatores de transcrição na longevidade de sementes de trigo .....	66
4.4.2.1	Expressão relativa de <i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3</i> (ABI3) e <i>ABA INSENSITIVE 5</i> (ABI5) na longevidade de sementes de trigo .....	66

4.4.2.2	Expressão relativa de <i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9 (HSFA9)</i> e <i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FATOR A4A (HSFA4)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	70
4.4.2.3	Expressão relativa de <i>DROUGHT RESPONSIVE ABSCISIC BINDING PROTEIN 2 (DREB 2)</i> na longevidade de sementes de trigo.....	74
4.4.2.4	Expressão relativa de <i>LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	77
4.4.3	Expressão genica dos antioxidantes na longevidade de sementes de trigo.....	78
4.4.3.1	Expressão relativa de <i>VITAMIN E DEFICIENT 1 (VTE1)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	79
4.4.3.2	Expressão relativa dos genes <i>ASCORBATE PEROXIDASE 2 (APX2)</i> , <i>SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (SOD1)</i> e <i>GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)</i> na longevidade de sementes de trigo.....	82
4.4.3.3.	Expressão relativa de <i>METALLOTHIONEIN 2 (MT2)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	87
4.4.3.4.	Expressão relativa de <i>MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 2 (MST2)</i> na longevidade de sementes de trigo.....	89
4.4.4.	Expressão relativa de proteínas na longevidade de sementes de trigo .....	91
4.4.4.1.	Expressão relativa de <i>CHLOROPLASTIC LIPOCALIN (CHL)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	91
4.4.4.2.	Expressão relativa de <i>PROTEIN-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE 2 (PIMT2)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	95
4.4.4.3.	Expressão relativa de <i>TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN ALPHA (TIP3;1)</i> na longevidade de sementes de trigo.....	95
4.4.5.	Expressão relativa de <i>TRANSPARENT TESTA 4 (TT4)</i> na longevidade de sementes de trigo .....	98
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>101</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma gramínea de grande importância no cenário mundial, sendo um dos três principais cereais mais produzidos, ocupando o segundo lugar após milho. É uma das principais culturas alimentares, cultivado em uma gama de ambientes e regiões geográficas, possuindo uma grande relevância na dieta alimentar por sua quantidade e qualidade de proteínas e por sua variedade de produtos derivados (PIRES et al, 2011; BOREM e SCHEEREN, 2015). Está entre as espécies vegetais de maior importância para a alimentação humana, tornando-se como alimento básico de aproximadamente um terço da população mundial.

Segundo a USDA – *WORLD Agriculture Supply and Demand Estimates*, a produção mundial de grãos da safra 2016/17 está estimada em 751,07 milhões de toneladas, projeção de março de 2017, um aumento de mais de 2% comparado com a safra anterior. O maior produtor mundial de trigo é a China com uma produção de 128,85 milhões de toneladas, seguido dos EUA com 62, 86 milhões de toneladas e Austrália com 35 milhões de toneladas. No Brasil, conforme estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) de março de 2017, a produção do cereal diminuiu de 6,726 milhões de toneladas (safra 2016) para 5,649 milhões de toneladas, uma redução de 16%, onde os maiores produtores de trigo são os estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

A acidez do solo é um dos principais fatores capazes de reduzir o potencial produtivo dos solos tropicais, ocasionando redução na produtividade. Solos ácidos podem afetar as características das sementes, devido a redução na disponibilidade de nutrientes para a planta-mãe. Shewry et al. (2012) afirma que diversos fatores podem interferir na composição das sementes, tais como ano de cultivo, condições climáticas, variedade, adubações e local de cultivo.

Um dos benefícios proporcionado pela calagem em solos ácidos é a redução do pH, favorecendo uma maior disponibilidade de nutrientes para planta, sendo esses nutrientes essenciais para os processos de formação das sementes. De acordo com Teixeira et. al. (2005), a disponibilidade de nutrientes influencia na formação do embrião e dos cotilédones, resultando em efeitos positivos na qualidade fisiológica

das sementes. Atuam principalmente na constituição das membranas e no acúmulo de carboidratos, lipídeos e proteínas (SÁ, 1994).

Para a obtenção de grandes produções do cereal, se faz necessário a utilização de sementes de boa qualidade. De acordo com França Neto et al. (2010), as sementes de alta qualidade resultam em plântulas fortes, vigorosas, bem desenvolvidas e que se estabelecem nas diferentes condições edafoclimáticas, com maior velocidade de emergência e de desenvolvimento das plantas.

O componente fisiológico de qualidade compreende a longevidade da semente e a sua capacidade de gerar uma planta perfeita e vigorosa, avaliada pela germinação e vigor. Em tecnologia de sementes, a germinação é definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, originando uma plântula normal sob condições ambientais favoráveis (BRASIL, 2009). Já vigor de sementes é definido pela *International Seed Testing Association* (ISTA, 2014) como “o conjunto de propriedades que determinam a atividade e o desempenho de lotes de sementes com germinação aceitável, sob ampla variação de condições de ambiente”. Segundo Sano et. al. (2016), a longevidade de sementes é definida como a capacidade da semente de reter a germinação durante o armazenamento.

A longevidade de semente é conferida pela capacidade de estabilizar o sistema biológico por longos períodos de tempo, suspendendo a sua atividade metabólica e formando uma matriz amorfa altamente viscosa (isto é, um estado vítreo) que retarda severamente as reações de deterioração (BUITINK e LEPRINCE, 2004; CHATELAIN et al., 2012), sendo a última característica a ser adquirida durante o desenvolvimento da semente (BEWLEY et. al. 2013).

Vários são os mecanismos que interferem na longevidade das sementes. Em termos moleculares, diversas moléculas protetoras são sintetizadas para contribuir na sobrevivência das sementes no estado seco, tais como açúcares não redutores (HOEKSTRA et al., 2001), proteínas *Late Embryogenesis Abundant* (LEAs) (HUNDERTMARK et al., 2011; CHATELAIN et al., 2012), proteínas de choque térmico (HSPs) (PRIETO-DAPENA et al., 2006; ROSNOBLET et al., 2007), várias outras proteínas de estresse (SUGLIANI et al., 2009), e um conjunto de defesas antioxidantes contra o stress oxidativo tal como glutathiona (GSH) (KRANNER et al., 2006), tocoferóis (SATTTLER et al. al., 2004), e os flavonóides presentes na testa

(DEBEAUJON et al., 2000). Além disso, demonstrou-se que a longevidade das sementes está associada com sistemas de reparação de DNA e de proteínas, tais como DNA ligase (WATERWORTH et al., 2010) e proteína L-isoaspartil metiltransferase (OGÉ et al., 2008).

A planta ao ser submetido a estresse, biótico ou abiótico, começa um complexo processo de adaptação, mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo a expressão de genes que dão a planta o caráter de tolerância ao estresse (NEPOMUCENO et al., 2001). Fatores ambientais ou abióticos (luz, temperatura, umidade, solo) e bióticos (ataque de parasitas, espécies invasoras, etc), atuam sobre os organismos induzindo alterações na expressão dos genes da planta.

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de estudar a qualidade fisiológica e a expressão de genes associados com a longevidade em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário aplicados no solo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura do trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma gramínea cultivada em todo o mundo pelo seu grão altamente nutritivo, fazendo parte do seletivo grupo de *commodities* agrícolas que domina tanto a produção quanto o comércio mundial de grãos, sendo um dos três principais cereais mais produzidos no mundo, ocupa o segundo lugar após milho e seguido do arroz (PIRES et al, 2011).

Este cereal é uma das principais culturas alimentares, cultivado em uma gama de ambientes e regiões geográficas, possuindo uma grande relevância na dieta alimentar por sua quantidade e qualidade de proteínas e por sua variedade de produtos derivados. O cereal ocupa mais de 17% da terra cultivável do mundo, aproximadamente 30% da produção mundial de grãos, constituindo uma cultura importante na composição de sistemas de produção agrícola sustentáveis, como alternativa para sucessão e rotação em sistemas de produção, contribuindo para o manejo integrado de pragas, doenças e plantas daninhas. (BOREM e SCHEEREN, 2015).

O trigo possui um importante papel no aspecto econômico e nutricional da alimentação humana, pois a sua farinha é largamente utilizada na indústria alimentícia (FERREIRA, 2003), estando entre as espécies vegetais de maior importância para a alimentação humana. A composição única de suas proteínas de reserva, que permite a obtenção de vários produtos por meio do processo de panificação, faz do trigo um cereal mundialmente consumido (JOSHI et al., 2007).

A cultura do trigo, devido as características de composição do seu grão, é utilizado na fabricação de pães, biscoitos, bolos, barras de cereais, além de macarrões, massas para pizza, entre outras utilizações de seus derivados pela indústria. De acordo com Sleper e Poehlman (2006), devido suas características, o trigo têm se tornado como alimento básico de aproximadamente um terço da população mundial, dentre elas se destacam sua diversidade de utilização, suas características nutricionais e sua facilidade de armazenamento, fornecendo 500 kcal de energia per capita por dia em dois dos mais populosos países do mundo, a China e a Índia, e mais de 1400 kcal per capita por dia no Irã e na Turquia (DIXON, 2009).

Três espécies são destacadas pela representatividade de mais de 90% do trigo cultivado no mundo: *Triticum aestivum*, *Triticum compactum* e *Triticum durum*, sendo que o *T. aestivum* é o mais cultivado, possuindo seu grão cerca de 15% de proteína, 70% de carboidratos e 2% de lipídeos, respondendo por mais de quatro quintos da produção mundial, por ser adequado ao processo de panificação. O *T. compactum* tem menor teor de glúten e é utilizado para a fabricação de biscoitos e bolos mais macios e menos crocantes. Já o *T. durum* é indicado para massas e macarrão, pois essa espécie forma um glúten mais resistente (BRANDÃO e LIRA, 2011).

A produção mundial da safra 2016/17, segundo a USDA – WORLD *Agriculture Supply and Demand Estimates*, será de 751,07 milhões de toneladas, projetadas em março de 2017, um aumento de mais de 2% comparado com a safra anterior. Os estoques finais globais também foram revisados, e aumentaram de 240 milhões para 253,29 milhões de toneladas da safra anterior para a safra de 2016/2017.

No Brasil, conforme estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) de março de 2017, a área de produção da cultura do trigo se manteve constante na safra 2017 comparada com a safra 2016, apresentando 2.118,4 mil hectares. A produção do cereal diminuiu de 6.726,8 mil toneladas (safra 2016) para 5.649,3 mil toneladas, uma redução de 16%. A produtividade reduziu de 3.175 t.ha<sup>-1</sup> obtidas na safra de 2016 para 2.667 t.ha<sup>-1</sup>.

O crescimento da cultura do trigo é drasticamente reduzido pela presença de solos ácidos, favorecendo uma baixa produção vegetal. A acidez do solo é um dos principais fatores capazes de reduzir o potencial produtivo dos solos tropicais, limitando o desenvolvimento do sistema radicular das culturas e a absorção de água e nutrientes, o que ocasiona redução na produtividade.

Para resolução dessa problemática, o uso de corretivos tem sido bastante utilizado e estudado, sendo a prática da calagem a principal delas, onde, o calcário através da hidrólise, libera uma base capaz de neutralizar a atividade dos íons acidificantes. De acordo com a natureza química dos seus constituintes, os corretivos são classificados em carbonatos, hidróxidos ou silicatos de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (SOUSA et al., 2007), sendo que o calcário é o corretivo mais utilizado para esta finalidade.

A calagem fornece de Ca e Mg como nutrientes, eleva o pH do solo, promove também o aumento da CTC efetiva, reduzindo a lixiviação de bases, aumentando a

disponibilidade dos nutrientes e reduzindo atividade dos elementos tóxicos no solo (alumínio (Al) e manganês (Mn)), que são fatores que proporcionam condições favoráveis ao crescimento radicular das plantas (CAIRES et al., 2006); melhora a estrutura do solo, auxiliando na atividade microbiana (SOUTO et al., 2008) e na capacidade do solo em adsorver alguns nutrientes, reduzindo assim suas perdas por lixiviação. Isto facilita a absorção e a utilização dos nutrientes e da água, nutrientes estes que estão entre os fatores ambientais que mais influenciam no desenvolvimento das plantas, de maneira especial naquelas de interesse agrícola (FLOSS, 2008).

No sistema plantio direto, a correção da acidez do solo é feita por meio da aplicação de calcário na superfície sem incorporação. Segundo Caires (2013), a aplicação superficial de calcário, dependendo dos critérios empregados na recomendação de calagem, pode, ao longo dos anos, amenizar os efeitos nocivos da acidez em camadas mais profundas do solo. A acidez nas camadas subsuperficiais, apresentando níveis tóxicos de Al e/ou deficiência de Ca, pode comprometer a penetração de raízes e a nutrição das plantas, deixando as culturas suscetíveis ao estresse hídrico.

Os solos ácidos podem afetar as características de qualidade das sementes. Em relação a composição química das sementes, diversos fatores podem interferir, tais como ano de cultivo, condições climáticas, variedade, adubações, local de cultivo (SHEWRY et al., 2012). Segundo Sá (1994), o aspecto nutricional das plantas afeta o tamanho, massa e viabilidade das sementes produzidas, características estas relacionadas à qualidade e comercialização das sementes. Assim como a produtividade, a obtenção de sementes de qualidade está associada a fatores como condições ambientais e nível de nutrição da planta-mãe (ARTHUR e TONKIN 1991).

De acordo com Sá (1994), o papel dos nutrientes é de fundamental importância na formação das sementes, principalmente no que se refere à constituição de membranas e acúmulo de carboidratos, lipídeos e proteínas. As funções de ativação de enzimas, síntese de proteína, transferência de energia e regulação hormonal, são características fundamentais do aspecto de formação, desenvolvimento e maturação das sementes e, assim, tanto macro como micronutrientes apresentam importância similar nesses eventos.



Diversos trabalhos têm buscado observar o efeito da nutrição da planta-mãe (uso de adubos e corretivos do solo) no potencial fisiológico das sementes, dentre eles se destacam os de Veiga et. al., (2010) e Lima et. al., (2009) em sementes de soja; Souza et. al., (2010) e Leite et al., (2011) em sementes de arroz; Zucareli et al., (2011) em sementes feijão e Abrantes et al., (2010) em sementes de painço.

A utilização de sementes de alta qualidade é um dos aspectos que merecem atenção especial para se obter o melhor aproveitamento do potencial produtivo do trigo, quanto aos componentes genético e fisiológico.

## 2.2 Qualidade de sementes

O Brasil possui grandes extensões de terra com problemas de fertilidade relacionadas com a alta acidez e toxidez por alumínio, além de alta capacidade de fixação de fósforo, macronutriente essencial para as plantas, e em especial, para as sementes (LOPES e GUILHERME, 2007) e isso torna-se relevante para formação das sementes, onde a quantidade de nutrientes é para elas translocada. Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), a boa formação do embrião e do órgão de reserva, assim como sua composição, depende da disponibilidade de nutrientes para a planta que, conseqüentemente, irá influenciar no metabolismo e no vigor da semente.

A qualidade das sementes na produção agrícola é um dos principais fatores a ser considerado na implantação da cultura. Sementes de alta qualidade resultam em plântulas fortes, vigorosas, bem desenvolvidas e que se estabelecem nas diferentes condições edafoclimáticas, com maior velocidade de emergência e de desenvolvimento das plantas (FRANÇA-NETO, 2010). Sementes de alta qualidade são responsáveis por possibilitar maior uniformidade de emergência e vigor das plântulas e maior produtividade final, constituindo, portanto, fator básico para o sucesso de uma horta ou lavoura comercial. (FREITAS et al., 2008).

Em geral, considera-se semente de alta qualidade aquela que germina rapidamente, originando uma plântula normal e sadia, livre de contaminações, com todas as estruturas essenciais desenvolvidas, ou seja, sistema radicular e parte aérea. Assim a qualidade fisiológica da semente, representada pela germinação e vigor, é motivo de preocupação, recebendo maior atenção do agricultor, por estar diretamente relacionada ao estabelecimento das plântulas no campo e à obtenção de um estande

uniforme, com reflexos diretos no desenvolvimento inicial da lavoura (NASCIMENTO et. al., 2011).

A semente possui atributos de qualidades genética, física, fisiológica e sanitária, o que lhe confere a garantia de um elevado desempenho agrônômico. Para a semente ser considerada de alta qualidade, deve ter características fisiológicas e sanitárias, tais como altas taxas de vigor, de germinação e de sanidade, bem como garantia de purezas física e varietal. Abreu (2005) descreve os componentes da semente de alta qualidade, onde o componente genético compreende às características próprias da cultivar como, por exemplo, potencial produtivo, resistência às pragas e doenças, entre outras. O componente físico refere-se à pureza do lote e a condição física da semente (teor de umidade, tamanho, cor, formato e densidade da semente). O componente fisiológico compreende à longevidade da semente e a sua capacidade de gerar uma planta perfeita e vigorosa, avaliadas pelo teste de germinação e vigor. O componente sanitário refere-se à qualidade sanitária, determinada pelo grau de ocorrência de microrganismos e insetos que causam doenças ou danos à semente no armazenamento, ou que são transmitidos pela semente, e que são capazes de causar doenças e reduções na produtividade das culturas no campo.

A qualidade fisiológica das sementes é obtida durante o processo de maturação. De acordo com Delouche (1971), esse processo de maturação da semente de uma planta compreende uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais que ocorrem a partir da fertilização do óvulo, prosseguindo até o momento em que as sementes estão em condições para a colheita. Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), durante o processo de formação e maturação das sementes, são verificadas alterações na massa da matéria seca, grau de umidade, tamanho, germinação e vigor, sendo a maior qualidade fisiológica observada no estágio denominado maturidade fisiológica.

Sendo um processo controlado geneticamente, a maturação das sementes engloba um conjunto de etapas sucessivas de preparação para o sucesso da germinação. Tal processo é caracterizado pela síntese e acúmulo de reservas, as quais são posteriormente mobilizadas durante a germinação, sendo responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e energia necessários para a manifestação das funções vitais das sementes. (GUTIERREZ et al., 2007; MARCOS FILHO, 2005).

Estudos realizados com maturação de sementes de diversas espécies indicam o ponto de máximo conteúdo de matéria seca como o melhor e mais seguro indicativo

de que as sementes atingiram a maturidade fisiológica. De acordo com Demir e Ellis (1992), a maturidade fisiológica fica caracterizada como aquele ponto após o qual a semente não recebe mais nutrientes da planta-mãe, cessando a conexão planta-semente. Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), neste ponto, geralmente, a qualidade fisiológica (germinação e vigor) da semente é máxima e a deterioração é mínima.

A qualidade fisiológica das sementes é representada pela germinação e pelo vigor. Em tecnologia de sementes, a germinação é definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, originando uma plântula normal sob condições ambientais favoráveis (BRASIL, 2009). Já vigor de sementes é definido pela *International Seed Testing Association* (ISTA, 2014) como “o conjunto de propriedades que determinam a atividade e o desempenho de lotes de sementes com germinação aceitável, sob ampla variação de condições de ambiente”.

Demir (2008) elucida que uma das formas de avaliar a qualidade fisiológica das sementes é pelo teste de germinação, porém, esse teste fornece condições ideais ao processo, possibilitando ao lote expressar seu potencial máximo de formação de plântulas normais, onde difere muitas vezes dos resultados obtidos em campo. Em virtude disso, os testes de vigor tornam-se importantes, pois complementam as informações obtidas no teste de germinação, com resultados confiáveis em período de tempo relativamente curto (MARCOS FILHO, 2005; CASAROLI et al., 2009).

Sendo assim, a avaliação do vigor no controle da qualidade da semente, torna-se fundamental e necessária para estimar o potencial fisiológico dos lotes de sementes, estudando as informações em conjunto com os resultados obtidos no teste de germinação, visto que a utilização de sementes de alta qualidade constitui-se na base para a obtenção de estandes uniformes, plantas bem desenvolvidas e alta produtividade (MARCOS FILHO, 2005; MENDES et al., 2010).

A sensibilidade das sementes ao processo deteriorativo, em determinado ambiente, pode ser atribuída, em parte, à constituição genética. Sementes de algumas espécies são geneticamente e quimicamente formadas de modo a apresentar um período de armazenabilidade maior do que de outras espécies, mesmo quando armazenadas sob as mesmas condições. Assim, as diferentes espécies apresentam diferenças quanto à longevidade de suas sementes (NASCIMENTO, 2009). Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), a longevidade corresponde a habilidade das sementes de se manterem viáveis durante o armazenamento. De acordo com Oliveira (2012), a

qualidade fisiológica das sementes compreende todas as características de viabilidade, vigor, longevidade e outras, que mostram a capacidade de realizar funções vitais.

### 2.3 Longevidade de sementes

Durante a maturação, as sementes adquirem uma série de características fisiológicas que são cruciais para o estabelecimento bem-sucedido de plântulas no campo, como germinação, vigor e longevidade. Estas características dependem da notável capacidade das sementes de sofrer dessecação completa sem perda de viabilidade (tolerância à dessecação [DT]) e permanecerem vivas por longos períodos de tempo quando armazenadas no estado seco (longevidade) (BUITINK e LEPRINCE, 2010). Enquanto o DT é adquirido durante o enchimento da semente (VERDIER et al., 2013), a longevidade aumenta progressivamente durante a fase final da maturação das sementes (PROBERT et. al., 2009; CHATELAIN et. al., 2012).

Sementes de várias espécies de plantas são extremamente tolerante a condições ambientais severas, desde que estejam num estado de dessecação. De acordo com Landjeva et al., (2010) a semente em “estado seco” reduz a atividade metabólica para um nível muito baixo, mantendo a sua capacidade de germinar durante períodos consideráveis. Esta capacidade de retenção da germinação após determinado período de armazenamento, que as sementes apresentam, é um componente da “longevidade de sementes”, que pode ser definido com o período em que a semente consegue permanecer viável (SANO et al., 2016).

Durante a aquisição de tolerância à dessecação, o citoplasma das células da semente passa de fluido para o estado vítreo. Neste estado os componentes celulares estão estabilizados e sua mobilidade é reduzida. Segundo Abreu et al. (2014), a longevidade está associada diretamente a tolerância à dessecação das sementes, com exceção de sementes recalcitrantes, as quais são sensíveis à dessecação e não podem ser armazenadas por longos períodos. A formação deste estado é favorecida pela substituição de água por oligossacarídeos, isto é, sacarose e rafinoses, no citoplasma celular. Estes açúcares também servem de energia durante a germinação, quando quebrados durante a embebição (SANO et al., 2016).

Verdier et al. (2013) relatam em seu estudo com sementes de *Medicago truncatula* que durante a maturação fisiológica, a semente adquire a tolerância a dessecação, e conseguinte a longevidade. Sobre sua aquisição nas sementes, Probert et al. (2007) relatam que existem três padrões para aquisição da longevidade: i) aquisição da longevidade durante a maturação, que se mantém após dispersão (tomate, pimenta); ii) aquisição da longevidade durante a maturação, com posterior queda após a abscisão (*Medicago*, mostarda); e iii) aquisição da longevidade durante a maturação e após abscisão (espécies selvagens – *Digitalis*).

Sendo assim, a longevidade é conferida pela capacidade de estabilizar o sistema biológico por longos períodos de tempo, suspendendo a sua atividade metabólica e formando uma matriz amorfa altamente viscosa (isto é, um estado vítreo) que retarda severamente as reações de deterioração (BUIKINK e LEPRINCE, 2004; CHATELAIN et al., 2012), sendo a última característica a ser adquirida durante o desenvolvimento da semente (BEWLEY et al., 2013).

No estado vítreo estes oligossacarídeos são eficazes contra danos a membrana devido a desidratação, impedindo a fusão das vesículas adjacentes durante a secagem e mantendo lipídios em uma fase fluída durante a dessecação. Os açúcares também ajudam a proteger a estrutura e funcionamento de proteínas lábeis (IMAMURA et al., 2003). O estado vítreo impede eventos prejudiciais, como reação de Maillard, onde as rafinoses têm sido associadas a proteção de danos oxidativos, possivelmente por eliminação de radicais hidroxilas (NISHIZAWA et al., 2008). No citoplasma em estado vítreo também se encontra abundância de proteínas LEA, que são extremamente hidrofílicas, que estão associadas a tolerância a dessecação e stress.

Em termos moleculares, foram descobertos vários mecanismos que influenciam a sobrevivência no estado seco. Incluem a síntese de moléculas protetoras, tais como açúcares não redutores (HOEKSTRA et al., 2001), proteínas *Late Embryogenesis Abundant* (LEAs) (HUNDERTMARK et al., 2011; CHATELAIN et al., 2012), proteínas de choque térmico (HSPs) (PRIETO-DAPENA et al., 2006; ROSNOBLET et al., 2007), várias outras proteínas de estresse (SUGLIANI et al., 2009), e um conjunto de defesas antioxidantes contra o stress oxidativo tal como glutatona (GSH) (KRANNER et al., 2006), tocoferóis (SATTLER et al. al., 2004), e os flavonóides presentes na testa (DEBEAUJON et al., 2000). Além disso, demonstrou-se que a longevidade das

sementes está associada com sistemas de reparação de DNA e de proteínas, tais como DNA ligase (WATERWORTH et al., 2010) e proteína L-isoaspartil metiltransferase (OGÉ et al., 2008).

Outro aspecto envolvido com a longevidade de sementes é o ácido abscísico (ABA). Na fase de maturação do desenvolvimento de sementes, um aumento progressivo nos níveis de ABA prepara as sementes para resistir à dessecação e ao envelhecimento. Os níveis de giberelinas (GAs) são reduzidos durante os últimos estágios de maturação, mas um aumento na GA se torna necessário para quebrar a dormência induzida pela ABA no momento da germinação (HOLDSWORTH et al., 1999; BRAYBROOK e HARADA, 2008). Segundo Ooms et. al., (1993), tanto a longevidade, como a intensidade de dormência são determinadas durante o desenvolvimento da semente na planta mãe, e os estudos genéticos indicam que o ABA está envolvido no controle de ambos os traços. Mutantes de *Arabidopsis* que tem insensibilidade ao ABA - aba insensitive3 (*abi3*) - apresentaram redução da dormência, intolerância a dessecação e perda rápida da viabilidade durante armazenamento a seco, pois estes se mostraram mais sensíveis ao envelhecimento que plantas do tipo selvagem (CLERKX et al., 2004).

No armazenamento, as sementes sofrem alterações progressivas em seus constituintes celulares (proteínas, lipídios, ácidos nucléicos, açúcares, etc.), em função do processo de oxidação, tais como a reação de Maillard e Amadori (MURTHY e SUN, 2000), peroxidação lipídica (WILDON e MCDONALD, 1986) ou carbonilação de proteínas (ARC et al., 2011). No início do armazenamento ocorre a liberação da dormência e um aumento na germinação das sementes; depois com o prolongamento do armazenamento em condições não ideais, há acúmulo do dano celular oxidativo, induzindo a perda do vigor das sementes, levando a incapacidade de germinação (SANO et al., 2016).

Além de seu estado metabolicamente quiescente, as sementes secas podem suportar várias reações oxidativas não enzimáticas, levando ao acúmulo progressivo de danos associados as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) durante o armazenamento. Isso resulta em uma fraqueza que pode ser fatal para o embrião durante a embebição. Se a semente encontrar condições adequadas para a germinação durante a sua vida, pode, se ainda viável, cumprir a sua finalidade e liberar a plântula jovem. Mas como consequência do processo de

envelhecimento, o vigor das sementes pode ser severamente afetado. Em outras palavras, a capacidade de um lote de sementes para germinar rapidamente, uniformemente sob ampla gama de condições ambientais pode ser prejudicada ou destruída. Como o processo de germinação de sementes depende principalmente de mRNA e proteínas armazenados (RAJJOU et. al., 2004), os danos no nível de DNA podem resultar em um desenvolvimento de plântulas anormais.

A oxidação leva ao acúmulo de ROS durante o armazenamento, que são altamente reativas e podem modificar e inativar proteínas, lipídios, DNA e RNA, além de induzir disfunções celulares (MOLLER et al., 2007). O estudo de danos mediados por ROS e reparação nas sementes é complexo, especialmente quando estão em estado desidratado. A adição de água para as sementes secas poderia iniciar processos de germinação, o que posteriormente ativa o mecanismo de defesa antioxidante (CLERKX et. al., 2004).

À medida que os ROS aumentam com a secagem, os mecanismos de eliminação de radicais livres são provavelmente ativados. Em tecidos vegetativos, os genes que codificam antioxidantes enzimáticos tais como ascorbato peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase são regulados durante a secagem ou reidratação. Deve compreender-se que os sistemas antioxidantes enzimáticos podem ser ativos apenas sob condições de água suficiente e que, no estado seco, apenas antioxidantes moleculares (glutathione, ascorbato, polióis, hidratos de carbono, proteínas como peroxirredoxina e moléculas anfífilas tais como tocoferol, quinonas, flavonóides e fenólicos) podem aliviar os estádios oxidativo (HOEKSTRA et al., 2001).

Portanto, a promoção da longevidade requer sistemas antioxidantes. É importante distinguir o mecanismo passivo, que inclui sistemas de eliminação não enzimático de ROS, do mecanismo ativo enzimático de desintoxicação da ROS. Com finalidade de remoção do excesso de ROS, a semente usa um conjunto de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalases, glutathione e ascorbato peroxidase, monodehydroascorbate e glutathione reductase) (BAILLY, 2004; KUMAR et al., 2015) que se acumula durante o armazenamento das sementes e controla a superprodução de radicais livres gerados pelo reinício do metabolismo mediante embebição.

A capacidade de desintoxicação de sementes é alterada quando estas enzimas sofrem danos durante o armazenamento, levando a redução do vigor da semente. Em

condições em que tais danos não atingem um nível crítico, o potencial de desintoxicação da semente pode ser restaurado por tratamento de *priming* (GOEL et al., 2003). Por outro lado, quando estes danos se acumulam, sementes perdem sua capacidade de controlar ROS e não suportam a reinicialização do metabolismo durante a germinação.

Segundo Bertram e Hass (2008), a oxidação é o principal problema na manutenção da longevidade em sementes secas. Durante o armazenamento a semente se dispõe de diversos mecanismos para impedir o avanço dos danos, porém com o tempo este se acumula no DNA, RNA e proteínas. A acumulação de danos macromolecular, incluindo danos no DNA e genômica, é considerada como uma força motriz para o processo de envelhecimento.

Entre os numerosos fatores ambientais conhecidos por afetar a longevidade das sementes, a temperatura e o teor de água parecem ser os mais importantes tanto em condições de armazenamento controlado como no solo (ELLIS e HONG (2006); LONG et. al., 2009). De fato, a longevidade de um lote de sementes pode ser estimada com bastante precisão, desde que a temperatura e o teor de água da semente sejam conhecidos. De acordo com Harrington (1972), tem sido sugerido que cada diminuição de 1% no teor de água de sementes ou uma redução de temperatura de 5-6 ° C duplica a vida útil da semente. A taxa da maioria das reações bioquímicas, incluindo o processo de respiração, está fortemente correlacionada a estes dois parâmetros. Quanto menor a temperatura da semente e o teor de água, mais lento será o metabolismo. De acordo com Leopold et al. (1994), a mobilidade molecular é cada vez mais considerada um fator chave que influencia a estabilidade na armazenagem, uma vez que se pensa que controla a taxa de reações de envelhecimento prejudicial responsáveis pela redução da vida útil.

No campo, inúmeras restrições, como o pH do solo, salinidade, disponibilidade de oxigênio, luz, presença de compostos tóxicos e microrganismos podem promover o envelhecimento das sementes. Em plantas, tem sido descrito que processos de desenvolvimento e / ou tensões ambientais podem induzir a produção de ROS endógena, embora os mecanismos envolvidos na sua geração em sementes ortodoxas permaneçam indescritíveis (BEWLEY e BLACK, 1994).

E. H. Roberts foi um dos pioneiros na análise quantitativa da perda de viabilidade durante o armazenamento. Ele observou que a perda da viabilidade geralmente segue



um padrão sigmóide e reconheceu que isso poderia estar relacionado a uma distribuição normal de vida entre as sementes de uma população. Com o envelhecimento as sementes em algum momento perdem a capacidade de formar plântulas normais (BEWLEY et al., 2013).

## 2.4 Expressão gênica

A expressão de genes em plantas está sujeita a influência de diferentes tipos de estímulos ambientais (KUHLEMEIER et al., 1987) e genéticos (GEMAYELL et al., 2010; LISCH, 2013); tais estímulos promovem a ativação ou inativação de alguns genes específicos. Fatores ambientais ou abióticos (luz, temperatura, umidade, solo, etc) e bióticos (ataque de parasitas, espécies invasoras, etc), atuam sobre os organismos induzindo alterações na expressão dos genes da planta.

De acordo com Nepomuceno et al. (2001), a planta ao ser submetida a estresse, biótico ou abiótico, começa um complexo processo de adaptação, mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo a expressão de genes que dão a planta o caráter de tolerância ao estresse. A identificação e a compreensão de como esses eventos são ativados/desativados e como interagem entre si é essencial no desenvolvimento de variedades mais tolerantes. Portanto, genótipos que diferem em tolerância devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica.

Estímulos bióticos ou abióticos provocam nas plantas a expressão de genes para defesa ou para suportar o tipo de estresse que está sofrendo (MARUYAMA et al., 2012). Segundo Taiz e Zeiger (2010), essas alterações na expressão são respostas aos estímulos que elas estão recebendo. A planta ao perceber a ação desses fatores induz uma transdução de sinal, através de mensageiros que levam essas informações ao núcleo da célula que ativa seus mecanismos de resposta promovendo alterações nas suas vias bioquímicas e metabólicas para responder a essas mudanças.

Mudanças climáticas, altas concentrações de minerais ou metais pesados, seca, maior ou menor incidência de luz ultravioleta, ataque de pragas, são alguns dos fatores que influenciam na atividade regulatória dos promotores (MARUYAMA et al., 2012; CALLIS et al., 2014; XU et al., 2011; DUBEY et al., 2013; WEI et al., 2013),

sendo assim, a resposta da planta é ativar genes que vão desencadear a expressão de moléculas (peptídeos e/ou proteínas) de defesa ou mecanismos de reparo.

Por isso, a regulação da expressão gênica se torna um processo fundamental para relacionar a informação presente no genoma com a resposta de organismos às condições ambientais. De acordo com Wang et al (2009), o estudo dos diferentes conjuntos de transcritos contidos na célula auxilia na correlação entre os padrões de resposta dos organismos com suas bases genômicas.

Uma poderosa ferramenta para quantificação da expressão gênica é a técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). De acordo com Bustin et al., 2009, a técnica de PCR tornou-se como referência para a quantificação de ácidos nucleicos, devido sua simplicidade conceitual e prática, em conjunto com a combinação de velocidade, sensibilidade, e especificidade em um mesmo ensaio.

A PCR permite à amplificação de segmentos definidos da molécula de DNA (ZAHA et. al., 2014). Essa técnica foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e literalmente revolucionou a genética molecular. Ela possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências, dispensando muitas vezes as trabalhosas etapas da clonagem gênica. Essa técnica explora a capacidade de replicação do DNA (FARAH, 2007).

Um avanço importante na técnica de PCR foi o desenvolvimento de metodologias que possibilitaram o acompanhamento da amplificação do DNA em todo o processo e não somente em seu final (PCR convencional). A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) é um método de detecção e quantificação confiável dos produtos gerados durante cada ciclo de amplificação, os quais são proporcionais à quantidade de molde disponível no início do processo do PCR (ZAHA et. al., 2014)

As aplicações do PCR estendem-se desde a genotipagem e a quantificação da expressão gênica até à toxicologia forense e à biossegurança. Em estudos com plantas, essa técnica pode ser utilizada também para a quantificação do nível de transcritos em órgãos vegetais (HERNANDEZ et. al., 2001; SONG et. al., 2011; WANG et. al., 2012), além da detecção de organismos geneticamente modificados (BAKO et al., 2011), estudar famílias de genes (BARROS et.al., 2012), determinar o número de inserções de T-DNA em plantas transgênicas (YANG et.al., 2005) e muitas outras

aplicações. Esta amplitude de aplicações é demonstrada pelo crescimento quase exponencial das publicações científicas baseadas nesta técnica desde a sua criação em 1993 (MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Desde a descrição da técnica de PCR, inúmeras modificações foram desenvolvidas para atender outras necessidades e aplicações específicas. Uma possibilidade comumente usada é iniciar a PCR tendo como fita-molde a molécula de RNA, em vez de DNA. Essa variação no método transporta a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR para detecção, amplificação e quantificação de RNA. Uma vez que o primeiro passo é a cópia do mRNA em cDNA pela enzima transcriptase reversa, o método tem sido designado como RT-PCR (FARAH, 2007), sendo utilizada principalmente na mensuração da expressão de genes, validação de experimentos de microarranjos e monitoramento de biomarcadores (VANGUILDER et al., 2008) e tem sido empregado com sucesso na análise da expressão de vários genes relacionados aos diferentes processos fisiológicos de sementes de plantas modelos, tal como *Arabidopsis* (BARRERO et. al., 2010, DAVE et. al., 2011; HUDERTMARK et. al., 2011).

A análise dos resultados dos estudos com PCR em tempo real pode ser realizada através da quantificação absoluta ou da quantificação relativa. De acordo com Sudgen e Winter (2008), a quantificação absoluta determina o número exato de cópias do transcrito de interesse, geralmente relacionando o sinal da PCR a uma curva padrão e a quantificação relativa descreve a alteração na expressão do gene alvo relativa a algum grupo referência como um controle não-tratado ou uma amostra tempo zero.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

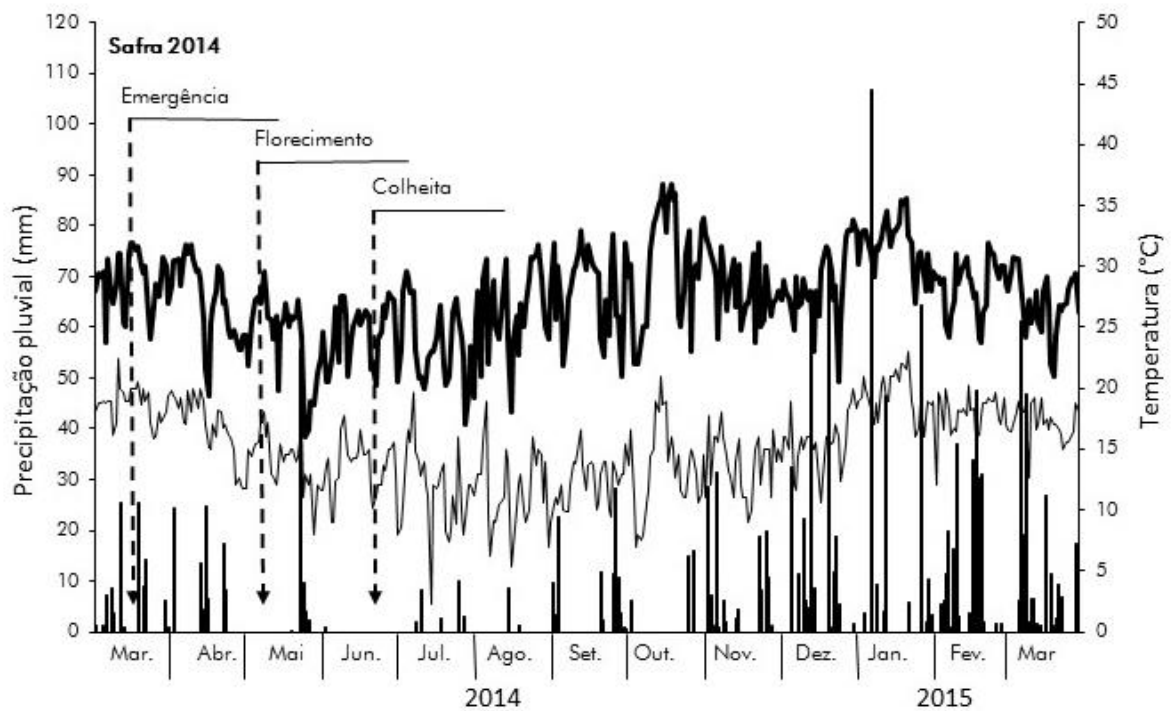
#### 3.1 Caracterização da área

As sementes de trigo (*Triticum aestivum*) da cultivar CD116 foram produzidas na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, localizada no município de Botucatu (SP), na safra 2014, no espaçamento 0,17 m, com distribuição de 20 sementes viáveis por metro linear em sistema de produção de plantio direto. A área onde o trigo foi cultivado tem um histórico de ausência de calagem desde o ano de 2002.

Foram cultivadas as seguintes culturas de safra e entressafra nos anos agrícolas 2002/03, 2003/04, 2004/05, 2005/06, 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/2010, 2010/2011, 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014: arroz/aveia preta, feijão/aveia preta, amendoim/aveia branca, amendoim/aveia branca, milho/braquiária, milho/braquiária, soja/aveia preta, soja/sorgo granífero, milho/crambe - feijão-caupi, milho/crambe - feijão-caupi, milheto - trigo, e feijão - trigo, respectivamente.

De acordo com a classificação de Köeppen, o clima predominante na região é do tipo Cwa, que se caracteriza pelo clima tropical de altitude, com inverno seco e verão quente e chuvoso (LOMBARDI NETO e DRUGOWICH, 1994). Os dados diários referentes à precipitação pluvial e às temperaturas máxima e mínima durante a condução do experimento foram coletados na Estação Meteorológica da Fazenda Experimental Lageado, pertencente ao Departamento de Recursos Naturais – Setor de Climatologia (Figura 1).

Figura 1 - Dados diários de precipitação pluvial e temperaturas máximas e mínimas de março de 2014 a março de 2015



Fonte: próprio autor.

Em agosto de 2002, o solo da área experimental tinha as seguintes características químicas e granulométricas, conforme informações contidas nas tabelas 1 e 2 (SORATTO e CRUSCIOL, 2008c), respectivamente.

Tabela 1 - Características químicas do solo da área antes da instalação do experimento em 2002\*

Prof.	pH (CaCl <sub>2</sub> )	M.O.	P (resina)	H+Al	Al	K	Ca	Mg	CTC	V
(m)		(g dm <sup>-3</sup> )	(mg dm <sup>-3</sup> )	----- (mmolc dm <sup>-3</sup> )-----						(%)
0-0,20	4,2	21	9,2	37	2	1,2	14	5	58	37

Fonte: SORATTO e CRUSCIOL, 2008c

Tabela 2 - Características granulométricas do solo da área antes da instalação do experimento em 2002\*

Profundidade	Areia	Argila	Silte	Textura do solo
(m)	----- (g kg <sup>-1</sup> ) -----			
0-0,20	545	347	108	Médio
0,20-0,40	513	360	127	Argiloso

\*Conforme metodologia proposta por Embrapa (1997). Fonte: SORATTO e CRUSCIOL, 2008c

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no esquema de parcelas com quatro repetições. As parcelas foram constituídas por três doses de calcário

dolomítico (0, 2.000 e 4.000 kg.ha<sup>-1</sup>). As doses de calcário foram definidas de acordo com a análise química do solo na profundidade 0-0,2 m, tanto na implantação do experimento (2002) quanto em cada reaplicação (2004 e 2010) para elevar a saturação por bases a 70% (2.000 kg.ha<sup>-1</sup>).

Antes da implantação do experimento em 2014 (implantação da cultura do trigo) foi realizado análise de solo em outubro de 2013, antes da semeadura do feijão, para conhecer as características químicas (Tabela 3).

Tabela 3 - Características químicas do solo da área antes da instalação do experimento em 2013\*

Doses	pH (CaCl <sub>2</sub> )	M.O.	P (resina)	H+Al	Al	K	Ca	Mg	CTC	V
kg.ha <sup>-1</sup>		(g dm <sup>-3</sup> )	(mg dm <sup>-3</sup> )	----- (mmolc dm <sup>-3</sup> ) -----						%
0	4,0	27	47,4	94	10	3,0	4	3	104	9
2000	5,5	30	53,1	47	0	3,2	33	22	106	55
4000	6,3	30	61,7	26	0	3,2	47	31	108	75

\*Conforme metodologia proposta por Rajj et al. (2001). Fonte: próprio autor.

### 3.2 Caracterização das sementes

As sementes de trigo foram colhidas mecanicamente e separadas de acordo com suas parcelas (repetição do campo), onde foram levadas para o armazenamento em câmara fria com temperatura e umidade relativa de 12°C e 50%, respectivamente. Os tratamentos consistiram em sementes produzidas sem calagem, dose recomendada de calcário (2000 kg.ha<sup>-1</sup>) e o dobro da dose recomendada (4000 kg.ha<sup>-1</sup>).

As sementes foram caracterizadas quanto seu teor de água, porcentagem de germinação, vigor (porcentagem de protrusão radicular, índice de velocidade de germinação e T50).

#### 3.2.1. Teor de água

Para determinação do teor de água das sementes, foi empregado método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas com duas sub-amostras, de acordo com Brasil (2009), com os resultados expressos em percentuais em base úmida.

### 3.2.2. Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com oito sub-amostras de 50 sementes, dispostas em substrato de papel toalha do tipo germitest, umedecido com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos confeccionados permaneceram acondicionados dentro de sacos plásticos (espessura de 0,033mm) fechados, mantidos em um germinador regulado à temperatura de 20°C. As leituras foram efetuadas aos quatro e oito dias após a semeadura, computando-se as porcentagens de plântulas normais, anormais e de sementes mortas (BRASIL, 2009).

### 3.2.3. Índice de velocidade de germinação

Foi determinado mediante contagem diária de sementes germinadas (protrusão radicular) durante oito dias, de acordo com a fórmula adaptada de Maguire (1962); onde:

$IVG = (G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn)$ , onde:

IVG = índice de velocidade de germinação

G1, G2 e Gn = número de sementes germinadas determinado na primeira, na segunda, ...e na última contagem.

N1, N2 e Nn = número de dias da “semeadura” à primeira, à segunda, ...e à última contagem.

### 3.2.4. T50

O tempo necessário para a germinação de 50% de sementes viáveis foi analisado por contagem diária de protrusão radicular. O cálculo foi realizado através da análise de dados de germinação (protrusão radicular) cumulativa utilizando o módulo de ajuste de curva do pacote de software Germinator (JOOSSEN et al., 2010).

### 3.3 Estudo da longevidade

A longevidade das sementes de trigo foi determinada pelo P50 (período em dias, em que a viabilidade das sementes se reduz pela metade).

As sementes foram distribuídas em uma única camada sobre tela metálica acoplada à caixa plástica (11 x 1,0 x 3,5 cm) sob uma atmosfera de 75% de umidade relativa (UR) a 35 °C obtidos por meio de solução saturada (40 ml de água destilada em 18 g de sal) de cloreto de sódio (NaCl). As sementes foram amostradas a cada 15 dias até o 90º dia e avaliadas quanto ao seu potencial germinativo (protrusão radicular). Estas contagens sucessivas foram realizadas a fim de se obter curvas de germinação ao longo do teste de longevidade.

Dos resultados obtidos foi elaborada a curva de distribuição da longevidade dos tratamentos ao longo do período do teste, sendo os valores transformados em probit para determinação do momento em que a germinação reduz pela metade – P50, calculados conforme Ellis e Roberts (1980), onde pode ser calculado com base na equação matemática:  $v = Ki - p/\sigma$  (BEWLEY et al., 2013).

### 3.4 Análise nutricional de semente

As análises de macro e micronutrientes foram realizadas de acordo com Malavolta et al. (1997) em sementes produzidas nas diferentes condições de calagem em dois tempos do teste de longevidade (0 e 60 dias). As regiões embrionárias de cada tratamento foram maceradas e a digestão foi realizada pelo método de ácido sulfúrico com sais e catalisadores para avaliação do nitrogênio (N), utilizando 0,100g de amostra e pelo método de nítrico-perclórico (0,250g de regiões embrionárias) para fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e Zinco (Zn).

### 3.5 Estudo molecular da longevidade em sementes de trigo



Para o estudo de genes relacionados a longevidade, foram selecionados dois tempos do envelhecimento controlado (0 e 60 dias) para averiguar o efeito das doses de calagem (sem calagem, 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup> de calcário).

As sementes de trigo foram embebidas por 30 horas para iniciar o processo germinativo e facilitar a secção das sementes, cortadas na região do embrião, sendo coletadas 8 repetições de 35 sementes de cada tratamento (tempo e dose). Após a coleta, as amostras biológicas foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 ml, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em deep freezer à temperatura de -80 °C.

### 3.5.1 Extração de RNA

Foi realizada de acordo com o protocolo de extração de Wang et. al. (2012), método este modificado de dodecil sulfato de sódio (SDS) / TRIzol, onde o tampão de extração é constituído Tris-HCl 100 mM (pH 9,0), 2% de β- Mercaptoetanol (v / v) preparado com autoclave água de MilliQ tratada com DEPC (pirocarbonato de dietilo).

Foram usadas três amostras biológicas de cada tratamento (Tempo 0 e 60 dias: sem calagem (0 Kg.ha<sup>-1</sup>), dose recomendada (2000 Kg.ha<sup>-1</sup>) e o dobro da dose recomendada (4000 Kg.ha<sup>-1</sup>)). No total foram 18 amostras de RNA extraídas.

Conforme descrito no protocolo, as sementes seccionadas foram maceradas com o auxílio de um conjunto de almofariz e pistilo. Uma pequena concentração de macerado foi transferida para o tubo de plástico livre de ribonuclease (RNAse) de 1,5 ml (quantidade suficiente para preencher o fundo do tubo), onde foi adicionado um volume de 0,4 mL de tampão de extração de RNA ao pó. A amostra foi cuidadosamente misturada utilizando um agitador vortex e incubada a temperatura ambiente durante 15 min.

Após esse período, foi adicionado um volume de 20 µL de SDS a 20% ((w/v), com 0.1% DEPC, autoclavado) à suspensão, invertido suavemente por cinco a oito vezes e incubado na temperatura ambiente por 5 min, logo após a mistura foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C. A solução aquosa (400 µL) foi transferida cuidadosamente para um novo tubo, adicionando um volume de 800 µL de trizol, homogeneizando a mistura com ajuda do vortex, onde fica incubado em temperatura

ambiente por 10 minutos. Adiciona 240  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, misturando com vórtex, levando para centrifugar à 12000 g por 10 minutos a 4°C.

A fase aquosa (700  $\mu\text{L}$ ) foi transferida cuidadosamente para o novo tubo com uma pipeta (evitando a interface), adicionando um volume igual de isopropanol, homogeneizando por inversão várias vezes, sendo armazenado a -20°C por 20 minutos. Logo após a amostra foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi resuspendido suavemente com 400  $\mu\text{L}$  com água tratada com DEPC; um volume igual de citrato tampão saturado fenol (pH 4,3) e clorofórmio foi adicionado e homogeneizado cuidadosamente. As amostras foram para a centrífuga à 12000 g por 10 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, a fase aquosa (400  $\mu\text{L}$ ) das amostras foi transferido cuidadosamente para um novo tubo com uma pipeta, evitando a interface, e um volume igual de clorofórmio foi adicionado, onde são homogeneizadas com a ajuda de vórtex. As amostras foram centrifugadas à 12000 g por 10 minutos a 4°C. Um volume de 350  $\mu\text{L}$  da fase aquosa é transferida para o novo tubo, adicionando 1/10 de volume (3,5  $\mu\text{L}$ ) de 3 M de acetato de sódio (pH 4,8) e 700  $\mu\text{L}$  de etanol gelado, sendo misturado invertendo várias vezes e colocado a -80°C por 30 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido utilizando uma pipeta e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% congelado; mais uma vez as amostras foram centrifugadas à 12000 g por um período menor (5 minutos) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi deixado secando a temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC para dissolver o “pellet”, onde foi armazenado a -80°C para futuro uso.

### 3.5.2 Determinação de quantidade e qualidade do RNA extraído

Após a extração de RNA, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng/ $\mu\text{L}$ . A pureza do RNA foi estimada a partir da relação absorbância A<sub>260/280</sub> nm que é uma estimativa de contaminação, principalmente por proteínas e fenóis. A verificação da qualidade das amostras foi realizada por meio da avaliação de gel de agarose a 1,0% (0,5 g de agarose e 50  $\mu\text{L}$  de TAE 1X) corado com gel *red*. Soluções contendo 7  $\mu\text{L}$  de RNA extraído e 5  $\mu\text{L}$  azul de bromofenol foram submetidas à corrida de eletroforese, a 90 volts durante 30 minutos.

Como marcador foi utilizado o 1kbp DNA Lader (Jena Bioscience) no volume de 1  $\mu$ L. Para visualização das bandas no gel foi utilizado um fotodocumentador (Mini Bis 24 mm da DNR Bio-Imaging Systems).

A verificação da qualidade das amostras por meio do gel de agarose detectou a presença de DNA, por esse motivo, todas as amostras foram submetidas ao tratamento de DNase, acrescentando 1  $\mu$ L da enzima na mistura água+RNA, incubando a solução a 37°C por 20 min, antes da confecção do cDNA.

### 3.5.3 Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o “kit” High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A síntese do cDNA foi elaborada para uma reação de 20  $\mu$ L, utilizando para 2000 ng, conforme descrito no protocolo, onde o volume exato de RNA foi dependente da quantificação fornecida no espectrofotômetro (tabela 4), completando o volume com água MiliQ até atingir 10  $\mu$ L, acrescentando 1  $\mu$ L de DNase, passando pelas condições descritas no item anterior. O mix de cDNA consistiu de 2  $\mu$ L de 10X RT Random Primers, 2  $\mu$ L de 10x RT Buffer, 0,8  $\mu$ L 25X dNTP Mix (100mM), 1  $\mu$ L MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase e 4,2  $\mu$ L Nuclease-free H<sub>2</sub>O. Por fim, o mix do cDNA (10  $\mu$ L) foi homogeneizado com a solução de RNA tratada (11  $\mu$ L) e levado para o termociclador.

As reações foram incubadas em termociclador PTC-100 – Programmable Thermal Controller, Peltier – Effect Cycling (MJ Research, INC.), sendo submetidas a temperaturas e tempos específicos necessários para a ativação inicial da enzima (25 °C por 10 minutos), síntese de cDNA (37°C por 120 minutos), inativação da enzima (85°C por 5 minutos) e finalizando a ciclagem sob 4°C constante. A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e diluídas a uma concentração padrão de 60 ng(- $\mu$ L) . Após a padronização, as amostras foram armazenadas em deep freezer a -80°C.

### 3.5.4 Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados utilizando o programa software PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>). Os genes estudados foram identificados por buscas na literatura de genes associados à longevidade. Foram

usados sequencias homólogas de *Triticum aestivum* encontrados no banco de dados de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), uma espécie modelo para estudos genéticos devido a diversas vantagens, tais como: tamanho do porte da planta, genoma relativamente pequeno, densidade genética superior a outras espécies, mas principalmente pela eficiência na sua transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*. A sequência dos genes estudados para o desenho dos *primers* foi retirado no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Foram testados 4 (quatro) genes de referência (ADP – Ribosylation fator, RNase 1 inibitor-like protein,  $\alpha$ - tubulin e histone) e utilizados 16 genes candidatos para o estudo molecular da longevidade (Quadro 1).

Após a confecção dos *primers*, os mesmos foram verificados quanto sua especificidade no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI. Todos os *primers* foram desenhados de modo que não houvesse presença de introns, utilizando apenas a sequência CDS, sendo utilizado o programa Softberry (<http://www.softberry.com/>) para a confirmação da presença, unicamente, dos éxons na sequência.

Os parâmetros utilizados no desenho dos *primers* foram: tamanho da amplificação de 80 a 150, temperatura de anelamento de 58 - 61°C e tamanho do primer de 18 a 24 pares de bases. A eficiência de amplificação para cada par de iniciadores foi determinada por RT-qPCR e calculada a partir da curva de amplificação utilizando LinReg PCR.

Quadro 1 - *Primers* específicos da região embrionária de sementes de trigo utilizados para análises de PCR em tempo real

Genes	Acesso <i>Arabidopsis T.</i>	Acesso <i>T. aestivum</i>	Forward (5'–3')	Reverse (3'–5')
<i>ADP- RIBOSYLATION FATOR</i>	AT1G23490.1	AY736124.1	AGGGTCTCATCTTTGTTGTGG	AACTCATCCTCATTGAGCATCC
<i>RNASE L INHIBITOR-LIKE PROTEIN</i>	AT4G19210.1	AY059462.1	TGTGTATTGGTTGTGGTATTTGTG	ATAGCGATGGGTAGTATCTTTCTC
<i>A-TUBULIN</i>	AT4G14960.2	DQ435659.1	ATGCTTTCAACACCTTCTTCAG	CAGTCCTCACCTCATCAATCAC
<i>HISTONE</i>	AT3G45980.1	X59873.1	AAGATCTACATCTTCAAGGTGCTG	GAAGATGTGCTTGATGAAGGAG
<i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)</i>	AT3G24650.1	FJ640559.1	GGTGATTTTCATCGTGCTTTACTC	TTGTGCTTGGCTAGATCCTG
<i>ABA INSENSITIVE 5</i>	AT2G36270.1	AB362818.1	CAGGCTTATACAATGGAGTTGG	GTCCGAAGTATCCTTCATCTC
<i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9, HSA9</i>	AT5G54070.1	KF208543.1	GAAGAGATTGAGATGCTAAAGAGG	TTGCTCCATTCCGTGAAGAC
<i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A</i>	AT4G18880.1	KF208542.1	CTGGTCCTGAGTGTATATTCCC	GTCATCGGTCTCATCAGTGTC
<i>DROUGHT RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2</i>	AT5G05410.1	AB193608	TACTACAACGTCCACCAACC	GTAATGCTCGACAGACTCCA
<i>LEAFY COTYLEDON 1</i>	AT1G21970.1	KM078734.1	TACGGGTACGAGGAAGGAG	GTCATGCGATTCTTCTGCTG
<i>VITAMIN E DEFICIENT 1 (VTE1)</i>	AT4G32770.1	DQ456882.1	CACATCTAAGCAGAAGTCAACAG	CTCCATCCCATTCTATCCATCC
<i>ASCORBATE PEROXIDASE 2</i>	AT3G09640.1	EF555121.1	CAAATGGTTCAATTAGATACGAGG	TGGATGCTTCGCTTTAATAGG
<i>SUPEROXIDE DISMUTASE 1</i>	AT3G10920.1	KP313757.1	GTTGAAACTACTCCTAATCAGGAC	ATGCTCCAGACATCAATTCC
<i>GLUTATHIONE S-TRANSFERAS</i>	AT1G10370.1	AJ414700.1	TACGAGTACGTGGAGGAGAG	TCGATGTACTGCACGATGAC
<i>METALLOTHIONEIN 2</i>	AT3G09390.1	AF470355.1	TAGCAGAGCGGATAAACTCAG	ATCTCAGGGTACATCTTGAC
<i>MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 2</i>	AT1G16460.2	AY036608.1	CTCACCAAGTAGTTGATGCC	GTATATGCCCACTTCTAACTCC
<i>CHLOROPLASTIC LIPOCALIN</i>	AT3G47860.1	DQ223009	TTCACCTGACGGATACATCAC	ACTTGCTGCTGATCATCTCC
<i>PROTEIN-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE 2</i>	AT5G50240.1	L07941.1	ACAGTCCTATGCCTATTGGT	TAATCCTTCAACAGTTCTAAGCAG
<i>ALPHA-TOINOPLAST INTRINSIC PROTEIN, TIP3;1</i>	AT1G73190.1	AB535600.1	CGTGACCGTGAACATCTCC	GCGCGATCCAGTAGAAGAG
<i>TRANSPARENT TESTA 4</i>	AT5G13930.1	AY286098.1	TTCAAGATCACCAAGAGCGA	CTTCCTGATCTGCGATTTGTC

### 3.5.5 Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão gênica relativa dos genes em estudo e dos genes de referência, foi utilizado o Lumino Ct Sybr Green qPCR Ready Mix (Sigma Life Science), totalizando uma solução de 20,0  $\mu$ L, sendo duas repetições técnicas de cada repetição biológica (10  $\mu$ L para cada repetição técnica), totalizando 6 amostras para cada tratamento. Para certificação de não haver contaminações das amostras, foi elaborado um controle negativo, onde ao invés de cDNA foi colocado água DEPC.

Com a utilização do termociclador óptico Eco Real-Time (Illumina), foi realizada a amplificação dos fragmentos alvos seguindo os determinados passos: etapa inicial de incubação a 50°C durante 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 10 segundos e pareamento a 60°C por 1 minuto. No final do processo foi realizada a curva de melting seguindo os passos: 15 segundos a 95°C, 65°C e 95°C respectivamente. Os dados obtidos foram analisados no programa EcoStudy versão 5.0 da Illumina.

Para mensurar a expressão gênica foi utilizado o cálculo do  $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), que se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão  $QR = 2^{-\Delta\Delta$ Ct, onde QR representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial;  $\Delta$ Ct se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência;  $\Delta\Delta$ Ct representa a diferença entre o  $\Delta$ Ct da amostra de interesse em determinado tempo e o  $\Delta$ Ct da amostra de referência.

### 3.5.6 Análise estatística

Para a análise fisiológica foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados médios (porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, T50, P50 e análise nutricional) foram analisados estatisticamente através de testes de normalidade (Shapiro-Wilk), análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$  de significância (SISVAR).

Para quantificação da expressão gênica relativa foi utilizado o programa REST® que realiza a quantificação comparativa pelo método de "Pair-Wise Fixed Reallocation

Randomization Test” (PFAFFL et al., 2002), comparando um grupo de amostras com o grupo controle, sendo neste trabalho representado pelo o tratamento 2000 kg.ha<sup>-1</sup> (0 dia). A comparação sempre é realizada a partir de um gene normalizador (gene expresso na mesma quantidade nas condições experimentais avaliadas). Além disso, o software REST considera a eficiência individual de cada reação, realizando uma normalização subsequente dos dados de quantificação.

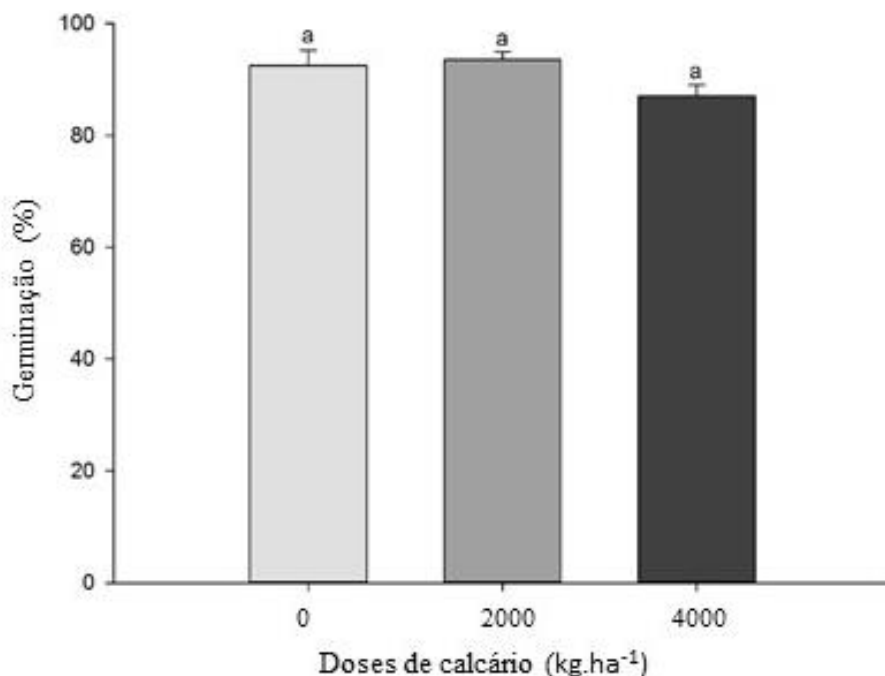
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Qualidade fisiológica de sementes de trigo

As sementes de trigo apresentaram teor de água em torno de 11%. Após o teste de longevidade, nos diversos pontos, o teor de água das sementes alterou levemente, ficando em torno de 12-13%. O teor de água na semente representa um índice comercial de grande importância, pois influencia no seu peso específico, rendimento de moagem, conservação e características tecnológicas. O teor de água recomendado para armazenar o trigo colhido é de 13%.

A porcentagem de germinação não diferiu significativamente entre os tratamentos (Figura 2). Sementes de trigo oriundas da produção sem calagem, dose recomendada ( $2000 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) e o dobro da recomendada de calcário ( $4000 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) apresentaram germinação de 92%, 93% e 87%, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Lima et. al. (2009), onde a calagem superficial não afetou a qualidade fisiológica de sementes de soja cultivadas em “safriha”.

Figura 2 - Germinação em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário



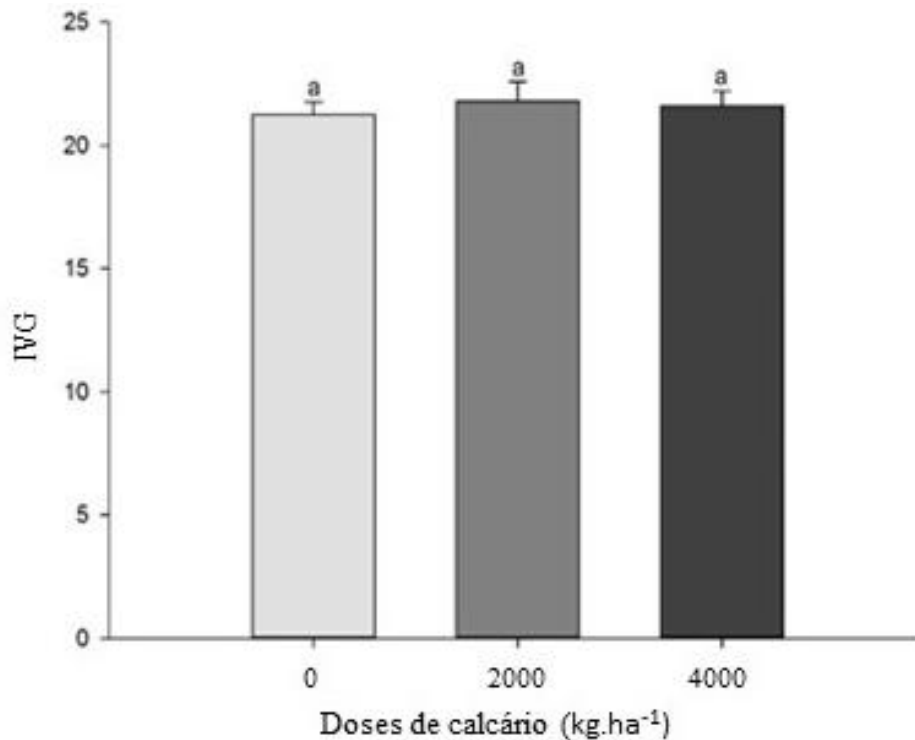
Fonte: próprio autor.

As diferentes doses de calcário usadas não contribuíram para que houvesse diferença significativa em relação ao Índice de velocidade de germinação e T50 (Figuras 3 e 4), seguindo o mesmo padrão da porcentagem de germinação. As



sementes apresentaram IVG de 21,2, 21,7 e 21,6 e T50 de 43,77h, 43h e 42,68h nos tratamentos 0 kg.ha<sup>-1</sup>, 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Figura 3 - Índice de velocidade de germinação em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário



Fonte: próprio autor.

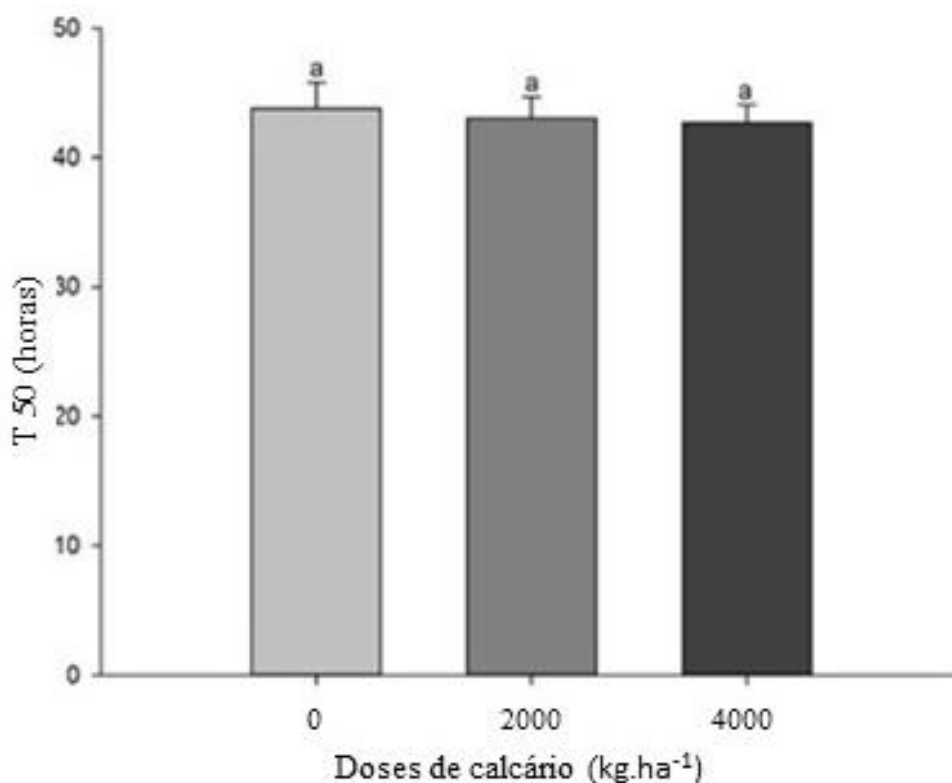
A resposta típica das plantas, cultivadas em solos de baixa fertilidade, é a redução na quantidade de sementes produzidas e não na qualidade (Delouche,1980). Tal afirmação é confirmada pelos dados de produtividade encontrada por Carmeis Filho et al. (2017), onde as sementes produzidas foram utilizadas neste trabalho. No que se refere aos efeitos da aplicação de fertilizantes no solo ou via foliar sobre o potencial fisiológico das sementes produzidas, predominam resultados em que a germinação não é alterada. Foi o que verificaram Leite et al. (2010), com aplicação de boro em arroz; Prando et al. (2012) com aplicação de nitrogênio em trigo; Gomes-Junior e Sá (2010), nitrogênio em feijão; e Zucareli et al. (2012), com aplicação de nitrogênio em milho doce.

Souza et al. (2010) estudando a resposta das doses de calcário na qualidade fisiológica em sementes de arroz, demonstrou que o índice de velocidade de germinação não foi influenciado, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. A velocidade de germinação é um dos conceitos mais antigos de vigor de

sementes (AOSA, 1983), sendo mais vigorosas, portanto, aquelas sementes com maior índice de velocidade de germinação.

Segundo Sá (1994), as plantas adubadas de modo adequado e equilibrado apresentam condições de produzir maior quantidade de sementes, aliadas à melhor qualidade podendo resistir mais facilmente às adversidades que podem surgir no período de produção. Porém, de acordo com os resultados encontrados a calagem não influenciou na porcentagem de germinação e no vigor, constatado pelo índice de velocidade de germinação e T50 (Figuras 3 e 4); demonstrando que mesmo em condições de acidez e de baixa saturação por bases, a qualidade fisiológica das sementes (germinação e vigor) não foi afetada.

Figura 4 – T 50 em sementes produzidas sob diferentes doses de calcário



Fonte: próprio autor.

Para se obter ganhos no rendimento da cultura, levando em consideração a qualidade de sementes produzidas, é necessário que as condições de fertilidade dos solos estejam perfeitamente equilibradas, com disponibilidade de macro e micronutrientes, suficientes para atender à demanda. Entretanto, em função da

deficiência de alguns micronutrientes, os rendimentos esperados podem não ser obtidos (SFREDO e OLIVEIRA, 2010).

Em situações de baixa disponibilidade de nutrientes no solo, a resposta típica das plantas é a redução na quantidade de sementes produzidas sem prejudicar a viabilidade e o vigor das mesmas. As plantas, de modo geral, desenvolveram essa capacidade de ajustar a produção de sementes aos recursos disponíveis, sem afetar a sua qualidade fisiológica, como estratégia para garantir descendentes (DELOUCHE, 1980).

#### 4.2 Composição nutricional das sementes

A composição nutricional das sementes produzidas em diferentes doses de calcário, no período de 0 dia, apresentou diferença significativa nos teores de potássio (K), manganês (Mn), nitrogênio (N) e fósforo (P), tendo o tratamento sem calagem maior concentração de K, Mn e P; e tratamento com dose recomendada apresentando a maior teor de N (Tabela 5).

As principais funções do potássio na planta estão relacionadas à translocação de açúcares, abertura e fechamento dos estômatos e regulação osmótica (MALAVOLTA, 2006), sendo essencial para o crescimento, desenvolvimento e maturação dos grãos e frutos vegetais (MEURER, 2006). Segundo Faquin (2005), a principal função bioquímica do K é ativação enzimática. Mais de 50 enzimas são dependentes do K para sua atividade normal, citando-se as sintetases, oxiredutases, desidrogenases, transferases e quinases.

Trabalhos que relacionam a influência do potássio na germinação e vigor de semente foram realizados, demonstrando que a maior disponibilidade desse elemento não influencia na qualidade fisiológica das sementes, destacando Veiga et al. (2010) e Filho et al. (2013) em soja e Deminicis et al., (2010) em sementes de capim quicuidá-Amazonia.

Tabela 4 - Análise nutricional de sementes com 0 dia do teste de longevidade

Doses	Ca	Mg	K	Cu	Zn	Mn	Fe	N	P	S
kg.ha <sup>-1</sup>	-----g/kg-----			-----mg/kg-----			-----g/kg-----			
0	3,2 a	1,2 a	5,5 a	12,9 a	50,2 a	77,0 a	48,6 a	21,7 b	2,8 a	1,0 a
2000	2,6 a	1,2 a	4,9 b	10,7 a	39,9 a	42,5 b	39,2 a	24,6 a	2,5 b	1,3 a
4000	3,0 a	1,2 a	5,1 ab	13,2 a	29,7 a	30,4 c	34,1 a	22,4 b	2,6 ab	0,9 a
CV (%)	10,66	4,33	5,57	54,49	17,96	7,51	28,42	3,48	4,28	38,46

<sup>1</sup>médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey P≤0,05). Fonte: próprio autor.

O manganês é essencial à síntese de clorofila e tem como principal função a ativação de enzimas, onde em pH alto ocorre diminuição da solubilização e da absorção, sendo o pH do solo, na maioria dos casos, o mais importante fator de controle da disponibilidade de Mn para as plantas (DECHEN e NACHTIGALL, 2006), comprovado nos resultados desse trabalho através da composição química da semente.

Segundo Melarato et al. (2002), o manganês pela sua natureza, pode estar envolvido, direta ou indiretamente, na qualidade fisiológica das sementes produzidas, pois sua função na ativação enzimática, biossíntese, transferência de energia e regulação hormonal são fundamentais para formação, desenvolvimento e maturação das sementes. Contudo, a diferença desse nutriente nos tratamentos estudados não diferiu significativamente quanto a germinação e vigor das sementes de trigo.

O nitrogênio é fundamental no metabolismo vegetal, com participação na biossíntese de proteínas e clorofila, sendo responsável pelas funções estruturais e participa de vários compostos orgânicos vitais para a planta, como proteínas, prolina e aminoácidos (PARIDA e DAS, 2005). Segundo Ta e Weiland (1992), durante o enchimento dos grãos, o N está disponível para planta em duas fontes: o N absorvido do solo e o N remobilizado dos tecidos vegetais. Durante a fase de enchimento de grãos, os fotossimilados produzidos são canalizados primeiramente para a semente em enchimento.

Barbosa et al. (2011), avaliando o efeito do nitrogênio na produção e qualidade de sementes feijão, observaram que as doses de nitrogênio não alteraram o potencial fisiológico das mesmas, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho sobre a porcentagem de germinação e vigor das sementes de trigo.

A diferença estatística obtida no teor de fosforo (Tabela 5) não influenciou na germinação e vigor nas sementes de trigo. Resultados semelhante foram obtidos por

Salum et al. (2008) avaliando as características químicas e fisiológicas em função do teor de fósforo na semente de feijão e Vazquez et al. (2014) avaliando a qualidade fisiológica de sementes de crambe em diferentes doses de fósforo.

O fosforo tem cinco funções principais: composição de moléculas grandes ou agrupamentos de moléculas como DNA, RNA e os fosfolipídios das membranas; transportador de substratos e de energia química (ATP); participação da sinalização celular; modifica proteínas irreversivelmente; e constituinte de biominerais (EPSTEIN e BLOOM, 2006).

A reserva de fósforo em sementes e frutos são os fitatos (sais de Ca, Mg e K do ácido fitico = éster hexafosfórico ou inositol) e representam 60 a 70% em grãos de cereais). A concentração de P nos grãos parece ser parcialmente consequência da quantidade de carboidratos no grão, que dilui uma quantidade de P controlada por fatores genéticos ou ambientais.

Após os 60 dias de envelhecimento, as sementes diferiram significativamente quanto ao teor de macronutrientes (magnésio, nitrogênio e fósforo) e de micronutrientes (zinco e manganês) (Tabela 6). A diferenciação desses macronutrientes podem estar relacionados com a longevidade da semente, interferindo nos muitos processos biológicos, prolongando assim, a germinabilidade das sementes.

Tabela 5. Análise nutricional de sementes com 60 dias após a instalação do teste de longevidade

Doses	Ca	Mg	K	Cu	Zn	Mn	Fe	N	P	S
kg.ha <sup>-1</sup>	-----g/kg-----			-----mg/kg-----			-----g/kg-----			
0	3,1 a	1,1 b	4,8 a	10,3 a	65,5 a	76,7 a	43,0 a	21,0 b	2,4 b	1,0 a
2000	3,3 a	1,3 a	5,1 a	16,5 a	49,3 b	51,0 b	47,3 a	24,0 a	3,0 a	0,8 a
4000	3,3 a	1,3 a	4,8 a	16,5 a	44,0 b	47,2 b	61,0 a	22,0 b	2,7 a	0,8 a
CV(%)	10,66	4,33	5,57	54,49	17,96	7,51	28,42	3,48	4,28	38,46

<sup>1</sup>médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey P≤0,05). Fonte: próprio autor.

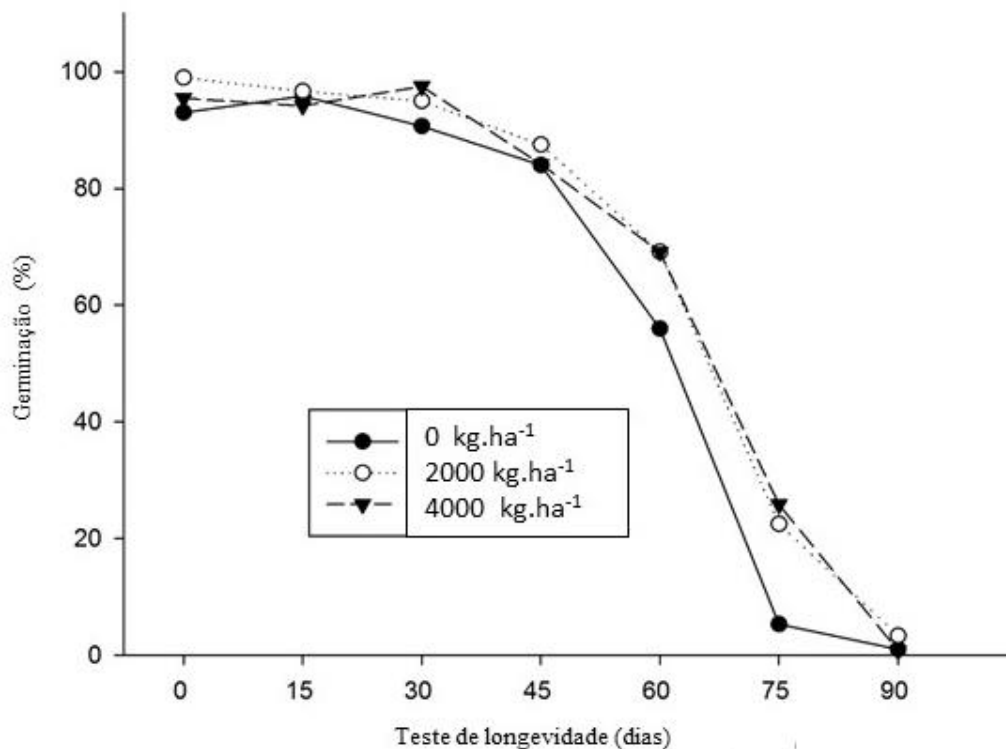
O tratamento sem calagem apresentou o maior teor de zinco (Zn) e manganês (Mn) diferindo estatisticamente dos tratamentos com calagem. Tal resultado é explicado devido a acidez do solo; segundo Malavolta (2006) a disponibilidade de nutrientes está relacionada ao pH do solo, assim quando o pH sobe formam-se hidróxidos e carbonatos menos disponíveis, conseqüentemente cai a concentração

desses elementos na solução do solo, dificultando assim sua absorção e redistribuição desses micronutrientes para as sementes.

#### 4.3 Longevidade de sementes de trigo

O comportamento das sementes ao longo do teste de longevidade apresentou diferença estatística, observando uma maior viabilidade nas sementes produzidas sob condição de calagem (Figura 5). As sementes de trigo produzidas sem aplicação de corretivo perderam mais rapidamente sua viabilidade, sendo maior a diferença da porcentagem de germinação (aqui sendo considerado a protrusão radicular) nos pontos 60 e 75 dias. Aos 90 dias as sementes de trigo, nas condições do teste de longevidade realizado neste estudo, não sobreviveram.

Figura 5 - Germinação ao longo do teste de longevidade em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário.



Fonte: próprio autor.

A redução da viabilidade das sementes de trigo ao longo do teste de longevidade já era esperada, pois em relação ao armazenamento de sementes, os fatores que influenciam a conservação do potencial fisiológico são a qualidade e o teor de água iniciais das sementes, em interação com a umidade relativa e a temperatura do ar do ambiente. Dois fatores foram primordiais para a rápida redução da viabilidade das

sementes, a elevada a umidade relativa e a temperatura do ar do ambiente, não havendo assim, a conservação do potencial fisiológico das sementes.

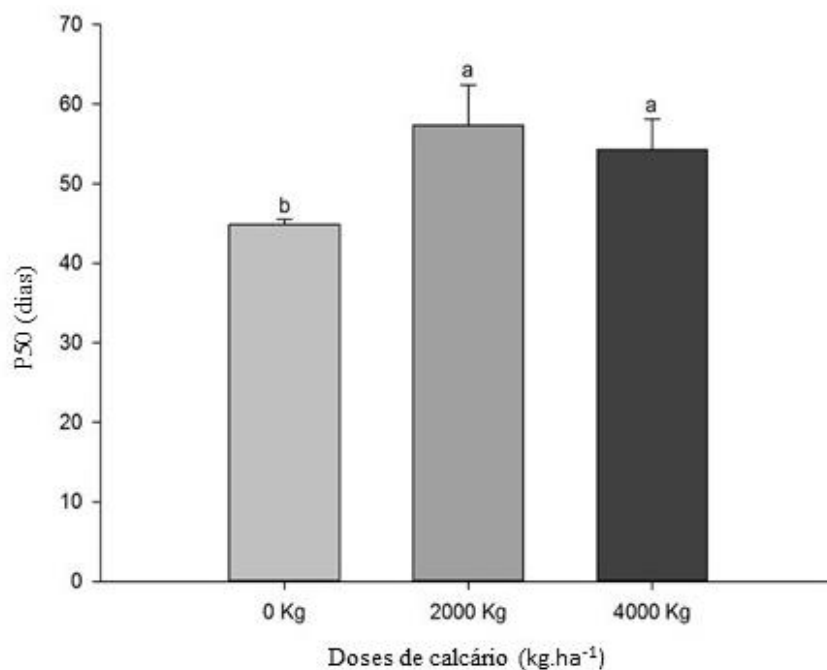
As sementes de trigo produzidas sob calagem (dose recomendada e o dobro) indicaram maior longevidade, diferindo significativamente das sementes produzidas sem corretivos (Figura 6). Os tratamentos com calagem apresentaram P50 de 60 dias para dose recomendada ( $2000 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) e 57 dias para o dobro da dose de calagem ( $4000 \text{ kg.ha}^{-1}$ ), indicando um aumento de aproximadamente 17% e de 12%, respectivamente, comparado com o tratamento sem calagem (50 dias).

A resposta positiva da calagem na longevidade das sementes coincide com maior presença dos macronutrientes nas sementes (magnésio, nitrogênio e fósforo) (Tabela 6). O magnésio ativa mais enzima do que qualquer outro elemento, sendo um co-fator de quase todas as enzimas fosforilativas, formando uma ponte entre o pirofosfato do ATP ou ADP e a molécula da enzima, sendo considerado como carregador de fósforo, contribuindo para a entrada de P na planta (VITTI et al., 2006).

Sendo o nitrogênio um elemento essencial requerido em maior quantidade pela planta e tendo sua função como componente constituinte de todas as proteínas (formadas por aminoácidos) e ácidos nucleicos, sua participação nos eventos que governam a longevidade das sementes não seria algo muito distante da realidade. Foi realizado o estudo molecular de genes relacionados a esse componente de qualidade das sementes para esclarecer o papel desses nutrientes na longevidade.

Para obtenção dos valores de P50 foi necessário realizar regressão linear utilizando as curvas de sobrevivência por meio de análise de probit das sementes ao longo do envelhecimento controlado, resultando em valores médios do coeficiente de regressão ( $R^2$ ) de 0,8543, 0,9298 e 0,8082 dos tratamentos  $0 \text{ kg.ha}^{-1}$ ,  $2000 \text{ kg.ha}^{-1}$  e  $4000 \text{ kg.ha}^{-1}$ , respectivamente (Figura 7).

Figura 6 - Valores de P50 em sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calcário



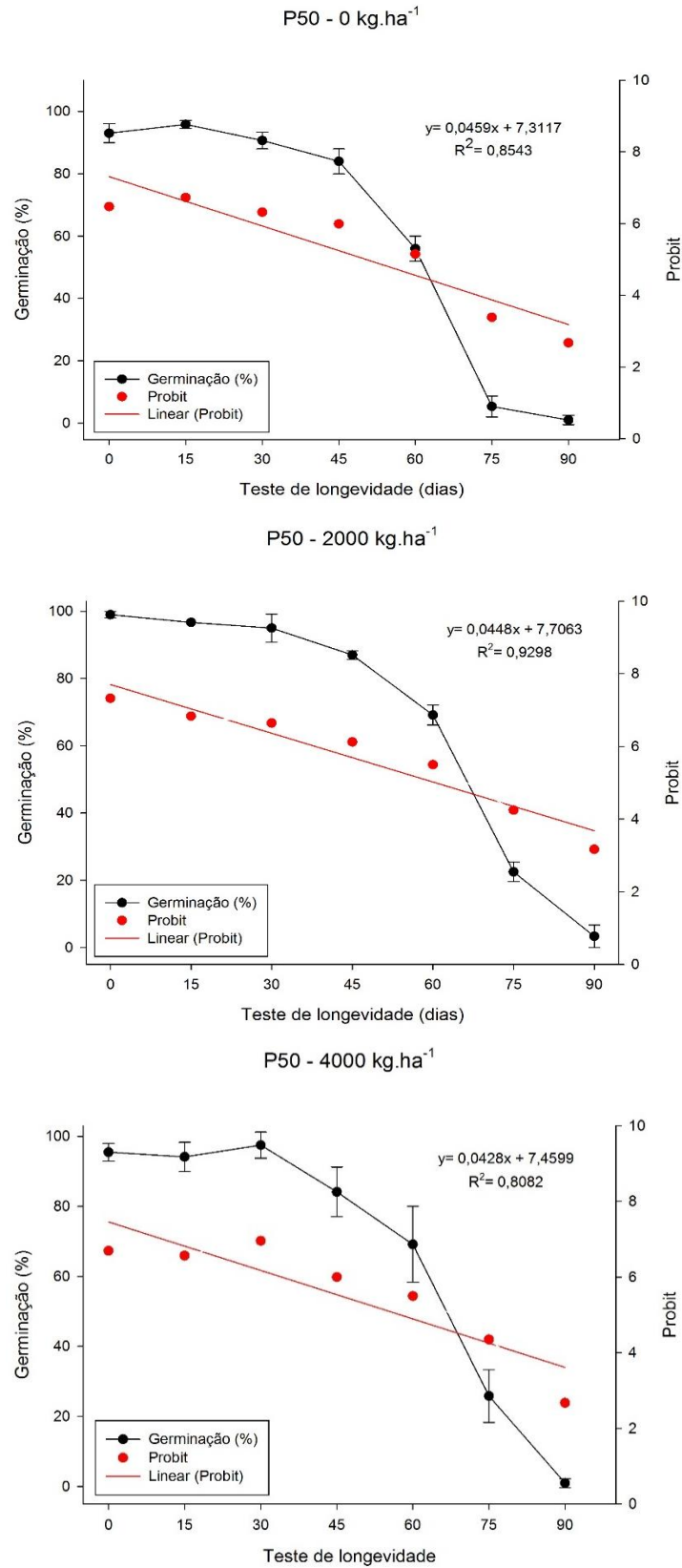
Fonte: próprio autor.

Utilizando o modelo de probit proposto por Ellis e Roberts (1980), a perda da viabilidade de sementes armazenadas, em função do período de armazenamento, temperatura do ambiente e grau de umidade das sementes, tem sido prevista com sucesso para um grande número de espécies e cultivares.

Muitos trabalhos ao avaliar o efeito da adubação na qualidade fisiológica de semente, só estudam as variáveis porcentagem de germinação e vigor de sementes, não dando a devida atenção nos efeitos da disponibilidade de nutrientes no solo na longevidade das sementes; com isso a literatura é escassa quando se aborda determinado estudo.



Figura 7 - Análise de probit das sementes de trigo ao longo do teste de longevidade nas diferentes doses de calcário.



Fonte: próprio autor.

## 4.4 Expressão gênica

### 4.4.1 Extração de RNA e eficiência dos *primers*

A extração de RNA utilizando protocolo de extração de Wang et. al., 2012, método modificado de dodecil sulfato de sódio (SDS) / TRIzol gerou RNAs totais com alta qualidade (razão de comprimento de onda 260/280 na faixa de 1,7 a 2,0) e íntegros. O uso do tratamento com DNase, incubando a solução a 37°C por 20 min, forneceu uma amostra de RNAs livre de impurezas.

Segundo Manning (1991), a contaminação por polissacarídeos ou polifenóis é indicada pela relação entre a absorbância A260/A230 e a contaminação por proteínas é observado pelo valor da relação A260/A280. De acordo Asif et al. (2006) quando esses valores estiverem entre 1,8-2,1 indicam a descontaminação das amostras. A presença de DNA ou resíduos de fenol altera esta relação (BUSTIN et al., 2010), onde valores próximos ao da relação não alteram a qualidade do RNA.

A eficiência dos *primers* alvos e do gene de referência apresentaram eficiências próximas e dentro dos limites aceitáveis (Tabela 6). As condições ótimas de amplificação são absolutamente essenciais para a quantificação precisa e reprodutível das amostras por RT-qPCR. As características de um ensaio otimizado de RT-qPCR são: curva linear padrão,  $R^2 > 0,980$ , eficiência de ampliação variante de 1,8 a 2,1. A eficiência do primer indica a taxa de duplicação do *amplicon* de um par de *primers* específicos durante uma PCR. O valor  $R^2$  indica a qualidade do ajuste da curva padrão aos pontos de dados traçados.

Dentre os genes de referência, o  $\alpha$  tubulin apresentou mais estabilidade entre os tratamentos, sendo esse gene escolhido como normalizador na análise da expressão gênica. A normalização é realizada com base em um ou mais genes que possuam expressão uniforme na maioria das células do organismo de estudo, bem como durante as várias fases de desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais. Estes são os chamados genes constitutivos ou *housekeeping* genes (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009).

Tabela 6 - Eficiência dos *primers* dos genes de referência e candidatos na longevidade de sementes

<i>Primers</i>	Média
<i>ADP- RIBOSYLATION FATOR</i>	1,827
<i>RNASE L INHIBITOR-LIKE PROTEIN</i>	1,889
<i>α-TUBULIN</i>	1,886
<i>HISTONE</i>	1,909
<i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)</i>	1,898
<i>ABA INSENSITIVE 5</i>	1,8765
<i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9, HSF A9</i>	1,886
<i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A</i>	1,864
<i>DROUGHT RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2</i>	1,756
<i>LEAFY COTYLEDON 1</i>	1,804
<i>VITAMIN E DEFICIENT 1 (VTE1)</i>	1,739
<i>ASCORBATE PEROXIDASE 2</i>	1,891
<i>SUPEROXIDE DISMUTASE 1</i>	1,842
<i>GLUTATHIONE S-TRANSFERAS</i>	1,617
<i>METALLOTHIONEIN 2</i>	1,901
<i>MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 2</i>	1,892
<i>CHLOROPLASTIC LIPOCALIN</i>	1,812
<i>PROTEIN-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE 2</i>	1,879
<i>ALPHA-TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN, TIP3;1</i>	1,830
<i>TRANSPARENT TESTA 4</i>	1,828

Fonte: próprio autor.

#### 4.4.2 Expressão genica dos fatores de transcrição na longevidade de sementes de trigo

Em genomas de plantas, aproximadamente 7% das sequências codificadoras são atribuídas a fatores de transcrição (TFs) e muitos destes são genes responsivos ao stress abiótico (KILIAN et al., 2012). Alguns desses TFs são mestres reguladores de sinalização e vias regulatórias de adaptação ao estresse, regulando temporariamente e espacialmente a transcrição de seus genes-alvo (GOLLACK et al, 2011; JIN et al, 2014), ativando assim uma cascata de sinalização de toda a rede de genes que atuam em conjunto no aumento da tolerância das plantas às condições ambientais adversas (AKHTAR et al., 2012).

Os fatores de transcrição ABI3, ABI5, HSFA9, HSFA4, DREB2 e LEC1 desempenham papel de grande importância na longevidade de semente (RIGHETTI et al. 2015; ZINSMEISTER et al, 2016; TEJEDOR-CANO et al., 2010; PERSONAT et al., 2014; ALMORENGA et al., 2009; SUGLIANI et al., 2009).

##### 4.4.2.1 Expressão relativa de *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (ABI3) e *ABA INSENSITIVE 5* (ABI5) na longevidade de sementes de trigo

ABI3 é um dos principais transdutores do sinal de hormônio do ácido abscísico (ABA), que é necessário para a expressão de genes relacionados a maturação, tais como os genes da proteína de armazenamento de sementes (SSP) (PARCY et al., 1997, KROJ et al., 2003), genes de *Late abundant embryogenesis* (LEA) (GIRAUDAT et al., 1992), genes com funções antioxidantes (HASLEKÂS et al., 2003) e genes de proteína de choque térmico (HSP) (KOTAK et al., 2007).

Mutantes de ABI3 exibem armazenamento reduzido de reserva, intolerância à dessecação e germinação precoce (NORTH et al., 2010). A redução simultânea da longevidade e da dormência em sementes mutantes foi assim explicada pela sua incapacidade de adquirir tolerância à dessecação e induzir dormência durante o desenvolvimento tardio da semente (SANO et al., 2016).

O ABI5 é um membro da família de zíper de leucina básica (bZIP) referida como elemento de resposta ao ácido abscísico (ABA) (AREB) ou fatores de ligação ao elemento promotor (ABRE) responsivo a ABA, que controlam as respostas celulares a ABA em sementes e tecidos vegetativos. Agindo em fluxo descendente e / ou

sinérgicamente com ABI3, ABI5 funciona como homo - heterodímeros que se ligam a elementos ABRE encontrados nas regiões reguladoras de muitos genes relacionados ao estresse. (CARLES et al., 2002; LOPEZ-MOLINA et al., 2001; NAKABAYASHI et al., 2005; DE GIORGI et al., 2015).

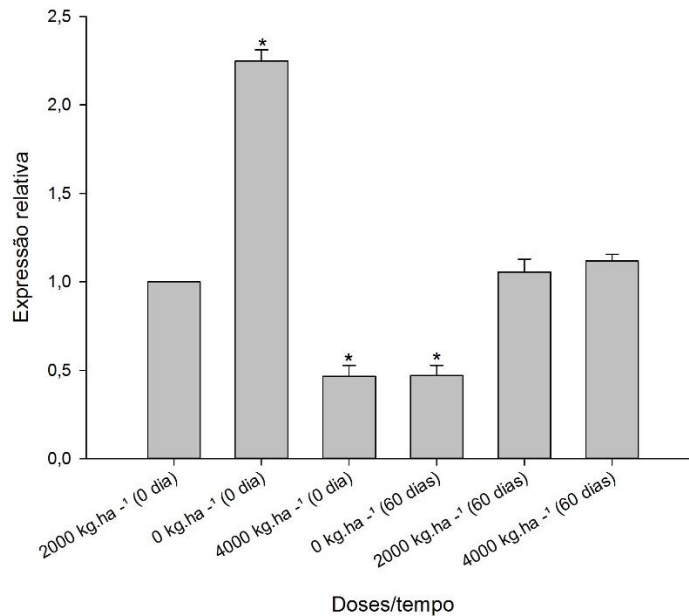
De acordo com Rajjou et al. (2012), o ABA está envolvido no acúmulo de proteínas e lipídios de reserva, na aquisição de tolerância à dessecação, na inibição da germinação precoce e na imposição de dormência primária, exercendo um efeito inibitório sobre mecanismos geradores de germinação precoce e deletéria das sementes em desenvolvimento na planta-mãe, permitindo que o processo de maturação seja mantido e que as sementes sejam formadas dotadas de reservas adequadas para o estabelecimento de plântulas vigorosas após a germinação.

Para o estudo de expressão dos genes candidatos para a avaliação da longevidade da semente de trigo, foi considerado o tratamento referente a dose recomendada de calagem ( $2000 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) tempo 0 como tratamento-controle.

Em sementes produzidas sem calagem no tempo 0 dias, a expressão relativa de *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (ABI3) na região embrionária de sementes de trigo foi superior 2 vezes ao tratamento controle, havendo redução na expressão nos tratamentos dobro da dose ( $4000 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) no tempo 0 e sem calagem aos 60 dias do teste de longevidade, diferindo significativamente (Figura 8).

Após 60 dias, a expressão do gene reduziu drasticamente no tratamento sem calagem e aumentou nos tratamentos  $2000$  e  $4000 \text{ kg.ha}^{-1}$  de calcário, sem diferir significativamente do tratamento controle, porém sua elevada expressão pode se tornar um diferencial nos demais eventos, onde comporta-se como fator de transcrição para os demais genes.

Figura 8. Expressão relativa de ABI3 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*

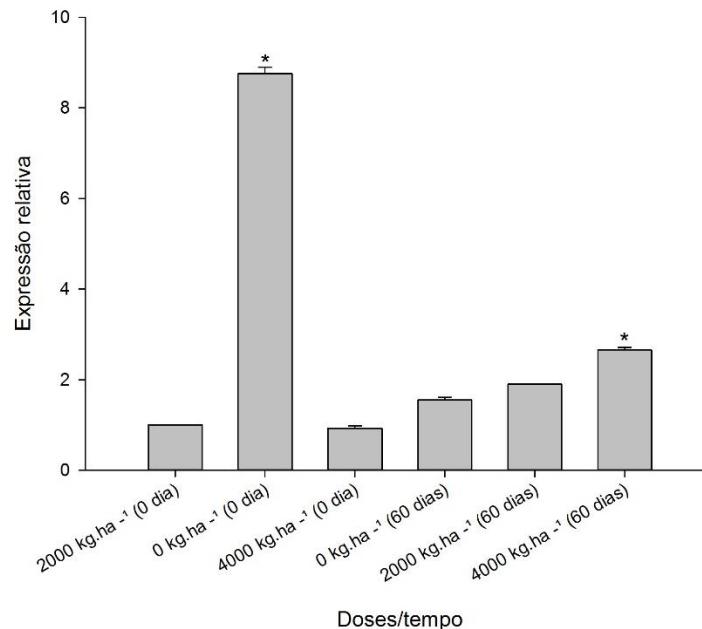


Fonte: próprio autor.

A expressão relativa de *ABA INSENSITIVE 5* (ABI5) se comportou de forma semelhante ao ABI3, onde o tratamento sem calagem (0 dias) foi quase 9 vezes superior ao tratamento-controle e o dobro da dose recomendada (60 dias) quase 4 vezes (Figura 9), diferindo significativamente. A redução da expressão do tratamento sem calagem e o aumento da expressão dos tratamentos 2000 e 4000 kg.ha<sup>-1</sup> após 60 dias foram constatados, esclarecendo o comportamento das sementes que apresentaram maior viabilidade nesse período do teste de longevidade.

De acordo com os resultados obtidos na expressão relativa dos genes ABI3 e ABI5 e os resultados gerados da análise nutricional das sementes aos 60 dias do teste de longevidade, pode-se inferir que existe uma relação.

Figura 9. Expressão relativa de ABI5 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

O nitrogênio tem grande participação na rota de sinalização do ABI3, através do aminoácido triptofano, onde a auxina (AIA) é sintetizada a partir desse aminoácido. A auxina regulava positivamente a dormência de sementes antes do fluxo de informação do ABI3, através da regulação mediada pela ABI3 (LIU et al., 2013). Segundo Normanly e Bartel (1999) as fases do desenvolvimento vegetal, as quais necessitam temporariamente de elevadas concentrações de AIA livre, ativam a rota de síntese dependente de triptofano, como, por exemplo, durante o início da embriogênese ou da germinação de sementes.

É de grande importância ressaltar a dominância do fósforo no metabolismo de energia nas plantas, desde a fosforilação até a síntese de ATP. Na principal rota de biossíntese do ABA, muitas moléculas e enzimas tem na sua constituição fósforo, onde íons de magnésio atuam como cofator nas reações enzimáticas, dentre muitas etapas, é ressaltado a conversão de 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) a metileritritol fosfato (MEP) pelo rearranjo intramolecular e pela redução em uma reação catalisada pela enzima DXP redutoisomerase (DXR), onde a enzima pode utilizar Mg<sup>+2</sup> como cofator e a reação catalisada por esta enzima é iniciada por um rearranjo no esqueleto

carbônico seguido de uma redução que requer a utilização da coenzima NADPH (EISENREICH et al., 2004) .

#### 4.4.2.2 Expressão relativa de *HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9* (HSFA9) e *HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FATOR A4A* (HSFA4) na longevidade de sementes de trigo

Todos os organismos possuem um mecanismo de defesa celular rápido e evolutivamente conservado, comumente designado como resposta ao choque térmico (HS), que ativa uma variedade de reações em resposta ao estresse térmico e químicos (HARTL e HAYER-HARTL, 2002). É caracterizada por uma rápida reprogramação da expressão gênica, levando à produção de um conjunto definido de proteínas chamadas proteínas de choque térmico (Hsps), a maioria das quais atuam como chaperonas moleculares (MORIMOTO et al., 1994).

O HSFA9 é caracterizado como um HSF especializado para a embriogênese e maturação de sementes, contribuindo para a longevidade e para a tolerância à desidratação severa durante a embriogênese. O HSFA9 (A9, *Helianthus annuus*, Fator de Choque Térmico A9) é o único fator de choque térmico que, em girassol (ALMOGUERA et al., 2002) e em *Arabidopsis* (KOTAK et al., 2007) foi encontrado apenas nas sementes.

Os estudos funcionais HSFA4 nas plantas são muito escassos, há apenas algumas evidências mostrando que suas funções estão relacionadas com respostas ao estresse moderado. Segundo PERSONAT et al. (2014), o gene A4 mostra estrita dependência ao A9 para causar a resistência ao estresse reforçada. HSFA4 e HSFA9 podem sinergicamente co-ativar o mesmo programa genético de longevidade de sementes e tolerância à dessecação (TEJEDOR-CANO et al., 2014).

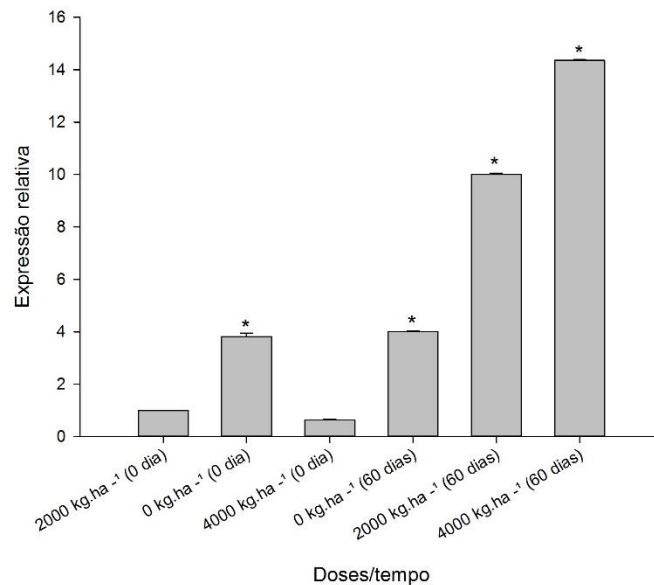
A expressão relativa de HSFA9 no tratamento sem calagem (0 dias) foi 4x superior ao tratamento controle; no período após 60 dias, todos os tratamentos diferiram significativamente do tratamento controle, apresentando expressão relativa superior do gene candidato de 4, 10 e 14 vezes nos tratamentos sem calagem, dose recomendada e o dobro da dose de calagem (Figura 10).

As sementes de trigo produzidas sem calagem apresentaram expressão constante do gene *HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9* (HSFA9) após 60 dias; situação diferente foi observado nos tratamentos 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup> de



calcário, onde a expressão do gene após o teste de longevidade elevou, conferindo maior longevidade nas sementes de trigo produzidas nestas situações (Figuras 6 e 7).

Figura 10. Expressão relativa de HSFA9 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

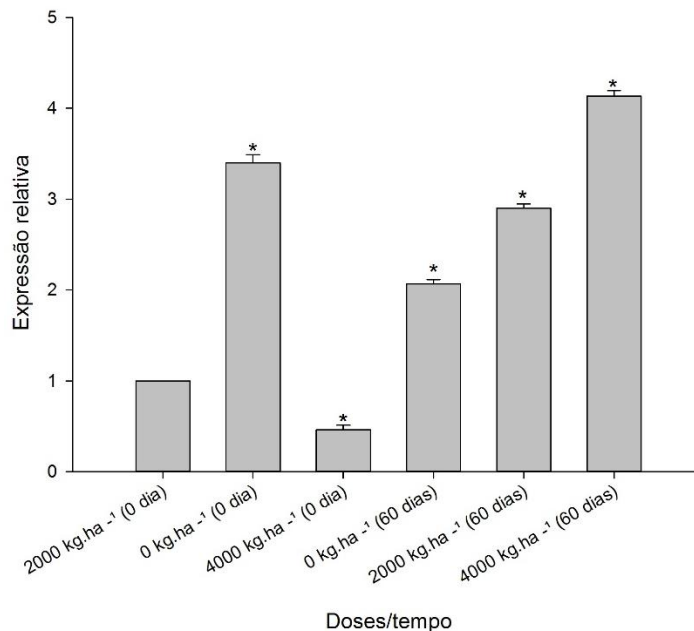
A expressão relativa do gene *HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A* (HSFA4) em todos os tratamentos diferiram do tratamento controle (Figura 11). No tempo 0 dias, o tratamento sem calagem resultou em sementes com expressão do gene 3x superior ao tratamento controle e o tratamento com o dobro da dose de calcário houve redução na expressão.

Após o período de estresse de 60 dias nas condições do teste de longevidade aplicado neste trabalho, a expressão do gene aumentou em todos os tratamentos, sendo observado uma maior expressão nos tratamentos onde as sementes foram produzidas sob calagem, demonstrando uma progressiva expressão de 3x e 4x superior ao tratamento controle, referente aos tratamentos 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

O estresse oxidativo é produzido como um estresse secundário durante a resposta ao estresse térmico, o que resulta na abundante produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nas plantas, a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um processo rápido. Este sinal

é percebido por histidina quinases e HSFs. Segundo Miller e Mittler (2006), o HSFA4a atua como um sensor do sinal  $H_2O_2$ .

Figura 11. Expressão relativa de HSFA4 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

Em *Arabidopsis*, o ABI3 tem sido implicado como um dos ativadores das proteínas *Heat Shock* durante o desenvolvimento de sementes. Em adição ao ABI3, o HSFA9 tem sido indicado como regulador de expressão, sendo um fator de transcrição de choque térmico com expressão única no estágio posterior de desenvolvimento de sementes. Segundo Kotak et al. (2007), o ABI3 tem sido indicado como o ativador do promotor do HSFA9, enquanto o HSFA9 ativa os promotores dos genes de HPS, esclarecendo assim sua função como membro especializado da família do fator de transcrição do choque térmico que regula a expressão dos HPS durante a maturação das sementes.

Em *Medicago truncatula* uma rede reguladora que inclui ABI3 e HSFA9 tem sido associada à tolerância à dessecação de sementes e à longevidade (VERDIER et al., 2013). Em sementes de tabaco, Tejedor-Cano et al. (2010), estudando a perda de função do “fator A9”, usando diferentes formas modificadas de A9 especificamente sobre-expressas, verificaram que as formas inativas de transcrição eram ineficazes quando comparadas com uma forma repressora ativa (A9-SRDX); utilizando apenas

A9-SRDX, foram observados efeitos negativos específicos na acumulação de HSP e uma redução significativa na longevidade da semente.

Na composição nutricional das sementes de trigo após 60 dias de envelhecimento controlado (Tabela 5) nos tratamentos com calagem observa-se um maior conteúdo de fósforo nas sementes, amenizando o impacto do estresse por calor, tornando as sementes mais longevas. Tal afirmação é justificado por Cheng et al. (2013), onde para resistir ao estresse por calor, muitas enzimas, antioxidantes e hormônios são produzidas, compreendendo redes de resposta ao estresse térmico, onde o autor destaca a peroxidação de fosfolipídios e a remodelação da membrana fosfolipídica. A remodelação dos fosfolipídios da membrana é característica da resposta ao estresse e a sinalização de fosfoinositida é o evento inicial após o início do estresse por calor.

O fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) e o ácido fosfatídico (PA) atuam como mediadores chave das vias de sinalização, da dinâmica das membranas e da organização do citoesqueleto (ZHU, 2002). Sob estresse de calor, os níveis de PIP2 e PA são aumentados. A proteína G (classe de proteínas envolvida na transdução de sinais celulares, funcionando como “chaves moleculares”) traduz o sinal iniciado pelo calor requerido para a acumulação de PIP2 e PA (MISHKIND et al., 2009). O PIP2 é transformado a partir de PI e é transportado para o envelope nuclear e nucléolo. O DAG produzido através da hidrólise catalisada por PLC de PIP2 é rapidamente convertido em PA através da ação da diacilglicerol quinase (DGK) à custa de ATP. IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) é o outro produto de PIP2, que é rapidamente convertido em IP6 (hexafosfato de inositol ou ácido fítico) (LIU, 2006).

O ácido fítico está presente nas sementes como principal fonte de fosfato (HAYAKAWA et al., 1989). É um composto de ocorrência natural formado durante a maturação de muitas sementes de cereais (ERDMAN, 1979). Em condições naturais, eles se encontram carregados negativamente, devido à presença de grupamentos fosfatos em sua estrutura, os quais sugerem forte potencial quelante, com íons carregados positivamente, como cálcio, ferro, zinco, cobre e moléculas de proteínas (COZZOLINO, 2007).

Estudos afirmam característica antioxidante do ácido fítico que, ao se ligarem com íons minerais, impedem a oxidação de lipídeos (AHN, 2004; LAJOLO, 2004). Ao contrário de antioxidantes que agem sobre o oxigênio nas reações de oxidação, o

ácido fítico inibe a formação do radical hidroxil dirigido por metais, especialmente o ferro, e os tornam inativos.

#### 4.4.2.3 Expressão relativa de *DROUGHT RESPONSIVE ABSCISIC BINDING PROTEIN 2* (DREB 2) na longevidade de sementes de trigo

As proteínas de elemento responsivo à desidratação (DREB) são consideradas como os principais reguladores das respostas ao stress abiótico das plantas incluindo a seca, a salinidade e o frio. Eles também estão envolvidos em outros processos de desenvolvimento, tais como desenvolvimento de embrião e endosperma. Os DREBs constituem uma grande família de fator de transcrição e conferem tolerância ao estresse abiótico às plantas, induzindo a expressão de um grande número de genes funcionais (AGARWAL et al., 2010).

Os fatores de transcrição do DREB desempenham importantes papéis na regulação dos genes relacionados com o stress abiótico, conferindo tolerância (DUBOUZET et al., 2003). Enquanto os *DREB2s* estão envolvidos na resposta à seca (WANG et al., 2008).

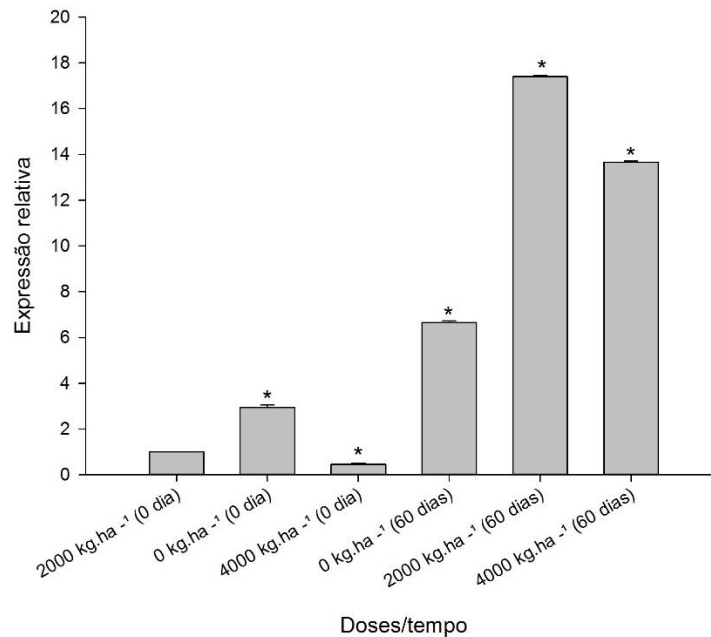
A expressão relativa do gene DREB2 diferiu significativamente em todos os tratamentos em comparação com o tratamento-controle (Figura 12). As sementes produzidas em condições sem calagem no período 0 dias apresentaram maior expressão, sendo aproximadamente 4x superior ao tratamento-controle.

Aos 60 dias após o início do teste de longevidade, houve maior expressão do gene DREB2, sendo a expressão 6, 17 e 13x maior do que o tratamento controle, para os tratamentos sem calagem, dose recomendada e o dobro da dose recomendada, respectivamente. Os tratamentos 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup> de calcário apresentaram expressão do gene superior ao tratamento sem calagem, indicando que a disponibilidade de nutrientes causada por essa prática agrícola, favoreceu maior desdobramento de proteínas de resposta a desidratação, tornando as sementes com maior longevidade.

Cada proteína DREB contém um domínio altamente conservado, chamado de APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF), que consiste numa sequência de 60 a 70 aminoácidos. De acordo com Agarwal et al. (2006) e Sharoni et al. (2011), as proteínas AP2/ERF desempenham funções relacionados a regulação da transcrição de genes em uma variedade de processos biológicos, tanto no crescimento e

desenvolvimento, bem como em várias respostas a estímulos ambientais, que regulam a expressão de genes de plantas responsivos a estresses bióticos e abióticos.

Figura 12. Expressão relativa de DREB2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

A sequência DRE, que integram a via de tradução dos sinais ABA–independente é importante para a regulação da expressão do gene RD29A, presentes em duas classes: DREB1 que participa da resposta ao frio; e DREB2, envolvido na resposta à desidratação. Entretanto, relatos de interações entre as vias já foram descritos (CHINI et al., 2004) (Figura 10).

As respostas ao estresse nas plantas estão interligadas. Segundo Taiz e Zeiger (2009), o mecanismo de transição gênica é controlado pela interação de proteínas denominadas fatores de transcrição, que reconhecem sequencias particulares, sendo ácido abscísico (ABA) o hormônio de maior importância na relação estabelecida entre as plantas e as várias classes de estresse, devido a sua capacidade de regulação da transdução de sinais e da expressão gênica. Como já citado, diferentes caminhos de transdução de sinais foram postulados para rotas que apresentam interação com ABA,

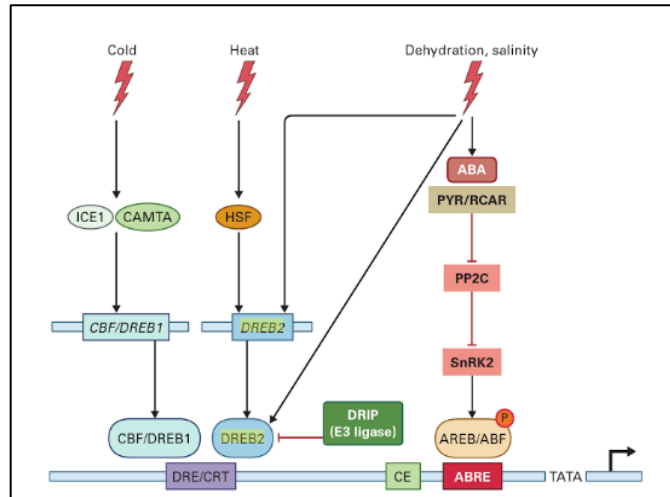
caminhos independentes da presença de ABA e um caminho onde estão presentes genes responsivos às duas condições (MAGALHÃES JÚNIOR, 2010).

A complexidade da regulação do processo de transcrição na resposta aos estresses abióticos se deve ao elevado número de genes regulatórios em comunhão com expressões integradas. Os fatores de transcrição interagem com elementos cis-regulatórios integrantes das regiões promotoras dos vários genes induzidos por esse estresse, e por consequência, corregulam os genes envolvidos na manifestação da tolerância.

Os fatores de transcrição ABI3, HSFA9 e DREB2 interagem para expressão gênica e por fim alterações metabólicas que resultam na manifestação da tolerância. A rede de comunicação gênica se torna compreensível diante dos resultados encontrados nesse trabalho, onde os tratamentos de sementes produzidas sob calagem apresentam maior longevidade comparadas com o tratamento sem, apresentando maiores expressões dos genes estudados.

A presença dos nutrientes apresentou efeito positivo na expressão dos genes estudados, atuando como fatores de constituição de várias moléculas (enzimas, proteínas), principalmente o nitrogênio em forma de aminoácidos na constituição de vários domínios de proteínas participantes; o fósforo participando ativamente na rota metabólica do ABA e seus produtos fosforizados como moléculas sinalizadoras ao estresse; o magnésio atuando como co-fator em várias reações enzimáticas e fornecimento de energia para o sistema.

Figura 13. Modelo esquemático das vias independente e dependente de ABA na regulação da transcrição de diferentes fatores de transcrição, desempenhando papéis fundamentais no frio, calor e desidratação celular em plantas



Fonte: Buchanan et al., 2015.

#### 4.4.2.4 Expressão relativa de *LEAFY COTYLEDON 1* (*LEC1*) na longevidade de sementes de trigo

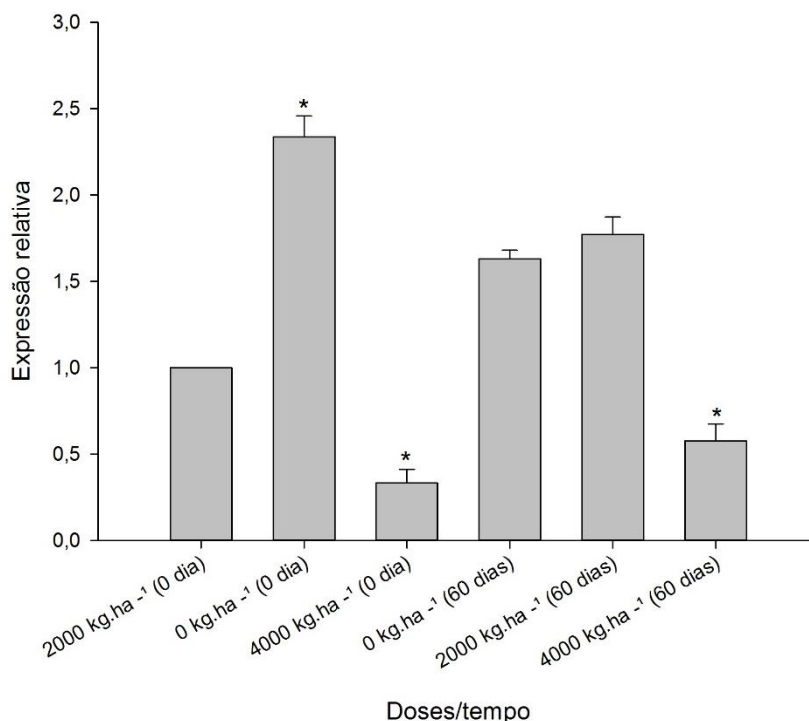
O fator de transcrição *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) é um regulador crucial da embriogênese e desenvolvimento de sementes. Consistente com o seu papel na embriogênese, *LEC1* é predominantemente expressa durante fases iniciais e tardias de desenvolvimento de sementes (Le et al., 2010). *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*), *LEC2*, *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3* (*ABI3*) e *FUSCA3* (*FUS3*) fazem parte de uma rede de fatores de transcrição reguladores mestres que controla a maturação e a indução de dormência em sementes. Segundo Yazawa et al. (2004), estes genes codificam proteínas que desempenham um papel central no desenvolvimento de sementes como reguladores transcricionais de embriogênese e maturação de sementes.

A perda de função da *LEC1* provoca um fenótipo pleiotrópico, incluindo a intolerância à dessecação embrionária e defeitos no acúmulo de compostos de armazenamento de sementes nas sementes em desenvolvimento. De acordo com Sano et al. (2016), a redução simultânea da longevidade e da dormência em sementes

mutantes foi assim explicada pela sua incapacidade de adquirir tolerância à dessecação e induzir dormência durante o desenvolvimento tardio da semente.

A expressão relativa do gene LEC1 foi significativa no período de 0 dia nos tratamentos sem calagem (aproximadamente 3x superior ao tratamento controle) e o dobro da dose recomendada de calcário (redução da expressão) em comparação ao tratamento controle (Figura 14).

Figura 14. Expressão relativa de LEC1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

Houve redução de expressão relativa do gene no tratamento 4000 kg.ha<sup>-1</sup> após 60 dias do teste de longevidade. Os tratamentos sem calagem e dose recomendada de calcário não diferiu significativamente do tratamento controle. A maior longevidade de sementes encontrada nos tratamentos sob calagem não correspondeu a expressão do gene LEC.

#### 4.4.3 Expressão genica dos antioxidantes na longevidade de sementes de trigo

O envelhecimento das sementes está associado a certas alterações no metabolismo celular e na bioquímica, incluindo a peroxidação lipídica, inativação



enzimática, ruptura da integridade da membrana e danos ao DNA (HU et al., 2012). A acumulação de espécies reativas de oxigênio leva à disfunção mitocondrial, inativação enzimática, perturbação de membrana e oxidação de lipídios, proteínas e material genético (DNA e RNA) (MOLLER et al., 2007), considerado uma das principais causas da deterioração das sementes (VESELOVA et al., 2015), sendo observado como fator primário que leva ao envelhecimento das sementes durante o armazenamento (PATERO e AUGUSTO, 2015).

Embora potentes agentes de deterioração celular, a produção de ROS está envolvida na sinalização e funções fisiológicas em respostas de estresse abiótico (GILL e TUTEJA, 2010) durante a germinação e dormência de sementes (BAILLY, 2004; EL-MAAROUF-BOUTEAU e BAILLY et al., 2008; KRANNER et al., 2010; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2013; DIAZ-VIVANCOS et al., 2013).

Para reverter lesões induzidas por ROS, as células possuem um sistema de defesa antioxidante. A presença de antioxidantes tem sido uma força motriz na evolução das plantas, uma vez que as sementes contêm grandes quantidades de vários antioxidantes. Segundo Zhou et al. (2012), a proteção contra danos causados por ROS pode aumentar a resistência ao envelhecimento das sementes, resultando em maior longevidade da semente.

#### 4.4.3.1 Expressão relativa de *VITAMIN E DEFICIENT 1 (VTE1)* na longevidade de sementes de trigo

Vitamina E (Vit E) é um termo comum usado para tocoferóis e tocotrienóis que inclui quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis nomeados e identificados pelos prefixos  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol.

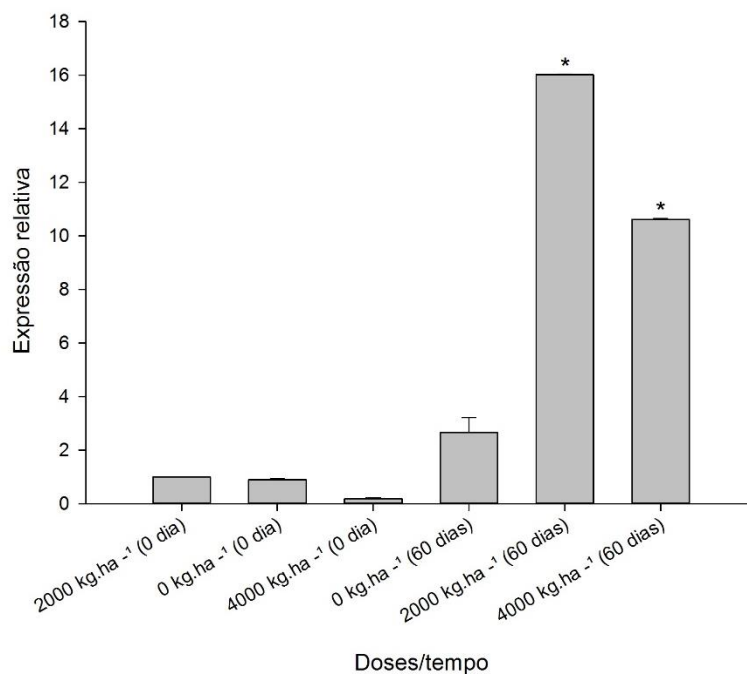
Os tocoferóis ajudam a manter a estrutura e a integridade da membrana (FALK e MUNNÉ-BOSCH, 2010), atuam como antioxidantes não enzimático, limpadores de radicais livres e desempenham outras funções não-antioxidantes relacionadas à sinalização e à regulação da transcrição. Desempenham um papel importante na manutenção da viabilidade das sementes, uma vez que previnem a oxidação dos lipídios durante o armazenamento (SANO et al., 2016).

A expressão de VTE1 na região embrionária de sementes de trigo no período 0 dias foi baixa, não diferindo do tratamento controle. Após 60 dias do início do teste de

longevidade, as sementes produzidas na presença de calagem apresentaram expressão do gene VTE1 superior ao tratamento sem calagem, sendo de 16 e 10x superior ao tratamento controle, no tratamento dose recomendada e no dobro da dose recomendada, respectivamente (Figura 15).

A calagem proporcionou sementes com maior expressão do gene VTE1 após período de estresse, favorecendo a longevidade. Segundo Sattler et al. (2004), a vitamina E é um antioxidante que previne a oxidação não lipídica enzimática e tem sido comprovada para promover a longevidade da semente, uma vez que mutantes nos genes de síntese de vitamina E (*vte1* e *vte2*) mostraram diminuição da longevidade da semente.

Figura 15. Expressão relativa de VTE1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

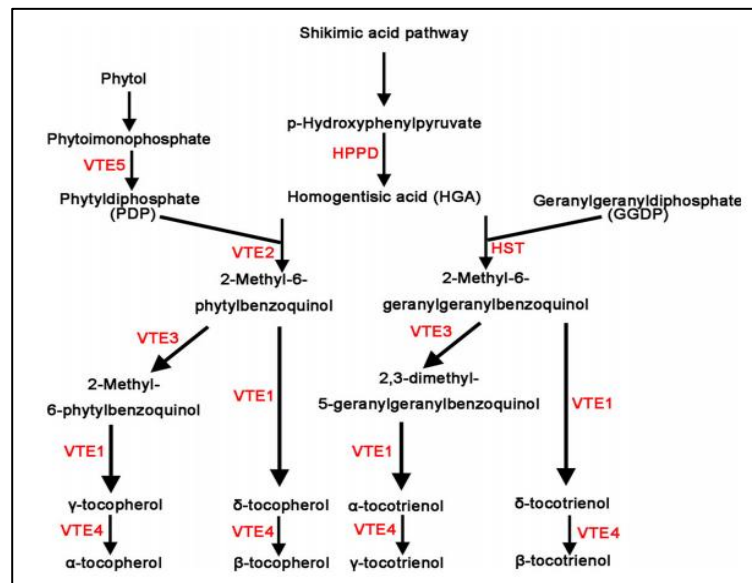
O  $\alpha$ -tocoferol, em cooperação com outros antioxidantes, desempenha um papel importante na redução dos níveis de ROS (principalmente  $O_2^-$  e OH) nas membranas fotossintéticas. Segundo Giurizato et al. (2012), os níveis de  $\alpha$ -tocoferol em sementes de soja mostraram uma correlação linear com o aumento do tempo de armazenamento.

Sete genes na via de biossíntese da vitamina E que codificam enzimas biossintéticas da vitamina E foram identificados e caracterizados em plantas: p-hidroxifenilpiruvato desidrogenase (HPPD), homogentisato geranylgeranyl transferase (HST), homogentisato fitil transferase (HPT/VTE2), dimetil-fitolquinolmetil transferase (MPBQMT/VTE3),  $\gamma$ - tocoferol metiltransferase ( $\gamma$ TMT/VTE4), tocoferol ciclase (TC/VTE1) e fitol quinase (PK/VTE5) (LI et al., 2008).

De acordo com Jo e Hiun (2011), a composição tocoferólica total é determinada pelas atividades e especificidades combinadas das enzimas de prenilttransferase homogeneizado (VTE2), tocoferol ciclase (VTE1) e duas enzimas metiltransferases (VTE3 e VTE4) presentes num dado tecido.

A maior presença de fósforo nos tratamentos com calagem pode ter favorecido a biossíntese de vitamina E, resultando em uma maior longevidade das sementes. Duas moléculas fosfatadas participam da via de biossíntese da vitamina E; o difosfato de fito (PDP) na biossíntese de tocoferol com a prenilação de ácido homogentísico (HGA) que é catalisada por VTE2, para formar 2-metil-6-fitolbenzoquinol (MPBQ), e o diganylgeranyl difosfato (GGDP) na biossíntese de tocotrienol com a condensação de HGA e para formar 2-metil-6-geranylgeranyl benzoquinol por HST (ZHANG et al., 2013) (Figura 16)

Figura 16 - Vias de biossíntese de tocoferol e tocotrienol em plantas



Fonte: Modificado de Jo e Hyun, 2011.

A análise da via biossintética dos tococromanóis (tocoferóis e tocotrienol) revela que as enzimas podem influenciar no acúmulo e na composição da VTE (perfil dos isômeros) nos tecidos vegetais (ESTÉVEZ et al., 2001; TSEGAYE et al., 2002; RIPPERT et al. 2004).

As duas vias da biossíntese de tococromanóis produzem precursores para muitos compostos do metabolismo da planta. De acordo com DellaPena e Pogson (2006) a metil-eritritol-fosfato (MEP) é responsável pela formação do geranylgeranyl 2P, precursor da síntese de clorofilas, plastoquinonas, giberelina, carotenóides entre outros. Síntese de precursores para vias do folato, fenilpropanóides, alcalóides e de aminoácidos aromáticos - fenilalanina, tirosina e triptofano são produzidos na rota chiquimato SK (TZIN et al., 2010), havendo comunicação (crosstalk) entre essas rotas associadas e o conteúdo de VTE.

#### 4.4.3.2 Expressão relativa dos genes *ASCORBATE PEROXIDASE 2* (APX2), *SUPEROXIDE DISMUTASE 1* (SOD1) e *GLUTATIONA S-TRANSFERASE* (GST) na longevidade de sementes de trigo

Condições de estresse abiótico induzem danos celulares e constituem alguns efeitos mecânicos, metabólicos e oxidativos nas plantas devido ao desequilíbrio entre gerações de espécies reativas de oxigênio (ROS), radical de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo (OH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e o sistema antioxidante (AYDIN et al. 2013; MUNNS 2011). As enzimas de remoção de ROS de plantas incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPX), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutationa redutase (GR), glutationa S-transferase (GST) e peroxiredoxina (PRX).

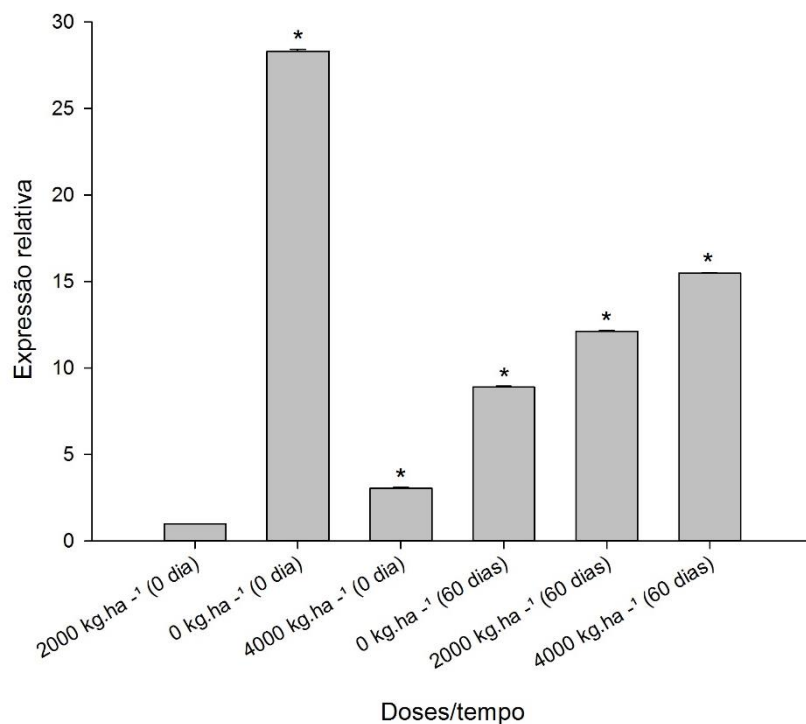
A análise genômica mostra que as isoenzimas APX são de uma família multigênica, sendo encontrado oito genes no arroz, 9 em *Arabidopsis* e 7 em tomate (CHEW et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004; NAJAMI et al., 2008). Em arroz, APX1 e APX2 estão localizados no citosol, APX3 e APX4 nos peroxissomas, APX6 em mitocôndrias e APX5, APX7 e APX8 em cloroplastos. As isoformas compartimentalizadas têm papéis específicos. Os APX citosólicos (APX1 e APX2) têm

um papel geral de proteção contra o estresse na defesa contra estresses abióticos e bióticos

A expressão relativa de APX2 foi 28 e 3x superior ao tratamento controle no período de 0 dia, diferindo estatisticamente, nos tratamentos sem calagem e o dobro da dose recomendada de calcário ( $4000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), respectivamente; garantindo a não alteração da qualidade fisiológica das sementes de trigo (germinação e vigor).

Após o início do teste de longevidade (60 dias), os tratamentos com calagem apresentaram maior expressão relativa do gene APX2 e uma redução drástica no tratamento sem calagem. As sementes provenientes dos tratamentos sem calagem, dose recomendada e o dobro da dose recomendada de calcário apresentaram expressão relativa de 8, 12 e 15x superior ao tratamento controle, respectivamente, diferindo significativamente (Figura 17).

Figura 17. Expressão relativa de APX2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

Em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi), a sobreexpressão do gene APX2 aliviou o dano produzido pelas condições de estresse

hídrico (FAIZE et al, 2011). Bonifácio et al. (2011) demonstraram que os mutantes deficientes em ascorbato peroxidase citosólico são susceptíveis ao dano oxidativo induzido pela salinidade.

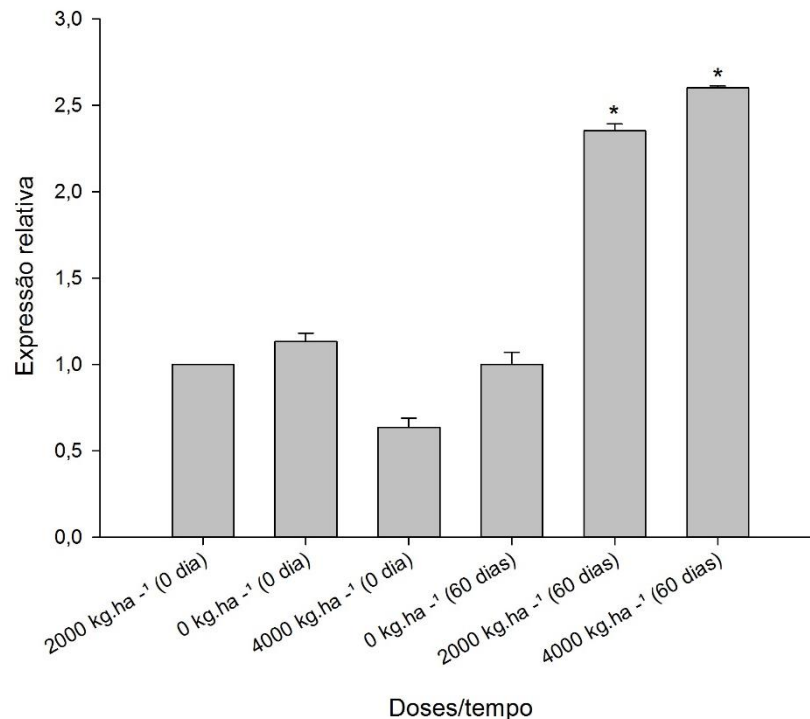
A superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra ROS reforçada acentuada pelo estresse abiótico e seus produtos de reação onde SODs catalisam a dismutação de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$  em todos os compartimentos subcelulares tais como cloroplastos, mitocôndrias, Núcleos, peroxissomas, citoplasma e apoplastos (GILL e TUTEJA, 2010). Nas células eucarióticas, existem três superóxidos dismutases distintas, *Sod1*, *Sod2* e *Sod3*, e cada um é um produto de genes distintos e distinta localização subcelular, catalizando a mesma reação.

*Sod1* é a principal superóxido dismutase citosólica responsável por dismutar superóxido, um radical livre que é altamente reativo e pode causar danos celulares (TSANG et al., 2014). Segundo Pilon et al. (2011), a reação completa da dismutação dos ânions superóxidos requer a participação de dois íons metálicos (cobre e zinco), os quais atuam como cofatores para a efetiva catálise.

A prática da calagem não influenciou na expressão relativa de SOD1 no período de 0 dia (Figura 18), onde o sistema antioxidante não foi alterado, pois o estresse oxidativo não foi acentuado. Após os 60 dias do início do teste de longevidade, as sementes produzidas sob calagem demonstraram expressão relativa do gene SOD1 superior ao tratamento controle, diferindo estatisticamente, observando valores de expressão 2x superior para ambos os tratamentos (dose recomendada ( $2000 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) e o dobro da dose recomendada de calcário ( $4000 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ))

A produção de ascorbato peroxidase e superóxido dismutase estão relacionados com o ABA. A tolerância ao estresse induzida pela ABA está parcialmente ligada à ativação de sistemas de defesa antioxidantes, incluindo componentes enzimáticos e não enzimáticos, que protege as células vegetais contra danos oxidativos (HUANG et al., 2012; ZHANG et al., 2012a, 2014). Qi et al. (2015) sugerem claramente que a exposição de tecidos de plantas ao estresse desencadeia a acumulação de ABA, o que induz uma geração aumentada de ROS. A superprodução de ROS não só apenas ativa o sistema enzimático antioxidante para eliminar o excesso de ROS, mas para manter o estado redox ótimo nas plantas.

Figura 18. Expressão relativa de SOD1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

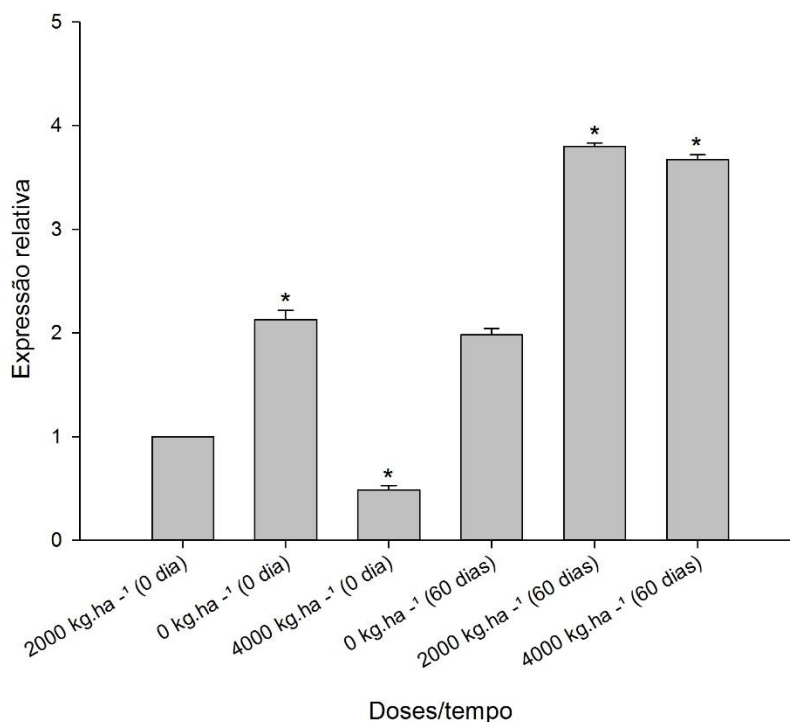
As glutathione S-transferases (GSTs, E.C. 2.5.1.18) são uma família de enzimas multifuncionais que são conhecidas por desempenharem papéis importantes no combate a diferentes stress bióticos e abióticos (BARTLING et al., 1993). Segundo Dixon et al. (2010) e Cummins et al. (2011), as proteínas GST estão envolvidas em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento cruciais, incluindo destoxificação xenobiótica (por exemplo, herbicidas), transdução de sinal, isomerização e proteção contra danos oxidativo.

As GSTs têm papel importante no controle de compostos resultantes da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, como aldeídos e, hidroxialdeídos-, cetoaldeídos- $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados e/ou seus respectivos epóxidos; algumas destas são altamente genotóxicos (MARNETT et al., 2003). De acordo com Dudler et al. (1991) e Bartling et al. (1993), as GSTs promovem a conjugação de glutathione reduzida com produtos endógenos causadores de danos oxidativos (radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA), levando sua desintoxicação.

As sementes de trigo provenientes do tratamento sem calagem (0 dia) apresentaram expressão relativa do gene GST 2x superior ao tratamento controle, havendo redução de expressão no tratamento 4000 kg.ha<sup>-1</sup> de calcário, não alterando a porcentagem de germinação e o vigor das sementes de trigo. Após 60 dias do início do teste de longevidade, as sementes produzidas sob calagem apresentaram maior expressão relativa do gene GST, sendo, aproximadamente, 4x superior ao tratamento controle em ambos os tratamentos, diferindo significativamente (Figura 19).

De acordo com os resultados encontrados, a maior expressão do gene GST também favoreceu a longevidade de sementes de trigo. Trabalhos realizados por Cummins et al., (1999); Edwards et al., (2000); Kilili et al., (2004) relatam a ação de GSTs na redução de danos oxidativos em várias espécies de plantas. Ji et al., (2010) elucidam que plantas transgênicas que super produzem um gene GST exibiram tolerância significativa ao estresse oxidativo; além disso seu envolvimento também foi sugerido no controle da morte celular programada (KAMPRANIS et al., 2000).

Figura 19. Expressão relativa de GST na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*

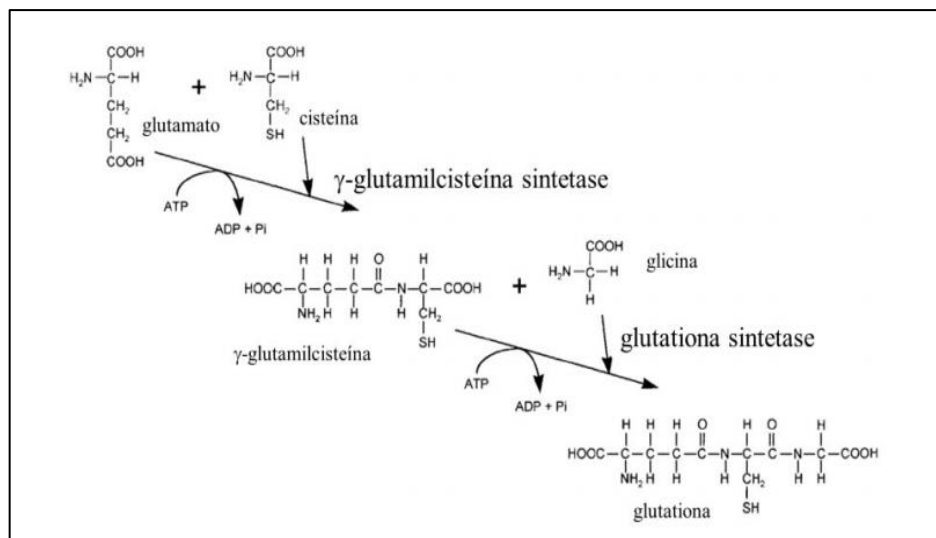


Fonte: próprio autor.



Os efeitos da calagem podem ter disponibilizado mais nitrogênio no processo da biossíntese da glutathiona (GSH), estabelecida por meio de duas reações dependentes de ATP, onde os aminoácidos glutamato e cisteína são os precursores (Figura 20). A glutathiona é o precursor de fitoquelatinas (cruciais no controle das concentrações de metais pesados na célula) e o substrato para a ação das glutathiona-S-transferases (GSTs) (NOCTOR et al., 2002). Segundo Foyer (2001) a regulação da síntese de GSH também ocorre pela disponibilidade de cisteína.

Figura 20 - Representação esquemática da rota da biossíntese da glutathiona.



Fonte: Adaptado de Noctor et al., 1998.

As glutathiona S-transferases possuem papel no metabolismo de compostos exógenos (xenobióticos) via conjugação da glutathiona a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e usualmente citotóxicos. Além disso, as GST das plantas estão envolvidas na transdução de sinal, na ligação não catalítica de flavonoides e participam no metabolismo intermediário (CHRONOPOULOU e LABROU, 2009).

#### 4.4.3.3. Expressão relativa de *METALLOTHIONEIN 2* (MT2) na longevidade de sementes de trigo

As metalotioneínas (MTs) são proteínas ricas em cisteína de baixa massa molecular, amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais (COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002). Em plantas podem ser divididas em quatro

subfamílias com base na distribuição de resíduos de cisteína nas suas regiões amino e carbóximo-terminal; envolvidas na homeostase de metais, desintoxicação e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HASSINEN et al, 2011; XIA et al., 2012), induzido por uma variedade de estímulos ambientais, incluindo peróxido, seca, frio, calor, sal e toxicidade de metais pesados, estímulos esses acompanhados pela produção de ROS (YANG et al., 2009; KUMAR et al., 2012).

Os genes MT de tipo 2 são expressos principalmente nas folhas, no caule e nas sementes em desenvolvimento. Liu et al. (2015) mostrou que a superexpressão do gene *OsMT2c* está associada à diminuição da acumulação de ROS e, em seguida, aumenta significativamente a tolerância de *Arabidopsis* contra o estresse abiótico.

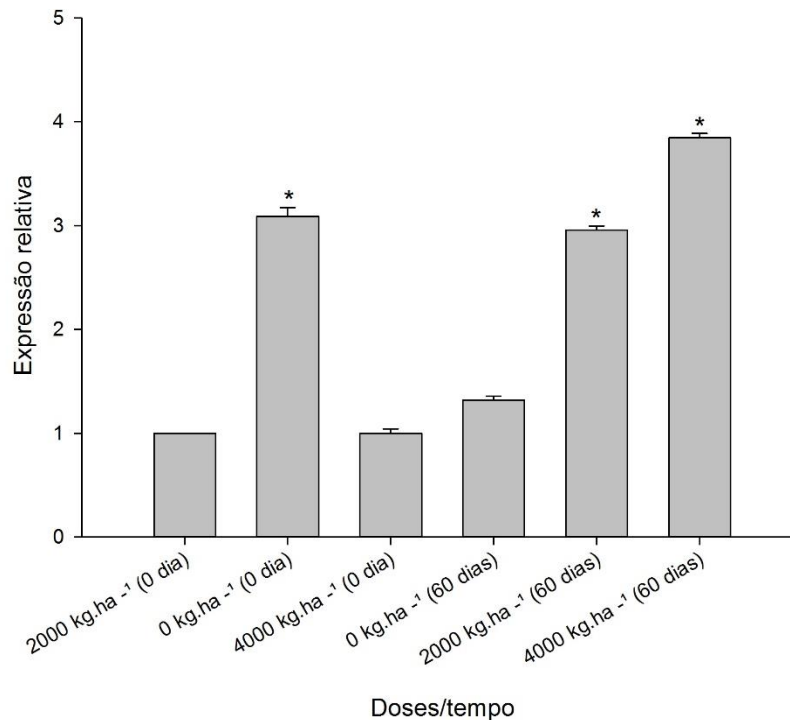
A expressão relativa de *METALLOTHIONEIN 2* em sementes de trigo, no período 0 dia, foi significativo para o tratamento sem calagem, sendo a expressão 3x superior em comparação ao tratamento controle. Após o início do teste de longevidade (60 dias), a expressão do gene reduziu no tratamento sem calagem, observando um aumento significativo para as sementes produzidas sob calagem (dose recomendada - 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e o dobro da dose recomendada de calcário - 4000 kg.ha<sup>-1</sup>). Os tratamentos que receberam calagem, após 60 dias, apresentaram expressão relativa do gene alvo de aproximadamente 3 e 4x (2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente) superior ao tratamento controle (Figura 21), favorecendo a longevidade das sementes de trigo.

Os resultados obtidos de maior expressão relativa do gene em estudo nos tratamentos sob calagem, no período de 60 dias após o início do teste de longevidade, podem ter uma correlação com a maior disponibilidade de nitrogênio nas sementes, pois as proteínas metalotioneínas possuem regiões ricas em cisteínas, onde são caracterizados como ligantes a metais, cumprindo assim seu papel no mecanismo de defesa para desintoxicar metais em excesso. Leszczyszyn et al. (2013) mostraram que os resíduos de ligação de metal Cys em MTs também podem eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim, em vez de remobilização de metal, a indução de MT está correlacionada com a sinalização e eliminação de ROS.

As diferenças na disponibilidade de nutrientes podem alterar a expressão de genes. Segundo Kisa et al. (2016), os elementos encontrados no meio de crescimento das plantas podem afetar vários genes. Assim, o efeito de nutrientes e metais pesados

pode ser revelado em expressões de genes que são responsáveis pelo transporte de elementos e casos entre si. Tombuloglu et al. (2012) demonstram que a expressão dos genes é alterada de acordo com a disponibilidade de nutrientes.

Figura 21. Expressão relativa de MT na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

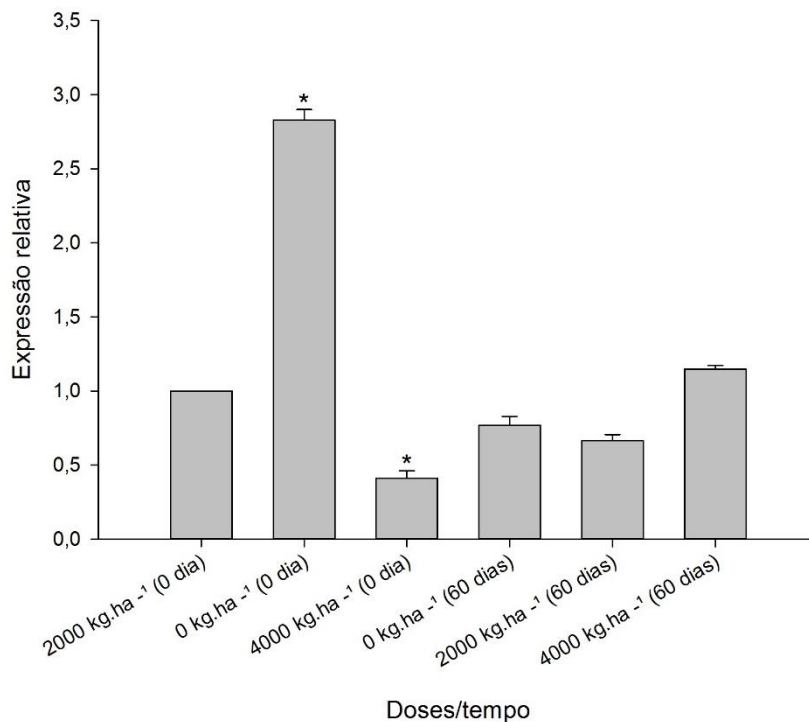
#### 4.4.3.4. Expressão relativa de *MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 2* (MST2) na longevidade de sementes de trigo

A enzima Mercaptopiruvato Sulfurtransferase (MST) é a principal via bioquímica in vivo para desintoxicação do cianeto (CN), onde é responsável pela oxidação do cianeto (CN) em tiocianato (SCN). Segundo Rajjou et al. (2008), a desintoxicação de compostos tóxicos que se acumulam durante o armazenamento e germinação das sementes realizado pelo Mercaptopiruvato Sulfontransferase mostrou estar relacionada à longevidade da semente, uma vez que a abundância desta enzima foi reduzida durante o envelhecimento das sementes.

O MST2 está localizado no citosol e desempenham papéis importantes no desenvolvimento de embriões e sementes de *Arabidopsis* (PAPENBROCK e SCHMIDT, 2000). O MST catalisa a transferência de enxofre do mercaptopiruvato para aceptadores de enxofre, tais como tióis e cianeto (PAPENBROCK e SCHMIDT, 2000a), presumivelmente contribuindo para a destoxificação do cianeto.

As sementes produzidas sem calagem, no período de 0 dias, tiveram expressão relativa do gene *MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 2* aproximadamente 3x superior ao tratamento controle, diferindo estatisticamente. Após os 60 dias do início do teste de longevidade, a expressão relativa reduziu no tratamento sem calagem e se manteve constante nos tratamentos sob calagem (2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup>) (Figura 22).

Figura 22. Expressão relativa de MST2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

A calagem não alterou a expressão do gene MST2 em sementes de trigo aos 60 dias do teste de longevidade, podendo concluir que a maior longevidade apresentada nos tratamentos dose recomendada e o dobro da dose recomendada de calcário não

tem a relação com o gene *MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 2*; embora expressados, os tratamentos não diferiram entre si.

#### 4.4.4. Expressão relativa de proteínas na longevidade de sementes de trigo

##### 4.4.4.1. Expressão relativa de *CHLOROPLASTIC LIPOCALIN* (CHL) na longevidade de sementes de trigo

As lipocalinas pertencem ao grupo de proteínas pequenas, principalmente extracelulares, implicadas em muitas funções importantes, como na modulação do crescimento e do metabolismo celular, na ligação dos receptores da superfície celular, na biogénese e reparação da membrana e em resposta ao estresse ambiental. Encontrados em animais vertebrados e invertebrados, plantas e bactérias (FRENETTE CHARRON et al., 2002). Segundo Charron et al. (2005), baseados em informações de bancos de dados genômicos e de predições bioinformáticas indicou que muitas plantas possuem lipocalinas, e essas proteínas foram classificadas como lipocalinas induzidas pela temperatura (TILs) e lipocalinas cloroplásticas (CHLs).

As lipocalinas vegetais TIL e CHL são proteínas induzidas pelo estresse e a genética reversa em *Arabidopsis thaliana* mostrou que as funções celulares de AtTIL e AtCHL estão relacionadas com a resposta ao estresse ambiental e a prevenção de danos por estresse (CHARRON et al., 2008; CHI et al., 2009; LEVESQUE-TREMBLAY et al., 2009).

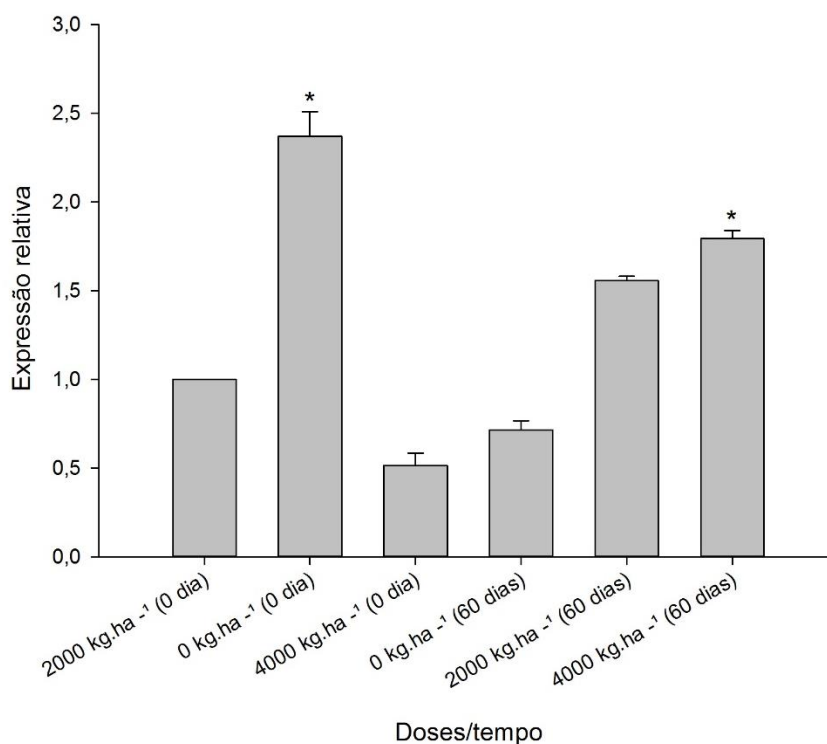
De acordo com resultados encontrados neste trabalho, o gene CHL foi mais expresso em sementes produzidas sem calagem (tempo 0 dia), atingindo uma expressão 2x superior comparado com tratamento-controle, diferindo significativamente (Figura 23). A maior presença das proteínas CHL nas sementes produzidas sem calagem não alterou a germinação e o vigor das sementes de trigo, observando sua maior contribuição na longevidade das sementes (tempo 60 dias), onde a indução do estresse (teste de longevidade) favoreceu os tratamentos 2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup> de calcário.

No período após a deterioração controlada, o tratamento sem calagem reduziu a expressão do gene candidato, havendo um crescimento na expressão dos

tratamentos dose recomendada ( $2000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e dobro da dose recomendada de calcário ( $4000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), diferindo estatisticamente para o tratamento  $4000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ .

Tal resultado pode ser explicado pela diminuição da peroxidação lipídica. Segundo Sarhan e Charron (2003), existem duas proteínas do tipo lipocalina nas plantas, encontradas como enzimas chave do ciclo xantofílico responsáveis pela proteção contra danos oxidativos, a proteína Violaxantina de-epoxidases (VDEs) e a zeaxantina epoxidases (ZEPs). Resultados encontrados por Boca et al. (2014) mostram que as lipocalinas de *Arabidopsis* (TIL e CHL) têm funções sobrepostas na proteção de lipídios que são essenciais para a resistência ao estresse e sobrevivência. Segundo Levesque-Tremblay et al. (2009), o *CHL* parece ser um possível candidato para a remoção destes intermediários de peroxidação lipídica no cloroplasto, mecanismo esse importante para evitar a propagação de danos a outros constituintes, como tilacóides ou outros compartimentos celulares.

Figura 23. Expressão relativa de CHL na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

De acordo com Johnson et al. (2007), dentre os carotenoides, a zeaxantina tem um papel central como protetor lipídico. A zeaxantina faz parte dos carotenoides que

possuem um grupo hidroxila (OH-) ligado aos anéis iononas de cadeia, fazendo parte da biossíntese do ABA.

O efeito positivo dos nutrientes disponíveis em maior quantidade nas sementes produzidas com calagem, apresentando maior expressão do gene CHL e maior longevidade das sementes, está envolvido na rota de biossíntese dos carotenoides, inserida na rota do ABA. O fósforo possui grande participação dentro da via de síntese de ABA (produtos fosforilados) e sua maior concentração nas sementes pode proporcionar maior efeito antioxidantes, mantendo uma maior porcentagem de sementes viáveis após o período de armazenamento.

#### 4.4.4.2 Expressão relativa de *PROTEIN-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE 2* (PIMT2) na longevidade de sementes de trigo

Vários processos fisiológicos e bioquímicos foram identificados durante o envelhecimento artificial das sementes. Por exemplo, o dano oxidativo ao DNA e às proteínas envolvidas no envelhecimento da semente (BAILLY, 2004). A oxidação das proteínas surge principalmente devido a modificações covalentes espontâneas de proteínas existentes, entre tais modificações de proteínas covalentes, está a conversão de resíduos L-aspartil ou asparaginil em resíduos isoaspartil (isoAsp) (OGÉ et al., 2008). As proteínas danificadas que contêm Asp anormal acumulam-se à medida que a semente envelhece, o que pode prejudicar o vigor e a longevidade das sementes (CHEN et al. 2010).

A proteína reparadora, a enzima *protein-L-isoaspartate metiltransferase* (PIMT) limita e repara os danos induzidos pela idade aos resíduos aspartil e asparaginil em proteínas. Segundo Clerckx et al. (2004), as proteínas PIMT são distribuídas em vários compartimentos subcelulares para reparar várias proteínas alvos que podem ser essenciais para preservar a longevidade e alta capacidade de germinação das sementes. Resultados apresentados por Oge et al. (2008) e Verma et al. (2013), demonstram que a sobre-expressão de PIMT1 e PIMT2 aumentou a longevidade da semente de *Arabidopsis* e grão de bico, respectivamente.

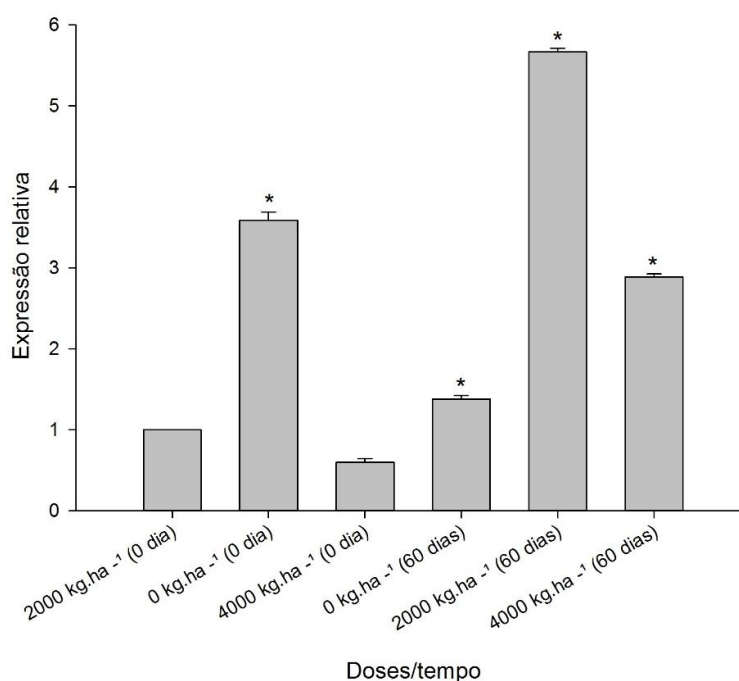
A expressão do gene PIMT2 foi 3x superior no tratamento sem calagem (0 dia) em comparação com o tratamento-controle (Figura 24), não alterando a germinação e

vigor das sementes de trigo, devido a maior resposta da enzima reparadora serem observadas em condições de estresse (estresse nutricional), onde as proteínas L-aspartil ou asparaginil sofrem oxidação.

Observando os resultados obtidos após o início do teste de longevidade (60 dias), as enzimas *protein-L-isoaspartate metiltransferase* (PIMT) aumentaram sua atividade nas sementes. A expressão do gene PIMT2 foi 5x superior no tratamento dose recomendada, em comparação com o tratamento controle. Os tratamentos sem calagem e o dobro da dose recomendada ( $4000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) também apresentaram elevação na expressão do gene diferindo significativamente do tratamento controle.

A calagem proporcionou maior expressão do gene em condições de estresse em sementes de trigo, favorecendo uma maior reparação das proteínas oxidadas, resultando em uma maior longevidade das sementes. Segundo (RAJJOU e DEBEAUJON 2008), a atividade de PIMT é mais elevada nas sementes, onde o dano não enzimático à proteína é predominante durante a desidratação na maturidade e durante o armazenamento.

Figura 24. Expressão relativa de PIMT2 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.



No trigo, a transcrição de PIMT aumenta durante o desenvolvimento da cariopse coincidente com aumentos na atividade de *PIMT* (MUDGETT e CLARKE, 1994). O ácido abscísico (ABA) é indicado como regulador comum nessas transcrições, onde também tem sido implicada na regulação da transcrição de PIMT em *Arabidopsis*. A transcrição de ambos os genes (PIMT1 e PIMT2) aumenta durante o desenvolvimento da semente e em resposta ao tratamento com ABA, sendo observado na transcrição de PIMT2 aumento em resposta ao estresse salino e à desidratação, enquanto que *PIMT1* é minimamente afetada pelas tensões (O'CONNOR, 2006).

As sementes produzidas com calagem, apresentaram maior concentração de nitrogênio, responsável pela constituição da *Protein-L-isoaspartate Methyltransferase*, ocorrendo maior reparação de proteínas oxidadas nestes tratamentos, aumentando a viabilidade das sementes após o estresse. O nitrogênio está presente em diversos compostos, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e reguladores de crescimento, todos os quais têm papéis cruciais no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo considerada uma molécula de sinalização que rapidamente desencadeia mudanças na expressão gênica, metabolismo e crescimento em plantas (ALBORESI et al., 2005).

#### 4.4.4.2. Expressão relativa de *TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN ALPHA* (TIP3;1) na longevidade de sementes de trigo

A regulação do movimento da água através das membranas celulares é feita por uma família de proteínas de canal de água chamadas aquaporinas (CHRISPEELS e MAUREL, 1994). As aquaporinas de plantas são parte da grande família de proteínas intrínsecas principais (MIPs), que é subdividida, de acordo com a localização subcelular, em proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP), tonoplast (TIP), nódulosinas (NIP), proteínas básicas pequenas (SIP).

A família TIP consiste em cinco subgrupos, nomeadamente TIP1 ( $\gamma$ -TIP), TIP2 ( $\delta$ -TIP), TIP3 ( $\alpha$ -TIP e  $\beta$ -TIP), TIP4 ( $\epsilon$ -TIP) e TIP5 ( $\xi$ -TIP). As isoformas *TIP* mostram diferentes padrões de expressão temporal e espacial. TIP1s (TIP1; 1 e TIP1; 2) são TIPs vegetativos localizados em vacúolos líticos, enquanto que TIP3s são TIPs

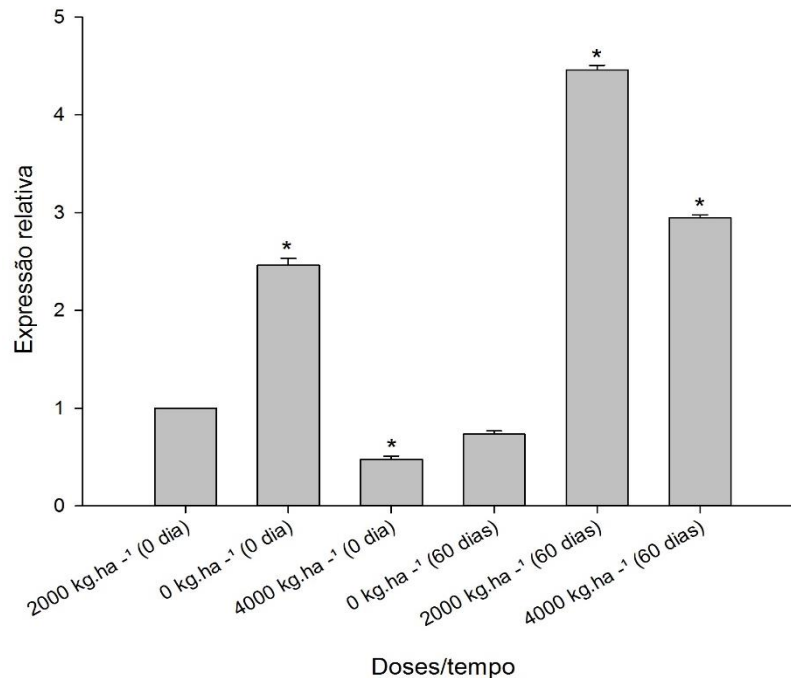
específicos de sementes localizados em vacúolos de armazenamento de proteínas de sementes (PSVs) (HOFTE et al., 1992; LUDEVID et al., 1992; GATTOLIN et al., 2011).

Segundo Johnson et al. (1989), a proteína de membrana vacuolar,  $\alpha$ -TIP (TIP3,1), acumula durante a maturação de sementes em células de parênquima de órgãos de armazenamento de sementes. Foi sugerido um papel na dessecação de sementes, osmorregulação citoplasmática e / ou reidratação de sementes.

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, a maior expressão do gene *TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN ALPHA* (TIP3;1) no tratamento sem calagem (0 dias) pode ter garantido que a germinação e o vigor das sementes de trigo se igualasse aos tratamentos com calagem. Segundo Afzal et al. (2016), os TIPs estão envolvidos na regulação de importantes processos fisiológicos que contribuem para o crescimento das plantas e adaptação aos estresses; tal afirmação é confirmado quando se observa a expressão do gene após 60 dias do teste de longevidade, onde a maior expressão do gene nos tratamentos com calagem (2000 kg.ha<sup>-1</sup> e 4000 kg.ha<sup>-1</sup>) proporcionaram sementes com maior expressão do gene TIP3, resultando em uma maior longevidade (Figura 25).

Os tratamentos dose recomendada (2000 kg.ha<sup>-1</sup>) e o dobro da dose recomendada de calagem proporcionaram expressão 2 e 4x superior ao tratamento controle, respectivamente, diferindo significativamente. De acordo com Mao e Sun, 2015, o gene *ABI3* está envolvido na regulação dos genes que codificam as proteínas intrínsecas tonoplastas TIP3;1 e TIP3; problemas em ambos os genes reduziram a resistência à deterioração controlada, sugerindo que a ABA pode controlar as relações hídricas e a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da modulação *ABI3* das aquaporinas, contribuindo assim para a longevidade da semente (SANO et al., 2016).

Figura 25. Expressão relativa de TIP3;1 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes /doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*

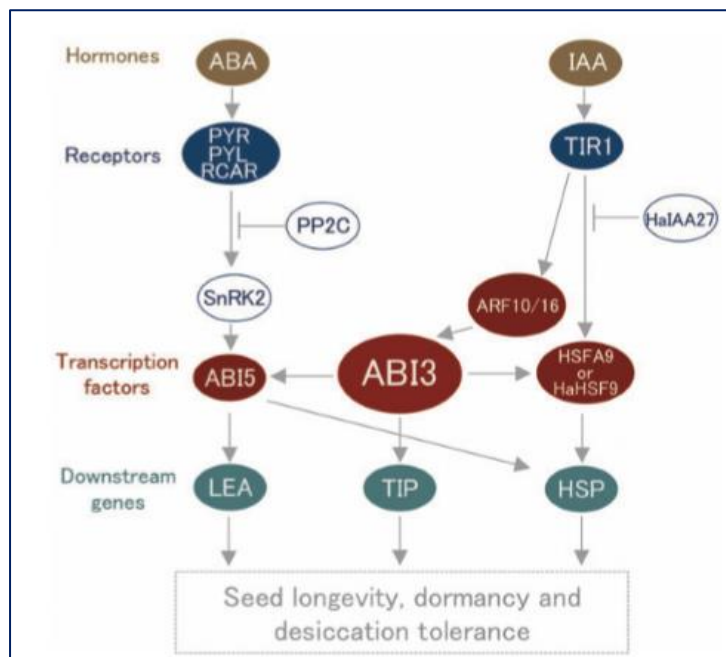


Fonte: próprio autor.

A tolerância ao estresse abiótico em plantas requer um controle eficiente sobre o balanço hídrico para permitir que as atividades fisiológicas continuem em face do estresse (KALDENHOFF et al., 2008). Aquaporinas facilitam o movimento de água e solutos através de diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento e crescimento; não sendo apenas necessário para o crescimento e aumento do tamanho do órgão, mas também para a manutenção ou supressão da condutância hidráulica durante o estresse e recuperação após o estresse (LAUR e HACKE, 2014).

É possível que o fornecimento de nitrogênio dentro da biossíntese da auxina esteja envolvido nos diferentes resultados referente a longevidade e expressão do gene TIP3;1, sendo o hormônio sintetizado a partir do aminoácido triptofano. Como foi comentado, o ABI3 tem importante papel na regulação do TIP3;1 e qualquer defeito em ambos os genes podem diminuir a tolerância da semente ao estresse. A auxina auxilia na regulação da dormência da semente. Em *Arabidopsis*, de acordo com Liu et al. (2013), a auxina regulava positivamente a dormência de sementes antes do fluxo de informação do ABI3, através da regulação mediada pela ABI3 (Figura 26).

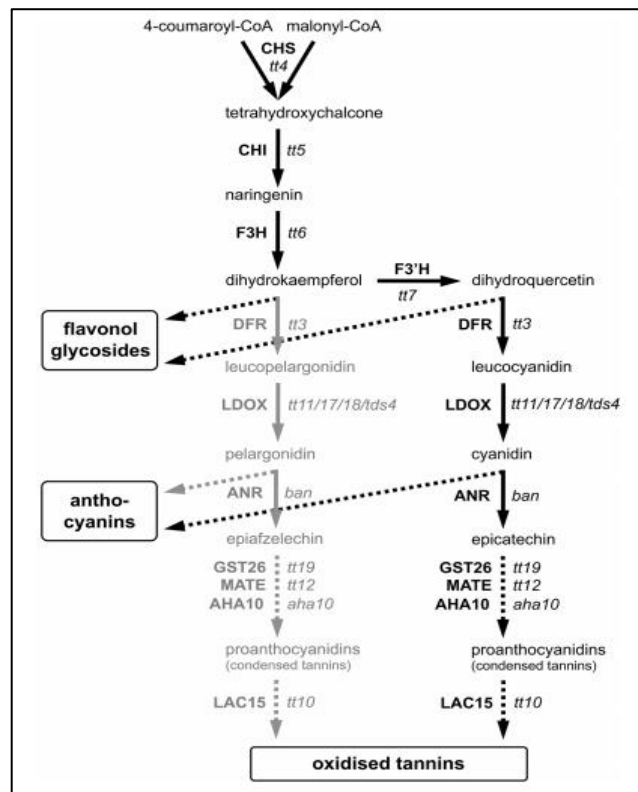
Figura 26 - Modelo esquemático de vias de sinalização ABA na longevidade de sementes, dormência e tolerância à dessecação mediada por ABI3



Fonte: Sano et al., 2016.

#### 4.4.5. Expressão relativa de *TRANSPARENT TESTA 4* (TT4) na longevidade de sementes de trigo

*TRANSPARENT TESTA 4* (TT4) foi identificado em *Arabidopsis thaliana* como o gene que participa na síntese de flavonoides, e assim o mutante deste gene é designado como testa transparente (tt) 4, uma vez que carece de formação de proantocianidinas (PAs) no revestimento de sementes (SAITO et al, 2013). Os flavonoides são metabolitos secundários que desempenham papéis importantes durante todo o ciclo de vida da planta, tendo um papel na defesa contra estresses bióticos ou abióticos e como na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas (PETRONI e TONELLI, 2011; GRUNEWALD et al. 2012). Os flavonoides pertencem a três classes principais: as antocianinas, proantocianidinas e os flavonóis (Figura 27), acumulando nos tecidos vegetativos, nos tegumentos de sementes e em ambos (sementes e tecidos vegetativos), respectivamente.

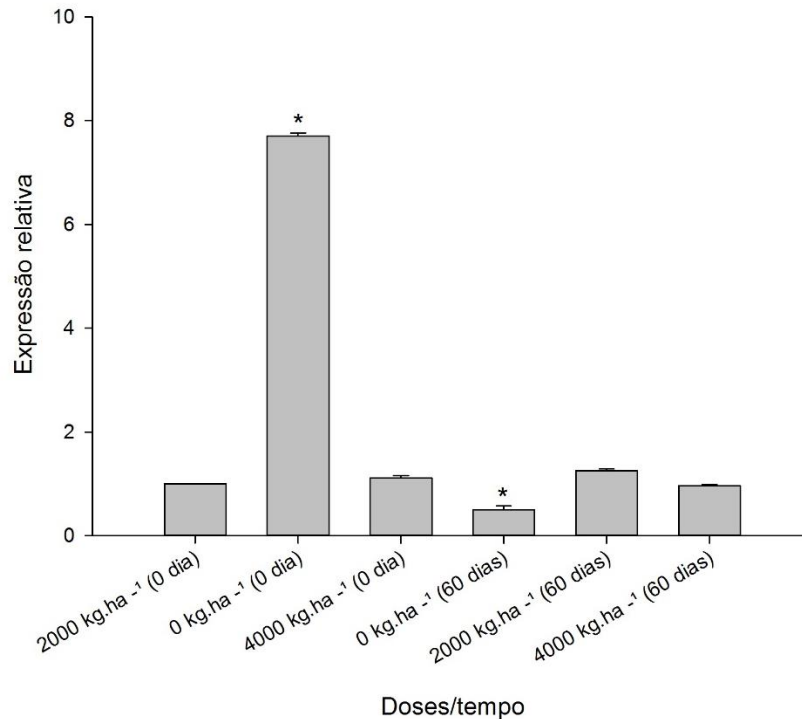
Figura 27 - Biossíntese de flavonoides em *Arabidopsis thaliana*

Fonte: Appelhagen et al., 2014.

Em *Arabidopsis*, os mutantes de *transparent testa* prejudicados no metabolismo de flavonoides apresentaram redução na longevidade de sementes (DEBEAUJON et al. 2000) e uma diminuição da tolerância das plantas ao estresse oxidativo (NAKABAYASHI et al., 2014).

Em sementes de trigo sem estresse (período de 0 dia) houve elevada expressão relativa do gene TT4 no tratamento sem calagem e redução da expressão no tratamento 4000 kg.ha<sup>-1</sup> de calcário em relação ao tratamento controle, diferindo significativamente. Após o estresse realizado pelo teste de longevidade aos 60 dias, observou-se redução da expressão no tratamento sem calagem, não diferindo dos tratamentos sob calagem (Figura 28).

Figura 28. Expressão relativa de TT4 na região embrionária de sementes de trigo produzidas sob diferentes doses de calagem, em 0 e 60 dias do teste de longevidade. Valores significativos estão indicados com um asterisco \*



Fonte: próprio autor.

As diferentes doses de calcário não alteraram a expressão do gene *TT4* sob condições de estresse, podendo concluir que este gene não responde a maior longevidade de sementes de trigo encontrada nos tratamentos sob calagem. Tal resultado pode ser explicado pelo uso da região embrionária das sementes para extração de RNA, não utilizando a testa da semente. Segundo Falcone Ferreyra et al. (2012), os flavonoides acumulam-se a níveis elevados na testa, embrião e, por vezes, na camada de aleurona de sementes de cereais.

## 5. CONCLUSÕES

A ausência da calagem não afeta a porcentagem de germinação e o vigor de sementes recém colhidas de trigo, porém a longevidade é influenciada.

O efeito residual da dose recomendada de calagem é o suficiente para produzir sementes com qualidade fisiológica (germinação, vigor e longevidade), sem a necessidade de aumento de dose.

A expressão dos fatores de transcrição (ABI3, ABI5, HSFA9, HSFA4 e DREB2), dos antioxidantes (VTE1, APX2, SOD1, GST) e das proteínas (CHL, PMIT2, TIP, MT2) coincidem com maior longevidade, quando as sementes foram produzidas em solo submetidos a calagem.

Os genes HSFA9, DREB2, VTE1 e APX2 apresentaram maior expressão nos tratamentos com calagem.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, F. L. et al. Nitrogênio em cobertura e qualidade fisiológica e sanitária de sementes de painço (*panicum miliaceum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 106-115, 2010.
- ABREU, Â. de F. B. Produção de sementes. In: ABREU, Â. F. B.; BIAVA, M. (Ed.). **Cultivo do feijão da primeira e segunda safra na Região Sul de Minas Gerais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005.
- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, 2014.
- AFZAL, Z. et al. The roles of aquaporins in plant stress responses. **Journal of Developmental Biology**, Basel, v. 4, n. 9, p. 1-22, 2016.
- AGARWAL, P., et al. Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 2, p. 1125–1135, 2010.
- AGARWAL, P.K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, V. 25, n. 12, p. 1263–1274, 2006.
- AHN, H. J. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 2, p. 173-178, 2004.
- AKHTAR, M. et al. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. **Journal of Genetics**, v. 91, n. 3, p. 385–395, 2012.
- ALBORESI, A. et al. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. **Plant Cell and Environment**, v. 28, n. 4, p. 500–512, 2005.
- ALMOGUERA C. et al. A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p.43866–43872, 2002.
- ALMOGUERA, C. et al. The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9 **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 75, 2009.
- ARC, E. et al. Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: how quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. **Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 1606–1618, 2011.
- ARTHUR, T. J.; TONKIN, J. H. B. **Testando o vigor da semente**. In: CONGRESSO BRASILEIRO D SEMENTES, 7. 1991, Campo Grande. Informativo Abrates. Campo Grande: Abrates, 1991. p. 38-42.
- ASIF, M. et al. Isolation of highquality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.15, p.5227-5229, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed Vigor Test Committee**. Lincoln: Handbook, 1983. 88p.



- AYDIN, S.; BÜYÜK İ.; ARAS, S. Relationship among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicon esculentum* L. exposed to cold stress. **Genetic and Molecular Research**, v, 12, n. 3, p. 3220– 3229, 2013.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93–107, 2004.
- BAKO, A.; GALL, G.; BALAZS, E. Quantification of transgene expression in maize (*Zea mays* L.) throughout the vegetation period. **Plant Breeding**, Berlin, v. 130, n. 1, p. 41-45, 2011.
- BARBOSA, R. M. et al. Nitrogênio na produção e qualidade de sementes de feijão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 470-474, 2011.
- BARRERO, J. M. et al. Gene expression profiling identifies two regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in Arabidopsis seeds. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 611–622, 2010.
- BARROS, B. et al. In silico characterization and expression analysis of the multigene family encoding the Bowman–Birk protease inhibitor in soybean. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 327–334, 2012.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1- 11, 2009.
- BARTLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from Arabidopsis thaliana: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, n. 2, p. 579-86, 1993.
- BERTRAM, C.; HASS, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 3 , p. 211-220, 2008.
- BEWLEY J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 408 p.
- BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds. Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BOCA, S. et al. Arabidopsis lipocalins AtCHL and AtTIL have distinct but overlapping functions essential for lipid protection and seed longevity. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 2, p. 368–381, 2014.
- BONIFACIO A. et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, n. 10, p. 1705-1722, 2011.
- BORÉM, A.; SCHEEREN, P. L. **Trigo: do plantio à colheita**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2015. 250 p.
- BRANDÃO, S. S.; LIRA, H. L. **Tecnologia de panificação e confeitaria**. Recife: EDUFPE, 2011. 148 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 398 p.
- BRAYBROOK S. A.; HARADA, J. J. LECs go crazy in embryo development. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 624-630, 2008.

- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Chicester: Jonh Wiley and Sons Ltd, 2015. 1280 p.
- BUITINK J.; LEPRINCE O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry State. **Cryobiology**, v. 48, n. 3, p. 215–228, 2004.
- BUSTIN, S. A. et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**, v. 11, p. 74, 2010.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CAIRES, E. F. et al. Surface application of lime ameliorates subsoil acidity and improves root growth and yield of wheat in an acid soil under no-till system. **Scientia Agrícola**, v. 63, n. 5, p. 502- 509, 2006.
- CALLIS, J. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. **The Arabidopsis Book**, v. 12, n., p., 2014.
- CARLES, C. et al. Regulation of Arabidopsis thaliana Em genes: role of ABI5. **The Plant Journal**, v.30, n. 3, p. 373–383, 2002.
- CARMEIS FILHO, A. C. A.; CRUSCIOL, C. A. C.; CASTILHOS, A. M. Liming demand and plant growth improvements for an Oxisol under long-term no-till cropping. **Journal of Agricultural Science**, p. 1-20, 2017.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.
- CASAROLI, D. et al. Testes para determinação do potencial fisiológico de sementes de abóbora. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 337-343, 2009.
- CHARRON, J. B. F. et al. Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. **Plant Physiology**, v. 139, n. 4, p. 2017–2028, 2005.
- CHARRON, J. B. F. et al. The plant apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. **BMC Plant Biology**, v. 8, p.86, 2008.
- CHATELAIN, E. et al. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.
- CHEN, T. et al. Substrates of the *Arabidopsis thaliana* protein isoaspartyl methyltransferase 1 identified using phage display and biopanning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37281–37292, 2010.
- CHENG, M. C. et al. The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Regulates Abiotic StressResponsive Gene Expression by Binding to Different cis-Acting Elements in Response to Different Stress Signals. **Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 1566–1582, 2013.
- CHEW O.; WHELAN, J.; MILLAR A. H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46869-46877, 2003.

CHI, W-T. et al. Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in Arabidopsis. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 7, p. 917–927, 2009.

CHINI, A. et al. Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. **Plant Journal**, v. 38, n. 5, p. 810–822, 2004.

CHRISPEELS, M. J.; MAUREL, C. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. **Plant Physiology**, v. 105, n. 1, p. 9–13, 1994.

CHRONOPOULOU, E.G.; LABROU, N.E. Glutathione transferases: Emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 211–223, 2009.

CLERKX, E. J. M. et al. Genetic differences in seed longevity of various Arabidopsis mutants. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 3, p. 448–461, 2004.

COBBETT, C.S; GOLDSBROUGH, P.B. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p.159-182, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos. **CONAB**, Brasília, v. 4, n. 6, p. 1.176, 2017.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007, 1002 p.

CUMMINS, I. et al. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p. 266–280, 2011.

CUMMINS, I.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. **The Plant Journal**, v.18, n. 3, p. 285–292, 1999.

DAVE, A. et al. 12-Oxo-Phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 2, p. 583-599, 2011.

DEBEAUJON I.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 403–413, 2000.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos Essenciais e Benéficos às Plantas Superiores. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006. p. 1-6.

DELLAPENNA, D.; LAST, R.L. Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 3, p. 356–368, 2006.

DELOUCHE, J. C. Seed maturation. In: **HANDBOOK of seed technology**. Mississipi: Mississipi State University, 1971. p. 17-21.

DELOUCHE, J.C. Environmental effects on seed development and seed quality. **Hort Science**, v. 15, n. 6, p. 775-780, 1980.

DEMIR, I. Prediction of germination and vigour in naturally aged commercially available seed lots of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) using the bulk

conductivity method. **Seed Science and Technology**, Wallingford, v. 36, n. 3, p. 509-523, 2008.

DEMIR, I.; ELLIS, R. H. Changes in seed quality during seed development and maturation in tomato. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 2, p.81-87, 1992.

DIAZ-VIVANCOS, P. et al. Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 8, p. 976–895, 2013.

DIXON, D. P.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R.. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 338–350, 2010.

DIXON, J. et al. **Wheat facts and futures**. (eds.) Mexico: CIMMYT. 2009. 105 p.

DOMINICIS, B. B. et al. Adubação nitrogenada, potássica e fosfatada na produção e germinação de sementes de capim quicuío-da-amazônia. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 59-65, 2010.

DUBEY, N. et al. Comparative transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* L. in response to sap sucking insects: aphid and whitefly. **BMC Genomics**, n. 14, p. 241, 2013.

DUBOUZET, J.G. et al OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-, and coldresponsive gene expression. **Plant Journal**, v. 33, n. 4, p. 751–763, 2003.

DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, n. 1, p. 14-18, 1991.

EDWARDS, R.; DIXON, D.P.; WALBOT, V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. **Trends Plant Science**, v 5, n. 5, p. 193-198, 2000.

EISENREICH, W. et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 12, p. 1401-1426, 2004.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D. Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-Moisture content relationships in hermitic storage. **Annals of Botany**, v. 97, n. 5, p. 785-791, 2006.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, v.45, n. 1, p. 13-30, 1980.

EL-MAAROUF-BOUTEAU H. et al. Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. **Frontiers of Plant Science**, v. 4, p. 1-5, 2013.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, v 3, n. 3, p. 175–182, 2008.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. Ed. Londrina: Planta, 2006. 403p.

ERDMAN, J. W. Oilseed phytates: Nutritional implications. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 56, n. 8, p. 736-741, 1979.

- ESTÉVEZ, J. M. et al. 1-Deoxy-dxylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22901-22909, 2001.
- FAIZE, M. et al. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. **Journal Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2599–2613, 2011.
- FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Front. Plant Sci**, v. 3, p. 222, 2012.
- FALK, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 6, p. 1549–1566, 2010.
- FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 183p.
- FARAH, S. B. DNA segredos e mistérios. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 538 p.
- FERREIRA, R. A. Trigo: o alimento mais produzido no mundo. **Nutrição Brasil**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 45-52, 2003.
- FERREYRA, F. M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v 3, p. 222, 2012.
- FILHO, F. B. et al. Adubação com fósforo e potássio para produção e qualidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 783-790, 2013.
- FLOSS, E. L. **Fisiologia das Plantas Cultivadas**: O estudo do que está por trás do que se vê. 4. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo. 2008. 733 p.
- FOYER, C. H; THEODOULOU, F. L; DELROT, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 10, p. 486-492, 2001.
- FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **A importância do uso de sementes de soja de alta qualidade**. Informativo Abrates, Londrina, v. 20, n. 1-2, p. 37-38, 2010.
- FREITAS, R. A.; NASCIMENTO, W. M.; CARVALHO, S. I. Produção de sementes. In: RIBEIRO, C. S.; LOPES, A. C.; CARVALHO, S. I.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Eds.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 173-187.
- FRENETTE CHARRON, J. B. et al. Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. **FEBS Letters**, v. 517, n. 1-3, p. 129–132, 2002.
- GATTOLIN, S.; SORIEUL, M.; FRIGERIO, L. Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating Arabidopsis seeds reveals dual localization of embryonic TIPs to the tonoplast and plasma membrane. **Molecular Plant**, v. 4, n. 1, p. 180–189, 2011.
- GEMAYEL, R. et al. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 445-477, 2010.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GIORGI, J. et al. An endosperm-associated cuticle is required for Arabidopsis seed viability, dormancy and early control of germination. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 12, p. 1-32, 2015.

GIRAUDAT, J. et al. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. **Plant Cell**, v. 4, n. 10, p. 1251–1261, 1992.

GIURIZATTO, M. I. K. et al.  $\alpha$ -Tocopherol levels in natural and artificial aging of soybean seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 3, p. 339-343., 2012.

GOEL, A.; GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal Plant Physiology**, Toronto, v. 160, n. 9, p. 1093-1100, 2003.

GOLLDACK, D.; LÜKING, I.; YANG, O. Plant tolerance to draught and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 8, p. 1389–1391, 2011.

GOMES JUNIOR, F. G.; SÁ, M. E. Proteína e qualidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em função da adubação nitrogenada em plantio direto. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1 p. 34-44, 2010.

GRFEN, C. et al. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. **Plant Journal**, v 64, n. 2, p. 355-365, 2010.

GRUNEWALD, W, et al. Transcription factor WRKY23 assists auxin distribution patterns during Arabidopsis root development through local control on flavonol biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 5, p. 1554–1559, 2012.

GUTIERREZ, L. et al. Combined networks regulating seed maturation. **Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 294-300, 2007.

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKI, T. T. **Seed biology**, New York, v. 3, p. 145-245, 1972.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M.. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852–1858, 2002.

HASLEKAS, C. et al. ABI3 mediates expression of the peroxiredoxin antioxidant AtPER1 gene and induction by oxidative stress. **Plant Molecular Biology**, v. 53, n. 3, p. 313–326, 2003.

HASSINEN, V. H. et al. Plant metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity?. **Plant Biology**, v. 13, n. 2, p. 225–232, 2011.

HAYAKAWA, T.; TOMA, Y.; IGAUE, I. Purification e characterization of acid phosphatases with or without phytase activity from rice bran. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 6, p. 1475-1483, 1989.

HERNANDEZ, M. et al. A rapeseed specific gene, Acetyl-CoA Carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of

- transgenes from mixed food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 3622-3627, 2001.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431–437, 2001.
- HOFTE, H. et al. Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 99, n. 2, p. 561–570, 1992.
- HOLDSWORTH, M.; KURUP, S.; McKIBBIN, R. Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. **Trends Plant in Science**, v. 4, n. 7, p. 275–280, 1999.
- HU, D. et al. Spatial and temporal nature of reactive oxygen species production and programmed cell death in elm (*Ulmus pumila* L.) seeds during controlled deterioration. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 11, p. 2045–2059, 2012.
- HUANG, J. et al. A TFIIIA type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 3, p. 337–350, 2012.
- HUNDERTMARK M. et al. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 21, n. 3, p. 165–173, 2011.
- IMAMURA, K. et al. Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, 2, p. 266–274, 2003.
- INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Seed vigour testing**. In: International Rules for Seed Testing. Zurich: ISTA, 2014. p. 1-15.
- JI, W. et al. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1173-1179, 2010.
- JIN, J. et al. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 1182-1187, 2014.
- JO, Y.; HYUN, T. K. et al. Genome-wide identification of antioxidant component biosynthetic enzymes: comprehensive analysis of ascorbic acid and tocopherols biosynthetic genes in rice. **Computational Biology and Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 261–268, 2011.
- JOHNSON, K. D.; HERMAN, E. M.; CHRISPPEELS, M. J. An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. **Plant Physiology**, v. 91, n. 3, p. 1006–1013, 1989.
- JOHNSON, M. P. et al. Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of *Arabidopsis* to photo oxidative stress by a lipid-protective, antioxidant mechanism. **The Journal Biological Chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22605–22618, 2007.
- JOOSEN, R. V. L. et al. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148–159, 2010.

JOSHI, A. K. et al. Stay green trait: variation, inheritance and its association with spot blotch resistance in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 153, n. 1, p. 59-71, 2007.

KALDENHOFF, R. et al. Aquaporins and plant water balance. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 5, p. 658–666, 2008.

KAMPANIS, S. C. et al. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. **Journal Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29207-29216, 2000.

Kilian, J. et al. Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. **Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 166–175, 2012.

KILILI, K. G. et al. Differential roles of Tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. **Journal Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24540-24551, 2004.

KISA, D. et al. Expression analysis of metallothioneins and mineral contents in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under heavy metal stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 6, p. 1916–1923, 2017.

KOTAK, S. et al. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 182–195, 2007.

KRANNER, I. et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 12, p. 2155–2165, 2006.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **The New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.

KROJ. T. et al. Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. **Development**, v. 130, 24, p. 6065–6073, 2003.

KUHLEMEIER, C.; GREEN, P. J.; CHUA NAM-HAI. et al. Regulation of gene expression in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 221-257, 1987.

KUMAR, G. et al. Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of OsMT1e-P confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 107, 2012.

KUMAR, S. J. et al. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015.

LAJOLO, F. M. Beneficial (antiproliferative) effects of different substances. In: MUZQUIZ, M. et al. (Ed.) **Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds**. Wageningen: Wageningen Academic, 2004. p. 123-135.

LANDJEVA, S.; LOHWASSER, U.; BÖRNER, A. Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. **Euphytica**, v. 171, n. 1, p. 129–143, 2010.



- LAUR, J.; HACKE, U. G. The Role of Water Channel Proteins in Facilitating Recovery of Leaf Hydraulic Conductance from Water Stress in *Populus trichocarpa*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 111751, 2014.
- LEITE, R. F. C. et al. Rendimento e qualidade de sementes de arroz irrigado em função da adubação com boro. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 785-791, 2011.
- LEOPOLD, A. C.; SUN, W. Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds analysis and function. **Seed Science Research**, v. 4, p. 267-274, 1994.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: From genomics to the field. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 554–564, 2010.
- LESZCZYSZYN, O. I.; IMAM, H. T.; BLINDAUER, C. A. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1146–1169, 2013.
- LEVESQUE-TREMBLAY, G.; HAVAUX M.; OUELLET, F. The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects *Arabidopsis* against oxidative stress. **Plant Journal**, v. 60, n. 4, p. 691–702, 2009.
- LI Y. et al. The current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 9, p. 1057–1069, 2008.
- LIMA, E. V. et al. Características agronômicas, produtividade e qualidade fisiológica da soja “safrinha” sob semeadura direta, em função da cobertura vegetal e da calagem superficial. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 69-80, 2009.
- LIMA, E. V.; CRUSCIOL, C. A. C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Características agronômicas, produtividade e qualidade fisiológica da soja “safrinha” sob semeadura direta, em função da cobertura vegetal e da calagem superficial. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.069-080, 2009.
- LISCH, D. How important are transposons for plant evolution?. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, p. 49-61, 2013.
- LIU, H. T. et al. Primary evidence for involvement of IP3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. **Cell Research**, v. 16, p. 394–400, 2006.
- LIU, J. et al. Copper-induced hydrogen peroxide upregulation of metallothionein gene, *osMT2c*, from *Oryza sativa* L. confers copper tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 294, p. 99–108, 2015.
- LIU, L. et al. PSI: a comprehensive and integrative approach for accurate plant subcellular localization prediction. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 75826, 2013.
- LIU, X. et al. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 38, p. 15485–15490, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

- LOMBARDI NETO, F.; DRUGOWICH, M. **Manual técnico de manejo e conservação de solo e água**. Campinas: CATI, v.2, 1994. 168p.
- LONG, L. R. et al. Soil type not effect seed ageing when soil water potencial and temperature are controlled. **Plant Soil**, v. 320, n. 1-2, p. 131-140, 2009.
- LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. 2007. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: Novais et al. (Eds). **Fertilidade do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa-MG, p. 1-64.
- LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; CHUA, N. H. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4782–4787, 2001.
- LUDEVID, D. et al. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein gamma-TIP in Arabidopsis thaliana is correlated with cell enlargement. **Plant Physiology**, v. 100, n. 4, p. 1633–1639, 1992.
- MACKAY, I. M. et al. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries. In Mackay, I. M. et al (Ed.). **Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization** . Caister Academic Press Norfolk, 2007, p. 1-40.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Ácido abscísico e o estresse abiótico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado 2010; p. 1-29.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177. 1962.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. 1. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p
- MANNING, K. Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 195, n. 1, p. 45-50, 1991.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 .ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 660 p.
- MARNETT, L. J.; RIGGINS, J. N.; WEST, J. D.; J. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 583-593.
- MARUYAMA, K. et al. Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. **DNA Research**, v. 19, n. 1, p. 37-49, 2012.
- MELARATO, M. et al. Manganês e potencial fisiológico de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1069-1071, 2002.
- MENDES, R. C. et al. Testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 114-120, 2010.
- MEURER, E. J. Potássio. In: MANILO SILVESTRE, F. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2006. p. 281-298.

- MILLER, G.; MITTLER, R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?. **Annals of Botany**, v. 98, n. 2, p. 279–288, 2006.
- MISHKIND, M. et al. Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP accumulation at the plasma membrane and nucleus. **Plant Journal**, v. 60, n. 1, p. 10–21, 2009.
- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459–481, 2007.
- MORIMOTO, R. I. et al. Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In MORIMOTO, R. I.; TISSIERES, A.; GEORGOPOULOS, C. (eds), **Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones**. New York: Cold Spring Harbor, p. 417–455.
- MUDGETT, M. B.; CLARKE, S. Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25605–25612, 1994.
- MUNNS, R.. Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities. **Advances in Botanical Research**, v. 57, n. 1, p. 1–32, 2011.
- MURTHY, U. N.; SUN, W. Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal Experimental Botany**, v. 51, n.348, p. 1221–1228, 2008.
- NAJAMI N. et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, n. 2, p. 171–182, 2008.
- NAKABAYASHI, K. et al. Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **Plant Journal**, v. 41, n. 5, p. 697–709, 2005.
- NAKABAYASHI, R. et al. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. **Plant Journal**, v 77, n. 3, p. 367–379, 2014.
- NASCIMENTO, W. M. **Hortaliças: Tecnologia de produção de sementes**. 1. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011. 316 p.
- NASCIMENTO, W. M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 432 p.
- NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4n.23, p.12–18, 2001.
- NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 147, n.3, p. 1251–1263, 2008.
- NOCTOR, G. et al. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 841–850, 2002.

NOCTOR, G; FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–279, 1998.

NORMANLY J; BARTEL B. Redundancy as a way of life- IAA metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 207-231, 1999.

NORTH, H. et al. Arabidopsis seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research. **Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 971–981, 2010.

O'CONNOR, C. M. Protein L-isoaspartyl, D-aspartyl O-methyltransferases: catalysts of protein repair. In: CLARKE, S. G.; TAMANOI, F. **The Enzymes**, Boston: Elsevier Inc., p. 385–433.

OGÉ L. et al. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 20, n. 11, p. 3022–3037, 2008.

OLIVEIRA, O. S. **Tecnologia de sementes florestais: espécies nativas**. Curitiba: UFPR, 2012. 404 p.

OOMS, J. J. J. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). **Plant Physiology**, v. 102, n. 4, p. 1185–1191, 1993.

PAPENBROCK, J.; SCHMIDT, A. Characterization of a sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 145-154, 2000.

PAPENBROCK, J.; SCHMIDT, A. Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5571-5579, 2000.

PARCY, F. et al. The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3 and LEAFY COTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. **Plant Cell**, v. 9, n. 8, p. 1265–1277, 1997.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, n. 3, p.324-349, 2005.

PATERO, T.; AUGUSTO, P. E. D. Ultrasound (US) enhances the hydration of sorghum (*Sorghum bicolor*) grains. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 11-15, 2015.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**, New York: Springer, 332 p.

PERSONAT, J. M. et al. Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 56, 2014.

PETRONI, K.; TONELLI, C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 219–229, 2011.

PFAFFL, M. W. et al. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36, 2002.

- PILON, M.; RAVET, K.; TAPKEN, W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 8, p. 989-998, 2011.
- PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. **Trigo no Brasil: bases para a produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. 488p.
- PRANDO, A. M. et al. Formas de ureia e doses de nitrogênio em cobertura na qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n 2, p. 272-279, 2012.
- PRIETO-DAPENA, P. et al. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1102–1112, 2006.
- PROBERT, R. J., DAWS, M. I.; HAY, F. R. Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. **Annals of Botany**, v. 104, n. 1, p. 57–69, 2009.
- QI, W. et al. Pretreatment with low-dose gamma irradiation enhances tolerance to the stress of cadmium and lead in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 243–249, 2015.
- RAIJ, B. V. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: IAC, 2001. 285p.
- RAJJOU L. et al. Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 620–641, 2008.
- RAJJOU, L. et al. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 507–533, 2012.
- RAJJOU, L. et al. The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1598–1613, 2004.
- RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 796-805, 2008.
- RIGHETTI, K. et al. Inference of longevity-related genes from a robust co-expression network of seed maturation identifies new regulators linking seed storability to biotic defense-related pathways. **Plant Cell**, v. 27, n.10, p. 2692–2708, 2015.
- RIPPERT, P. et al. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 92–100, 2004.
- ROBERTS, E. H.; ABDALLA, F. H. The influence of temperature, moisture, and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans and peas. **Annals of Botany**, v. 32, n. 125, p. 97-117, 1968.
- ROSNOBLET, C. et al. The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, v. 51, n. 1, p. 47–59, 2007.

- SÁ, M. E. Importância da adubação na qualidade de sementes. In: SÁ, M.E.; BUZETTI, S. (Coords.). **Importância da adubação na qualidade dos produtos agrícolas**. São Paulo: Ícone, 1994. p. 65.
- SAITO K. et al. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 21–34, 2013.
- SALUM, J. D. et al. Características químicas e fisiológicas de sementes de feijão em função do teor de fósforo na semente e doses de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n 1, p.140-149, 2008.
- SANO, N. et al. Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. **Plant & Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, 2016.
- SATTLER, S. E. et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **Plant Cell**, v. 16, n. 6, p. 1419–1432, 2004.
- SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.
- SFREDO, G. J.; OLIVEIRA, M. C. N. **Soja: molibdênio e cobalto**. Londrina: Embrapa Soja. (Documentos/Embrapa Soja, 322).
- SHARONI, A. M. et al. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. **Plant Cell Physiology**, v. 52, n. 2, p. 344-360, 2011.
- SHEWRY, P. R. et al. Developing new types of wheat with enhanced health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 25, n. 2, p. 1-8, 2012.
- SLEPER, D. A.; POEHLMAN, J. M. **Breeding field crops**. 5. ed. Ames: Blackwell Pub Iowa, 2006. 424 p.
- SONG, J. et al. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. **Gene**, Amsterdam, v. 482, n. 1-2, p. 34–42, 2011.
- SORATTO, R. P.; CRUSCIOL, C. A. C. Atributos químicos do solo decorrentes da aplicação em superfície de calcário e gesso em sistema plantio direto recém-implantado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 675–688, 2008c.
- SOUSA, D. M. G; MIRANDA, L. N.; OLIVEIRA, S. A. Acidez do Solo e sua Correção. In: NOVAIS R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS/UFV, 2007. p. 205-274.
- SOUTO, P. C. et al. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 151-160, 2008.
- SOUZA, L.C.D. et al. Produtividade e qualidade de sementes de arroz em resposta a doses de calcário e nitrogênio. **Revista Trópica**, v. 4, n. 2, p. 27-35, 2010.
- SUDGEN, D.; WINTER, P. **Molecular Biomethods Handbook**. 2. ed. Humana Press: Springer, 2008. 1124 p.
- SUGLIANI, M. et al. Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants abscisic acid insensitive3-5 (*abi3-5*) and leafy cotyledon1-3 (*lec1-3*). **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 898–908, 2009.

SUGLIANI, M. et al. Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants abscisic acid insensitive3-5 (*abi3-5*) and leafy cotyledon1-3 (*lec1-3*). **New Phytologist**, v.184, p.898–908, 2009.

TA, C. T.; WEILAND, R. T. Nitrogen partitioning in maize during ear development. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 2, p. 443-451, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 764 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2010. 782 p.

TEIXEIRA, F. K. et al. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: Inferences from the rice genome. **Journal of Molecular Evolution**, v. 59, n. 6, p.761-770, 2004.

TEIXEIRA, I. R. et al. Teores de nutrientes e qualidade fisiológica de sementes de feijão em resposta a adubação foliar com manganês e zinco. **Bragantia**, Piracicaba, v.64, n.1, p.83-88, 2005.

TEJEDOR-CANO, J. et al. A passive repression mechanism that hinders synergic transcriptional activation by heat shock factors involved in sunflower seed longevity. **Molecular Plant**, v. 7, n. 1, p. 256–25, 2014.

TEJEDOR-CANO, J. et al. Loss of Function of the HSFA9 Seed Longevity Program. **Plant Cell Environ**, v. 33, n. 8, p. 1408-1417, 2010.

TOMBULOĞLU, H.. Boron induced expression of some stress-related genes in tomato. **Chemosphere**, v. 86, n. 5, p. 433–438, 2012.

TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nucleartranscription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-11, 2014.

TSEGAYE, Y.; SHINTANI, D. K.; DELLAPENNA, D. Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relation to tocopherol biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 913–920, 2002.

TZIN, V.; GALILI, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 956–972, 2010.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em 25 de março de 2017.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, Natick, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

VAZQUEZ, G. H. et al. Produtividade e qualidade fisiológica e composição química de sementes de crame em diferentes doses de fósforo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 707-714, May/June, 2014.

VEIGA, A. D. et al. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 953-960, 2010.

VERDIER, J. et al. A regulatory networkbased approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 757–774, 2013.

- VERMA, P. et al. PROTEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2 is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 1141–1157, 2013.
- VESELOVA, T. V.; VESELOVSKY, V. A.; OBROUCHEVA, N. V. Deterioration mechanisms in air-dry pea seeds during early aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, p. 133–139, 2015.
- VITTI, G. C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 299-396.
- WANG, C. et al. A seed specific AP2-domain transcription factor from soybean plays a certain role in regulation of seed germination. **Science China Crop Life Sciences**, v. 51, n. 4, p.336– 345, 2008.
- WANG, G. et al. Isolation of high quality RNA from cereal seeds containing high levels of starch. **Phytochemical Analysis**, v 23, n. 2, p. 159–163, 2012.
- WANG, J. et al. Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeriagraminis* f. sp. *tritici* using GeneChip. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 381–387, 2012.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews: Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.
- WATERWORTH, W. M. et al. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. **Plant Journal**, v 63, n. 5, p. 848–860, 2010.
- WEI, X. et al. Transcriptome Analysis of *Barbarea vulgaris* Infested with Diamondback Moth (*Plutella xylostella*) Larvae. **PIOS One**, v. 8, n. 9, 2013.
- WILSON, D. O.; McDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, v. 14, p. 269–300, 1986.
- XIA, Y. et al. Cloning and characterization of a type 1 metallothionein gene from the copper-tolerant plant *Elsholtzia haichowensis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1819–1826, 2012.
- XU, L. et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 15, p. 5607-5621, 2011.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in a Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or highsalinity stress. **Plant Cell**, v. 6, n. 2, p. 251-264, 1994.
- YANG, L. T. et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Cambridge, v. 23, n. 10-11, p. 759-763, 2005.
- YANG, Z. et al. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 1, p. 219–229, 2009.
- YAZAWA, K.; TAKAHATA, K.; KAMADA, H. Isolation of the gene encoding carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. **Plant Physiol Biochem**, v. 42, p. 215-223, 2004.



ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica: técnicas de biologia molecular**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014. 403p.

ZHANG, C. et al. Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production. **Plant Journal**, v. 73, n. 4, p. 628–63, 2013.

ZHANG, H. et al. A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. **Journal Experimental Botany**, v. 65, n. 20, p. 5795–5809, 2014.

ZHANG, H. et al. The C2H2-type zinc finger protein ZFP182 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 54, n. 7, p. 500–510, 2012.

ZHOU, Y. et al. Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 235, n. 3, p. 523–537, 2012.

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

ZINSMEISTER, J. et al. ABI5 is a regulator of seed maturation and longevity in legumes. **Plant Cell**, v. 28, p. 2735–2754, 2016.

ZUCARELI, C. et al. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na qualidade fisiológica de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3 p. 480-487, 2012.

ZUCARELI, C. et al. Fósforo na produtividade e qualidade de sementes de feijão Carioca Precoce cultivado no período das águas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2011.