

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE DOIS
GENÓTIPOS DE MILHO À LIMITAÇÃO HÍDRICA**

Rafaela Josemara Barbosa Queiroz

Engenheiro Agrônomo, MSc.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Outubro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE DOIS
GENÓTIPOS DE MILHO À LIMITAÇÃO HÍDRICA**

Rafaela Josemara Barbosa Queiroz

Orientador: **Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta**

Coorientador: **Prof. Dr. José Frederico Centurion**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Agronomia – Área de concentração Produção Vegetal.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Outubro de 2010

Q3a Queiroz, Rafaela Josemara Barbosa
Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica. – Jaboticabal, 2010
xi, 154f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Jairo Osvaldo Cazetta
Coorientador: José Frederico Centurion
Banca examinadora: Manuel Pedro Salema Fevereiro, Carlos Alberto Martinez Y Huaman, Janete Aparecida Desidério, David Arioaldo Banzatto

Bibliografia

1. *Zea mays* 2. Osmoprotetores. 3. Estresse hídrico I. Título. II. Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAELA JOSEMARA BARBOSA QUEIROZ - nascida em São Luis, Maranhão, em 19 de novembro de 1980, é Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Federal Rural da Amazônia – Belém, PA. Título esse concedido em 06 de novembro de 2003. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), participando ativamente em projetos de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental). Obteve título de *Magister Scientiae* pelo programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal. Em Junho de 2006 foi aprovada para Curso de Doutorado na mesma área e instituição em que realizou o Mestrado. Em Março de 2009, foi selecionada e contemplada com bolsa “sandwich” para desenvolver parte da sua tese no exterior por meio do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal Superior (PDDE-CAPES).

A verdadeira beleza da ciência está em saber não saber, em preferir ter mil dúvidas a uma certeza.

Em compreender que os “achados” podem ser relativos, passíveis e mutáveis.

É ter prazer em desvencilhar-se deles, sem medos; pois “saber não é uma supremacia sobre o quê os outros *não sabem*, e sim um asilo dos *achados* de outros”.

E é isso que me instiga a uma incessante busca dos porquês...

Penetrando-me cada vez mais aos meus deslumbramentos e devaneios científicos...

Rafaela Josemara Barbosa Queiroz

(Inverno Jaboticabalense de 2008)

"Entender é sempre limitado. Mas não entender... pode não ter fronteiras..."

[Cecília Meireles]

A Deus, sobretudo, por me conceder
muitas graças! Meu alicerce e alimento diário
de minha alma.

OFEREÇO

À Minha amada Mãe, Mara Inêz, a quem
devo minha vida e tudo que galguei até hoje!
Minha Inspiração, Minha Vida!

Ao meu grande amor, Marcelo (carinhosamente Junior), Aos
meus queridos irmãos Saulo, Paula e Felipe, a minha Vovó Inêz (*in
memoriam*), ao meu Pai José Maria, aos meus “bonsdrastos”:
Arlis e Dulce, aos meus tios, aos primos e aos meus amigos!
Todos! Sempre me instigaram a correr atrás dos meus sonhos e a
não esmorecer frente aos obstáculos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ainda que uma tese seja um trabalho individual, há contribuições de natureza diversa que não podem, nem devem deixar de ser ressaltadas. Por esse motivo, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, meu Pai Celestial e Guia.

À minha família, minha Mãe **Mara Inêz Mascarenhas Barbosa**, meus Irmãos, **Saulo José Barbosa Queiroz** e **Paula Jéssica Chaves da Costa Barbosa**, minha cunhada **Geovanna Oliveira Machado Queiroz** e claro, aos meus filhotes Yorkshires, **Rubisco** e **Susy**, e também meu Pitt Bull **Bb bizon**, meu primogênito. Vocês são as Borboletas do meu Jardim! Passamos pelas crisálidas da vida, mas nós transformamos nossas vidas num imenso, perene e colorido jardim!

Ao meu grande amor, meu marido, **Marcelo Lira Pinheiro**, pelo incentivo, carinho, amizade e amor a mim confiados; principalmente, pela paciência em esperar o término da Pós-Graduação, mostrando-me que seu amor é inabalável e persistente; fazendo-me acreditar que para “estar junto” não-necessariamente se precisa estar perto”. Você é a Ágape da minh’alma...

Ao **Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta** que me norteou desde os tempos de Mestrado, cujo valor e contribuição em minha formação são incalculáveis. Mostrou-me que para orientar, antes de tudo, é necessário ser amigo e ter muita paciência e, principalmente, humildade. Para ele nunca foi um demérito dizer: - Vamos aprender juntos! Pelo contrário, asilou-se de conhecimentos; e isso, para mim, é fazer ciência! O que o faz grande, em todos os aspectos: Número, Gênero e Grau!

Ao **Prof. Dr. José Frederico Centurion** pelas orientações prévias à montagem do ensaio experimental e Coorientação nas pesquisas da tese.

Ao **Prof. Dr. Manoel Pedro Salema Fevereiro** que sempre se mostrou solícito ao pedido do doutoramento “sandwich”, sobretudo a sua receptividade em realizar parceria com Instituições acadêmico-científicas brasileiras, bem como o quadro de Investigadores Científicos do LBCV.

Ao **Prof. Dra. Mara Cristina Pessoa da Cruz**, pelo auxílio e interpretação das análises de solo, bem como implantação do manejo nutricional do experimento.

Aos Pesquisadores, **Dr. Eniel David Cruz** e **Dr. Moacyr B. Dias-Filho** da Embrapa Amazônia Oriental, meus queridos e eternos orientadores, mestres e amigos, a quem sempre disponho para conselhos profissionais e pessoais, responsáveis pelos meus “despertar” e “aguçar” à pesquisa científico-acadêmica.

Aos “irmãozinhos” de Pós-Graduação da Unesp/FCAV, **Marcos Donizete Revoredo** e **Helen Cristina de Arruda Rodrigues**, e ao antigo orientado e “escragiário” **Guilherme Batista do Nascimento (Power)**, às estudantes de graduação, **Jacqueline Nayara Ferraça Leite (Abafa)**, **Cilene Cristina Mathias Mazzarelli (Dou-méstica)**, **Nayara Patrícia Morotti (Philco)**, **Mariana Gianneschi Demetrio (Mariza, Mãe)**, **Amanda de Faria Santos (Dou-rada)** e **Jaqueline Cristina Fernandes (Sinistra)**, pela solicitude durante a condução do ensaio experimental e análises, convívio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Análises Química e Bioquímica de Plantas (Unesp/FCAV), sempre dispostos a deixar a realização das tarefas mais prazerosa e menos maçante.

Aos amigos decênios **Maria das Graças Sant’Anna Ferreira dos Santos**, **Poliana Bento Bejo Altafim**, **Juliana Regina Rossi**, **Milena do Nascimento** e suas respectivas famílias e a **Família Valadão**. Que nunca deixaram esmorecer os laços de amizade.

Às minhas queridas irmãs e (ex) companheiras da república “Farfaruei”, **Vanessa Cristiane Vollet; Natacha Deboni Cereser; Fernanda Malva Ramos Costa; Juliana Moraes Boldini; Johanna Ramírez Díaz; Sônia Regina Alves Tagliari; Greicy Mitzi Bezerra Moreno; Meire Aparecida Silvestrini Cordeiro; Verónica Gonzalez Cadavid; Ludmilla Carregari** e à agregada *mor* **Samira Domingues Carlin Cavallari** pela amizade, incentivo, convivência alegre, paciência mútua, descobertas, pelos sorrisos e situações inusitadas, porém, divertidas, compartilhadas; pelo apoio nos momentos mais difíceis durante a conclusão do Mestrado e andamento do Doutorado. Saibam que mesmo em um lugar muito, muito longe, sempre me lembrarei dos anos, meses, dias, horas, segundos partilhados com vocês!

À **Família Vollet**, minha segunda família, que amenizaram a saudade de minha casa, deixando-me fazer parte das suas vidas! Temos um laço afetivo que nem o tempo e o espaço o desatarão.

A todos meus amigos e colegas do curso de Pós-Graduação, pela troca de experiências, ensinamentos e bons momentos partilhados.

Aos meus primeiros alunos de graduação, **Turma Bio08** da **Unesp/FCAV**, que foram pacientes em assistir aulas de uma eterna aprendizagem! Porém, que responderam, grandiosamente, às exigências da **disciplina de Química I**; saibam que vocês tornaram-me uma pessoa melhor e que houve um aprendizado mútuo! Espero ter despertado em vocês o gosto em obter mais e mais conhecimento!

Aos funcionários da Unesp/FCAV, pelo apoio infra-estrutural .

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp/FCAV), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Produção Vegetal (PG/PV), bem como seu corpo docente, pela oportunidade e contribuição em minha formação profissional e aos Departamentos de Tecnologia e

Biologia Aplicada à Agropecuária pelo apoio e uso infra-estrutural para realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos de doutoramento no Brasil e pela bolsa "sandwich" para estágio no Exterior.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, se não tivesse amor, nada seria... agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido... Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor. (1 Cor-13, 2;12-13)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY	xi
CAPÍTULO 1: Considerações Gerais	04
CAPÍTULO 2: Reação osmoprotetora na germinação de sementes de milho sob crescente potencial hídrico.....	18
2.1. Introdução.....	20
2.2. Material e Métodos.....	21
2.3. Resultados e Discussão.....	24
2.4. Conclusões.....	35
2.5. Referências Bibliográficas.....	35
CAPÍTULO 3: Tolerância de dois híbridos de milho à seca	39
3.1. Introdução.....	41
3.2. Material e Métodos.....	43
3.3. Resultados e Discussão.....	48
3.4. Conclusões.....	63
3.5. Referências Bibliográficas.....	64
CAPÍTULO 4: Quantificação da expressão gênica relativa do milho em resposta à disponibilidade hídrica no solo por meio de qRT-PCR.....	70
4.1. Introdução.....	72
4.2. Material e Métodos.....	76
4.3. Resultados e Discussão.....	89
4.4. Conclusões.....	113
4.5. Referências Bibliográficas.....	113
Considerações finais.....	118
APÊNDICE.....	119

RESPOSTA FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE DOIS GENÓTIPOS DE MILHO À LIMITAÇÃO HÍDRICA

RESUMO – Nesta pesquisa foi avaliado o metabolismo de dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) ao estresse hídrico e a correlação entre o teor de compostos responsáveis pela aclimação à limitação hídrica desses genótipos na germinação e no estágio vegetativo. Foram instalados dois experimentos. Inicialmente, um ensaio de germinação foi montado com o objetivo de verificar a tolerância de dois genótipos de milho, DKB 390 e DAS 2B710 ao déficit hídrico e de quantificar a prolina e a trealose nos tecidos endospermático e embrionário com intuito de descrever as suas funções fisiológicas na germinação. O segundo avaliou o ajustamento osmótico através das respostas bioquímicas e fisiológicas e moleculares de dois híbridos de milho sob duas disponibilidades hídricas no solo, em um latossolo vermelho. A partir desses resultados, verificou-se a tolerância destes híbridos a seca nesse estágio e o reflexo da expressão relativa de genes relacionados à síntese de solutos compatíveis em resposta à limitação hídrica no solo.

Palavras-Chave: *Zea mays*, solutos compatíveis, expressão gênica relativa, mRNA, tolerância, seca.

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR RESPONSE OF TWO MAIZE GENOTYPES TO WATER RESTRICTION

SUMMARY – The metabolism of maize genotypes (*Zea mays* L.) to soil water availability and the correlation between the content of compounds responsible for this acclimation to water limitation of these genotypes at the germination and the silking stage. Two experiments were carried out. First, the germination test was evaluated the tolerance of two genotypes of maize, DKB 390 and DAS 2B710 to water available and also to quantify the proline and trehalose in the endosperm and embryonary axis tissues with the aim of describe their physiological functions in germination. The second assay it was examined the osmotic adjustment through biochemical and physiological responses of two hybrids growing in two soil water availability. The results of that experiment, checking the degree of tolerance of these hybrids and the reflection of the gene expression related to synthesis of these compatible solutes in response to soil water availability.

Keywords: *Zea mays*, compatible soluble, relative gene expression, mRNA, tolerance, drought

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.), uma das gramíneas de maior importância econômica do mundo, é cultivado em países de clima tropical, subtropical e de clima temperado com verões quentes.

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica (seca) é um dos principais problemas da agricultura e a habilidade das plantas para resistir a tal estresse é de suma importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país. Estudos de tolerância à seca envolvendo o milho podem trazer melhorias no crescimento e no rendimento da cultura em regiões com limitação hídrica, já que o milho é conhecido pela sua alta sensibilidade a este estresse.

Grandes avanços em estudos sobre melhoramento do milho para a seca têm trazido resultados satisfatórios, gerando genótipos tolerantes. Contudo, pouco é conhecido sobre os mecanismos fisiológicos para a tolerância à seca. Nesse sentido, a caracterização dos materiais genéticos, assim como a elucidação dos possíveis mecanismos responsáveis pelo comportamento diferencial de genótipos sob condição de estresse, pode facilitar o processo de geração de novos materiais genéticos, além de contribuir para o desenvolvimento de técnicas de seleção que podem reduzir o tempo e o trabalho para avaliação de fontes genéticas de tolerância ao estresse hídrico.

Diante do exposto, é importante que se estude o acúmulo de solutos compatíveis e a expressão gênica de enzimas-chaves que regulam a biossíntese desses compostos e se estes influenciam na tolerância de plantas de milho submetidas a condições subótimas de água disponível no solo.

1.2. Revisão de Literatura:

1.2.1. O cultivo do milho propenso à limitação hídrica no solo

Previsões meteorológicas, através de projeções de modelos de simulação climática, indicam um aumento do aquecimento global nas próximas décadas, sendo esperada até o final do século XXI, uma variação de 1,4 a 5,8 °C na temperatura. Em decorrência disso, fenômenos como as secas são eminentes. Estima-se que este aquecimento reduzirá em 20% a disponibilidade de água, não apenas nas zonas propensas à seca, mas também nas regiões tropicais e subtropicais. Posto isso, deduz-se que uma grave crise hídrica é esperada, pois a falta de água dificultará o aumento da área agrícola irrigada e, conseqüentemente, a produção de alimentos, não havendo água suficiente para a agricultura, que é responsável por 70% do consumo mundial (Revisado por VIDAL et al., 2005).

De acordo com o cenário traçado pelos especialistas, as grandes culturas terão suas áreas de cultivo reduzidas praticamente pela metade quando a temperatura média da Terra estiver 5,8 °C acima da atual, situação prevista para ocorrer num prazo de 50 a 100 anos (TILMAN et al., 2001).

O milho é cultivado em regiões cuja precipitação varia de 300 a 5.000 mm anuais, sendo que a quantidade de água consumida por uma planta, durante o seu ciclo, está em torno de 600 mm, apresentando relativa tolerância à limitação hídrica durante a fase vegetativa. Porém, apresenta extrema sensibilidade na fase reprodutiva. Dois dias de estresse hídrico no florescimento diminuem o rendimento em mais de 20%, e quatro a oito dias no estágio de enchimento de grãos diminuem em mais de 50%. O aumento na deposição de matéria seca nos grãos está intimamente relacionado à fotossíntese e, uma vez que o estresse afeta este processo, reduz a produção de

carboidratos, implicando em menor acúmulo de matéria seca nos grãos (MAGALHÃES et al., 2002).

Na maioria das áreas cultivadas com milho no mundo, a ocorrência de seca ou períodos de estresse hídrico são fatores abióticos causadores de substanciais reduções na produtividade. No Brasil, as áreas cultivadas com milho são predominantemente desenvolvidas sem irrigação e mesmo em anos regulares de precipitação pluvial observam-se, normalmente, perdas na produção em virtude de períodos de estiagem denominados “veranicos”. As oscilações nas safras de milho, das principais regiões produtoras do Brasil, estão associadas à disponibilidade de água, sobretudo no período crítico da cultura. Por isso é fundamental avaliar os efeitos da disponibilidade hídrica durante todo ciclo da cultura. Os efeitos dos fatores climáticos no crescimento e desenvolvimento, assim como, a partição de assimilados entre os órgãos são importantes nas taxas de crescimento da cultura (MAGALHÃES et al., 2009).

O solo e a atmosfera são os constituintes físicos do ambiente no qual a maioria das espécies vegetais de interesse agrônomo cresce e se desenvolve. São eles que fornecem, de forma natural, as substâncias necessárias ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas, regulando a magnitude desses processos com o concurso da energia disponível no meio (ANGELOCCI, 2002). A restrição causada pela baixa disponibilidade de água do solo ou pela alta demanda evaporativa acionam certos mecanismos bioquímico-fisiológicos que permitem aos vegetais tolerar essas limitações climáticas. Dentre os mecanismos que contribuem para a tolerância à seca, os que têm sido discutidos pela comunidade científica é o ajustamento osmótico. Esse, por sua vez, inclui adaptações fisiológicas e bioquímicas de mecanismos que mantêm o turgor celular em condições de baixo potencial hídrico celular, pelo acúmulo e translocação de solutos compatíveis nas células (VERSLUES et al., 2006).

1.2.2. Resposta de plantas ao déficit hídrico: aspectos bioquímico-fisiológicos e moleculares

O estresse é geralmente definido como um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Esse conceito está intimamente associado com tolerância ao estresse, que é a capacidade da planta para enfrentar as condições desfavoráveis. Já a tolerância à seca é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável. Se a tolerância aumenta como consequência da exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está aclimatada (TAIZ & ZEIGER, 2010).

Em ambas as condições, naturais e agrícolas, fatores ambientais, como temperatura do ar, podem tornar-se estressantes em apenas alguns minutos. Conteúdo de água no solo pode levar dias ou semanas, enquanto que outros fatores como a deficiência mineral do solo, podem levar meses para se tornar estressantes. Respostas celulares ao estresse podem incluir mudanças no ciclo e divisão celular, as membranas celulares, a arquitetura da parede celular e metabolismo, por exemplo, a acumulação de substâncias osmoticamente ativas (BRAY et al., 2001).

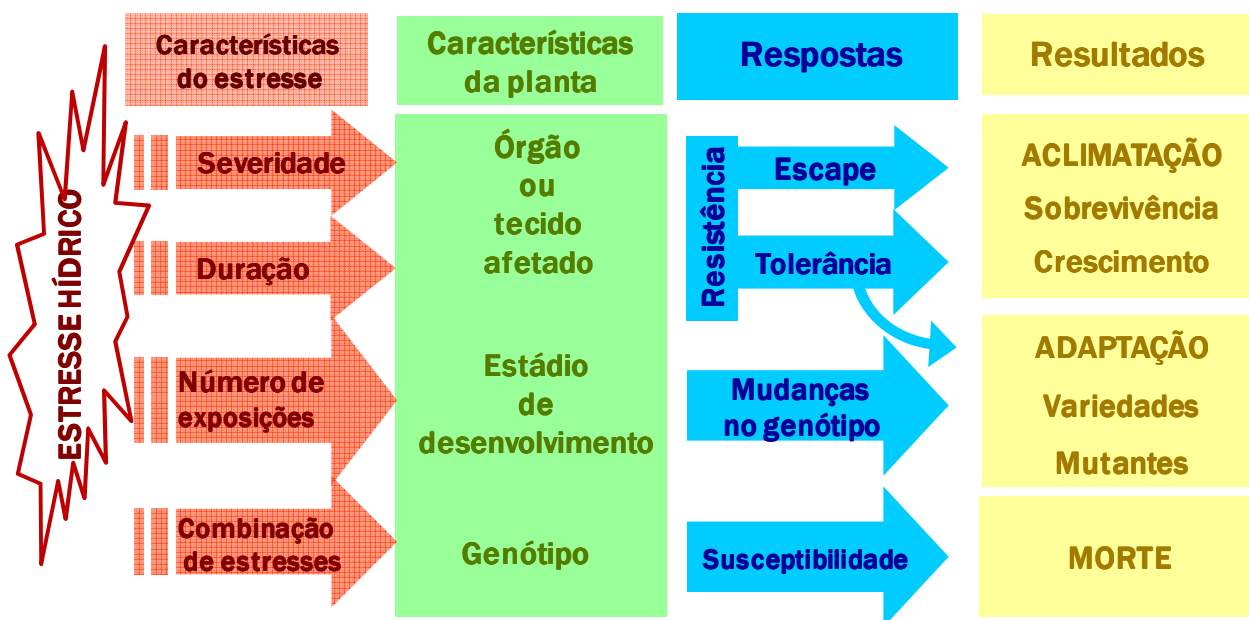


Figura 1. Resposta de plantas ao estresse hídrico (adaptado de BRAY et al., 2001).

O déficit hídrico em plantas inicia um complexo de respostas (Figuras 2 e 3), começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento. Em termos moleculares, o sinal de estresse, uma vez produzido pela célula vegetal, deve ativar uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. A perda do volume e da turgescência celular ou a concentração de solutos altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática da célula vegetal, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando assim o fenômeno físico do déficit hídrico em uma resposta bioquímica (BRAY et al., 2001).

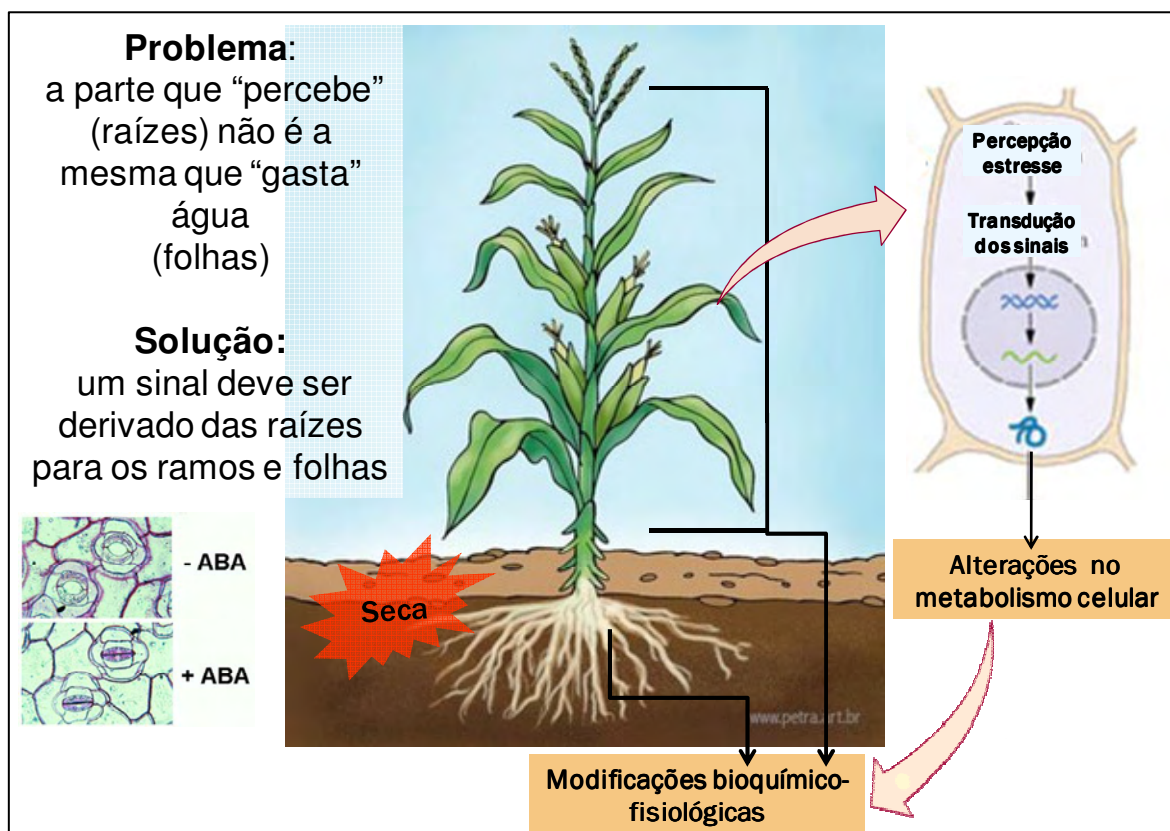


Figura 2. Modelo esquemático de um complexo de respostas à limitação hídrica (adaptado de BRAY et al., 2001).

Essas substâncias osmoticamente ativas são moléculas ou íons atóxicos que não interferem no metabolismo e se acumulam predominantemente no citoplasma, onde têm função de manter a turgescência celular, além de estabilizar proteínas e estruturas celulares nas condições subótimas dos fatores ambientais. O potencial osmótico da solução celular, ou simplástica pode aumentar por perda de água ou por aumento da síntese desses solutos (ANGELOCCI, 2002).

Há algum tempo, adota-se a hipótese de que o ajuste osmótico (osmoproteção) é uma característica importante de aclimação que confere vantagens às plantas tolerantes ao estresse hídrico, porque é um modo de se manter o conteúdo de água da célula em níveis adequados à atividade fisiológica (TAIZ & ZEIGER, 2010). No entanto, existe outra vertente, que faz ressalvas ao ajuste osmótico como um mecanismo de

manutenção da turgescência e do crescimento do tecido sob deficiência hídrica ou estresse, pois o processo seria limitado pela própria fotossíntese, que é a fonte de solutos orgânicos, que em condições de estresse hídrico é reduzida (SERRAJ & SINCLAIR, 2002).

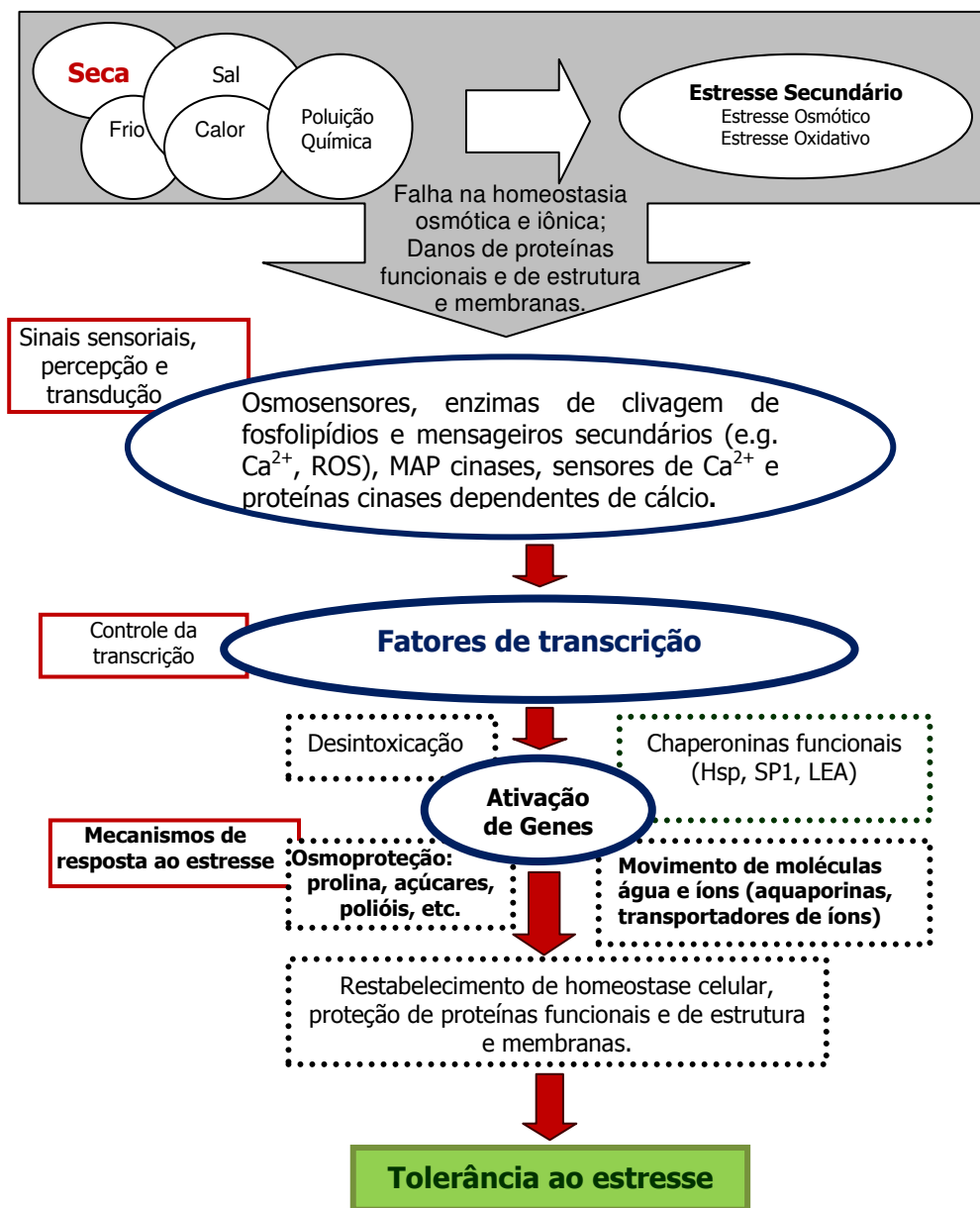


Figura 3. A complexidade da resposta das plantas ao estresse abiótico (adaptado de Prata, 2008 *apud* VINOCUR & ALTMAN, 2005).

Assim, uma função do ajuste osmótico poderia estar potencialmente ligada à eliminação de radicais livres, mas gerando, como função adicional, a retenção de água (revisado por ANGELOCCI, 2002). O estresse hídrico quebra o equilíbrio oxidativo/redutivo (redox) em várias organelas celulares, como os cloroplastos e as mitocôndrias. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente, leva à geração de espécies como radicais livres.

O estresse desempenha importante função na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais. O estresse é medido em relação à sobrevivência da planta, produtividade agrícola, crescimento (acúmulo de massa seca), processo primário de assimilação (absorção de CO₂ e de minerais), que estão relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2010).

Dentre os mecanismos de tolerância ao estresse hídrico, variações das respostas fisiológicas, bioquímicas, bem como estratégias de crescimento têm sido comparadas e discutidas em relação a características de tolerância de plantas à deficiência hídrica no solo (STRECK, 2004; BARTELS & SUNKAR, 2005). O grau de tolerância de uma espécie ou cultivar pode ser determinado através da capacidade de acumular solutos compatíveis, os quais, além de atuarem no ajustamento osmótico, protegem as estruturas celulares contra os danos induzidos pela desidratação e oxidação (ANAMI et al., 2009). Por essa razão o nome soluto compatível utilizado algumas vezes para designar estes osmólitos não é o mais apropriado devido estes compostos não serem apenas compatíveis, ou seja, não prejudiciais quando em elevada concentração, mas também protetores.

Medidas da variação da concentração de solutos têm sido usadas como meio para avaliar a capacidade de ajustamento osmótico das plantas. Supõe-se que o estresse hídrico pode afetar vias metabólicas ou "bombas" de íons ou causar um desbalanceamento entre fotossíntese e translocação de solutos. O grau de ajustamento osmótico na escala diária e em médio prazo varia bastante entre as espécies e até

mesmo entre genótipos. Desenvolve-se, preferencialmente, em plantas que sofrem uma secagem lenta, não persistindo mais que alguns dias.

As reações bioquímicas e fisiológicas em resposta ao estresse hídrico podem ser monitoradas através de alterações do padrão de expressão atividade que codificam determinadas enzimas, como a nitrato redutase, glutamina sintetase, sacarose sintase, trealase-fosfato-sintase, trealase, entre outras. O aumento ou redução da expressão de um gene em plantas submetidas a condições de déficit hídrico pode ser fator determinante da capacidade de aclimação dessas plantas, podendo ser identificada como um marcador molecular de tolerância ao estresse (VINOCUR & ALTMAN, 2005).

Por exemplo, alterações no metabolismo a nível molecular provocam, entre outras reações, redução no teor de proteínas, como consequência da redução na sua síntese ou na decomposição acentuada, resultando uma liberação reforçada de aminoácidos. Neste caso há um acréscimo da atividade da enzima glutamina sintetase, responsável pelo metabolismo dos aminoácidos, como a prolina (FERREIRA et al., 2002). Um exemplo de redução da atividade enzimática é o decréscimo da conversão da sacarose para amido nas folhas devido à diminuição da atividade da invertase, enzima-chave que converte sacarose para hexose (SILVA & ARRABAÇA, 2004). Entretanto, o estudo da atividade de enzimas de catabolismo de solutos compatíveis também é importante, como a trealase. Esta enzima responsável pela hidrólise da trealose tem atividade mais acentuada em plantas que as enzimas de síntese, pois para que este dissacarídeo funcione como osmoprotetor, deve estar em concentrações baixas nos tecidos vegetais, pois existem evidências científicas de que quando presente em altas concentrações influencia negativamente nas chaperoninas, que são responsáveis pela homeostase das proteínas (WINGLER, 2002).

A habilidade de algumas espécies ou genótipos de ajustar osmoticamente suas células em condições de estresse hídrico é uma resposta bioquímica-fisiológica que indica a capacidade destes organismos em aumentar a tolerância a períodos curtos de seca (NEPOMUCENO et al., 2001). Muitos trabalhos evidenciam que o acúmulo da

trealose e da prolina livre constitui-se em um critério para estudos de tolerância à seca, sendo estes osmoprotetores utilizados como indicadores bioquímico-fisiológicos de estresse hídrico (VINOCUR & ALTMAN, 2005; ANAMI et al., 2009; ROSA et al., 2009, DÍAZ et al., 2010).

Em condições de estresse, o metabolismo de aminoácidos é amplamente alterado, sendo a síntese de proteínas diminuída e a proteólise aumentada. Como uma consequência disto, ocorre a indução da biossíntese de prolina promovida pelo incremento de metabólitos como poliaminas, amônia, arginina, ornitina, glutamina, glutamato (FERREIRA et al., 2002). Várias funções são propostas a este acúmulo: ajustamento osmótico; reserva de carbono e nitrogênio utilizados no crescimento para restabelecimento após estresse; desintoxicação do excesso de amônia; estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de radicais livres. Adicionalmente, existem evidências de que a biossíntese desse aminoácido poderia estar também associada à regulação do pH citosólico ou mediação do incremento da razão NADP⁺/NADPH, influenciando o fluxo de carbono devido à via oxidativa da pentose fosfato. Além disso, pode atuar como fonte acessível de energia, onde uma única molécula oxidada é capaz de produzir 30 ATP (KAVI KISHOR et al., 2005).

A prolina livre é classificada como um "α – iminoácido", pois seu grupo amino está ligado a dois átomos de carbono, conferindo características de neutralidade à molécula. O acúmulo deste aminoácido pode ocorrer por duas vias paralelas nas plantas, uma direta e outra via ornitina (KAVI KISHOR et al., 2005).

A principal diferença entre as duas vias está na acetilação dos intermediários em uma delas. Pela via direta (dependente de glutamato), após a formação do glutamato semi-aldeído, a molécula se transforma em uma estrutura cíclica (Δ' -pirrolina-5-carboxilato), precursor da prolina. A estrutura cíclica é formada pela reação intramolecular (não-enzimática) dos grupos amino e aldeído do glutamato-semi-aldeído. Na via dos derivados acetilados (dependente de ornitina), a presença dos grupos acetil ligado ao grupo 2-amino impede essa reação interna, e uma estrutura aberta, a ornitina,

é formada. A ornitina pode ainda levar à formação da estrutura cíclica da prolina, após perda do grupo amino por transaminação. Embora as duas vias de biossíntese de prolina livre sejam igualmente importantes em condições normais, existem evidências que favorecem a via direta do glutamato (sem acetilação) em condições de estresse hídrico (BARTELS & SUNKAR, 2005; FUNCK et al., 2008).

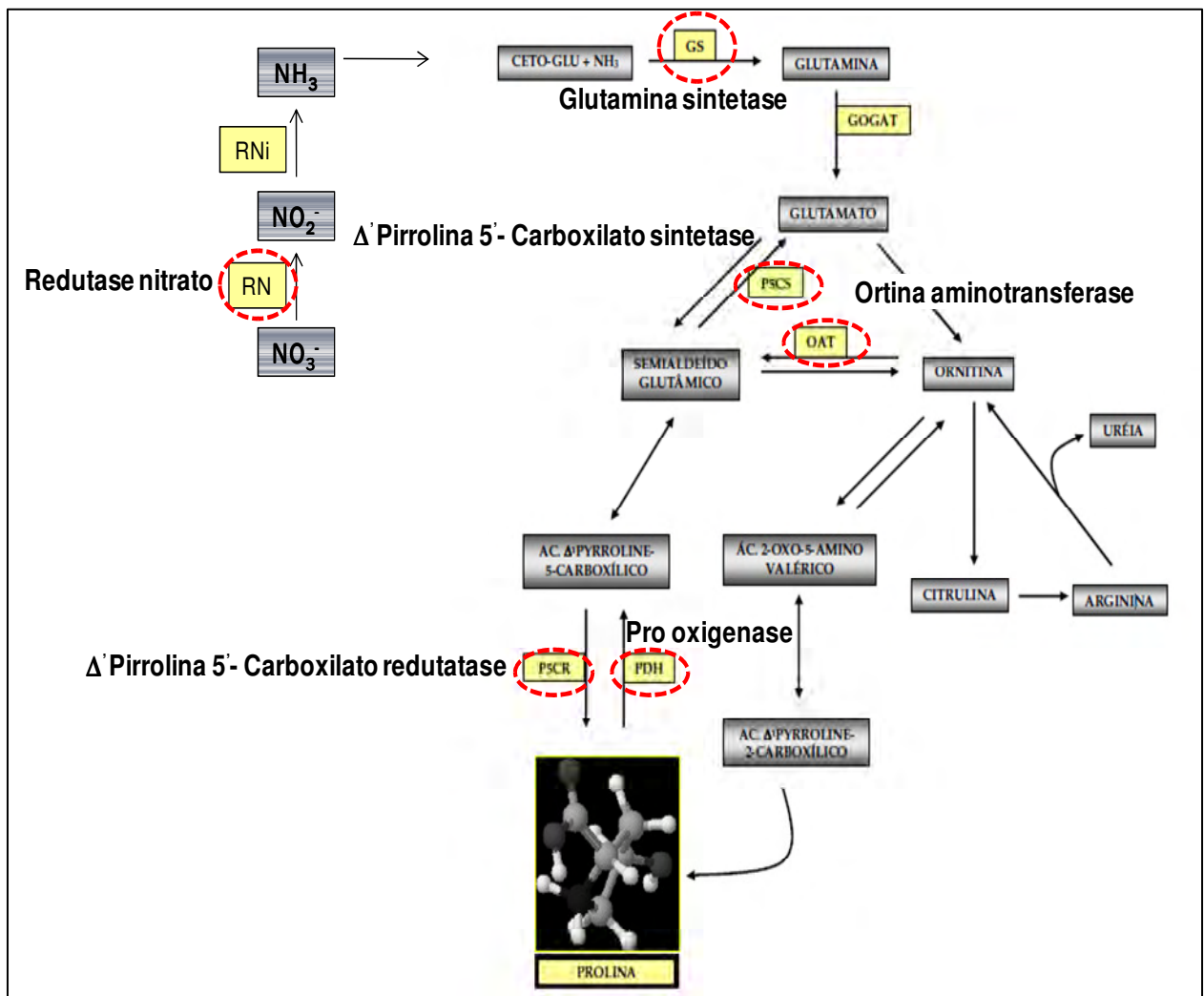


Figura 4. Rota metabólica do aminoácido prolina.

Quando ocorre a assimilação de uma fonte de nitrogênio (amônio) pela planta, esta exige uma alta demanda por esqueletos de carbono que poderia ocasionar em um desvio de esqueletos de carbono para produção desse aminoácido (TAIZ & ZEIGER, 2010). Entretanto, estudos indicam que a prolina desempenha um importante papel durante o desenvolvimento das plantas servindo como uma fonte rápida e acessível de energia. Além disso, a oxidação de uma molécula de prolina fornece 30 ATPs para a célula. Neste contexto, é importante saber como o acúmulo de prolina influencia outras vias de energia relacionadas, bem como no metabolismo de carbono durante e após o período de submissão a estresses abióticos (revisado por KAVI KISHOR et al., 2005).

O acúmulo de prolina livre em condições de estresse tem sido estudado por mais de 45 anos. Dentre os osmólitos, a prolina é aquele que é mais pesquisado nas respostas de vegetais superiores a estresses abióticos (KAVI KISHOR et al., 2005, FUNCK et al., 2008).

Com relação aos compostos advindos do metabolismo do carbono, a trealose tem despertado interesse pela comunidade científica. A trealose é um dos mais efetivos osmoprotetores, em termos de concentração mínima requerida. É um dissacarídeo que, por várias décadas, tem sido relatado em bactérias, fungos e leveduras como um dos responsáveis pela capacidade desses organismos de tolerar altos níveis de desidratação. Somente no final da década passada foi identificada em plantas superiores. A dificuldade na identificação de trealose, provavelmente, foi devido à alta atividade da enzima trehalase em plantas superiores. A trealose liga-se às membranas celulares e diminui sua temperatura de fusão, mantendo-as, assim, na sua fase líquido-cristalina (Revisado por NEPOMUCENO et al., 2001; PAUL et al., 2008).

A trealose é dissacarídeo não-redutor, solúvel, é composto de duas moléculas de glicose (α -D-glicopiranosil-[1,1]- α -D-glicopiranosídeo). Esse carboidrato é isômero químico de outros dois dissacarídeos amplamente encontrados em plantas, a sacarose (α -D-glicose-[1,2]- β -D-frutose) e a maltose (α -D-glicose-[1,4]- α -D-glicose). Eles têm a mesma fórmula química ($C_{12}H_{22}O_{11}$), entretanto, diferentes estruturas. Além destes

isômeros, existem três outros isômeros do dissacarídeo trealose: α,α -trealose, α,β -trealose e β,β -trealose. Destes, apenas o α,α -trealose é encontrado endogenamente em plantas. Apesar da biossíntese deste composto ser similar à da sacarose, evolutivamente, a origem da trealose é mais antiga, devido à sua presença em todos os reinos (GODDIJN & DUN, 1999) (Figura 5).

A sacarose é dissacarídeo não-redutor que pode ser hidrolisado em glicose e frutose pela ação da invertase, ou então separada em frutose e uridina difosfoglicose (UDPG) pela frutose sintase, conservando energia sob esta forma. Sendo os polissacarídeos da parede celular sintetizados a partir de UDPG, é de extrema importância a regulação da quantidade dos produtos deste açúcar. Pela figura 5 é possível visualizar o papel central que este açúcar representa para o metabolismo das plantas e como se relaciona com a trealose.

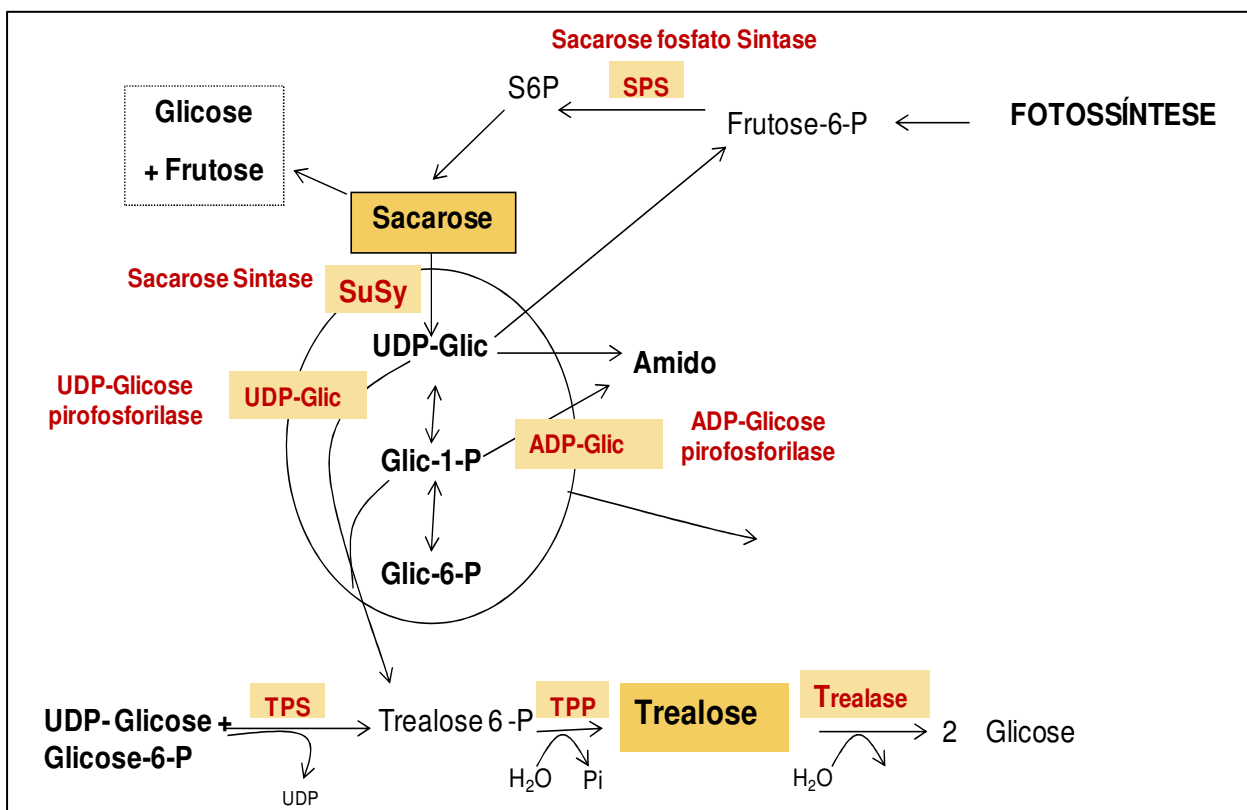


Figura 5: Modelo esquemático das vias metabólicas da sacarose e trealose

Quando submetidas à limitação hídrica, as plantas desenvolvem alguns mecanismos de resposta a esse tipo de estresse, que se resumem em três principais eventos: percepção dos sinais, respostas em nível molecular e respostas morfofisiológicas.

1.1. Referências Bibliográficas

ANAMI, S.; DE BLOCK, M.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTENS, M. Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. **Critical reviews in plant sciences**, Boca Raton, v. 28, n. 1, p. 16-35, 2009.

ANGELOCCI, L. R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 272 p.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. p. 1158-1203.

DÍAZ, P.; BETTI, M.; SÁNCHEZ, D. H.; UDVARDI, M. K., MONZA, J.; MÁRQUEZ, A. J. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. **New Phytologist**, no. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03440.x [versão on-line], Agosto, 2010.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M. de. PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 13-17, 2002.

FUNCK, D.; STADELHOFER, B.; KOCH, W. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 40, p.1-14, 2008.

GODDIJN, O. J. M.; DUN, K. van. Trehalose metabolism in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, n. 8, p. 315-319, 1999.

KAVI KISHOR, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S.; SREENATH RAO, REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

MAGALHÃES, P. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P. de.; KARAM, D.; CANTÃO, F. R. O. **Caracterização de plantas de milho sob estresse hídrico**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 6p. (Circular Técnica, 16).

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23 p. (Circular Técnica, 22).

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 23, p. 12-18, 2001.

PAUL, M.J.; PRIMAVESI, L.F.; JHURREEA; ZHANG, Y. Trehalose metabolism and signaling. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 59, p. 417-441, 2008.

PRADO, J. F. C. **Stress hídrico em *Medicago truncatula***: análise da expressão dos genes da via metabólica da trealose, 2008. 53p. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico de Lisboa, Universidade Técnica de Lisboa, 2008.

ROSA, M.; PRADO, C.; PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J. A., HILAL, M.; PRADO, F. E. Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, Bethesda, v. 4, n. 5, p. 388-393; 2009.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 333-341, 2002.

- SILVA, J. M.; ARRABAÇA, M. C. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C₄ grass *Setaria sphacelata*: a comparison between rapidly and slowly imposed water stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.16, p.551-555, 2004.
- STRECK, N. A. Do we know how plants sense a drying soil? **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 581-584, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 739-774.
- TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science's compass review**, v. 292, n. 5515, p. 281-284, 2001.
- VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Blackwell, v. 45, p. 523–539, 2006.
- VIDAL, M. S.; CARVALHO, J. M. F. C.; MENESES, C. H. S. G. **Déficit hídrico: aspectos morfofisiológicos**. Campina Grande: MAPA/Embrapa Algodão, 2005. 19 p. (Documentos, 142).
- VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 16, p. 123–132, 2005
- WINGLER, A.; The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 60, p. 437-440, 2002.

CAPÍTULO 2: REAÇÃO OSMOPROTETORA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO SOB CRESCENTE POTENCIAL HÍDRICO

RESUMO – O aminoácido prolina e o dissacarídeo trealose ocorrem naturalmente nas plantas, mas acumulam-se nos tecidos em resposta à limitação hídrica. São conhecidos pelos efeitos na proteção de enzimas e integridade de membranas, bem como no ajustamento osmótico. O teor de prolina e de trealose nos tecidos endospermático e embrionário foi estudado com o objetivo de descrever as suas funções fisiológicas na germinação de dois híbridos de milho (DKB 390 e DAS 2B710) em resposta a diferentes potenciais hídricos. As sementes germinaram em substrato de papel contendo soluções de PEG 6000 (Polietilenoglicol) com diferentes potenciais hídricos: 0,0; -0,3; -0,6; -0,9 ou -1,2 MPa. A diminuição do potencial hídrico reduz a germinação e a massa seca da parte aérea e raiz das plântulas dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710. Em condição de limitação hídrica, o índice de germinação de sementes sob tratamento foi semelhante entre os híbridos DKB 390 e DAS 2B710, contudo, o índice de velocidade de germinação foi maior e o tempo médio de germinação foi menor no híbrido DAS 2B710. A prolina pode ser utilizada como indicador metabólico de resposta dos híbridos de milho (DKB 390 e DAS 2B710) à limitação hídrica durante a germinação quando quantificada no eixo embrionário. No híbrido DAS 2B710 há o acúmulo de prolina conforme a redução do potencial hídrico. A trealose está presente na constituição do endosperma e eixo embrionário dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710, mas não indica resposta metabólica à limitação hídrica na germinação.

Palavras-chave: Prolina, trealose, *Zea mays*, estresse hídrico, híbridos, genótipos.

Reaction osmoprotectant on germination of maize seeds under increasing water potential

ABSTRACT – The amino acid proline and the disaccharide trehalose occur widely in higher plants, and usually accumulate in the tissues as a response to drought stresses. Those compounds are known to have positive effects on protecting enzyme and membrane integrity along with adaptative roles in mediating osmotic adjustment in plants. The variability in proline and trehalose content in endosperm and embryos tissues was studied with the objective to describe their physiological role in two genotypes (DKB 390 and DAS 2B710) germinating maize in response to different water potentials. Seeds were germinated on filter paper soaked with polyethylene glycol (PEG-6000) solution corresponding to the water potentials of 0.0; -0.3; -0.6; -0.9 or -1.2 MPa. The decrease of water potential reduces the germination and dry weight of shoot and root of seedlings of DKB 390 and DAS 2B710 genotypes. Under water stress, the germination index of the seeds under treatment was similar among the hybrids, however, the speed of germination was higher and average time of germination was shorter in DAS 2B710. Proline can be used as an indicator of metabolic response of maize hybrids (DKB 390 and 2B710 DAS) to water limitation during germination when quantified in the embryos axis. The DAS 2B710 hybrid accumulates proline as the reduction of water potential. Trehalose is present in the constitution of the endosperm and embryo axis of DKB and DAS 2B710 390 but does not indicate the metabolic response to water limitation on seed germination.

Key words: Proline, trehalose, *Zea mays*, water stress, hybrids, genotypes.

2.1. Introdução

A seca é um dos fatores ambientais mais limitantes na produção do milho. Por isso, há uma demanda por sementes de híbridos mais tolerantes aos estresses abióticos. Os esforços da pesquisa nesse campo têm se concentrado no estudo da fisiologia de plantas sob a seca, para determinar parâmetros e métodos rápidos de seleção de híbridos tolerantes (MAGALHÃES et al., 2002; ANAMI et al., 2009).

Há indícios de que haveria plasticidade no grau de tolerância à limitação hídrica do milho, em função do estágio fenológico da cultura, isto é, dependendo da fase de desenvolvimento, uma planta pode ser mais ou menos suscetível à deficiência hídrica (MOHAMMADKHANI & HEIDARI, 2008; ABO-EL-KHEIR & MEKKI, 2007; ANAMI et al., 2009). Todavia, são escassos os relatos de tolerância à seca, durante o processo de germinação, embasados em respostas bioquímico-fisiológicas (THAKUR & SHARMA, 2005).

Dessa forma, há um interesse em se comprovar a diferenciação de híbridos de milho quanto à susceptibilidade e/ou tolerância à seca mais precocemente, utilizando ensaios de germinação, além da avaliação bioquímico-fisiológica da semente, para uma melhor compreensão da fisiologia da germinação em condição de deficiência hídrica.

Uma resposta à limitação hídrica é o acúmulo de solutos osmoticamente compatíveis com o metabolismo celular. Preconiza-se que essa resposta pode conduzir a um ajustamento osmótico e à manutenção de um estado hídrico favorável para o metabolismo e, nesse caso, os solutos denominam-se osmorreguladores. Em contrapartida, a síntese de certos solutos compatíveis pode ter uma função primordial na proteção de proteínas, na estabilização de membranas celulares e no controle de espécies reativas de oxigênio, cuja produção aumenta em condições de deficiência hídrica. Os solutos para tal finalidade são designados de osmoprotetores (MUNNS, 2002). Essas moléculas também podem ser reservas de energia e, também de nitrogênio, no caso da prolina, para o restabelecimento da planta após período de

limitação hídrica (MUNNS, 2002; ANAMI et al., 2009). A prolina e a trealose são alguns dos principais solutos compatíveis estudados na avaliação e distinção da tolerância de plantas à seca.

Situações de estresse hídrico no solo podem ser simuladas em condições de laboratório, utilizando-se soluções aquosas com diferentes potenciais osmóticos, como as soluções de manitol e/ou de polietilenoglicol (PEG). Potenciais osmóticos muito negativos, geralmente, ocasionam atraso ou mesmo diminuição na porcentagem de germinação. O PEG é um agente osmótico, quimicamente inerte, atóxico para as sementes e constituído por macromoléculas que dificultam a absorção da água pelo tegumento (VILLELA et al., 1991). No presente trabalho foi usado esse artifício para estudar a variabilidade do teor de prolina e de trealose nos tecidos endospermático e embrionário, com o objetivo de descrever as suas funções fisiológicas na germinação de dois híbridos de milho (*Zea mays* L): DKB 390 e DAS 2B710; bem como verificar o grau de tolerância relativa à limitação hídrica desses genótipos.

2.2. Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

Tratamentos (simulação do estresse hídrico): inicialmente, o grau de umidade foi avaliado em 25 sementes com quatro repetições pelo método de estufa a 105 ± 3 °C durante 24 h (BRASIL, 2009). Foram utilizadas sementes com características biométricas semelhantes, sendo estas previamente tratadas com solução de nistatina a 1% (fungicida) para manutenção da sanidade das mesmas. A cada três dias, as sementes foram transferidas para novas caixas gerbox, contendo papéis umedecidos com o respectivo tratamento, para manutenção constante dos potenciais osmóticos. As parcelas foram distribuídas ao acaso em câmara de germinação (tipo BOD), em

condições controladas, $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 2\text{ \% UR}$ e fotoperíodo de 12 h, de acordo com BRASIL (2009). As contagens da germinação foram realizadas, diariamente, até o término do ensaio experimental (10 dias após a imposição dos tratamentos), considerando-se como germinadas as sementes com protrusão da raiz primária (2 mm).

Índice de germinação de sementes sob tratamento (IGT): a partir das contagens diárias dos números de sementes germinadas para cada tratamento, calculou-se o IGT: número de sementes germinadas sob estresse / número de sementes germinadas da testemunha) x 100 (ZEID & EL-SEMARY, 2001).

Índice de velocidade de germinação (IVG): com os dados diários do número de sementes germinadas, foi calculado o IVG, empregando-se a fórmula proposta por MAGUIRE (1962).

Tempo médio de germinação (TMG): a partir das contagens diárias dos números de sementes germinadas para cada parcela experimental, pode-se estimar o TMG segundo EDMOND & DRAPALA (1958).

Massa seca dos tecidos (g MS): após a liofilização, a parte aérea (PA), as raízes (R), o endosperma (EN) e o eixo embrionário (EE) foram separados manualmente, utilizando-se luvas e lupa para melhor separação desses tecidos. Após o manuseio, foram acondicionados em sacos de papel e armazenados em desumidificador até atingirem massa constante; subsequentemente foram pesados em balança de precisão ($\pm 0,01\text{ g}$).

Teor de prolina (Pro): após a liofilização, o eixo embrionário e endosperma foram separados e macerados em nitrogênio líquido e armazenados, separadamente, até a determinação da prolina. O acúmulo de prolina livre foi quantificado no endosperma (EN) e eixo embrionário (EE), segundo BATES et al., 1973.

Teor de trealose (Tre): a enzima trealase conidial foi preparada e purificada por método de NEVES et al. (1994), com modificações. Realizou-se cromatografia de filtração em gel em CM-cellulose column (0,6 x 30 cm). A trealose foi determinada segundo método enzimático, utilizando-se 0,1 g de tecido liofilizado do EN e EE.

Tratamento estatístico: o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 5 (híbridos x potenciais hídricos - HxP) com 4 repetições. Cada parcela experimental foi constituída de duas caixas tipo gerbox, cada uma contendo 25 sementes depositadas sobre papel germitest esterilizado e, dependendo do tratamento, umedecido com água destilada estéril (testemunha) correspondendo ao potencial 0,0 Mega Pascal (MPa) ou com diferentes concentrações de PEG 6000, obedecendo aos potenciais osmóticos: -0,3; -0,6; -0,9; e -1,2 MPa (sementes sob estresse). Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%) e análises da regressão polinomial foram utilizadas para o desdobramento dos graus de liberdade do fator quantitativo potencial osmótico e para o estudo da interação híbrido x potenciais osmóticos (BORGHETTI & FERREIRA, 2004; SANTANA & RANAL, 2004). Realizou-se análise de correlação linear de Pearson entre as variáveis avaliadas.

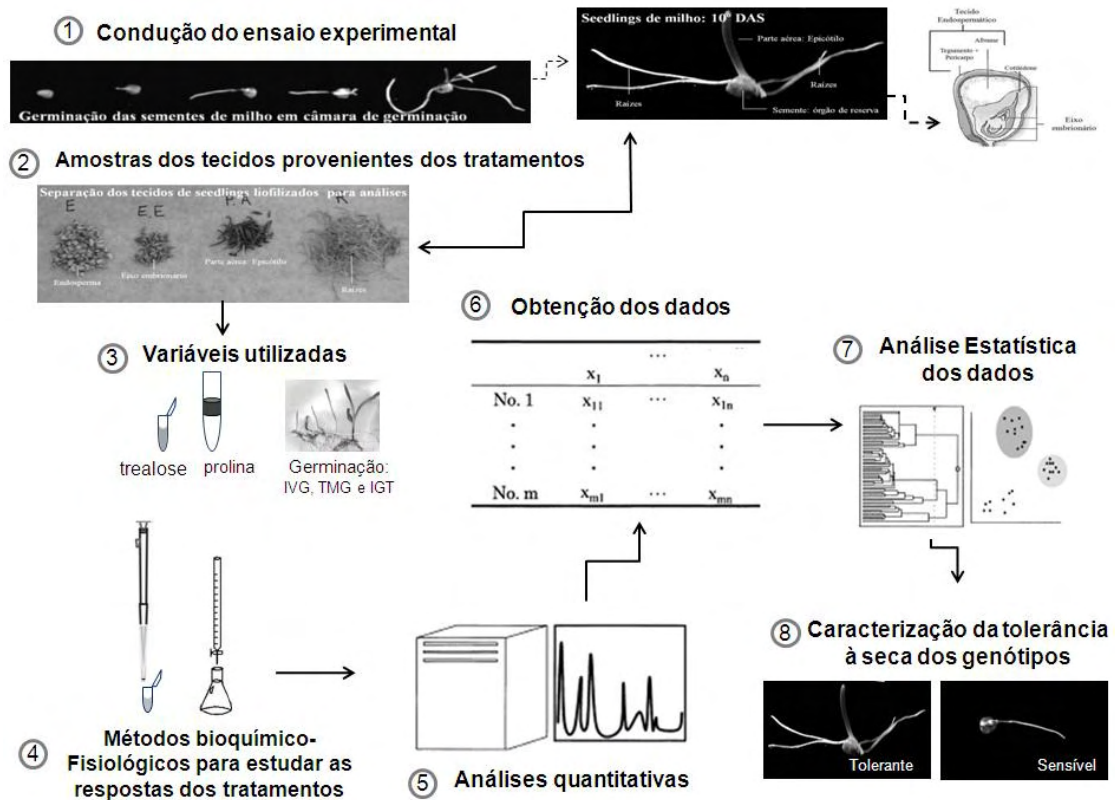


Figura 1. Esquema metodológico do ensaio da germinação de sementes de milho sob crescente potencial hídrico.

2.3 – Resultados e Discussão

A diminuição da disponibilidade hídrica para a germinação (DHG), simulada pelo polietilenoglicol (PEG), ocasionou redução de até 52% no índice de germinação de sementes (IGT) sob o menor potencial osmótico, aos 10 dias após a imposição dos tratamentos (DAT), independentemente do híbrido (Figura 2).

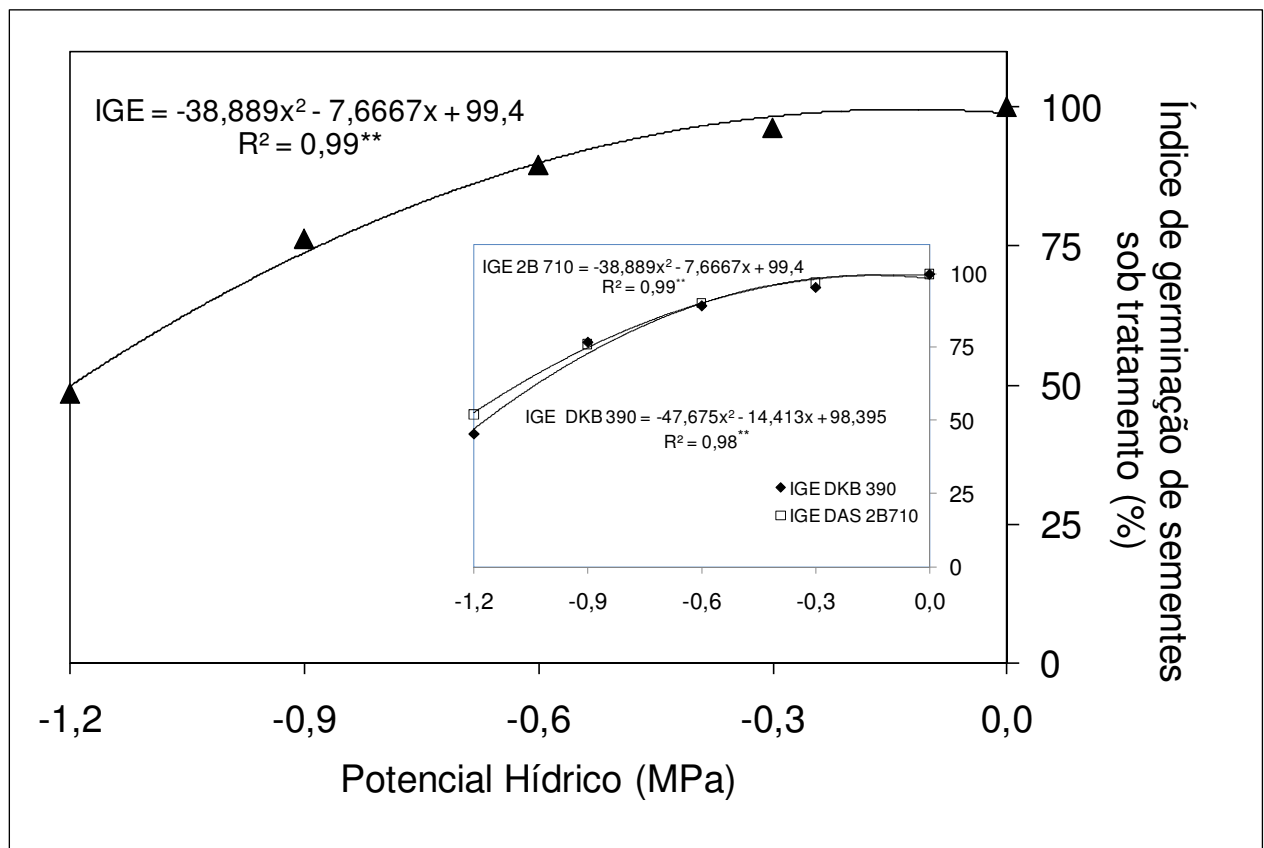


Figura 2. Efeito da limitação hídrica na germinação de híbridos simples de milho, simulado pela solução de Polietilenoglicol (PEG 6000), no 10º dia após a semeadura. Índice de germinação de sementes sob tratamento (IGT) de híbridos de milho (Interação HxP^{ns}; $p > 0,05$)

Para o índice de velocidade de germinação (IVG) e o tempo médio germinação (TMG), observou-se que o IVG reduziu-se proporcionalmente à menor DHG, enquanto para o TMG a relação é inversa, isto é, maior foi o tempo despendido à germinação das sementes. Nas variáveis IVG e TMG, verificou-se a diferença entre os híbridos, cujo maior IVG e menor TMG foram verificados no híbrido DAS 2B710 (Figuras 3A e 3B). Apesar do IGT de ambos híbridos assemelharem-se, averiguou-se que o IVG do híbrido DAS 2B710, no maior e menor potencial osmótico (0,0 MPa e -1,2 MPa), foi de 10,9 e 2,8 sementes germinadas por dia, respectivamente, contrapondo os 9,1 e 1,6 sementes germinadas por dia do híbrido DKB 390, para os mesmos potenciais.

Para o TMG do híbrido DAS 2B710 foram despendidos 2,4 e 6,5 dias para que 100% e 58% das sementes germinassem sob os potenciais 0,0 MPa e -1,2 MPa, respectivamente; já para o híbrido DKB 390 foram utilizados 2,8 e 7,3 dias para que 100% e 45% das sementes germinassem, respectivamente.

Constatou-se que as variáveis que melhor descreveram o processo de germinação em condições adversas foram o IVG e o TMG, principalmente na distinção da resposta dos híbridos à limitação hídrica. Outra observação pertinente seria que, possivelmente, a diminuição do IVG e o aumento do TMG em crescente limitação hídrica poderiam ter sido ocasionados pela quiescência, para assegurar uma boa germinação e o estabelecimento das plântulas em condições normais (FINCH-SAVAGE & LEUBNER-METZGER, 2006).

Verificou-se que além do PEG diminuir a disponibilidade hídrica para a germinação, comprometeu o estabelecimento das plântulas. A massa seca (g MS) em diferentes tecidos das plântulas não foi reduzida proporcionalmente à disponibilidade hídrica, por exemplo, nos tecidos endospermático (EN) e embrionário (EE). Tal fato foi também observado por ZEID & EL-SEMARY (2001) e GILL et al. (2002), onde a biomassa de tecidos como EN e EE não se reduziu, porém, a parte aérea e o sistema radicular tiveram drásticas diminuições conforme a supressão da água, concordando com os resultados apresentados na Tabela 1.

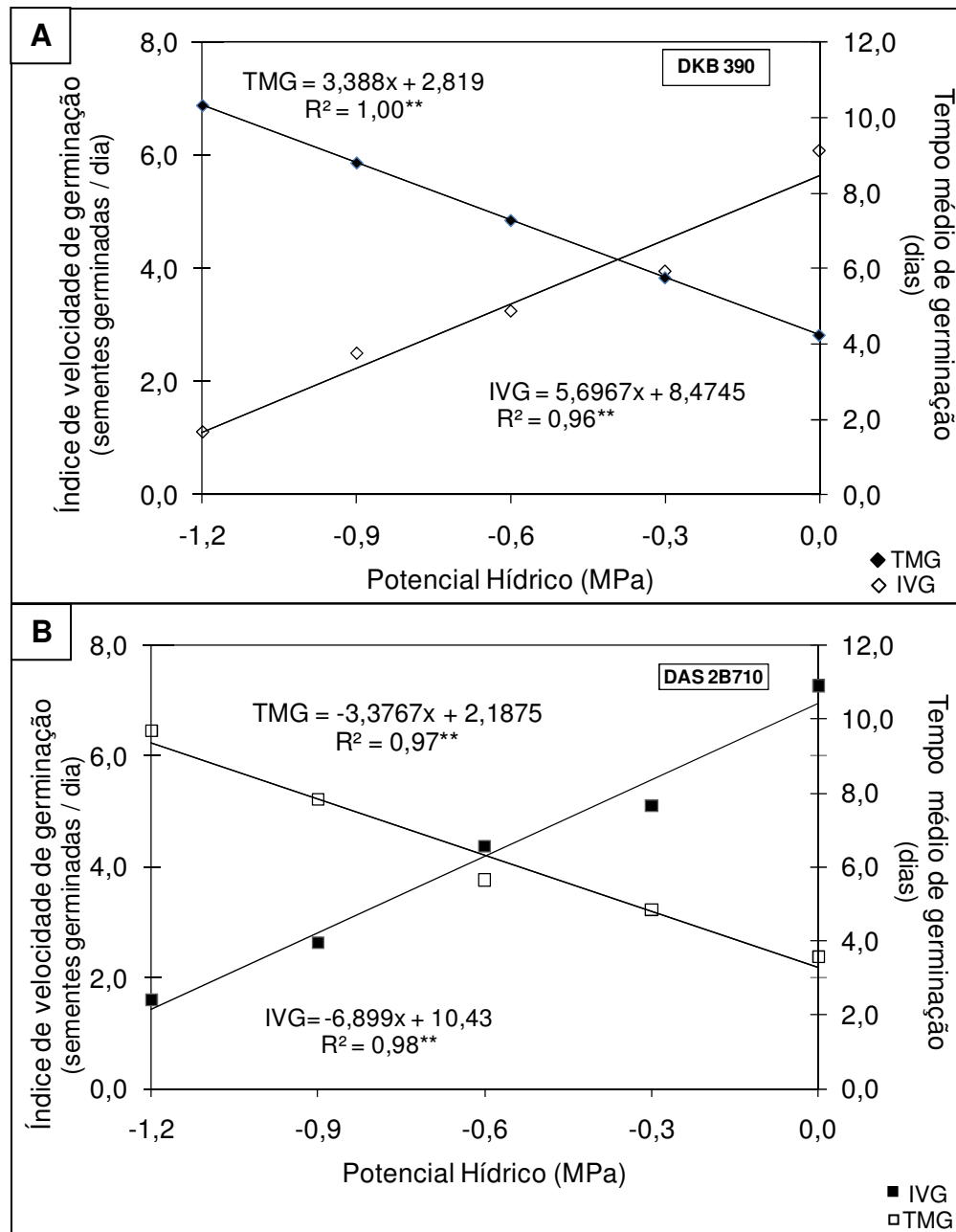


Figura 3. Efeito da limitação hídrica na germinação de híbridos simples de milho, simulado pela solução de Polietilenoglicol (PEG 6000), no 10º dia após a semeadura. Interação HxP* ($p < 0,05$) para as variáveis Tempo médio (TMG) e Índice de velocidade germinação (IVG). **A)** TMG e IVG do híbrido DKB 390 **B)** TMG e IVG do híbrido DAS 2B710. ******Regressão linear significativa ($p < 0,01$).

Tabela 1. Modificações na massa seca (g/plântulas MS) de dois híbridos de milho em diferentes potenciais hídricos (MPa) e tecidos*: parte aérea, endosperma, eixo embrionário e raiz no 10º dia após imposição dos tratamentos.

Potencial hídrico (MPa)	Tecidos (g MS) ¹							
	Parte Aérea		Endosperma		Eixo Embrionário		Raiz	
	DKB 390	DAS 2B710	DKB 390	DAS 2B710	DKB 390	DAS 2B710	DKB 390	DAS 2B710
0,0	1,64 ± 0,11	1,52 ± 0,13	5,03 ± 0,55	5,25 ± 0,23	1,87 ± 0,24	1,67 ± 0,18	2,08 ± 0,15	1,67 ± 0,69
-0,3	1,10 ± 0,19	1,65 ± 0,16	7,94 ± 0,14	6,06 ± 2,07	1,91 ± 0,12	1,75 ± 0,19	1,69 ± 0,43	1,88 ± 0,33
-0,6	0,99 ± 0,03	1,53 ± 0,54	5,29 ± 0,58	5,13 ± 0,64	1,66 ± 0,03	1,62 ± 0,10	2,09 ± 0,26	2,72 ± 0,99
-0,9	0,90 ± 0,16	1,72 ± 0,00	6,90 ± 0,16	5,31 ± 0,37	1,58 ± 0,19	2,04 ± 0,09	1,22 ± 0,15	0,98 ± 0,06
-1,2	0,29 ± 0,01	0,57 ± 0,01	6,97 ± 0,90	7,40 ± 0,85	1,52 ± 0,07	2,38 ± 0,21	0,06 ± 0,00	0,73 ± 0,17

*Interação significativa entre híbridos x potenciais hídricos ($p < 0,05$). ¹Valores da média e desvio padrão.

Essa resposta é esperada, pois a parte aérea e a raiz dependem da semente (órgão fonte de reserva de energia de carbono e nutrientes minerais), podendo até serem denominados de órgãos “comensais”, uma vez que há uma interdependência com a semente, principalmente da interação entre endosperma e eixo embrionário, para a formação desses órgãos (parte aérea e raiz), até que haja a autonomia dos mesmos (MARCOS FILHO, 2005).

O teor de prolina no híbrido DKB 390, para os tecidos endospermático (EN) e embrionário (EE), nessa ordem, foi de 0,2 e 2,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS em 0,0 MPa. Contudo, em situação de limitação hídrica (-0,3 a -1,2 MPa) acresceu-se, em média, em 2,8 e 2,7 vezes (Tabela 2). Em contrapartida, o teor do aminoácido nos tecidos EN e EE do híbrido DAS 2B710 (0,2 e 0,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) aumentou em duas e oito vezes, respectivamente. O acúmulo de prolina foi gradativo conforme houve a limitação hídrica para o genótipo 2B 270, em ambos tecidos. Entretanto, para o DKB 390 apenas no EN houve similaridade na tendência linear. No EE, o teor do aminoácido foi oscilante, tendo um acúmulo máximo de 9,23 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS em -0,32 MPa e mínimo de 3,66 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS em -0,93 MPa (Figura 4).

O acúmulo de prolina no EN e no EE das sementes em função dos diferentes potenciais hídricos pode evidenciar a capacidade de osmoproteção dessas plantas durante o processo de germinação em condição adversa. Outro fato, é que o EN é um tecido altamente dependente do EE à mobilização de compostos. De acordo com MOHAMMADKHANI & HEIDARI (2008), o acúmulo desse aminoácido é relativamente dependente dos níveis de carboidratos nos tecidos e mencionam ainda que a sacarose tenha um efeito positivo no acúmulo de prolina.

Sabe-se que o eixo embrionário possui maiores concentrações de açúcares não-redutores e redutores, e que o endosperma tem seu metabolismo reduzido, pois a sua função principal é a de reserva e fonte energética, ou seja, há a predominância em sua constituição de macromoléculas como o amido (LOPES & LARKINS, 1993; BORGHETTI & FERREIRA, 2004).

Tabela 2. Teor de solutos compatíveis ($\mu\text{mol/g MS}$) de dois híbridos de milho em diferentes potenciais hídricos (MPa) e tecidos, endosperma e eixo embrionário no 10º dia após imposição dos tratamentos.

Potencial hídrico MPa	Solutos compatíveis ($\mu\text{mol/g MS}$) ¹							
	Prolina*				Trealose			
	DKB 390		DAS 2B710		DKB 390		DAS 2B710	
	Endosperma	Eixo embrionário	Endosperma	Eixo embrionário	Endosperma	Eixo embrionário	Endosperma	Eixo embrionário
0,0	0,20 $\pm$ 0,00	2,61 $\pm$ 0,49	0,20 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 0,04	3,37 $\pm$ 0,60	8,02 $\pm$ 1,36	5,63 $\pm$ 1,67	7,75 $\pm$ 0,63
-0,3	0,31 $\pm$ 0,01	10,83 $\pm$ 0,59	0,20 $\pm$ 0,00	3,35 $\pm$ 0,42	2,36 $\pm$ 1,03	6,44 $\pm$ 1,29	2,75 $\pm$ 1,17	6,27 $\pm$ 1,50
-0,6	0,44 $\pm$ 0,10	4,38 $\pm$ 0,52	0,27 $\pm$ 0,04	3,52 $\pm$ 0,59	3,96 $\pm$ 1,03	6,17 $\pm$ 2,74	6,58 $\pm$ 1,13	6,93 $\pm$ 1,77
-0,9	0,56 $\pm$ 0,06	5,30 $\pm$ 0,62	0,40 $\pm$ 0,07	5,82 $\pm$ 0,82	3,00 $\pm$ 1,36	7,39 $\pm$ 1,11	3,23 $\pm$ 1,05	3,23 $\pm$ 1,05
-1,2	0,60 $\pm$ 0,08	7,62 $\pm$ 0,42	0,76 $\pm$ 0,04	6,61 $\pm$ 0,35	2,80 $\pm$ 0,44	4,18 $\pm$ 1,41	2,61 $\pm$ 0,44	2,61 $\pm$ 0,44

*Interação significativa entre híbridos x potenciais hídricos ($p < 0,05$). ¹Valores da média e desvio padrão.

Adicionalmente, esse aminoácido pode ser considerado um indicador metabólico de tolerância à seca para esses híbridos, principalmente se quantificado no EE das sementes, onde o teor é até oito vezes superior ao do EN, mostrando-se acumulativo a partir do potencial -0,3 MPa com leve declínio no potencial -1,2 MPa (Figura 5).

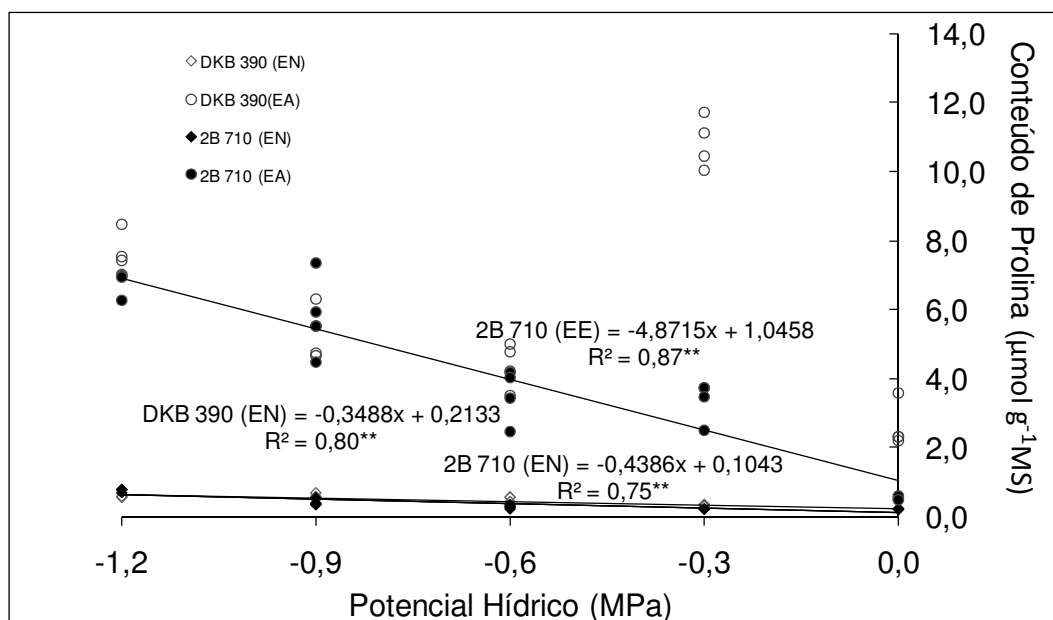


Figura 4. Efeito da limitação hídrica (simulada pela solução de polietilenoglicol) no conteúdo de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) em sementes germinadas de milho aos dez dias após a imposição dos tratamentos. Interação significativa HxP** ($p < 0,01$). Tecidos: endospermático (EN) e embrionário (EE). Regressões significativas: ** $p < 0,01$.

Com isso, observa-se que a síntese de prolina (Pro), possivelmente, tenha um limite ótimo, o qual é dependente da condição de restrição hídrica em que a semente germina. O decréscimo do aminoácido pôde ter ocorrido em detrimento da semente requerer energia para manutenção do seu metabolismo, podendo estar associado à degradação de moléculas de Pro, resultantes da regulação recíproca das vias de síntese e de degradação o que a torna fonte energética. A versatilidade do aminoácido foi verificada por KAVI KISHOR et al. (2005) que relatam que a oxidação de 1 mol de prolina pode gerar 30 mol de ATP (Adenosina trifosfato).

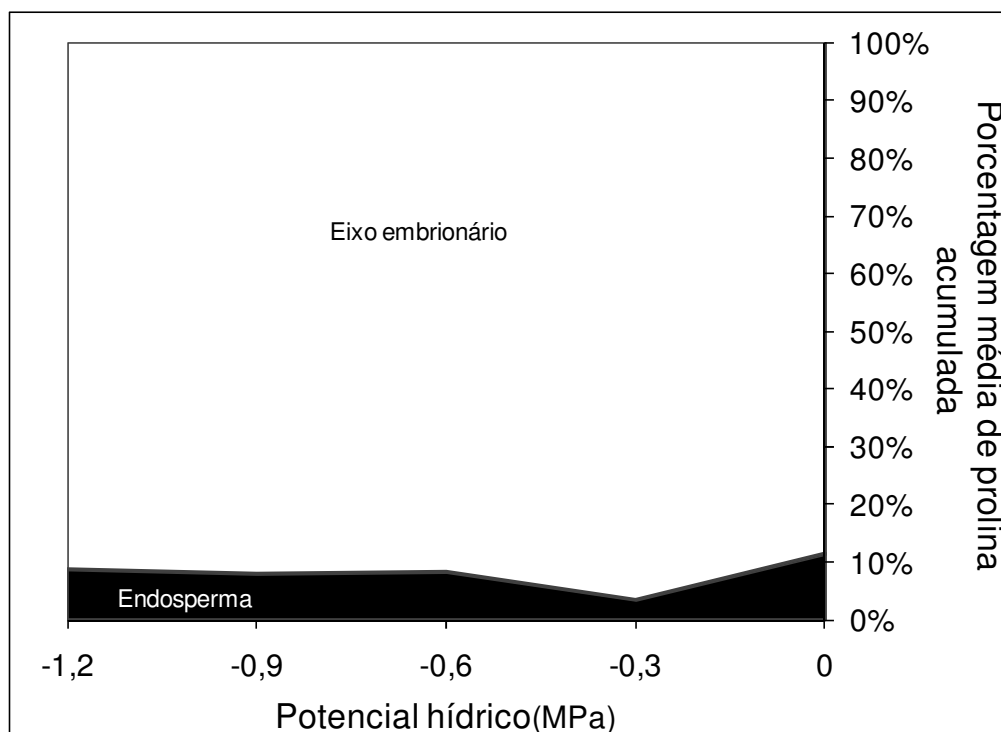


Figura 5. Efeito da limitação hídrica (simulada pela solução de polietilenoglicol) sobre a distribuição média da prolina nos tecidos endospermático e embrionário de sementes germinadas de milho, aos dez dias após a imposição dos tratamentos.

Com relação ao conteúdo de trealose (Tre) nas sementes no 10º DAT, houve oscilação nos teores nos tecidos endospermático (EN) e embrionário (EE), independente do híbrido estudado ($H \times P^{ns}$, $p > 0,05$). Contudo, o teor de trealose no EE foi o dobro em relação ao EN (Figura 6). A distinção quanto à concentração de metabólitos nesses tecidos é esperada, como mencionado anteriormente. Apesar disso, notou-se a mesma tendência em ambos tecidos conforme o estresse hídrico, em que nos potenciais -0,29 MPa e -0,78 MPa apresentaram acúmulo máximo de $6,62 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS e mínimo de $5,90 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS para EE, enquanto para o EN, $4,34 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS foi o máximo acumulado (-0,81 MPa), e mínimo $3,48 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS (-0,29 MPa).

Observou-se que há um *feedback* negativo entre EE e EN, corroborando com a literatura DOWNIE et al. (2003). O potencial em que houve maior acúmulo de Tre no eixo embrionário (-0,29 MPa), foi o de menor acúmulo no EN (-0,29 MPa) e vice-versa

(Figura 6). Com isso, o aumento e declínio de Tre (Figura 7) indica que há uma regulação metabólica entre os dois tecidos. O aumento, possivelmente, atrelou-se à redução de polímeros, em grande parte compartimentalizados, metabolizados a partir da demanda dessas moléculas na preservação da membrana plasmática, que estaria desestabilizada pela seca (PAUL et al., 2008).

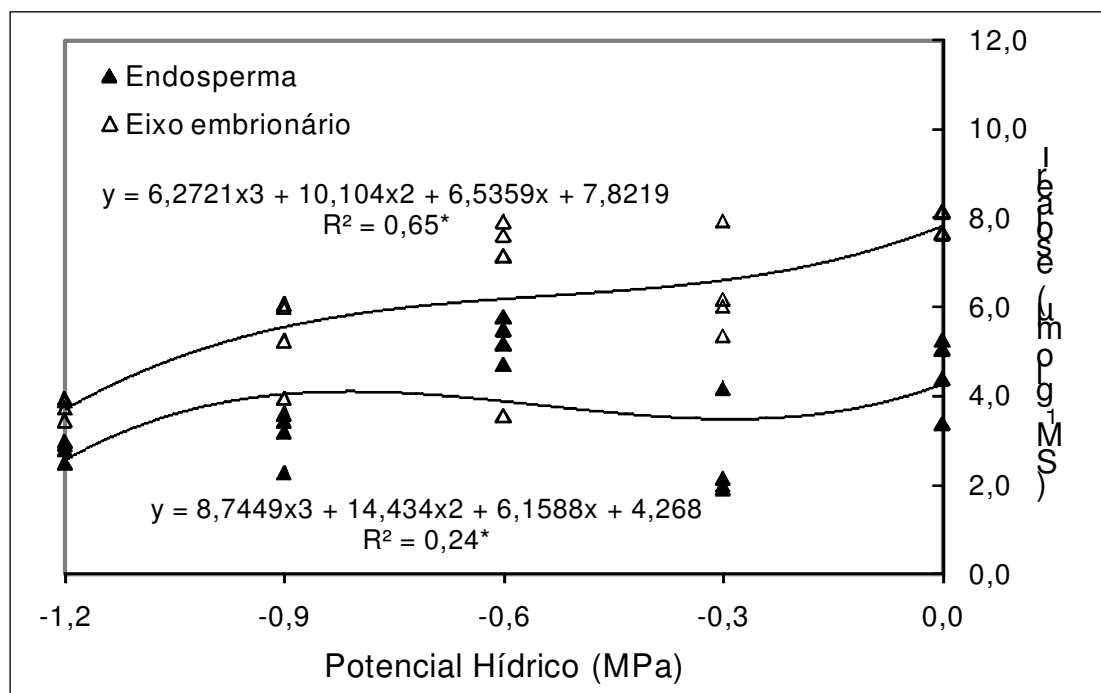


Figura 6. Efeito da limitação hídrica (simulada pela solução de polietilenoglicol) no conteúdo de trealose ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) em sementes germinadas de milho aos dez dias após a imposição dos tratamentos.

Já a redução no teor de trealose (Tre) em ambos os tecidos poderia estar conexa ao dispêndio de energia para sintetizar cada mol desse açúcar, que é limitado nas plantas em condições adversas. Adicionalmente, há relatos do efeito deletério de elevadas concentrações da Tre nas células do tecido vegetal, pois podem influenciar negativamente as chaperoninas, responsáveis pela homeostase das proteínas (WINGLER, 2002).

Tal hipótese permite explicar as oscilações do teor nos distintos tecidos no presente trabalho. Assim, para que haja a manutenção do nível ótimo deste açúcar nos tecidos estudados, há um balanço entre a síntese e a degradação. De tal modo, percebe-se que nem sempre existe a relação direta entre a síntese de Tre com o aumento da limitação hídrica. Possivelmente, o soluto pode ter conduzido à manutenção de um estado hídrico favorável para o metabolismo, atendendo a função de osmorregulador. Do mesmo modo, como o acúmulo de Pro é relativamente dependente dos níveis de sacarose (MOHAMMADKHANI & HEIDARI, 2008), analogicamente, a trealose poderia ter função comum, uma vez que possui função semelhante ao seu isômero (WINGLER, 2002).

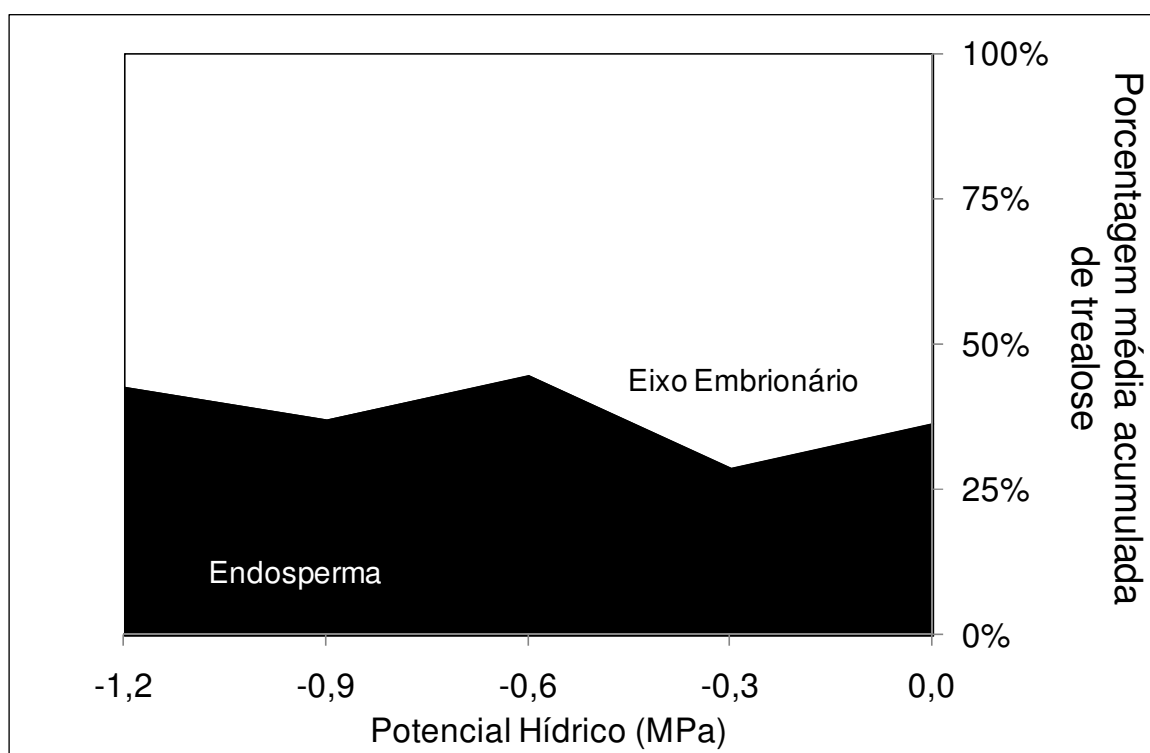


Figura 7. Efeito da limitação hídrica (simulada pela solução de polietilenoglicol) sobre a distribuição média da trealose nos tecidos endospermático e embrionário de sementes germinadas de milho, aos dez dias após a imposição dos tratamentos.

Os estudos sobre a interação dos mecanismos dessas respostas, tanto do ponto de vista fisiológico quanto bioquímico, podem ser observados na análise de correlações de Pearson (Tabela 3).

Verificou-se a dependência entre algumas variáveis avaliadas em resposta à germinação dos híbridos em limitação hídrica. Constatou-se que as variáveis que quantificam a germinação têm correlação entre si, bem como com algumas variáveis metabólicas. As sementes que germinaram mais rapidamente (alto IVG e baixo TMG) e em maior percentual, apresentaram biomassa seca na parte aérea e radicular proporcionais, bem como o teor de trealose (Tre) no eixo embrionário (Tre EE). O inverso ocorreu para o teor de prolina (Pro), tanto no endosperma (Pro EN) quanto no eixo embrionário (Pro EE). Com isso, demonstrou-se que esse dissacarídeo seria mais constitutivo, uma vez que apresentou tendência similar às variáveis de crescimento.

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre variáveis estudadas: Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de germinação (TMG), Índice de germinação sob tratamento (IGT), Teor de prolina no endosperma (Pro EN), Teor de prolina no eixo embrionário (Pro EE), Teor de trealose no endosperma (Tre EN), Teor de trealose no eixo embrionário (Tre EE), Massa seca da parte aérea (MSPA), endosperma (MSEN), eixo embrionário (MSEE) e Raiz (MSR) no 10º dia após semeadura.

	IVG	TMG	IGT	Pro EN	Pro EE	Tre EN	Tre EE	MSPA	MSEN	MSEE	MSR
IVG		-0,98**	0,88**	-0,89**	-0,68*	0,47 ^{ns}	0,65*	0,75*	-0,55 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,68*
TMG	-0,98*		-0,96**	0,92**	0,64*	-0,46 ^{ns}	-0,67*	-0,83**	0,57 ^{ns}	0,17 ^{ns}	-0,79**
IGT	0,88**	-0,96**		-0,89**	-0,47 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,83**	-0,49 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,85**
Pro EN	-0,89**	0,92**	-0,89**		0,49 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	-0,85*	0,57 ^{ns}	0,32 ^{ns}	-0,73*
Pro EE	-0,68*	0,64*	-0,47 ^{ns}	0,49 ^{ns}		-0,64*	-0,56 ^{ns}	-0,56 ^{ns}	0,82**	0,27 ^{ns}	-0,47 ^{ns}
Tre EN	0,47 ^{ns}	-0,46 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	-0,64*		0,35 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-0,65*	-0,42 ^{ns}	0,57 ^{ns}
Tre EE	0,65*	-0,67*	0,63 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	-0,56 ^{ns}	0,35 ^{ns}		0,63 ^{ns}	-0,44 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,48 ^{ns}
MSPA	0,75*	-0,83**	0,83**	-0,85**	-0,56 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,63 ^{ns}		-0,69*	0,01 ^{ns}	0,68*
MSEN	-0,55 ^{ns}	0,57 ^{ns}	-0,49 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,82**	-0,65*	-0,44 ^{ns}	-0,69*		0,27 ^{ns}	-0,55 ^{ns}
MSEE	-0,19 ^{ns}	0,17 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,27 ^{ns}	-0,42 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,27 ^{ns}		-0,21 ^{ns}
MSR	0,68*	-0,79**	0,85**	-0,73*	-0,47 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,68*	-0,55 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	

Correlação significativa *p < 0,05 e **p < 0,01; ^{ns}não-significativa; N=10

O mesmo não ocorreu para Pro EN e Pro EE, havendo uma relação inversa, pois as sementes que estiveram em condições hídricas ótimas para a germinação, não necessitariam acumular o aminoácido. Dessa forma, esse soluto compatível atuaria, efetivamente, na osmoproteção desses tecidos para assegurar o adequado estabelecimento das plântulas em condições subótimas. Outra hipótese seria de que além da prolina agir como uma molécula atóxica de proteção em condições de estresse, também atuaria na dormência secundária da semente. De acordo com THAKUR & SHARMA (2005), possivelmente, esse aminoácido faça parte do sistema que mantém o desenvolvimento do eixo embrionário em repouso, o que corrobora com os resultados de o teor acumulado de prolina ser maior nesse tecido (Figura 5), além da relação inversa com IVG e direta com TMG (Tabela 3).

A relação negativa do teor de Pro EN com MSPA e MSR pode estar relacionada à localização, atuando como fonte energética, uma vez que, com o aumento MSPA e MSR há uma demanda energética para o estabelecimento da plântula, com isso o metabolismo de moléculas de prolina é necessário. A relação inversa do MSEN com teor de Tre EN poderia estar aliada ao metabolismo dos carboidratos (DOWNIE et al., 2003). Acréscimos no potencial osmótico celular ocorrem pelos aumentos na concentração de solutos compatíveis presentes na célula túrgida. Todavia, no caso da trealose, a osmorregulação ocorreria devido à degradação do açúcar para atender a manutenção do metabolismo, como fonte energética, atendendo a demanda celular na síntese de moléculas como a prolina (relação inversa Tre En e Pro EE).

Dessa forma, o estudo da resposta na germinação de milho sob condições adversas é complexo e muitos aspectos necessitam ser mais estudados, elucidados e discutidos.

2.4. Conclusões

A diminuição do potencial hídrico reduz a germinação e a massa seca da parte aérea e raiz das plântulas dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710;

Em condição de limitação hídrica, o índice de germinação de sementes sob tratamento foi semelhante entre os híbridos DKB 390 e DAS 2B710, contudo, o índice de velocidade de germinação foi maior e o tempo médio de germinação foi menor no híbrido DAS 2B710;

A prolina pode ser utilizada como indicador metabólico de resposta dos híbridos de milho (DKB 390 e DAS 2B710) à limitação hídrica durante a germinação quando quantificada no eixo embrionário;

No híbrido DAS 2B710 há o acúmulo de prolina no eixo embrionário conforme a redução do potencial hídrico;

A trealose está presente na constituição do endosperma e eixo embrionário dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710, mas não indica resposta metabólica à limitação hídrica na germinação.

2.5. Referências Bibliográficas

ABO-EL-KHEIR, M. S. A.; MEKKI, B. B. Response of maize single cross-10 to water deficits during silking and filling stages. **World Applied Sciences Journal**, Babol, v. 3, n. 3, p. 269-272, 2007.

ANAMI, S.; DE BLOCK, M.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTNENS, M. Molecular Improvement of tropical maize to drought stress tolerance in Sub Saharian Africa. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 28, p. 16-35, 2009.

BATES, L. S.; WALDREW, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p.205-207, 1973.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 210-222.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

DOWNIE, A. B.; ZHANG, D.; DIRK, L. M. ., THACKER, R. R.; PFEIFFER, J. A.; DRAKE, J. L.; LEVY, A. A.; BUTTERFIELD, D. A; BUXTON, J. W.; SNYDER, J. C. Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 145–160, 2003.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 71, p. 428-434, 1958.

FINCH-SAVAGE; W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, London, v. 171, p. 501-523, 2006.

GILL, P. K.; , SHARMA, A. D.; SINGH, P.; SINGH BHULLAR, S. Osmotic stress-induced changes in germination, growth and soluble sugar content of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 28, n. 3–4, p. 12–25, 2002.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S.; SREENATH, R., REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Lausanne, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

LOPES, M. A.; LARKINS, B. A. Endosperm: Origin, Development and Function. **The Plant Cell**, Heidelberg, v. 5, p. 1383-1399, 1993.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23 p. (Circular Técnica, 22).

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-7, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ. 2005. 495 p.

MOHAMMADKHANI, N.; HEIDARI, R. Drought-induced accumulation of sugars and proline in two maize varieties. **World Applied Sciences Journal**, Babol, v.3, n.3, p.449-453, 2008.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.25, p. 239-250, 2002.

NEVES, M. J.; TERENCE, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalose from the thermophilic fungus *Hudicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 17-19, 1994.

PAUL, M. J.; PRIMAVESI, L. F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. Trehalose metabolism and signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 417-441, 2008.

SANTANA, D. G. de.; RANAL, M. A. Análise estatística. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 197-208.

THAKUR, M.; SHARMA, A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. **Journal of Arid Environments**, London, v. 62, p. 517-523, 2005.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1957-1968, 1991.

WINGLER, A. The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 437-440, 2002.

ZEID, I. M.; EL-SEMARY, N. A. Response of two differentially drought tolerant varieties of maize to drought stress. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Bethesda, v.4, n. 7, p. 779-784, 2001.

CAPÍTULO 3: TOLERÂNCIA DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO À LIMITAÇÃO HÍDRICA

RESUMO: As plantas podem desencadear respostas à limitação hídrica como alterações no metabolismo, crescimento e desenvolvimento. Os teores de sacarose, trealose, açúcares redutores, amido, aminoácidos livres e prolina em folhas de milho (*Zea mays* L.), nos híbridos DKB 390 e DAS 2B710, foram determinados em respostas ao déficit hídrico no estágio vegetativo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em vasos (54 dm³) contendo Latossolo vermelho distrófico (LVd). Houve a redução na fotossíntese, na condutância estomática e no crescimento dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710. O estresse hídrico induziu acúmulo de sacarose e prolina, que podem ser indicadores metabólicos de resposta à limitação hídrica dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710. O híbrido DKB 390 mantém os teores de açúcares redutores e de amido, reduz o teor de trealose e aumenta o teor de aminoácidos livres quando exposto a uma condição hídrica adversa. Já o híbrido DAS 2B710 reduz os teores açúcares redutores e de amido na menor disponibilidade hídrica no solo e mantém os de trealose e aminoácidos livres nessas condições. Os híbridos DKB 390 e DAS 2B710 apresentam tolerância semelhante à limitação hídrica no estágio vegetativo.

Palavras-chave: *Zea mays*, fotossíntese, metabolismo, solutos compatíveis, estresse hídrico.

Tolerance of two maize hybrids to water stress

ABSTRACT: Plants can trigger responses to water limitation as changes in metabolism, growth and development. The levels of sucrose, trehalose, reducing sugars, starch, total free amino acids and proline in leaves maize (*Zea mays* L.), DKB 390 and DAS 2B710 varieties, were determined in response to a water deficit at the silking stage. The experiment carried out in greenhouse. Plants were cultivated in pots (54 dm³) containing Oxisoil. There was a reduction in photosynthesis, stomatal conductance and growth of DKB 390 and DAS 2B710 hybrids. The water stress induced accumulation of sucrose and proline, which can be indicators of metabolic response to water limitation of DKB and 390 DAS 2B710. The DKB 390 hybrid maintains the reducing sugars and starch content, reduces the level of trehalose and increased the free amino acids content when exposed to adverse water conditions. Since the DAS 2B710 hybrid reduces the levels of reducing sugars and starch in less soil water availability and maintain the trehalose and free amino acids in these conditions. The DKB 390 and DAS 2B710 hybrids show similar tolerance to water limitation in the vegetative stage.

Key words: *Zea mays*, photosynthesis, metabolism, soluble compatible, water stress

3.1. Introdução

Durante o ciclo de vida das plantas nem sempre as condições ambientais são ótimos ao seu crescimento e desenvolvimento. Um importante fator ambiental que frequentemente limita o crescimento é a redução na disponibilidade hídrica do solo. O estresse hídrico ocorre geralmente na natureza e em ecossistemas de produção, de maneira gradual e, por isso, as plantas tolerantes desenvolveram mecanismos para se adaptarem às limitações hídricas do solo (MAGALHÃES et al., 2002; DURÃES et al., 2004).

A tolerância de plantas a ambientes adversos ou a condições de fatores ambientais subótimos envolve a adaptação a estresses múltiplos, com interações diretas e indiretas. Assim, torna-se de grande importância a caracterização de genótipos contrastantes, bem como os estudos sobre a interação e a sobreposição de mecanismos, tanto do ponto de vista fisiológico quanto bioquímico (DURÃES et al., 2004; ANAMI et al., 2009).

A capacidade de acúmulo de solutos compatíveis é uma resposta comum em organismos sob condições adversas, e vem sendo muito investigada nas plantas nos últimos anos (ZEID & EL-SEMARY, 2001; ABO-EL-KHEIR & MEKKI, 2007; MOHAMMADKHANI & HEIDARI, 2008; DÍAZ et al., 2010). Os vegetais superiores em condições de estresse hídrico acumulam açúcares, prolina livre, ácidos orgânicos, íons, entre outros solutos (BARTELS & SUNKAR, 2005; ANAMI et al., 2009). Estes solutos compatíveis são moléculas ou íons atóxicos que não interferem no metabolismo e se acumulam predominantemente no citoplasma, onde têm função de manter a turgescência celular, além de estabilizar proteínas e estruturas celulares nas condições subótimas dos fatores ambientais (BRAY et al., 2001; BARTELS & SUNKAR, 2005).

O crescimento vegetal é reflexo do balanço de carbono na planta, que depende dos processos de fotossíntese e de respiração nos vegetais, os quais, por sua vez, dependem de uma complexa série de fatores ambientais, como disponibilidade de água, de nutrientes e de energia (ANGELOCCI, 2002). A redução da capacidade fotossintética é uma importante resposta ao estresse hídrico. Para conservar água, nutrientes e

carboidratos necessários para a sobrevivência, as plantas apresentam modificações morfofisiológicas, como a redução da expansão foliar e o fechamento dos estômatos. Como o estômato controla a difusão de CO₂ e de vapor de água, suas respostas à deficiência hídrica são fundamentais no controle da eficiência de assimilação de CO₂ e da economia de água (TAIZ & ZEIGER, 2010).

A cultura do milho (*Zea mays* L.) encontra-se amplamente disseminada no Brasil e no mundo. Dessa forma, o cultivo desta espécie é realizado em determinadas regiões cujo ciclo de desenvolvimento coincide com os períodos em que ocorre a limitação hídrica, afetando o desenvolvimento das plantas, e, portanto, a produção da biomassa vegetal. Estima-se que na região tropical, 95% do cultivo são realizados em áreas propensas à deficiência hídrica, ocasionando um declínio de 10% a 50% da produção, dependendo do estágio fenológico em que a cultura se encontra (MAGALHÃES et al., 2002; MOHAMMADKHANI & HEIDARI, 2008).

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é um dos principais problemas da agricultura e a habilidade das plantas para tolerar a tal estresse é de suma importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país. Estudos de tolerância à limitação hídrica envolvendo o milho podem trazer melhorias no crescimento e no rendimento da cultura em regiões com limitação hídrica, pois o milho é conhecido pela sua alta sensibilidade a este estresse (revisado por MAGALHÃES et al., 2009). Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de solutos orgânicos e suas respectivas contribuições para o ajustamento osmótico em folhas de diferentes híbridos de milho, em distintas disponibilidades hídricas no solo.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Instalação e condução do experimento

O experimento foi desenvolvido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

Com o intuito de se observar as respostas bioquímico-fisiológicas à limitação hídrica foi desenvolvido um experimento em casa de vegetação com os híbridos DKB 390 e DAS 2B710 que possuem as características apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos híbridos de milho

Empresa	Híbrido	Base genética*	ciclo	grão
Dekalb	DKB 390 [®]	HS	Precoce	semidentado
Dow AgroSciences	DAS 2B710 [®]	HS	Precoce	semiduro

*Base Genética: HS-Híbrido simples.

Após a germinação e desbaste, foram mantidas três plantas por vaso com capacidade para 54 dm³, as quais foram cultivadas em Latossolo Vermelho distrófico (LVd), típico, textura média, A moderado caulinitico, hipoférico (ANDRIOLI & CENTURION, 1999) sem restrição hídrica até o estágio V₃, quando as plantas foram submetidas a duas distintas tensões hídricas (-0,01 e -0,06 MPa). Sendo assim, os quatro tratamentos implantados foram os seguintes:

Tratamento 1 = Híbrido DKB 390 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,01 MPa (Controle);

Tratamento 2 = Híbrido DKB 390 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,06 MPa (déficit hídrico);

Tratamento 3 = Híbrido DAS 2B710 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,01 MPa (controle);

Tratamento 4 = Híbrido DAS 2B710 cultivado em solo com tensão hídrica de $-0,06$ MPa (déficit hídrico).

Para o controle do conteúdo de água no solo foram instalados dois tensiômetros em cada unidade experimental, sendo um na profundidade de 10 cm e o outro na de 30 cm. Através de tensímetro digital, foi mensurada a umidade (tensão hídrica) do solo com o monitoramento diário das leituras das tensões do solo, mantendo a umidade concernente a cada tratamento (Figura 1). A estimativa da umidade do solo de cada vaso foi realizada a partir da média das leituras dos tensiômetros instalados nos vasos. A reposição de água foi realizada com uso de regas superficiais e de um tubo de PVC com perfurações ao longo de toda a extensão do vaso, instalado no centro geométrico, para garantir uma rápida e uniforme distribuição da umidade no solo do vaso.

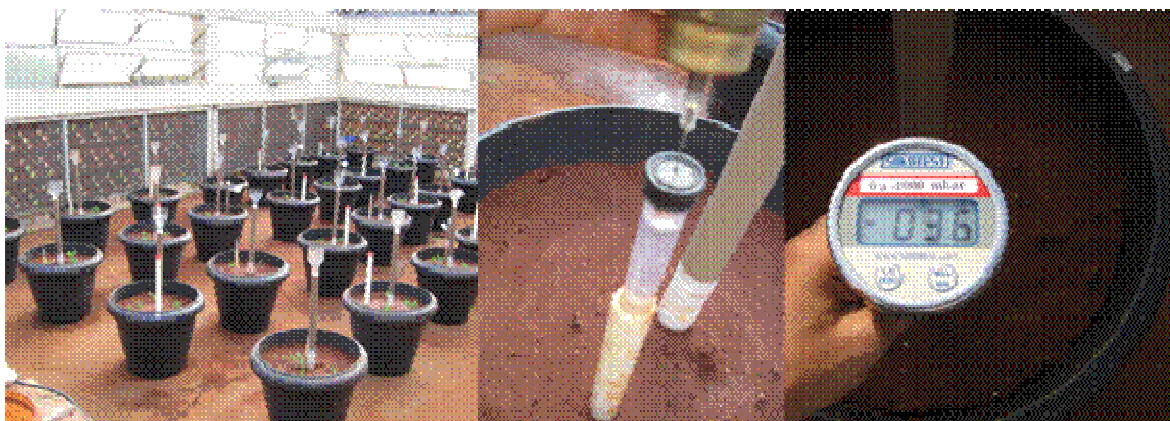


Figura 1. O controle do conteúdo de água no solo foi realizado através de tensiometria.

Após a germinação foram mantidas três plantas por vaso, as quais foram mantidas sem limitação hídrica até estágio vegetativo V_3 . A partir deste estágio, houve a diminuição da tensão do solo conforme estabelecido nos tratamentos, mantidos até o estágio V_{10} (Figura 2).

As adubações de base e de cobertura foram realizadas de acordo com as recomendações para a cultura do milho (RAIJ et al., 1997; FORNASIERI FILHO, 1992;

Vide apêndice A.3). A temperatura e a umidade relativa do ar foram monitoradas na casa de vegetação, com auxílio de um termohigrômetro até o término do experimento.



Figura 2. Mantiveram-se três plantas/vaso. Visão geral do experimento

4.3.2. Avaliações bioquímico-fisiológicas

Durante o período de limitação hídrica, o comprimento de uma folha jovem em expansão (com a lígula ainda não evidente) foi medido diariamente, no mesmo horário, em todas as unidades para cálculo da taxa de elongação foliar. O alongamento diário foi adquirido da diferença entre a medida do dia corrente com a do dia anterior. A elongação foliar está relacionada à expansão da célula que é dependente do turgor celular, o qual é extremamente sensível à limitação hídrica. Com auxílio de uma trena mediu-se a altura das plantas (do solo até a inserção da folha +1) e a altura de inserção

de espiga (do solo até a inserção da espiga principal). O diâmetro foi avaliado com auxílio de paquímetro no terceiro internó a contar do solo.

Na primeira folha jovem e completamente expandida foi medida a fotossíntese líquida e condutância estomática, com auxílio de um medidor portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor, Inc. EUA), equipado com uma fonte artificial de luz, ajustada para 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, entre 9 e 12 h, horário local (Figura 3).

No estágio V₆, foi coletada a folha +1 (caracterizada como primeira folha com aurícula visível) no início da manhã e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para ultra-freezer ajustado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem realizadas as quantificações dos metabólitos (Figura 4).



Figura 3. Mensuração da fotossíntese líquida e condutância estomática, com auxílio de medidor portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor, Inc. EUA).

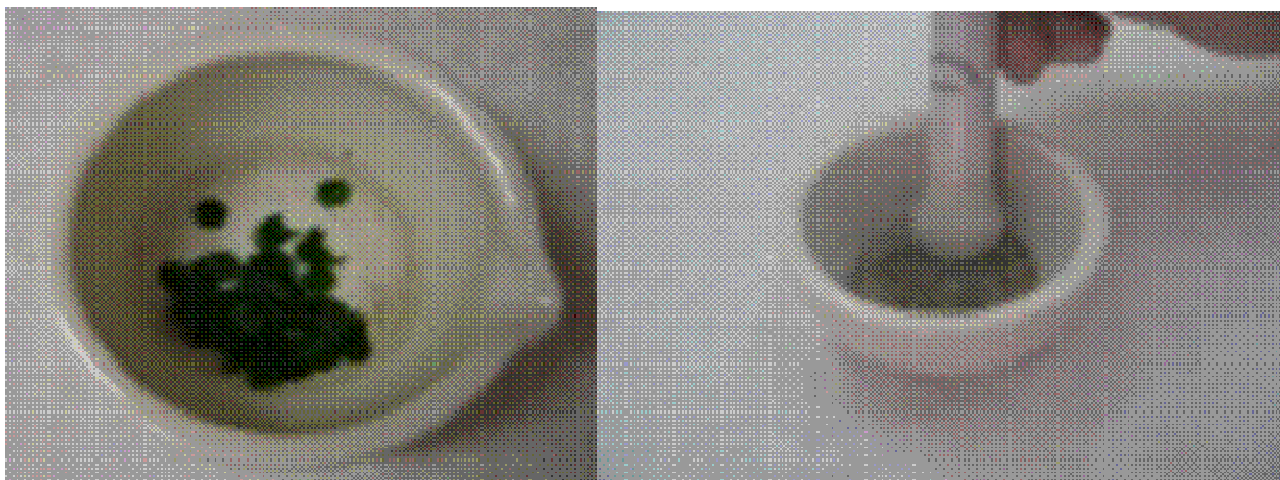


Figura 4. Amostras de folhas liofilizadas maceradas em nitrogênio líquido para análises bioquímicas.

Para a extração dos metabólitos sacarose, açúcares redutores, amido e aminoácidos livres, utilizaram-se 25 mg de cada amostra. Em seguida a amostra foi agitada em um tubo de centrífuga contendo 1 mL de etanol 80% e em seguida colocou-se em banho-maria a 60 °C, por 30 minutos. Após centrifugação durante 20 minutos a 1.200 x g o sobrenadante foi retirado, adicionado mais 1 mL de etanol 80% repetindo-se o processo por mais duas vezes, juntou-se os sobrenadantes e o volume completado para 8 mL com água deionizada (FALEIROS et al., 1996).

Neste extrato foram determinados os teores de açúcares redutores através da reação com DNSA (ácido 3,5-dinitrosalicílico), com posterior determinação espectrofotométrica a 520 nm, seguindo as indicações de FALEIROS et al. (1996). Os teores de sacarose foram determinados através da reação quantitativa com resorcinol, com posterior leitura espectrofotométrica a 520 nm (FIEW & WILLENBRINK, 1987). Os teores de aminoácidos livres foram determinados pela reação quantitativa com ninhidrina, com posterior determinação espectrofotométrica a 570 nm (MOORE, 1968).

A prolina livre foi extraída e mensurada de acordo com método descrito por BATES et al.(1973).

A trealose foi determinada por reação enzimática através da ação hidrolítica da trealase em meio tamponado, sendo posteriormente, quantificado o produto glicolítico, através da enzima glicoseoxidase e, posterior leitura espectrofotométrica a 505 nm (NEVES et al., 1994).

Para as avaliações biométricas, a parte aérea foi separada nas partes: lâminas foliares, colmo+bainha, flores e espiga, sendo acondicionadas em saco de papel e colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 80 °C até atingir peso constante. Posteriormente foram pesadas em balança digital com precisão de $\pm 0,01$ g.

3.2.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 2x2 (dois híbridos x duas disponibilidades hídricas no solo) com cinco repetições, a fim de se ter um melhor controle das variáveis ambientais dentro da casa de vegetação.

Realizou-se a análise de variância pelo teste F, utilizando-se do teste de Tukey para a comparação entre médias dos fatores qualitativos, híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS), segundo BANZATTO & KRONKA (2006).

3.3. Resultados e Discussão

Para a grande maioria das respostas bioquímico-fisiológicas, a interação híbrido x disponibilidade hídrica no solo (HxDHS) foi não-significativa ($p > 0,05$), ou seja, os efeitos da disponibilidade hídrica sobre a fotossíntese (A), a condutância estomática (gs), a elongação foliar (EFM), a altura da planta (Alt), a altura de inserção de espiga (Alt.I.E), o diâmetro do colmo (Diam.), a sacarose (sac.), a trealose (Tre) e a prolina (Pro) independem do tipo de híbrido. Para as variáveis açúcares redutores (Aç.Red.), amido e aminoácidos livres (AA) a interação foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 1).

As plantas sob estresse hídrico apresentaram reduções significativas ($\approx 98\%$) na fotossíntese líquida (Figura 5). O híbrido DKB 390 apresentou valores 26,05 e 1,47 $\mu\text{moles de CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ nas DHS -0,01 e -0,06 MPa, respectivamente. Enquanto que para o híbrido DAS 2B710 foram 29,43 e 1,47 $\mu\text{moles de CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$, nas mesmas condições. A condutância estomática (Figura 6) também foi afetada no potencial mais negativo (-0,06 MPa), de forma similar nos híbridos de milho: de 0,37 para 0,019 mmol de $\text{H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$, para o híbrido DKB 390, e de 0,30 para 0,020 mmol de $\text{H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$ no DAS 2B710.

Tabela 5. Análise de variância por meio do Teste F das respostas bioquímico-fisiológicas (*p value*) de híbridos de milho submetidos a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

Causa da variação	G.L.	<i>p value</i> dos parâmetros bioquímico-fisiológicos												
		A	Gs	EFM	Alt.	Alt.I.E	Diam.	MST	Sac.	Tre.	Ac.Red	Amido	AA	Pro
Híbridos (H)	1	0,46 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,78 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,01**	0,10 ^{ns}	0,01**	0,30 ^{ns}
Disponibilidade hídrica no solo (DHS)	1	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01*	0,01**	0,01**
Interação HxDHS	1	0,46 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,79 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,01**	0,02 [*]	0,01**	0,97 ^{ns}
(Tratamentos)	3													
Resíduo	16													
Total	19													
C.V	-	19,42	15,64	11,11	16,14	18,23	14,06	19,32	8,25	10,75	10,07	9,48	9,06	7,26

**significativo ($p < 0,01$); *significativo ($p < 0,05$); ^{ns}não-significativo ($p > 0,05$).

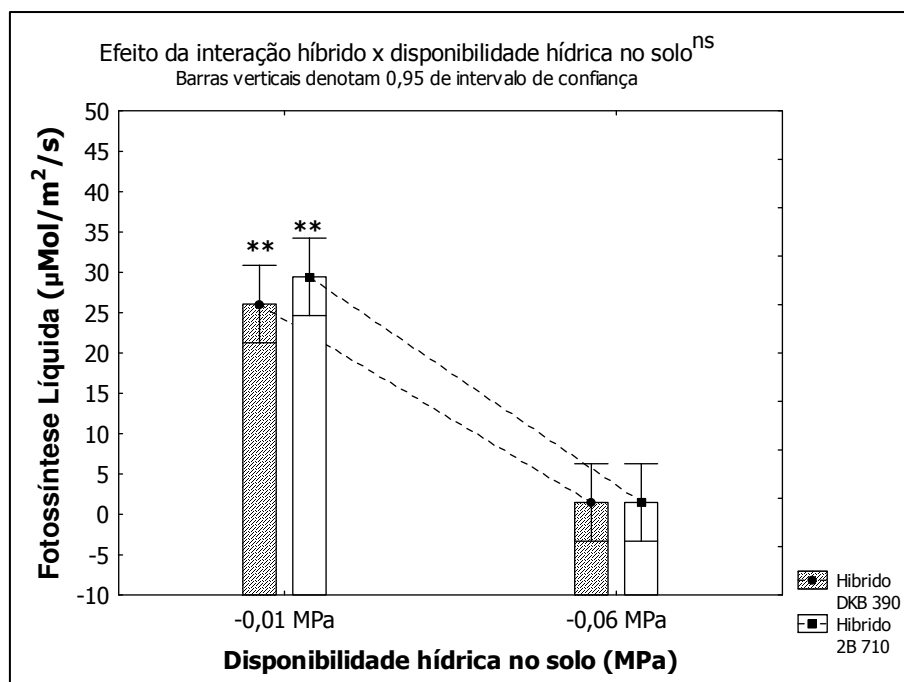


Figura 5. Fotossíntese líquida de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

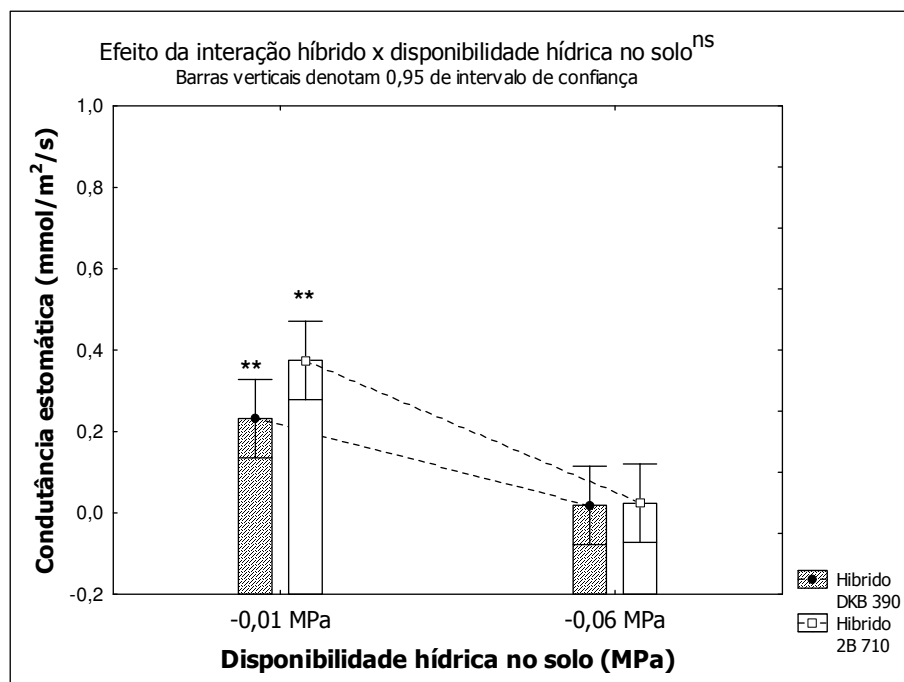


Figura 6. Condutância estomática de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

Esses resultados indicam que as plantas de milho sob deficiência hídrica possuem um decréscimo da fotossíntese, devido à diminuição da condutância estomática, ocasionando o fechamento dos estômatos e a redução da transpiração (GRZESIAK et al., 2007; GHANNOUM, 2009). Decréscimos na fotossíntese e na condutância foram também observados por XU et al. (2009) em uma variedade de milho chinesa sob deficiência hídrica. Estudos de HUND et al. (2009) indicaram diferenças na tolerância de híbridos de milho ao estresse hídrico por meio da avaliação das taxas fotossintéticas e condutância estomática, contrariamente, neste estudo os híbridos apresentaram respostas semelhantes em ambas DHS, corroborando com MAGALHÃES et al. (2009) que caracterizaram linhagens de milho contrastantes à seca no estágio de florescimento através de parâmetros de trocas gasosas, e não verificaram diferenças significativas entre as linhagens sob estresse hídrico.

O decréscimo na elongação foliar média foi semelhante para os dois híbridos (Figura 7). Contudo, houve diminuição significativa do crescimento do híbrido DKB 390 sob limitação hídrica. Como o alongamento foliar depende da expansão celular, em déficit hídrico, há uma inibição da expansão celular. Há evidências que fatores como síntese da parede celular e de membranas, divisão celular e síntese protéica coordenam essa resposta (TAIZ & ZEIGER, 2010), corroborando com os resultados de SANTOS & CARLESSO (1998) que verificaram menor redução na expansão de folhas de milho em plantas cultivadas em solo de textura arenosa, submetidas a déficit hídrico.

Os efeitos deletérios do estresse hídrico sobre o crescimento das plantas dos dois híbridos de milho foram detectados em todos os parâmetros analisados (Tabela 1). As características biométricas: altura, altura de inserção de espiga, diâmetro do colmo e massa seca total apresentaram diferenças quando as plantas foram submetidas à disponibilidade hídricas distintas. Conforme houve a supressão hídrica, a altura, a altura de inserção de espiga, o diâmetro do colmo e a massa seca total apresentaram reduções drásticas, aferindo redução no crescimento vegetal (Figuras 8, 9, 10 e 11).

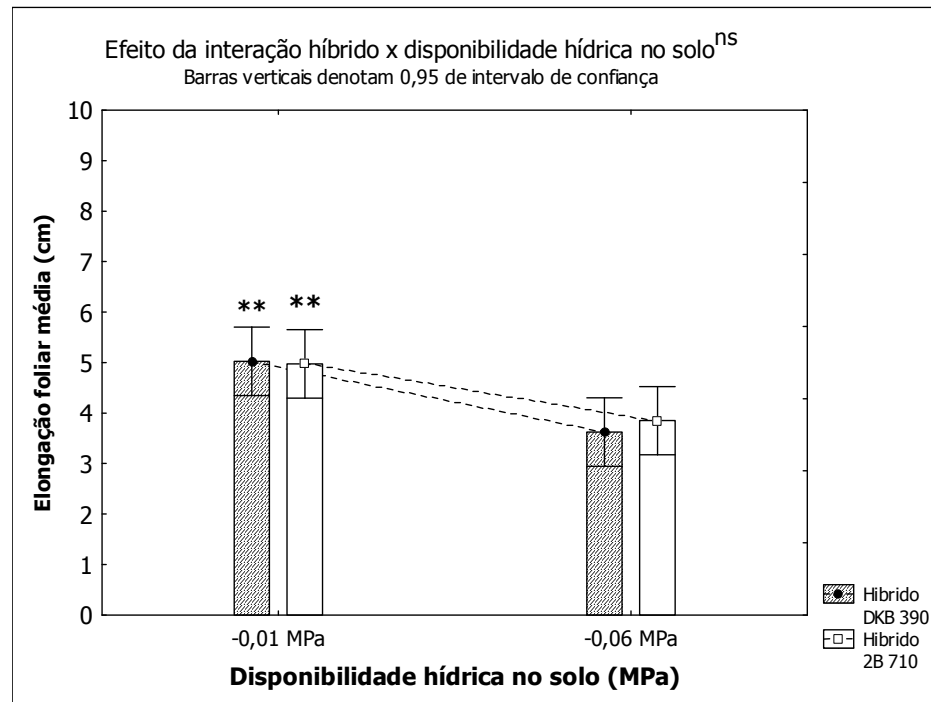


Figura 7. Elongação foliar de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

O crescimento celular que tem dois componentes, divisão e alongamento celular, é um dos processos da planta mais sensível à deficiência hídrica, e é, normalmente, reduzido mesmo antes da fotossíntese ou condutância estomática (DURÃES et al., 2004; TAIZ & ZEIGER, 2010). Com a diminuição da disponibilidade hídrica do solo, ocorreu uma redução do alongamento celular (Figura 8), e consequentemente, no consumo de carbono e energia, observados com a redução da fotossíntese líquida (Figura 5) e condutância estomática (Figura 6).

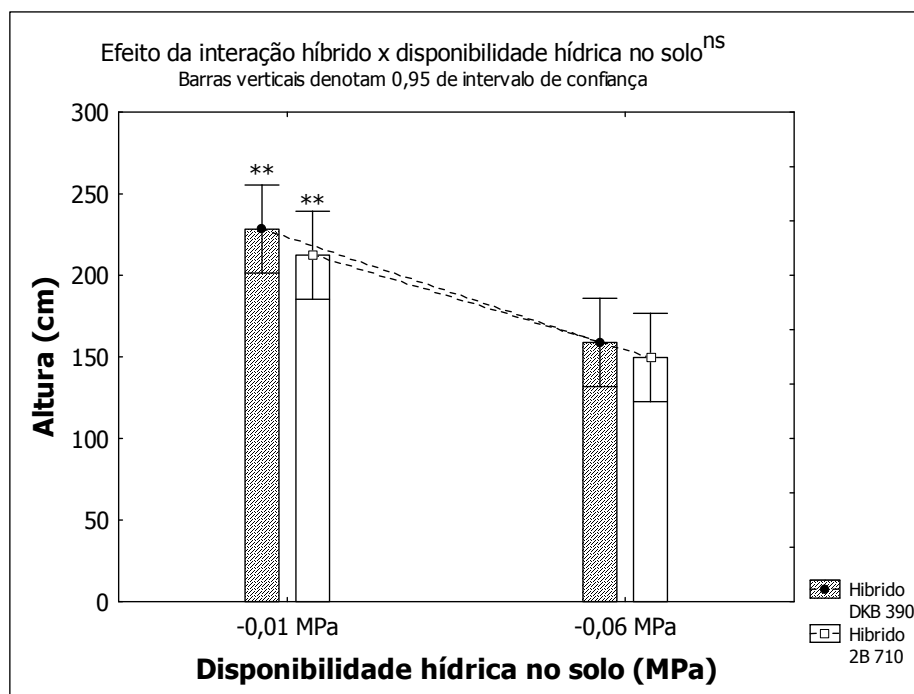


Figura 8. Altura da planta de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

**Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

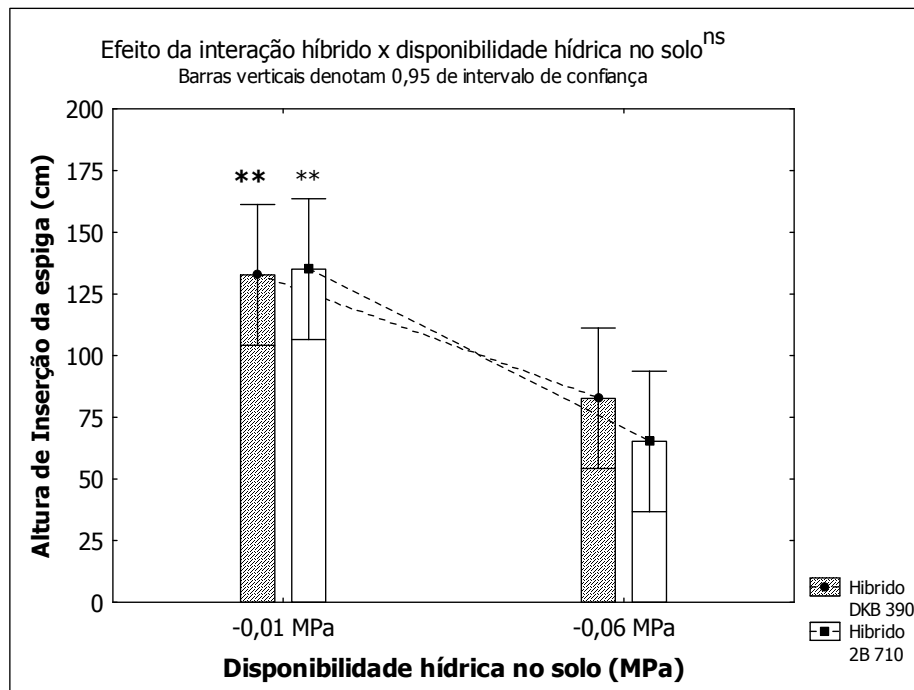


Figura 9. Altura de inserção de espiga de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

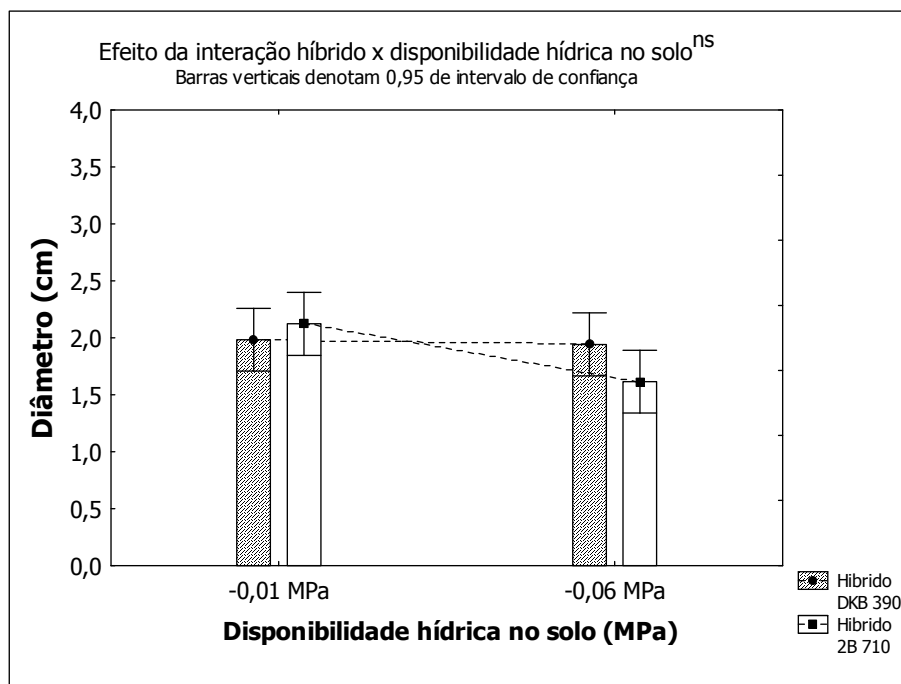


Figura 10. Diâmetro do colmo de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. Não houve diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p > 0,05$).

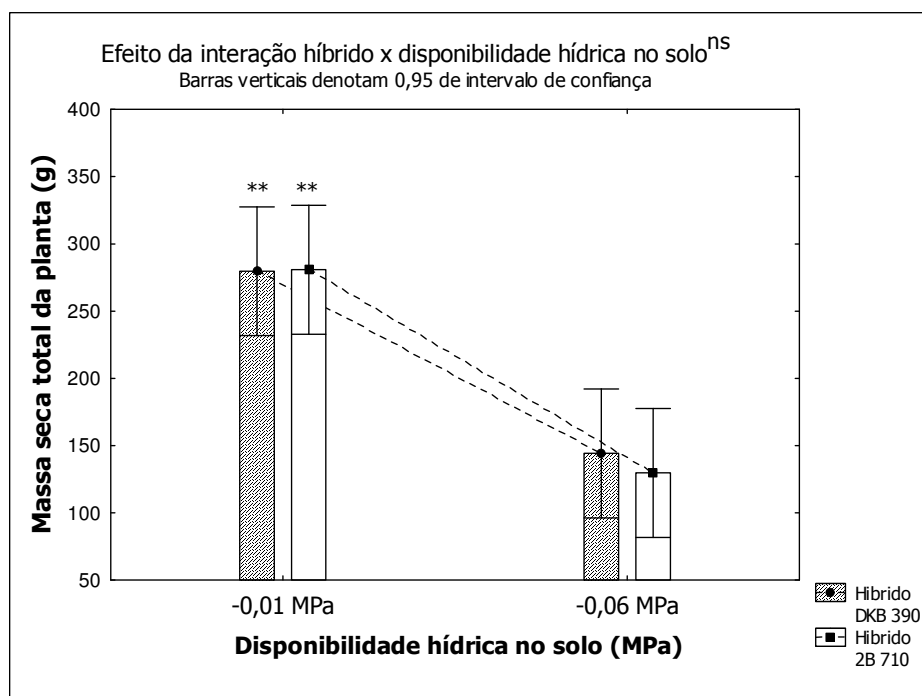


Figura 11. Massa seca total de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

Para muitas gramíneas a combinação dos mecanismos de tolerância à seca (acúmulo e translocação de assimilados, redução da área foliar, ajustamento osmótico, entre outros) é determinante no potencial de sobrevivência da espécie durante a seca, BARTELS & SUNKAR (2005) (Figura 12).



Figura 12. Sintoma visual do estresse hídrico: Enrolamento das folhas no tratamento com menor capacidade de água disponível no solo (-0,06 MPa).

Com relação aos teores de sacarose, os híbridos apresentaram um acréscimo nos teores na condição menor DHS (-0,06 MPa). O híbrido DKB 390 aumentou em 2,5 vezes o teor de açúcar ($47,58$ a $108,89 \mu\text{mol g MS}^{-1}$) em suas folhas. Em contrapartida, apesar de apresentar valores maiores no teor de sacarose nas duas DHS ($93,45$ a $167,02 \mu\text{mol g MS}^{-1}$), o híbrido DAS 2B710 acrescentou 1,8 vezes a mais o açúcar em suas folhas (Figura 13).

De acordo com esses resultados, presumiu-se que a sacarose exerceu alguma função em plantas de milho sob condição de limitação hídrica, pois apesar das plantas terem reduzido a sua taxa de fotossíntese drasticamente (Figura 6), percebeu-se que não houve competição entre a síntese de sacarose e fotossíntese, contrariando as postulações de SERRAJ & SINCLAIR (2002) os quais afirmam que um mecanismo de manutenção da turgescência e do crescimento do tecido sob deficiência hídrica ou

estresse (ajustamento osmótico), seria limitado pela própria fotossíntese, fonte do fotossintato sacarose. Porém, há indícios que o incremento nos teores de sacarose advém da hidrólise de polissacarídeos, como o amido, em grande parte compartimentalizados, pois haveria a demanda do açúcar para atuar na preservação da membrana plasmática, que estaria desestabilizada pela seca (ROSA et al., 2009).

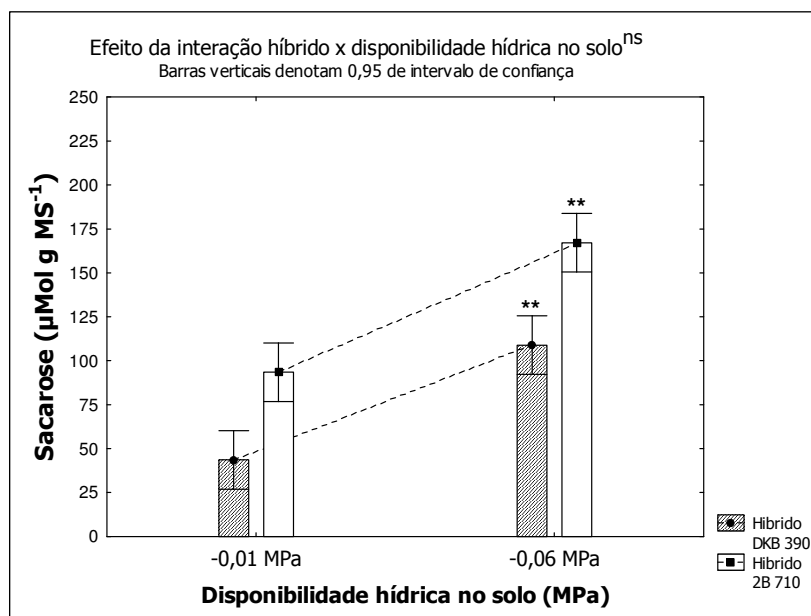


Figura 13. Teor de sacarose de híbridos de milho em reposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

Contrariamente ao seu isômero (sacarose), os teores do dissacarídeo trealose foram reduzidos significativamente no híbrido DKB 390 ($\approx 40\%$) de 1,81 para 1,04 $\mu\text{mol g MS}^{-1}$, enquanto que no híbrido DAS 2B710 houve um decréscimo irrisório ($\approx 15\%$) de 0,75 a 0,60 $\mu\text{mol g MS}^{-1}$ (Figura 14). Os resultados desta pesquisa vão de encontro às realizadas em outras gramíneas, onde as maiores quantidades foram também detectadas em plantas mais tolerantes à seca (GARG et al., 2002a; GARG et al., 2002b; El-BASHITI et al., 2005). As quantidades encontradas em cultivares geneticamente

modificadas para tolerar a seca, arroz, cana-de-açúcar e de trigo, foram de 0,17, 0,15 e 0,63 mg g⁻¹ de massa fresca, respectivamente.

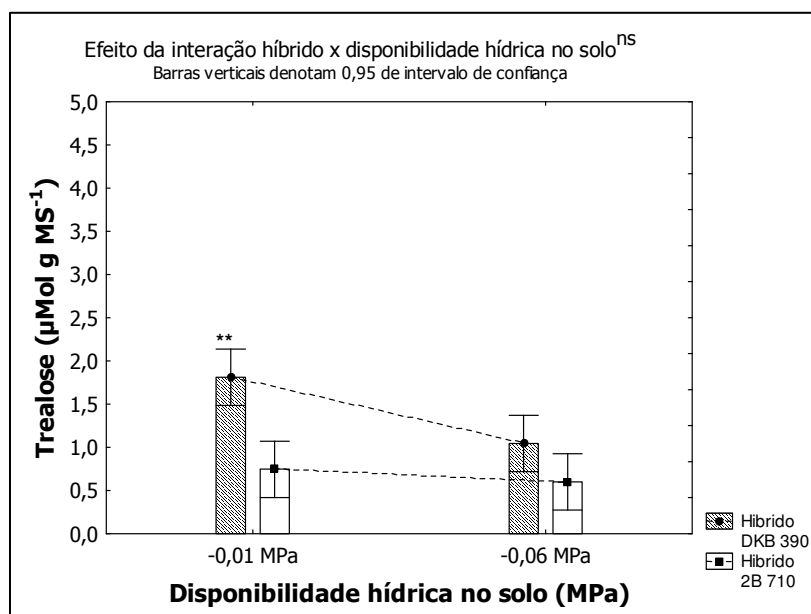


Figura 14. Teor de trealose de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. **Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

De acordo com ITURRIAGA et al. (2009), exceto nas plantas de ressurreição, os níveis de trealose obtidos nas plantas superiores não possuem correlação com a tolerância a estresse. Esta falta de correlação pode se dar devido a ela não ser o composto ativo e sim a trealose-6- fosfato (T6P). A trealose-6-fosfato (T6P), um intermediário da via da trealose formada pela ação da enzima TPS, é, segundo SCHLUEPMANN et al. (2003, 2004), indispensável para a utilização de carboidrato disponível durante o crescimento e desenvolvimento da planta e está intimamente relacionada com a percepção de estresses nutricionais, bióticos e abióticos. Dessa forma, pode-se explicar em parte o não-acúmulo de trealose nas folhas de milho em condição de estresse hídrico do presente estudo, contudo, teoricamente, deveria haver uma manutenção do conteúdo do açúcar e não um decréscimo, já que o mesmo tem função osmoprotetora em condição adversa.

Adicionalmente, alguns autores apontam que o acúmulo de trealose em plantas superiores vasculares, em condições adversas, é um fenômeno raro, sugerindo que na

maioria das espécies, a sacarose seria mais atuante na preservação membranas, proteínas, do que a trealose (WINGLER, 2002).

De fato, em vegetais superiores, as concentrações de sacarose são bem mais superiores que as de trealose, como também foram observadas no presente estudo. Isso se deve à ação celular deste último ser realizada em baixas concentrações para prevenção de efeitos danosos do seu acúmulo na regulação do metabolismo do carbono (WINGLER, 2002). Entretanto, muitos estudos demonstram que outros dissacarídeos como a sacarose induzem, somente em parte, a estabilização celular quando comparada com a trealose; e que a ação deste carboidrato na estabilização de membranas em condição de seca, chega a ser três vezes mais eficiente que a sacarose, devido à alta afinidade da molécula às ligações do tipo ponte de hidrogênio (PATIST & ZOERB, 2005; ITURRIAGA et al., 2009).

A quantidade de açúcares redutores varia entre híbridos conforme a disponibilidade de água no solo. O teor de açúcares redutores foi diferente nos híbridos apenas no maior potencial hídrico (-0,01 MPa). Para o híbrido DKB 390 não houve diferenças significativas no teor do açúcar nas plantas cultivadas em distintas DHS. O mesmo não ocorreu para o híbrido DAS 2B710 que apresentou diferença no potencial mais negativo (Figura 15). Para o teor de amido nas folhas, houve distinção de acordo com a disponibilidade de água no solo (Figura 16). Para o híbrido DKB 390 não houve diferenças significativas no teor do polissacarídeo nas plantas cultivadas em distintas DHS. Já o híbrido DAS 2B710 reduziu o teor de amido na menor disponibilidade hídrica (-0,06 MPa).

Para alguns autores, o acúmulo de açúcares não-redutores nas plantas pode ocorrer devido à degradação de polissacarídeos, como amido, resultando a produção de sacarose, altamente solúvel, que atua na preservação da integridade celular em condições adversas (BARTELS & SUNKAR, 2005; ITURRIAGA et al., 2009), corroborando com os resultados presentes nesta pesquisa.

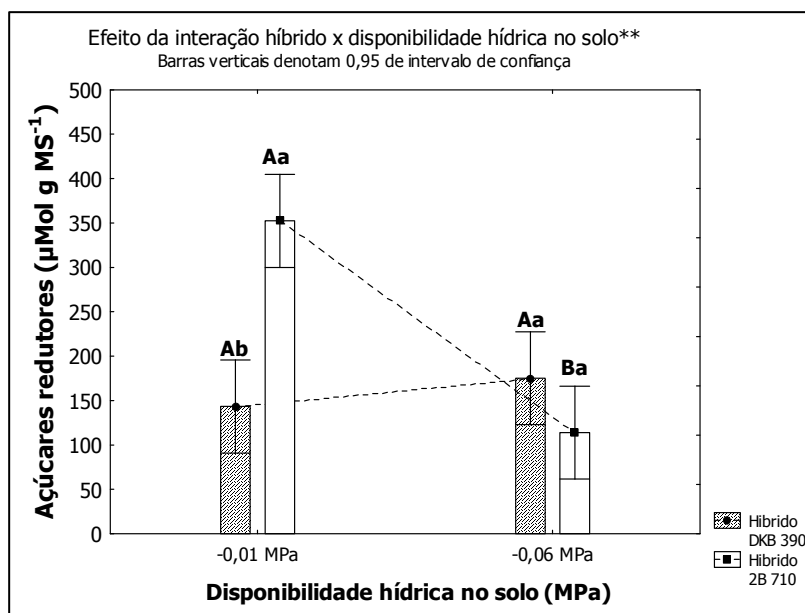


Figura 15. Teor de açúcares redutores de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si os teores de açúcares redutores em condições controle e déficit hídrico ($p>0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si os teores de açúcares redutores dos híbridos DKB 290 e DAS 2B710 ($p>0,05$).

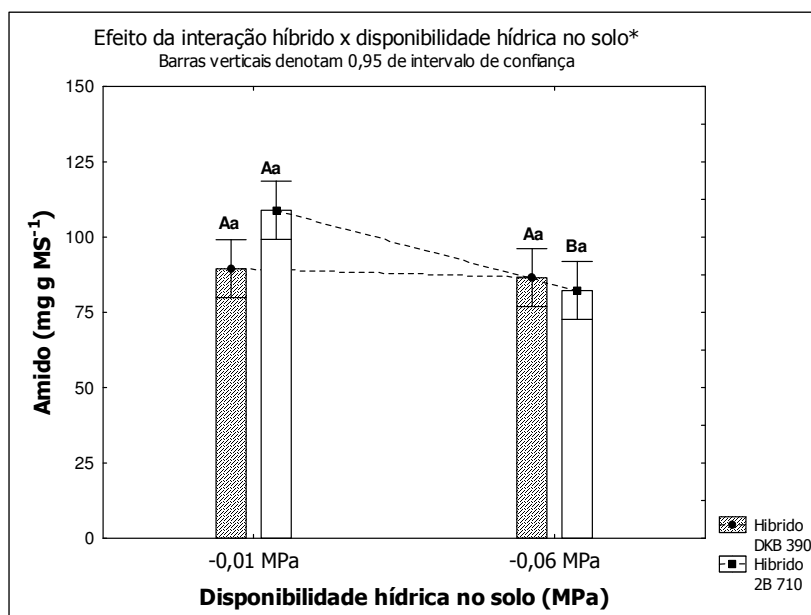


Figura 16. Teor de amido de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si os teores de amido em condições controle e déficit hídrico ($p>0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si teores de amido dos híbridos DKB 290 e DAS 2B710 ($p>0,05$).

Na figura 17, verificou-se o distinto comportamento no teor de aminoácidos livres dos híbridos quando submetidos a diferenças na disponibilidade hídrica no solo. Em condições ótimas de água no solo, não apresentaram diferenças entre si, contudo, a partir da redução da umidade no solo (-0,06 MPa) houve uma discrepância entre eles. O híbrido DKB 390 tem o teor aumentado de acordo com a redução do potencial. Já para o híbrido DAS 2B710 não houve alterações na produção desse soluto, sendo estável em todas as situações de DHS. Geralmente, parte dos estudos realizados em plantas sob condições de deficiência hídrica evidenciou que o acúmulo de aminoácidos livres aumenta gradativamente, conforme o tempo de imposição ao estresse (FUMIS & PEDRAS, 2002; YAMADA et al., 2005), embora, também seja verificada em outros trabalhos, tendências de estabilização e/ou decréscimo desses compostos (FUMIS & PEDRAS, 2002; CARVALHO et al., 2003). A constância das quantidades encontradas do híbrido DAS 2B710 poderia estar atribuída à aclimação do híbrido ao estresse, caracterizando certa tolerância (FUMIS & PEDRAS, 2002)

O teor de prolina aumentou em quase 50% quando as plantas de milho estiveram sob estresse hídrico (Figura 19). Esse desempenho foi semelhante em ambos os híbridos. Para o híbrido DKB 390 na DHS -0,01 MPa o teor foliar de prolina foi de $3,21 \mu\text{mol g MS}^{-1}$, acrescido a $5,68 \mu\text{mol g MS}^{-1}$ na condição limitante de água no solo (-0,06 MPa). No híbrido DAS 2B710 esses valores foram 3,69 e $6,12 \mu\text{mol g MS}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados corroboram com distintos estudos de FERREIRA et al. (2002), MOHAMMADKHANI & HEIDARI (2008) e EFEOGLU et al. (2009) que também observaram, em genótipos de milho, aumento significativo no teor do aminoácido, utilizando a prolina como marcador bioquímico na avaliação de genótipos de milho com diferentes graus de tolerância à seca. Nas plantas avaliadas por MOHAMMADKHANI & HEIDARI (2008), o incremento do aminoácido foi de 3,13 vezes na variedade mais tolerante em relação à sensível (1,56 vezes). No entanto, quando as plantas foram reidratadas, observaram decréscimo no conteúdo do soluto, ou retorno aos níveis normais, possivelmente, a prolina deixa o papel de soluto compatível e age como protetora atuando como eliminadora de radicais livres ou como fonte de energia (FERREIRA et al., 2002; EFEOGLU et al., 2009).

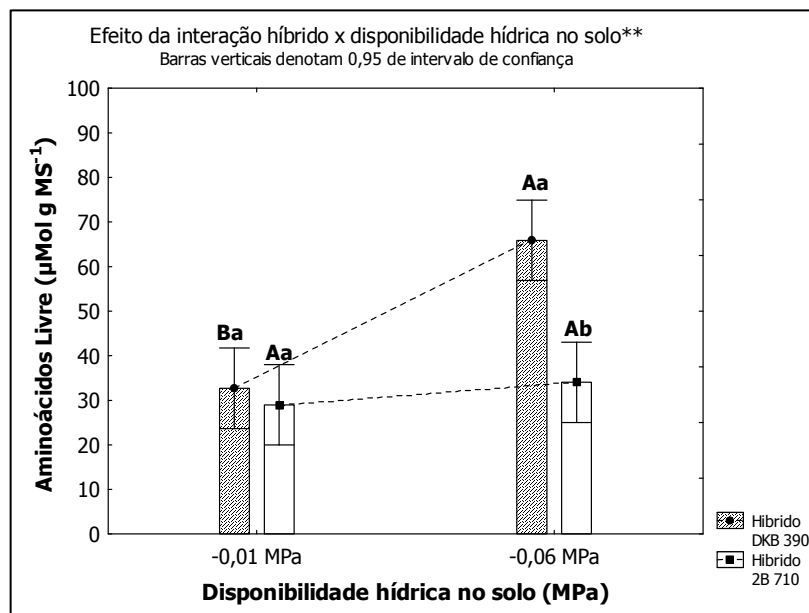


Figura 17. Teor de aminoácidos livres totais de híbridos de milho em reposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si os teores de aminoácidos livres em condições controle e déficit hídrico ($p > 0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si teores de amido dos híbridos DKB 290 e DAS 2B710 ($p > 0,05$).

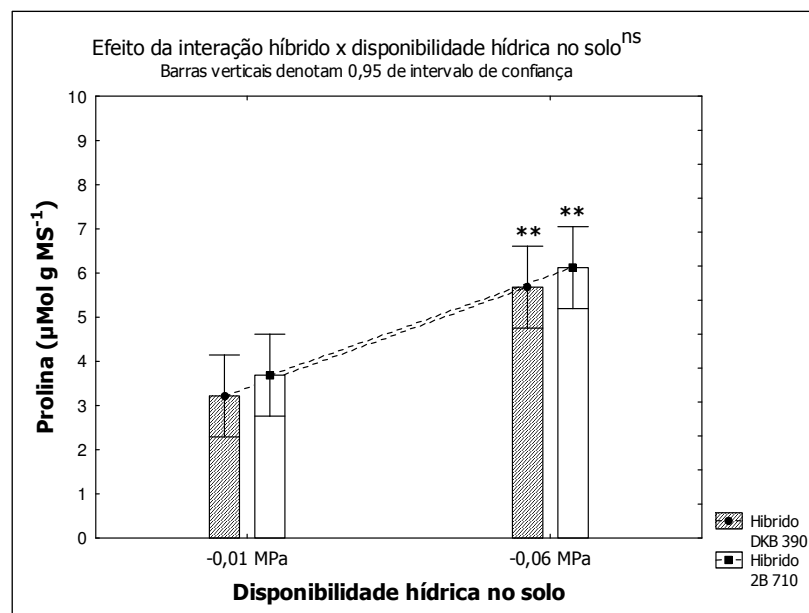


Figura 18. Teor de prolina de híbridos de milho em resposta a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

**Diferença estatística entre as disponibilidades hídricas no solo independente do híbrido ($p < 0,01$).

Na figura 19 podem ser observadas as diferenças fenotípicas no crescimento das plantas submetidas aos diferentes tratamentos e os sintomas de deficiência hídrica devido aos tratamentos com estresse.

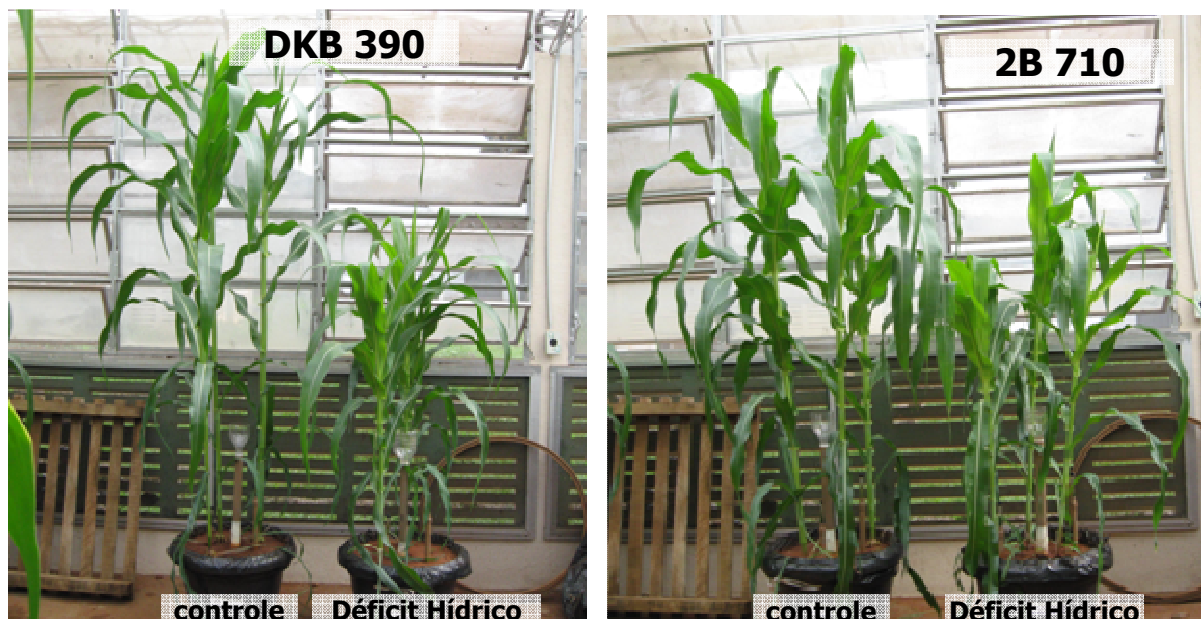


Figura 19. Híbridos de milho submetidos a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

3.4. Conclusões

A diminuição da disponibilidade hídrica no solo promove a redução da atividade fotossintética e da condutância estomática nos híbridos DKB 390 e DAS 2B710;

O crescimento dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710 é reduzido na menor disponibilidade hídrica no solo;

Os híbridos DKB 390 e DAS 2B710 apresentam maiores teores de sacarose e prolina em resposta à limitação hídrica;

O híbrido DKB 390 mantém os teores de açúcares redutores e de amido, reduz o teor de trealose e aumenta o teor de aminoácidos livres quando exposto a uma condição hídrica adversa. Já o híbrido DAS 2B710 reduz os teores açúcares redutores e

de amido na menor disponibilidade hídrica no solo e mantém os de trealose e aminoácidos livres nessas condições;

Os híbridos DKB 390 e DAS 2B710 apresentam grau de tolerância semelhante à limitação hídrica no estágio vegetativo.

3.5. Referências Bibliográficas

ABO-EL-KHEIR, M. S. A.; MEKKI, B. B. Response of maize single cross-10 to water deficits during silking and filling stages. **World Applied Sciences Journal**, Babol, v. 3, n. 3, p. 269-272, 2007.

ANAMI, S.; DE BLOCK, M.; MACHUKA, J. ; VAN LIJSEBETTNENS, M. Molecular Improvement of tropical maize to drought stress tolerance in Sub Saharian Africa. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 28, p. 16-35, 2009.

ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. p. 32.

ANGELOCCI, L. R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera**: introdução ao tratamento biofísico. Piracicaba: FEALQ, 2002, 272 p.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BATES, L. S.; WALDREW, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 39, n.1, p. 205-207, 1973.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. p. 1158-1203.

DÍAZ, P.; BETTI, M.; SÁNCHEZ, D. H.; UDVARDI, M. K., MONZA, J.; MÁRQUEZ, A. J. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. **New Phytologist**, no. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03440.x [versão on-line], Agosto, 2010.

DURÃES, F. O. M.; SANTOS, M. X. dos.; GOMES e GAMA; E. E.; MAGALHÃES, P. C.; GUIMARÃES, C. T. **Fenotipagem associada à tolerância à seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 18 p. (Circular Técnica, 39).

EFEUGLU, B.; EKMEKÇI, Y.; ÇIÇEK, N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.75, n.1, p. 34-42, 2009.

EI-BASHITI, T.; HAMAMCI, H.; OKTEM, H. A; YUCEL, M. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. **Plant Science**, Limerik, v. 169, p. 47-54, 2005.

FALEIROS, R. R. S.; SEEBAUER, J. R.; BELOW, F. E. Nutritionally induced changes in endosperm of shrunken-1 and brittle-2 maize kernels grown in vitro. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 947-954, 1996.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M. DE. PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, pp. 13-17, 2002.

IEW, S.; WILLENBRINK, J. Sucrose synthase and sucrose phosphatase synthase in sugar beet plants (*Beta vulgaris* L. ssp. *Altissima*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart- Hohenheim, v. 131, p. 152-162, 1987.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273 p.

FUMIS, T. de F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.

GARG, A. K.; JU-KON, K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; DO CHA, Y.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 25, p. 15898-15903, 2002a.

GARG, A. K.; RANWALA, A.; OWENS, T.; MILLER, W. B.; WU, R. J. Endogenous trehalose detection from leaf tissue of rice, maize, wheat, sorghum, sugarcane, pearl millet, arabidopsis and tobacco by HPLC Plant. **Paper presented at Animal and Microbe Genomes X Conference**, January, San Diego, CA, p.12-16, 2002b.

GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, London, v.103, p.635-644, 2009.

GRZESIAK, M.T.; RZEPKA, A.; HURA, T.; HURA, K.; SKOCZOWSKI, A. Changes in response to drought stress of triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. **Photosynthetica**, Prague, v. 45, p. 280-287, 2007.

HUND, A.; RUYA, N.; LIEDGENS, M. Rooting depth and water use efficiency of tropical maize in bred lines, differing in drought tolerance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 318, p. 311-325, 2009.

ITURRIAGA, G.; SUÁREZ, R.; NOVA-FRANCO, B. Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, p. 3793-3810, 2009.

MAGALHÃES, P. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P. de.; KARAM, D.; CANTÃO, F. R. O. **Caracterização de plantas de milho sob estresse hídrico**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 6p. (Circular Técnica, 16).

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: MAPA/Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23 p. (Circular Técnica, 22).

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Annals of Chemistry**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.

MOHAMMADKHANI, N.; HEIDARI, R. Drought-induced accumulation of sugars and proline in two maize varieties. **World Applied Sciences Journal**, Babol, v.3, n.3, p.449-453, 2008.

MOORE, S. Amino acids analysis: Aqueous dimethylsulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 243, p. 6281-6283, 1968.

NEVES, M. J.; TERENCE, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalose from the thermophilic fungus *Hudicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 17-19, 1994.

PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 107-113, 2005.

RAIJ, B. Van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas, Instituto Agrônômico & Fundação IAC (Boletim Técnico 100), 1997. p. 56-57.

ROSA, M.; PRADO, C. PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J. A., HILAL, M.; PRADO, F. E. Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, Bethesda, v. 4, n. 5, p. 388-393; 2009.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SCHLUEPMANN, H.; PELLNY, T.; VAN DIJKEN, A.; SMEEKENS, S.; PAUL, M. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 6849-6854, 2003.

SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJKEN, A.; AGHDASI, M.; WOBBS, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. **Plant Physiology**, Boca Raton, v. 135, p. 879-890, 2004.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 333-341, 2002.

SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 215-225, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 739-774.

van GENUCHTEN, M. T. A. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 44, p. 892-897, 1980.

WINGLER, A.; The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 60, p. 437-440, 2002.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 3737-3749, 2009.

ZEID, I. M.; EL-SEMARY, N. A. Response of two differentially drought tolerant varieties of maize to drought stress. **Pakistan journal of biological sciences**, Bethesda, v.4, n. 7, p. 779-784, 2001.

CAPÍTULO 4: QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DO MILHO EM RESPOSTA À DISPONIBILIDADE HÍDRICA NO SOLO POR MEIO DE qRT-PCR

RESUMO: De uma forma geral, as plantas submetidas à limitação hídrica desenvolvem mecanismos bioquímicos e moleculares para diminuir os efeitos nocivos do déficit hídrico, acumulado vários solutos compatíveis: prolina, trealose, sacarose, entre outros. Para se obter resultados precisos e confiáveis na avaliação da expressão dos genes das vias metabólicas que regulam a biossíntese desses compostos, faz-se necessária a normalização dos dados de qPCR em tempo real contra um gene de controle, que exibe expressão uniforme nas diferentes condições de disponibilidade hídrica. Com o intuito de identificar os melhores genes referência para análise de expressão diferencial de genes de milho em resposta à limitação hídrica por meio de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), o presente estudo propôs-se. Avaliou-se a expressão gênica de seis genes de referência: ACT2; eEF-1 α ; eIF-4 α ; GAPDH; UBC e ClatAd em tecidos foliares de milho sob diferentes disponibilidades hídricas, bem como de enzimas-chave da biossíntese da prolina, sacarose e trealose. A expressão de ACT2 e eIF-4 α foi a mais estável em todas as amostras de tecido analisadas.

Palavras-chave: Normalização, real-time PCR, solutos compatíveis, estresse hídrico, mRNA

Quantification of relative gene expression of maize in response to soil water availability by quantitative real-time PCR

Abstract: In general, plants subjected to water restriction develop biochemical and molecular mechanisms to reduce the harmful effects of water deficit, accumulated several compatible solutes: proline, sucrose, trehalose and among others. For accurate and reliable gene expression results in evaluating gene expression of metabolic pathways that regulate the biosynthesis of these compounds, normalization of real-time PCR data is required against a control gene, which exhibits uniform expression in maize for several in different conditions of water availability. Aiming to identify the best reference genes for analysis of differential gene expression of maize in response to water limitation by using RT-PCR in real time (qRT-PCR), the present study is intended. Assessed the gene expression of six frequently used reference genes: ACT2, eEF-1 α , eIF-4 α , GAPDH, UBC, and ClatAd, in leaf tissues of maize under different water availability, as well as key enzymes in the biosynthesis of proline, sucrose and trehalose. The expression of ACT2 and eIF-4 α was most stable across all the tissue samples examined.

Key Words: Normalization, real-time PCR, compatible soluble, water stress, mRNA

4.1. Introdução

Como as plantas são sésseis ao local em que crescem, têm capacidade limitada para evitar condições desfavoráveis ao seu meio como: condições extremas de temperatura, luz, escassez de água, nutrientes minerais insuficientes ou excessivos ou adversidades bióticas (herbívoros, patógenos, plantas daninhas, etc.). As plantas têm desenvolvido estratégias fisiológicas, bioquímicas e moleculares para se defender contra os estresses abióticos e bióticos como, muitas vezes combinados com alterações no crescimento e padrões de desenvolvimento (BRAY et al., 2001; GASPAR et al., 2002).

O estresse é geralmente definido como um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Esse conceito está intimamente associado com tolerância ao estresse, que é a capacidade da planta para enfrentar as condições desfavoráveis (TAIZ & ZEIGER, 2010).

Em ambas as condições, naturais e agrícolas, fatores ambientais, como temperatura do ar, podem tornar-se estressantes em apenas alguns minutos. Conteúdo de água no solo pode levar dias ou semanas, enquanto que outros fatores como a deficiência mineral do solo, podem levar meses para se tornar estressante. Respostas celulares ao estresse podem incluir mudanças no ciclo e divisão celular, as membranas celulares, a arquitetura da parede celular e metabolismo, por exemplo, a acumulação de substâncias osmoticamente ativas (BRAY et al., 2001).

Em condições de estresse hídrico as plantas têm necessidade de manter potencial hídrico interno abaixo do solo e manter o turgor para captação de água a fim de manter seu crescimento. Isso requer um aumento da pressão osmótica, quer seja por absorção de solutos do solo ou pela síntese de metabólitos (solutos compatíveis). Para ajustar o equilíbrio iônico dos vacúolos, o citoplasma acumula compostos de baixa massa molecular, chamados de soluto compatível, porque não interferem nas reações bioquímicas, contudo, pode atuar como moléculas que atuam similarmente à água em reações bioquímicas. Os compostos dividem-se em vários grupos: aminoácidos (prolina), compostos quaternários (glicina betaína) e seus derivados (β -alanina betaína, prolina-betaína, etc.), polióis e açúcares (manitol, D-ononitol, trealose, sacarose e frutanos).

O estudo da expressão dos genes responsáveis pela síntese e catabolismo desses compostos é de extrema importância, e abordagens genômicas podem contribuir consideravelmente para compreender o metabolismo das plantas sob a limitação hídrica (ANAMI et al., 2009), bem como para a manipulação genética do metabolismo desses osmoprotetores em relação à tolerância ao estresse abiótico em plantas melhoradas. Em nível celular, os genes que são induzidos com a seca podem ser classificados em dois tipos: genes que protegem diretamente contra o estresse ou genes que regulam a expressão da tradução de sinais em resposta ao estresse (DJILIANOV et al., 2005).

Tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são muito importantes em estudos de comparação de processos biológicos. Uma tecnologia bastante aplicada é a reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), técnica que permite uma análise precisa da expressão de genes em diferentes tecidos. A quantificação da expressão dos genes por qRT-PCR (do inglês, *real-time quantitative RT-PCR*) é muito sensível e reprodutível. Atualmente, é o método que apresenta maior sensibilidade e especificidade na análise de transcritos.

O princípio da técnica é o mesmo que um PCR tradicional, ou seja, tem como base o processo de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR), a diferença consiste na inclusão de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas ou não a nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em "tempo real"). Os produtos formados são monitorados a cada ciclo de reação, o que permite uma detecção rápida e específica dos produtos de amplificação (GACHON et al., 2004).

O sucesso na aplicação da técnica de RT-PCR quantitativa está na normalização adequada dos dados mensurados. Logo, atenção especial deve ser dada a aspectos como: utilização da mesma quantidade inicial de amostra, padronização da síntese de cDNA, escolha do gene de referência e do modelo matemático para a análise dos dados (UDVARDI et al., 2008).

Para a normalização, são necessários genes que apresentem transcritos que mostrem uma expressão uniforme na maioria das células do organismo ou entre as espécies que estão sendo analisadas, assim como durante várias fases do

desenvolvimento e sob distintas condições ambientais. Esses genes constitutivos são designados de genes de referência, ou normalizadores ou também conhecidos como *housekeeping genes*, ou seja, genes responsáveis por funções essenciais para a manutenção da estrutura ou do funcionamento celular (metabolismo primário). Um gene de referência ideal deve ter expressão constante nos diversos estádios de desenvolvimento, em diferentes tecidos e em condições fisiológicas distintas.

No entanto, vários estudos utilizam genes de referência sem prévia validação da estabilidade de sua expressão, o que pode levar a interpretações errôneas dos resultados obtidos. Há relatos que alguns genes utilizados na era pré-genômica não apresentam expressão estável entre tecidos e genótipos, e por esse motivo, não são adequados como controles a métodos mais sensíveis como qRT-PCR (CZECHOWSKI et al., 2005). A pesquisa realizada em *Arabidopsis*, por CZECHOWSKI et al. (2005), demonstrou que dos genes de referências tradicionais para estudo de qRT-PCR, ACT2, TUB6, EF-1 α , UBQ10 e GAPDH, apresentaram diferenças de expressão em alguma situação estudada. O resultado da análise de todo o conjunto de genes (23.500 genes) levou à indicação de 100 genes com expressão relativamente estável subdivididos em categorias de interesse. Desses, dezoito genes apresentaram-se estáveis em todas as condições e foram validados para normalização de qRT-PCR em *Arabidopsis*.

Entre as gramíneas de importância econômica, ISKANDAR et al. (2004) ao avaliar a expressão de α -TUB, β -TUB, GAPDH e 25S rRNA em diversos tecidos e genótipos de cana-de-açúcar (metabolismo C₄) constataram que os genes mais estáveis foram para GAPDH e rRNA 25S. Em arroz (metabolismo C₃), JAIN et al. (2006) estudaram dez genes (ACT11, UBC, eEF-1 α , GAPDH, β -TUB, eIF-4 α , UBQ10, UBQ5; 18S rRNA e 25S rRNA) em diferentes tecidos e órgãos em estádios de desenvolvimento, bem como em plântulas submetidas a condições adversas (estresse salino e seca) e diferentes hormônios. Dos genes estudados, os mais estáveis foram UBQ5 e eEF-1 α .

Posto o acima, para utilização de qRT-PCR e cálculo da expressão relativa de um determinado gene em diferentes tecidos, faz-se necessária a identificação de genes referência, ou seja, genes que apresentem um padrão de expressão estável em diferentes tecidos que possam ser utilizados para normalização dos dados. A utilização

de genes referência sem prévia verificação da sua estabilidade pode levar a má interpretação dos dados de expressão relativa e, com isso, gerar resultados que não representam as condições *in vivo* (UDVARDI et al., 2008).

Para o milho (*Zea mays* L.), ainda não foram descritos genes de referência para qRT-PCR. Com o intuito de identificar os melhores genes de referência para análise de expressão diferencial durante o estudo da resposta do milho à limitação hídrica, serão desenhados iniciadores para dez EST's, oriundos de uma biblioteca de cDNA de milho, que possuam similaridade com sequências de outras espécies que já foram utilizadas como genes de referência (CZECHOWSKI et al., 2005; JAIN et al., 2006) e esses iniciadores serão testados em reações de qRT-PCR utilizando como material vegetal os diferentes híbridos de milho submetidos a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

A medida da expressão do gene é baseada em duas estratégias qRT-PCR: medido em termos absolutos e/ou dedução, em termos relativos. A quantificação absoluta relaciona o sinal fluorescente PCR com o número das cópias em uma curva de calibração. A curva é altamente específica, sensível e reprodutível, mas a reprodutibilidade depende fortemente das condições e eficiência da amplificação. Nesse sentido, a quantificação relativa é muito mais fácil de fazer por não necessitar de curva de calibração. É com base na expressão de um gene de interesse contra um ou mais genes de referência ou controle, que não têm necessariamente de conhecer as concentrações das amostras e, portanto, não tem unidades qualquer relevância. Esta última forma de quantificar é adequada para a maioria dos estudos que pretendem investigar as relações entre as alterações fisiológicas das plantas e as respostas de expressão gênica.

A monocotiledônea de metabolismo C_4 *Zea mays* é a terceira mais importante cultura alimentar mundial depois do trigo e do arroz em termos de produção e a segunda cultura mais modificada geneticamente (OGM), depois da soja. Sua procura deverá aumentar em 45% até 2020 (ANAMI et al., 2009).

Assim, como hipótese científica cogitou-se que a tolerância de plantas de milho sob estresse hídrico é afetada pela expressão gênica significativa de determinadas enzimas envolvidas no metabolismo de solutos orgânicos. Dessa forma os objetivos

desta pesquisa foram: encontrar um ou um conjunto de genes que possam ser usados como referência para estudos de qRT-PCR em híbridos de milho em resposta à limitação hídrica; determinar se os genes envolvidos na produção de metabólitos celulares estão relacionados com as respostas fisiológicas dos híbridos de milho a deficiência hídrica.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi desenvolvido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP. Foram utilizados dois híbridos simples de milho, DKB 390 e DAS 2B710, cultivados em Latossolo Vermelho distrófico (LVd) em condições de casa de vegetação. A temperatura e a umidade relativa do ar foram monitoradas, com auxílio de um termohigrômetro até o término do experimento. Após a germinação e desbaste, foram mantidas três plantas por vaso com capacidade para 54 dm³, as quais foram cultivadas sem restrição hídrica até o estágio V₃, quando foram submetidas a duas tensões hídricas (-0,01 e -0,06 MPa). Sendo assim, os quatro tratamentos implantados foram:

Tratamento 1 = Híbrido DKB 390 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,01 MPa (controle);

Tratamento 2 = Híbrido DKB 390 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,06 MPa (déficit hídrico);

Tratamento 3 = Híbrido DAS 2B710 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,01 MPa (controle);

Tratamento 4 = Híbrido DAS 2B710 cultivado em solo com tensão hídrica de -0,06 MPa (déficit hídrico).

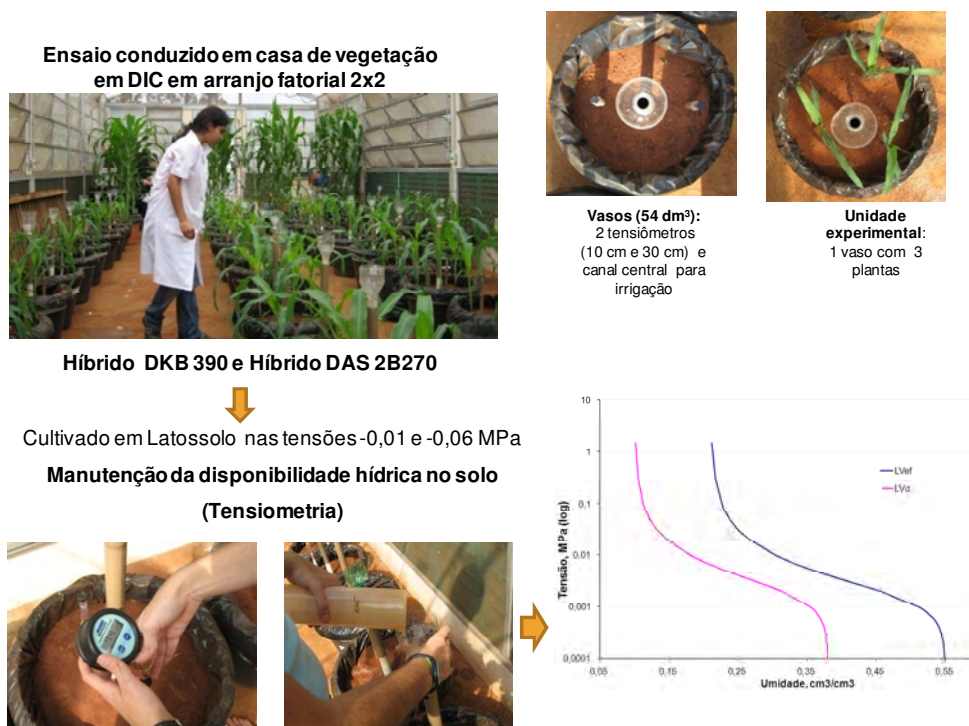


Figura 1. Controle e manutenção da disponibilidade hídrica no solo dos vasos.

O controle do conteúdo de água no solo foi realizado através de tensiometria, a partir do monitoramento diário das leituras das tensões do solo para controle da umidade do solo no nível concernente a cada tratamento. Para isso, foram instalados dois tensiômetros em cada vaso, um na profundidade de 10 cm e o outro na de 30 cm. Através de tensímetro digital, foi monitorada, diariamente, a umidade (tensão hídrica) do solo. A estimativa da umidade do solo de cada vaso foi realizada a partir da média das leituras dos tensiômetros instalados nos vasos. A reposição de água foi realizada através de um tubo de PVC com perfurações ao longo de toda a sua extensão, instalado no centro geométrico do vaso, para garantir uma distribuição uniforme da umidade em todos os estratos do solo.

No estágio V₆, as folhas +1 foram coletadas e estocadas em nitrogênio líquido até serem armazenadas em ultra-freezer (-80 °C) para posterior análise.

As análises dos transcritos foram realizadas no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Laboratório de Biotecnologia celular vegetal, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras-Portugal.

4.2.2. Extração, controle de qualidade do RNA e síntese de cDNA

O método de extração por Trizol, conforme recomendações dos fabricantes (Gibco™), foi utilizado para extração de RNA total das amostras dos tratamentos. O RNA foi então tratado com DNase (TURBO DNA-free™). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2% e a quantidade no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™). Somente as amostras de RNA com razão A260/ A280 entre 1,9 e 2,1 foram utilizadas para síntese da fita simples de cDNA. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa de 2 µg de RNA, no mínimo, em volume final de 20 µL utilizando a enzima Improm II reverse (Promega™), de modo a atingir concentrações de RNA que permitissem efetuar a síntese de cDNA de cadeia simples.

As condições de PCR foram otimizadas no termociclador Biometra T-Gradient, com 20 ng/µL de DNA genômico de milho a um gradiente de temperaturas de annealing. A reação efetuou-se em um volume total de 20 µL com 0,2 mM de dNTPs, 200 nM de cada primer, 2,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega, EUA) e tampão de Taq 1×. Em cada tubo de reação foram colocados 2 µL de DNA (10ng/µL).

A desnaturação do DNA deu-se a 94 °C durante 3 minutos, seguida por 40 ciclos com três passos: um passo a 95 °C durante 30 segundos, o segundo para ligação dos primers à cadeia molde de DNA com uma temperatura de annealing (58 °C) entre 55,9 - 64,1 °C por 30 segundos e por fim o passo de extensão a 72 °C durante 30 segundos. Um passo de extensão final de 3 minutos a 72 °C finalizou o ciclo.

Os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido com um almofariz e pilão, previamente tratados com RNaseZap (Sigma- Aldrich, EUA). O RNA total foi extraído por meio do método de extração por Trizol (Gibco™). O RNA foi então tratado com DNase (Amersham™) e purificado em coluna RNeasy Mini Column (Qiagen). Para cada amostra

foram feitas duas extrações independentes. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2% e a quantidade no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™). Somente as amostras de RNA com razão A260/ A280 entre 1,9 e 2,1 foram utilizadas para síntese da cadeia simples de cDNA. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa de 2 µg de RNA, no mínimo, em volume final de 20 µL utilizando a enzima Superscript II (Invitrogen™).

4.2.3. Análise *in silico*

Inicialmente, as buscas das mRNA de interesse se deram na base de dados do *GenBank sequence database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise *in silico* foi realizada comparando diversos bancos de dados de diferentes organismos utilizando o algoritmo BLASTn. As sequências homólogas identificadas em milho base de dados do NCBI - National Center for Biotechnology Information - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantESTBLAST.shtml>) foram comparadas com as identificadas na base de DFCI *gene index* - ZmGI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=maize>). Foi escolhida a sequência que obteve o melhor *E-value* (menor que e^{-10}) na homologia.

4.2.4. Desenho de iniciadores para genes controle e genes de interesse

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa o programa PRIMER 3, desenvolvido pelo Whitehead Institute e Howard Hughes Medical Institute, EUA. Os parâmetros considerados foram: tamanho dos oligonucleotídeos (18 – 23 nucleotídeos), conteúdo de G/C em torno de 50 %, temperatura de anelamento (60 °C), e tamanho do amplicon (83 - 211 bp). Foi utilizado o programa de comparação de sequências BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, para determinar a combinação de oligonucleotídeos mais específica. Os oligonucleotídeos sintetizados foram inicialmente testados na temperatura de anelamento desejada (60 °C) pelo método da PCR convencional. A especificidade do produto de amplificação foi verificada

em gel de agarose 2 % corado com sybr safe (0,5 µg/µL). Os melhores pares para cada gene, foram testados inicialmente em cDNA, via qRT-PCR; e a especificidade da amplificação foi verificada pela análise de curvas de dissociação por meio do programa Bio-Rad IQ™5 (Optical System Software).

Para identificação dos genes referência em milho foram desenhados iniciadores para seis genes ortólogos àqueles já descritos na literatura como referência para outras espécies de plantas (CZECHOWSKI et al., 2005; JAIN et al., 2006). A escolha dos genes escolhidos deveu-se por estes apresentarem menor variação na expressão (maior estabilidade – *M*) em estudos prévios para outras plantas (Tabela 1).

Tabela 1. Genes de referência para uso em qRT-PCR

Nome do Gene	Descrição do gene	Acesso (DFCI bank)
ACT2	structural constituent of cytoskeleton 2	TC494297
UBC	ubiquitin conjugating enzyme	TC459905
eEF-1α	elongation factor 1-alpha	TC561686
GAPDH	cytosolic glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TC496821
eIF-4α	translation initiation factor 4-alpha	TC471738
ClatAd	clathrin adaptor complexes	TC469062

O estudo da expressão de genes de enzimas-chave do metabolismo de plantas sob limitação hídrica está descrito na Tabela 2. Os genes estudados fazem parte do metabolismo primário das plantas. Dessa forma compõem os compostos: amido e sacarose, trealose, aminoácido e prolina.

Tabela 2. Genes de interesse para uso em qRT-PCR

Referência da sequência	Gene	E.C	Descrição do gene
<i>Metabolismo de carboidratos: sacarose e trealose</i>			
TC531667	SPS	2.4.1.14	Sucrose Phosphate Synthase
NM_001111724.1	SUSY	2.4.1.13	Sucrose Synthase
NM_001111568.1	ADP-Glu	2.7.7.27	ADP-glucose pyrophosphorylase
TC466102	UDP-Glu	2.7.7.9	UDP-glucose pyrophosphorylase
NM_001130121.2	T6PS	2.4.1.15	trehalose-6-phosphate synthase
NM_001158750.1	TPP	3.1.3.12	trehalose-phosphate phosphatase
TC474957	THE	3.1.3.28	Trehalase
<i>Metabolismo de compostos nitrogenados</i>			
NM_001112068.1	GtSy	2.6.1.13	glutamine synthetase
M27821.1	NtR	1.5.1.1	nitrate reductase
TC466517	OAT	1.2.1.41	delta ornithine aminotransferase
CO460824	P5CR	1.5.9.98	pyrroline 5-carboxylate reductase
TC471964	P5CS	1.2.1.8	delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
NM_001154188.1	PROX	1.14.15.7	proline oxidase

4.2.5. Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

A análise quantitativa da expressão foi realizada por qRT-PCR, usando o sistema de detecção Optical System Software (Bio-Rad IQ™5). Realizou-se, inicialmente, uma padronização do método que incluiu: a escolha do normalizador adequado; a determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos; a determinação da quantidade de cDNA molde; os ajustes na concentração final dos oligonucleotídeos e a avaliação das condições de termociclagem.

Foi utilizado o SYBR® Green PCR Master Mix para as reações de qRT-PCR, que é um agente fluorescente que se intercala nas cadeias duplas de DNA, e emite grande quantidade de fluorescência. Desta forma, a detecção do aumento de produtos de PCR gerados ao longo de cada ciclo, foi feito proporcionalmente ao aumento da fluorescência emitida pelo SYBR® Green. O equipamento detectou, a cada ciclo, uma elevação de sinal fluorescente e construiu uma curva de amplificação em tempo real (intensidade de fluorescência x ciclos). Foram testados seis normalizadores. O gene de referência normalizou a amplificação do gene alvo, obtendo um valor real de expressão do alvo em relação ao total de RNA utilizado na reação. As reações foram feitas em triplicatas, a fim de garantir a consistência dos dados coletados. Além disso, o perfil dos produtos amplificados foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%.

4.2.5.1. Curvas de eficiência

Foram construídas curvas de amplificação com quantidades conhecidas de cDNA, para determinar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos e o nível de expressão tecidual de cada variante. Diluições foram realizadas de 50 ng/μL, 25 ng/μL, 12,5 ng/μL e 6,25 ng/μL, a partir do cDNA estoque (100 ng/μL). Verificou-se a relação entre a quantidade inicial de amostra e o número de ciclos obtidos em uma determinada fluorescência (Ct). O esperado era que, a cada ciclo, dobrasse a quantidade de produto formado. Determinando-se um nível de fluorescência e o número de ciclos necessários para amplificar quantidades diferentes de cDNA inicial, foi possível fazer a correlação desses dois fatores. O valor de R^2 gerou o fator de correlação entre os pontos de diluição e o Ct obtido. A inclinação da reta (*slope*) determinou a eficiência de amplificação da reação. Uma reação onde ocorreu a duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo (100 % de eficiência), obteve uma inclinação de -3,32 e coeficiente de correlação igual a -1, quando todos os pontos da curva estiverem coincidentes ao Ct esperado. Por meio dessas análises, foi possível determinar a melhor quantidade de amostra para cada par de oligonucleotídeos desenhado.

4.2.5.2. Curvas de amplificação

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em placas ópticas de 96 amostras. Foi utilizado para reação: 2 µL de cDNA; 0,5 µL de cada oligonucleotídeo (200 nM) sense e anti-sense específico para cada variante; 10 µL de 2x SYBR Green PCR Master Mix e 7 µL de água (Nuclease-Free Water, Promega®), no volume total de 20 µL.

O programa de amplificação utilizado foi 95 °C por 3 minutos para ativação da AmpliTaq DNA Polymerase; 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação), 60 °C por 10 segundos (anelamento do primer) e 72 °C por 10 segundos (extensão). Ao final de cada ciclo foi realizada a coleta do sinal de fluorescência. O software quantificou a intensidade da fluorescência dada pelo SYBR. Utilizou-se um controle negativo de amplificação, que consistiu de uma reação sem o cDNA, a partir de uma mesma mistura de reagentes das amostras experimentais e na mesma placa óptica, possibilitando a exclusão de contaminação.

4.2.5.3. Curvas de dissociação

A curva de dissociação foi realizada após a reação de qRT-PCR, para determinar a especificidade dos produtos de PCR formados. Reações que apresentaram mais do que um pico de dissociação era indicador que podia existir interferência de intercalação de *primers* entre eles ou com eles mesmos; ou ainda um produto inespecífico a ser amplificado na reação. Os gráficos da curva de dissociação foram obtidos pelo programa Optical System Software (Bio-Rad IQ™5).

4.2.6. Análise da estabilidade da expressão gênica

Os dados gerados a partir do software Optical System Software (Bio-Rad IQ™5), utilizado para leitura de fluorescência, foram colocados em planilha MS Excel (Microsoft, Redmond, WA), e analisados nos aplicativos visual basic do MS Excel qBase versão 1.3.4

(<http://medgen.ugent.be/qbase/>), e GeNORM versão 3.4, (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

Para identificação dos genes mais estáveis dentro dos tratamentos, foi utilizado o programa GeNORM, que calcula um valor de estabilidade M. O cálculo de M é baseado na média da variação (*pairwise variation*) entre um gene particular e todos os outros genes analisados. Por exclusão dos genes menos estáveis, maior valor M, são identificados os genes mais estáveis. Como resultado, foi gerado um fator de normalização (NF) e a partir desse valor NF, houve a identificação de genes referência. Determinou-se o número ideal de genes referência a ser utilizado para uma normalização acurada dos níveis de expressão dos genes a serem estudados. Esse número ideal foi dado pela inclusão de genes controles (n+1) no cálculo de NF até que não houvesse contribuição significativa desses genes.

4.2.7. Quantificação da expressão gênica dos genes que regulam as vias metabólicas dos solutos compatíveis

As amostras de cDNA dos quatro tratamentos foram amplificadas por PCR com recurso ao Bio-Rad iCycler iQ™. Os *primers* usados para amplificação encontram-se na tabela 3 e 4. As condições de PCR foram as mesmas descritas no item 4.2.5.2.

As amplificações foram efetuadas em três placas: para cada amostra de cDNA fizeram-se 3 réplicas técnicas e por cada tratamento testaram-se três réplicas biológicas.

Repetiu-se a amplificação para os 15 genes alvo, e para os dois genes de referência, com *pools* de cDNA das amostras de cada tratamento.

Tabela 3. Descrição dos EST's escolhidos: sequências dos primers, temperatura de Melting e tamanho do produto de amplificação, utilizados para amplificar os genes em estudo para real-time RT – PCR.

Referência da sequência	Gene	Nome enzima	Primer Sense	Primer Antisense:	TM	Prod
NM_001155179.1	ACT	Constituinte estrutural do citoesqueleto 2	CCAAGTCCGAAG CCATC	TGCCATTGTCACAT ACGATAGG	55,7	96
EU953172.1	eEF-1α	Fator 1-alfa de elongação eucariótica	TGCTCTCCTTGCGT TCAC	CTTCCTTCACAATC TCTTCATAAC	55,6	113
NM_001111404.1	eIF-4α	Fator 4-alfa de iniciação (tradução) eucariótica	CTCTCCGTCGCTTC AGTC	AAGAACTCCTCAGT CTCACC	53,1	116
NM_001112481.1	GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenas e citosólico	CCTTCATCAGCACC GACTAC	CAGCAACCTCCTTC TCACC	55,1	130
NM_001111418.1	UBC	Enzima conjugada de Ubiquitina	CCTAATATCAACAG CAATGGAAG	GGAGCAGATGGAG AGCAG	53,2	99
TC483326	Clatad	Complexo adaptado para Clatirina	TCCACCGCTCCCG AGTCCAA	GGGCAGCCTTGTA TGCCACCA	59,5	133

Como já foi referido, para quantificação da expressão relativa dos genes alvo, foi necessário todo um tratamento de normalização dos valores de C_T . Assim, todos os valores de C_T foram corrigidos tendo em conta os valores de eficiências de cada gene no programa GenEx com recurso à expressão 1,

$$C_{TE=100\%} = C_{TE} \frac{\log(1+E)}{\log(2)} \quad (1)$$

Sendo: E = a Eficiência de cada gene.

Em seguida, a todos os valores de C_T de cada réplica técnica aplicou-se a expressão 2,

$$C_{T \text{ norm_repetições}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{Ti} \quad (2)$$

Dessa forma, efetuou-se a média aritmética dos valores de C_T para cada réplica biológica. Para se poder normalizar os genes alvo, calculou-se o valor de C_T normalizado, usando a expressão 3.

$$C_{T \text{ Gene_alvo,norm}} = C_{T \text{ Gene,alvo}} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{T \text{ Gene Referência}} \quad (3)$$

Por fim, as quantidades de expressão relativas foram determinadas através da expressão 4,

$$Q_{\text{relativo}} = 2^{C_{T \text{ calibração}} - C_T} \quad (4)$$

Como os valores de quantidades relativas não seguem normalmente uma distribuição normal, foi necessário transformá-los numa escala logarítmica. Desse modo, os valores apresentaram uma distribuição normal, podendo assim efetuar-se a análise estatística. As expressões diferenciais (*fold differences*) foram obtidas com recurso ao logaritmo de base 2 (expressão 5). Vide dedução da expressão no apêndice.

$$FD = \log_2(Q_{\text{relativo}}) \quad (5)$$

Tabela 4. Descrição dos EST escolhidos, sequências dos primers, temperatura de Melting e tamanho do produto de amplificação utilizados para amplificar os genes das vias metabólicas de solutos compatíveis para estudo em real-time RT – PCR.

Referência da sequência	Gene	Nome enzima	Primer Sense 5'-3'	Primer Antisense: 3'-5'	TM	Prod
TC531667	SPS	Sacarose Fosfato Sintase	CCTGGAGTGT ACAGGGTGG ACCT	TCCATCATTG GAACCGGCGC A	60,87	108
NM_001111724.1	SUSY	Sacarose Sintase	CACCGGCAC AAGGGGCAT GT	GGTGTGTCAG CAGGGAGCTT TGAC	59,9	116
TC466102	UDP-Glu	UDP-glicose pirofosforilase	CCCCGCTCAA GGTTTCTCCC AG	TCGCTCTGGA TGGGTTGCGG	59,43	109
NM_001111568.1	ADP-Glu	ADP-glicose pirofosforilase	TGCAGTGCCA TTGGGTGCCA	AGGTGACGGT TGAGGGAAGC AGA	59,47	123
NM_001130121.2	T6PS	Trealose-6-Fosfato sintase	ACTTGACCGG AGGCCGAAC G	TGCTGCTCGT GCTGCTGTGA	59,28	137
NM_001158750.1	TPP	Trealose-fosfato fosfatase	GGTCCGTCCT GTTATTGATT GG	ATCTTCATCTG TTCTGTCATCT CC	56,5	124
TC474957	THE	Trealase	GCCATTGCTG TGGCCGAGG A	ACCCAGCAT GTGGCTTGGC	59,9	272
M27821.1	NtR	Nitrato redutase	GCTCGTTTTG GATTGGGTGC CG	CCACTTGCCC ACTTCCTCGC A	59,31	121
NM_001112068.1	GtSy	Glutamina sintetase	GCGCTGTGG CAGTTGCATC AC	CAAACCCCTC CCGCGCACTT	59,9	149
TC471964	P5CS	delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase	AACATTGTGA CAGGATTAGG	GTAACAGGCT TAACCATAGG	50,1	140
TC466517	OAT	delta ornitina aminotransferase	GCTACAGCCC GAGAGATGG CAGT	CTTGTGCTGC CTCAACATCG GCA	60,36	166
CO460824	P5CR	pirrolina 5-carboxilato reductase	CTCTCCGCCT CCTCCTTC	AGCAGGTTCA CTTCACTCAC	54,8	96
NM_001154188.1	PROX	Prolina oxidase	GGAATTTGTC GTATGTCGGG ATG	ATGAGGCGGT GGAAGTGG	57,5	124

4.2.9. Tratamento estatístico

O delineamento experimental foi em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x2 com cinco repetições. A análise estatística dos dados realizou-se através do programa Statistica, em seguida foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

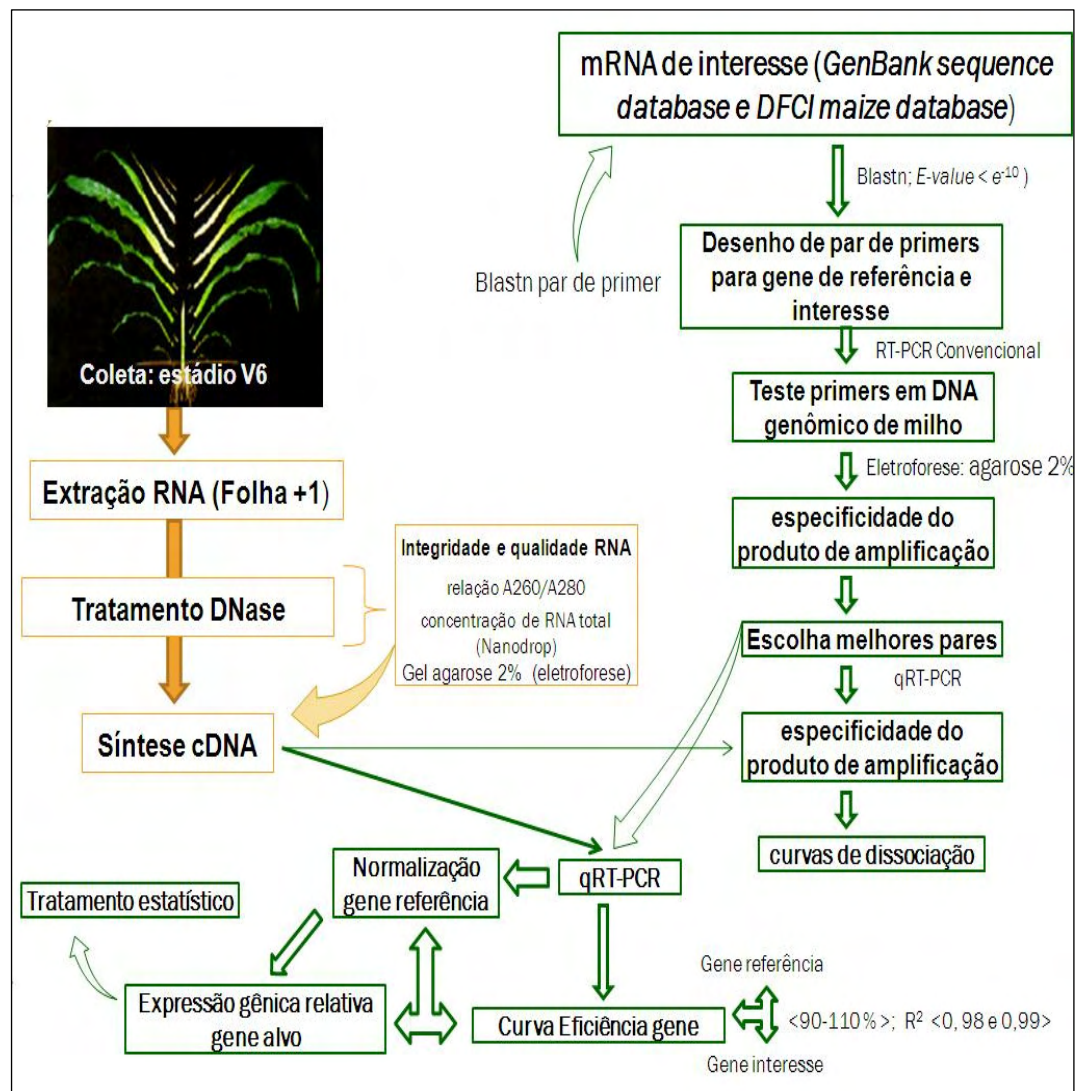


Figura 2. Etapas realizadas para validar os genes de referência e quantificação da expressão gênica relativa dos genes alvo.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Determinação dos genes de referência

Após a quantificação do RNA total por meio de avaliação por espectrofotometria (*vide* apêndice A4.3), cada uma das amostras foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (condições desnaturantes) para verificação da integridade do RNA total através da visualização das bandas 28S e 18S de RNA ribossomal (Figura 3).

A análise da qualidade e quantidade do RNA extraído também foi realizada por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Os resultados evidenciaram os níveis baixos de contaminações por polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas determinados pelas razões das absorbâncias 260/280 superiores a 1,8 (*vide* apêndice). A quantificação e análise da qualidade do RNA total extraído são necessárias, uma vez que a eficiência do processo de hibridação é influenciada por diversos parâmetros experimentais, em especial, pela qualidade e quantidade de RNA utilizado na síntese de cDNA (FELIX et al., 2002).

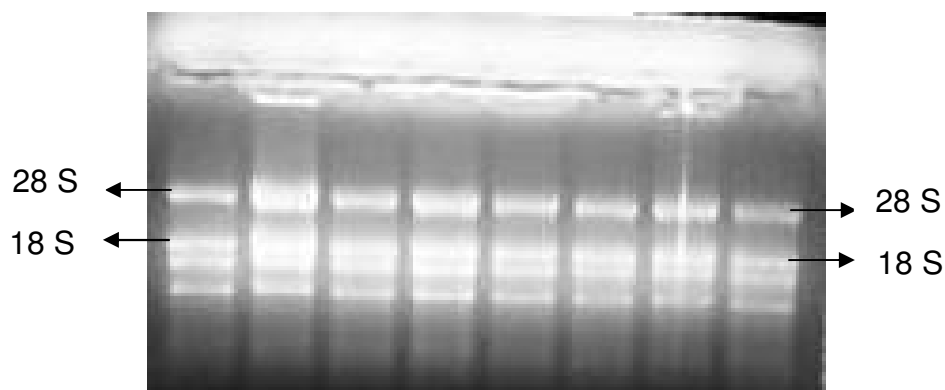


Figura 3. Integridade do RNA do tecido foliar de milho.

Com base na curva de dissociação (Vide apêndice) e análise em gel de agarose foi verificada a amplificação de um produto único para os seis genes (Figura 4).

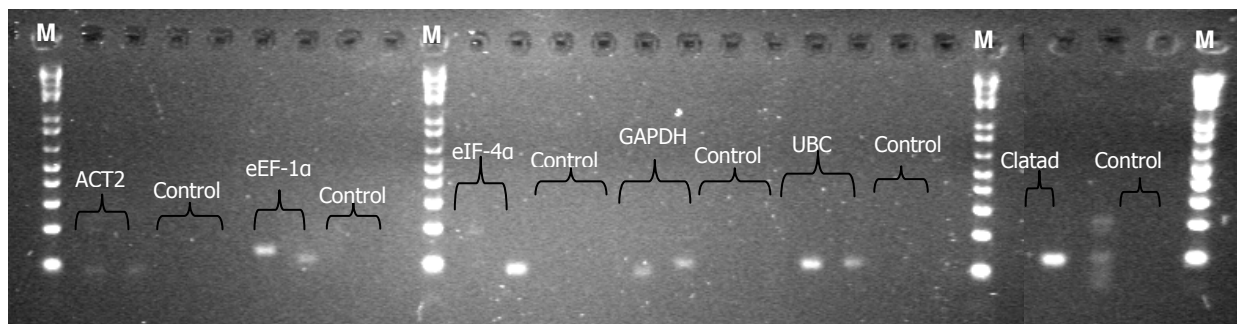


Figura 4. Gel de agarose 2% dos produtos de amplificação da reação de qRT-PCR. Presença de única banda para o teste da eficiência dos primers com pool de cDNA das réplicas biológicas de milho e ausência de banda no controle sem cDNA. M= marcador molecular 100 pb.

A partir dos resultados das análises de qRT-PCR, dos seis genes utilizados na análise, dois apresentaram um valor M desejado. Foram eles: eIF-4α e ACT2, com valor de estabilidade de 1,168 e 1,308, respectivamente, caracterizando-os como candidatos potenciais a genes de referência para análise da expressão gênica relativa para a presente pesquisa. Os genes eIF-4α e ACT2 demonstraram pouca variabilidade de expressão no tecido foliar de milho em diferentes condições de disponibilidade hídrica no solo (Figura 5), por essa razão foram os escolhidos.

Foram avaliados seis genes tradicionalmente utilizados como genes normalizadores, preconizados pela literatura (ISKADAR et al., 2005; CZECHOWSKI et al., 2005; JAIN et al., 2006; SILVEIRA et al., 2009) como genes padrões de expressão estável, verificou-se que há divergência dos resultados descritos para gramíneas de interesse econômico cultivadas em condições adversas com a deste estudo; corroborando a importância desse tipo de análise para cada caso particular de uma pesquisa.

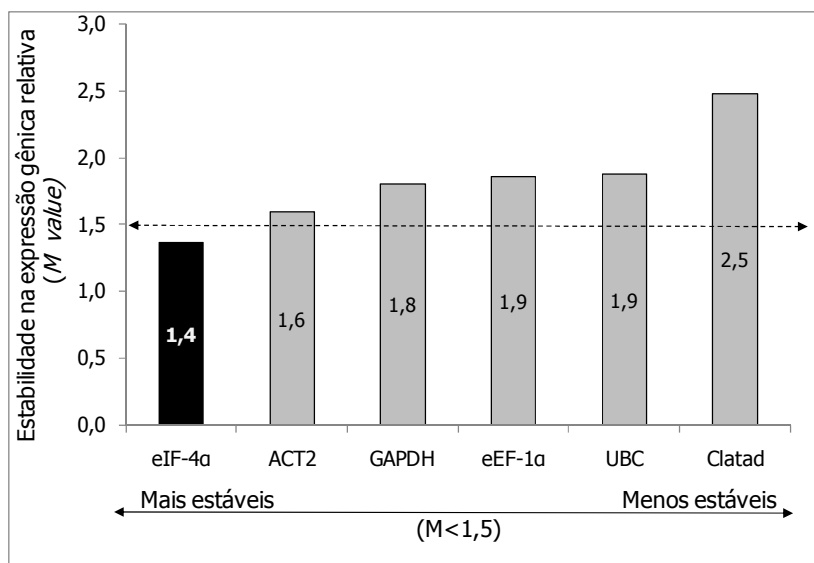


Figura 5. Estabilidade da expressão de genes de referência, baseado no valor M, calculado pelo GeNORM. Menor valor de M indica maior estabilidade nos tecidos foliares das plantas de milho sob os tratamentos.

Estudos realizados em cana-de-açúcar, que também apresenta metabolismo C_4 como milho, obtiveram como melhor gene constitutivo o GAPDH em diversos tecidos e genótipos, contrário ao observado neste estudo, que o classifica como menos estável ($M=1,6$) que os genes selecionados. JAIN et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes e discordantes a esta pesquisa, ao avaliar a estabilidade de 10 genes potencialmente estáveis. Estes autores contestaram a constitutividade do gene GAPDH para arroz, gramínea de metabolismo C_3 . Os genes GAPDH, eIF-4α, ACT2 foram classificados como menos estáveis enquanto que os genes eEF-1α, UBC, 18S rRNA e 25S rRNA mais estáveis. Resultados contrastantes foram observados por SILVEIRA et al. (2009) na gramínea forrageira *Brachiaria brizantha* (C_4). Esses autores demonstraram que os genes eEF-4α, GAPDH, eIF-1 α, UBC apresentaram, em ordem crescente, maior estabilidade.

Já CZECHOWSKI et al. (2005) observaram em *Arabidopsis* menor estabilidade para GAPDH e maior estabilidade para Clatad, contrastando com o resultado observado nas plantas de milho, onde dos genes avaliados, esse gene apresentou menor

estabilidade ($M=2,5$). Em relação ao número ideal de genes referência para análise, determinado a partir da variação entre os pares (Figura 6), houve um aumento da instabilidade quando incluído o gene Clatad.

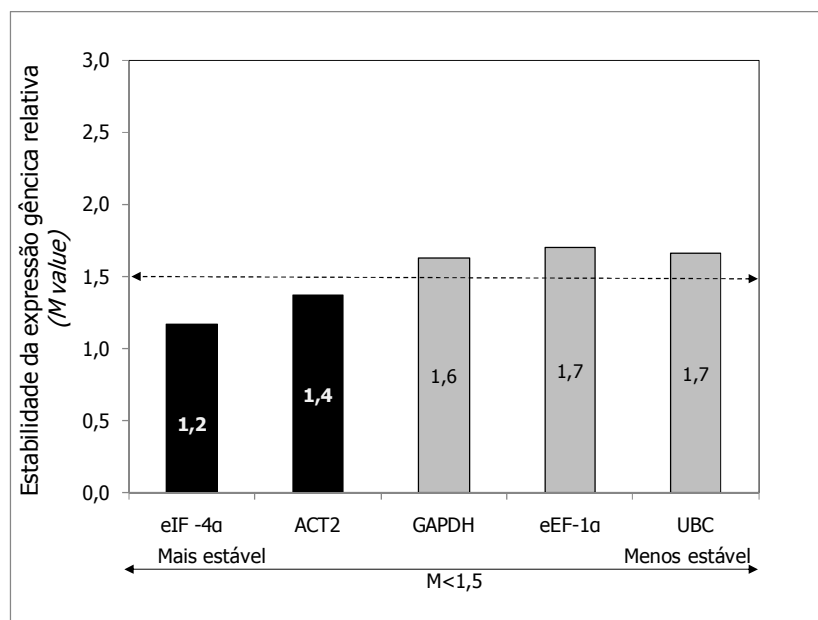


Figura 6. Estabilidade de expressão de candidatos a genes de referência, baseado no valor M , calculado pelo GeNORM. Menor valor de M indica maior estabilidade nos tecidos foliares das plantas de milho sob os tratamentos

Embora ao se realizar a validação de genes de referência, observaram-se tais concordâncias e discrepâncias com a literatura, tal fato pode estar relacionado à análise *in silico* realizada em um gene ortólogo em milho que possa não corresponder ao exato parálogo de cana-de-açúcar, braquiária e/ou arroz. Por exemplo, um alinhamento realizado entre as sequências derivadas dessas espécies pode revelar uma identidade de 90%, contudo, esse grau de similaridade não garante tratar-se de um mesmo ortólogo (CZECHOWSKI et al., 2005; JAIN et al. 2006).

Em conjunto, estes resultados sugerem que os genes denominados normalmente como de referência são regulados de forma diferente em diferentes espécies de plantas e podem apresentar padrões de expressão diferencial. Portanto, um gene de referência com expressão estável em um organismo pode não ser adequado para a normalização da expressão gênica em outro, em um determinado conjunto de condições e precisa ser

validado antes da sua utilização. Além da expressão estável, o nível da expressão do gene de referência em relação aos genes a serem analisados (genes alvo) também é importante, isto é, genes com expressão altamente estáveis não podem servir como um bom controle interno para a quantificação de genes com baixo nível de expressão (JAIN et al., 2006).

4.3.2. Expressão gênica dos genes que regulam as vias metabólicas dos solutos compatíveis

Na Tabela 5, observa-se o perfil da expressão relativa de genes das enzimas-chave do metabolismo de distintos híbridos de milho sob limitação hídrica. Verificou-se que para a expressão relativa dos genes, *ADP-Glic*, *P5CS* e *PROX* são diferentes entre os híbridos de milho quando submetidos a diferentes disponibilidades hídricas. Para outros genes, a expressão relativa foi contrastante independente do híbrido avaliado nas situações de disponibilidade hídrica no solo ($H \times DHS^{ns}$, $p > 0,05$). A expressão relativa dos genes *Susy*, *TPP*, *THE*, *GtSy* e *OAT* não apresentaram diferenças significativas quando os híbridos foram submetidos ao estresse hídrico. Os genes *T6PS*, *GTSY* e *OAT* apresentaram diferenças entre os híbridos, independente à condição de status hídrico cultivado; essa diferença refere-se às características genotípicas dessas plantas.

Como houve a avaliação de 13 genes de enzimas-chave relacionadas ao metabolismo de plantas sob estresse hídrico espera-se que muitos genes fossem induzidos pela limitação hídrica, promovendo o aumento da tolerância celular à limitação hídrica, o aumento das funções de proteção do citoplasma, organelas e membranas celulares, alterações do potencial celular osmótico, o aumento na absorção de água (ex. aquaporinas), o aumento no controle e no acúmulo de íons e maior regulação da expressão de outros genes (BRAY et al., 2001).

4.3.2.1. Metabolismo dos carboidratos sacarose e trealose

O metabolismo de açúcares específicos foi afetado pela limitação hídrica (Tabela 5). Para o dissacarídeo sacarose, o gene *sacarose-6-fosfato-sintase* (*S6PS*), reduziu sua expressão quando as plantas estavam em condição adversa (Figura 7), já a expressão do gene *Sacarose sintase* (*Susy*) permaneceu inalterada (Figura 8). Como o primeiro refere-se à síntese, *S6PS*, e o segundo, à degradação, *SuSy*; observou-se que houve sinergismo na regulação metabólica desse osmólito como postulado em literatura (ROSA et al., 2009).

Tabela 5. Análise de variância por meio do Teste F da expressão gênica dos genes que regulam as vias metabólicas dos solutos compatíveis (*p value*) em híbridos de milho submetidos a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

Causa da variação	G.L.	<i>p value</i> dos genes alvo do metabolismo de solutos compatíveis												
		<i>S6PS</i>	<i>SuSy</i>	<i>UDP-Glic.</i>	<i>ADP-Glic.</i>	<i>T6PS</i>	<i>TPP</i>	<i>THE</i>	<i>NTR</i>	<i>GTSY</i>	<i>OAT</i>	<i>P5CR</i>	<i>P5CS</i>	<i>PROX</i>
Híbridos (H)	1	0,02*	0,61 ^{ns}	0,01**	0,07 ^{ns}	0,01**	0,96 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,01**	0,06 ^{ns}	0,01**	0,94 ^{ns}
Disponibilidade hídrica no solo (DHS)	1	0,01**	0,14 ^{ns}	0,01**	0,05*	0,98 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,01**	0,74 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,15 ^{ns}
Interação HxDHS	1	0,18 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,02*	0,01**	0,94 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,93 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,01**	0,01**
(Tratamentos)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resíduo	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.V	-	7,61	7,31	1,82	5,47	2,92	4,28	13,54	8,54	9,59	4,28	10,28	6,96	7,08

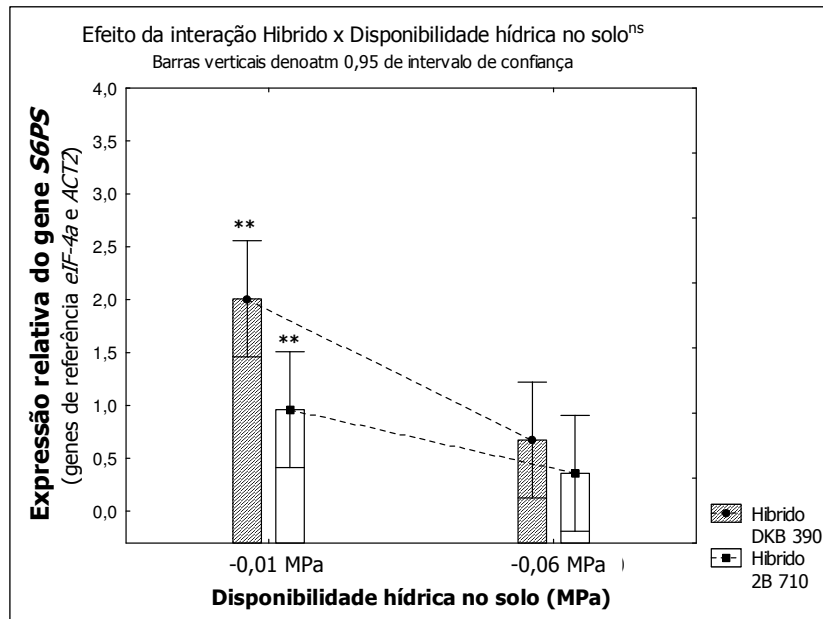


Figura 7. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *S6PS*. O fator DHS apresenta efeito distinto sobre a expressão desse gene ($p < 0,01$).

Segundo TAIZ & ZEIGER (2010), quando há redução nas taxas fotossintéticas das plantas em condições adversas, há a redução na concentração de hexoses fosfato no citosol, e, por conseguinte, da sacarose. Tal fato pode ser confirmado quando se analisa a expressões de genes-alvo das vias metabólicas. A redução da expressão do gene *S6PS*, precursor da sacarose-6-fosfato, importante molécula sinalizadora de tolerância ao estresse hídrico, foi também verificada por SILVA & ARRABAÇA (2004) e ROSA et al. (2009). Analogicamente, não havendo substrato para a degradação da molécula de sacarose, o padrão de expressão do gene *Susy* permaneceu inalterado, corroborando com os resultados da presente pesquisa.

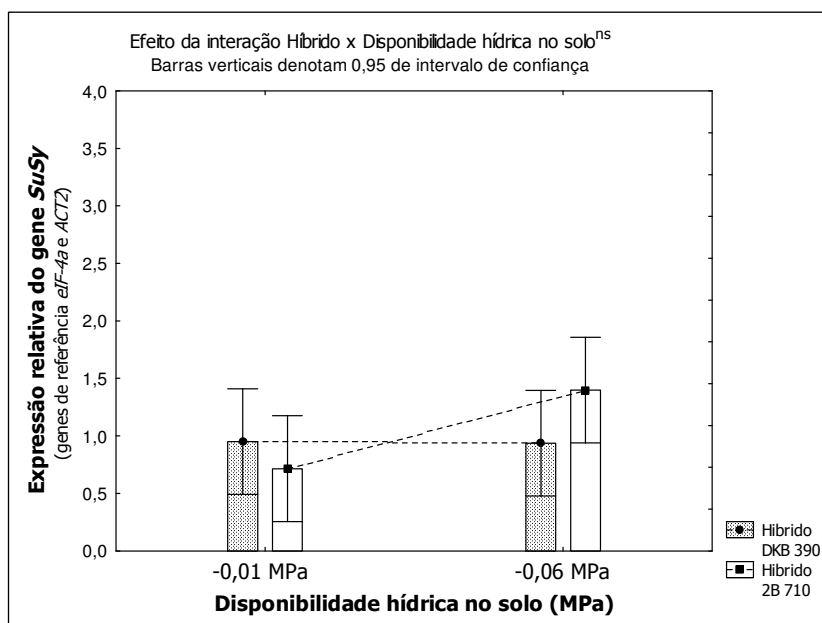


Figura 8. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *SuSy*. O fator DHS apresenta efeito semelhante sobre a expressão desse gene ($p > 0,05$).

A mudança do metabolismo da sacarose pode ocorrer devido à síntese e/ou à degradação do amido ser mais influenciada em condições adversas do que a síntese de sacarose (SILVA & ARRABAÇA, 2004). No presente estudo, ao se analisar a expressão do gene *ADP-glicose pirofosfolirase (ADP-Glic.)*, gene envolvido na síntese do amido (ADP-glicose: doadora de glicosil para alongamento da cadeia do polissacarídeo), observou-se que foi distinta entre os híbridos. No híbrido DKB 390 não houve alterações significativas na expressão desse gene independente da disponibilidade hídrica no solo em que foi cultivado, contudo, quando o híbrido DAS 2B710 foi submetido a menor DHS, houve redução da expressão gênica do mesmo gene (Figura 9).

Tanto a manutenção quanto a redução da expressão podem também estar relacionadas à redução da expressão do gene *S6PS*, pois há evidências que é uma molécula sinalizadora do *pool* das hexoses (ROSA et al., 2009), pois um baixo *status* de açúcar aumenta a mobilização de reservas e a exportação, enquanto que açúcares em abundância promove a estocagem de carboidratos (TAIZ & ZEIGER, 2010). Dessa

forma, a repressão do gene *ADP-glic.* seria uma forma de acionar invertases para hidrólise do amido para suprir o carbono necessário para a manutenção da produção de sacarose, uma vez que houve reduções nas taxas de assimilação do CO₂ (vide capítulo 3).

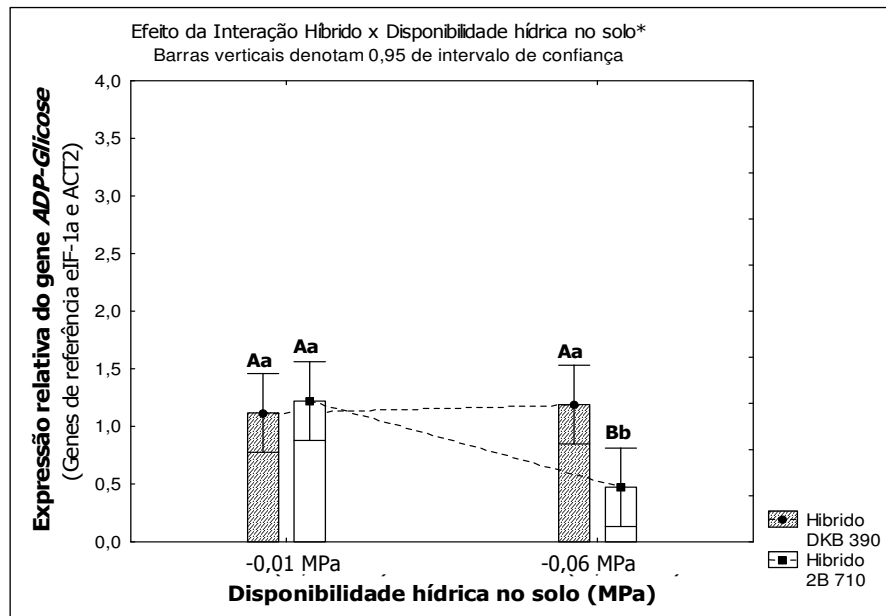


Figura 9. A interação HxDHS foi significativa ($p < 0,01$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene ADP-Glic. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si na expressão relativa do gene nas condições controle e seca ($p > 0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si na expressão relativa gênica dos híbridos DKB 290 e DAS 2B710 ($p > 0,05$).

Com relação ao gene *UDP-glicose pirofosforilase (UDP-Glic.)*, observou-se que houve um aumento da expressão do gene na condição mais limitante (Figura 10). O produto metabólico desse gene é uma molécula central, para biossíntese da sacarose e da trealose, derivando destas, várias outras funções celulares: obtenção de energia e produção de estruturas de carbonos para polissacarídeos de celulose e da parede celular, amido, lipídeos, proteínas, sacarose e trealose (PAUL et al., 2008).

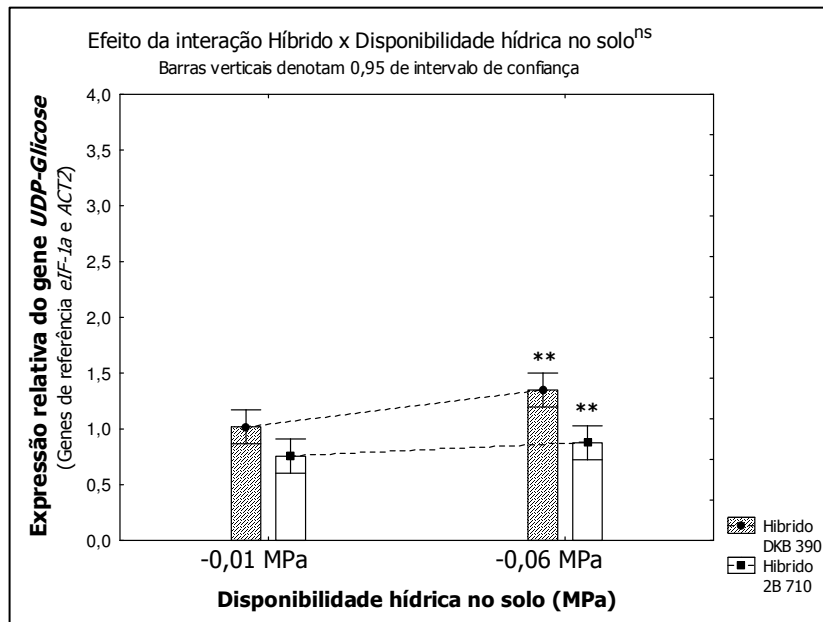


Figura 10. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbrido (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene UDP-glic. O fator DHS apresenta efeito distinto sobre a expressão desse gene ($p < 0,05$).

As vias de sinalização da sacarose e UDP-glicose se cruzam antagonicamente, pelo menos para os genes *S6PS*, *SuSy* e *UDP-glic.*, corroborando com a literatura (CIERESZKO et al., 2001). Entretanto, há relatos que as vias podem agir sinergicamente, em condições de deficiência mineral e baixa temperatura (LESZEK et al., 2004). Segundo esses autores, a presença de distintas vias de sinalização para os genes *UDP-glic* e *S6PS-T6PS* pode representar um mecanismo onde *UDP-glic.* é assegurada a ser produzida, mesmo se uma das vias está inativa ou bloqueada (LESZEK et al., 2004; PAUL et al., 2008).

Já para a via da trealose, houve distinção na expressão do gene *trealose-6-fosfato-sintase* (*T6PS*) entre os genótipos. Tendencialmente, para o genótipo DKB 390 houve o aumento da expressão do gene, enquanto para o DAS 2B710 houve a redução (Figura 11), apesar de não ser significativa. Contudo, no potencial -0,06 MPa, há diferença significativa da expressão do gene *T6PS* entre os híbridos, na qual o DKB 390

apresenta três vezes a mais de transcrição do gene comparado ao DAS 2B710. Os genes *trealose-6-fosfato-fosfatase* (*TPP*) e *trealase* (*THE*) não alteraram sua expressão, independente do híbrido e da umidade no solo (Figuras 12 e 13). Os padrões de expressão das enzimas-chave do metabolismo da trealose obtidos nas plantas superiores, às vezes, não possuem correlação com a tolerância ao estresse (EASTMOND et al., 2003; PAUL, 2008), uma vez que o composto ativo não seria a trealose e sim a trealose-6-fosfato (T6P) nessas condições (EASTMOND et al., 2003).

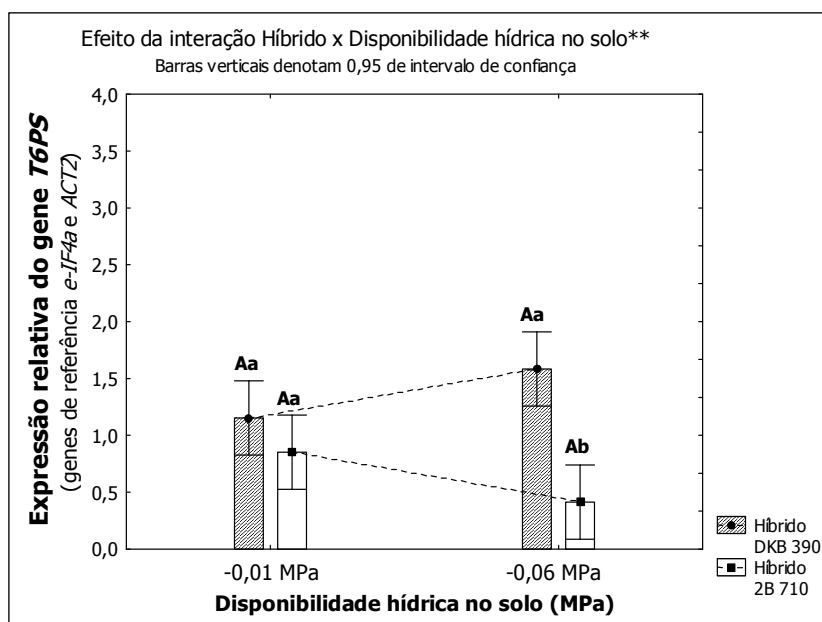


Figura 11. A interação HxDHS foi significativa ($p < 0,01$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene *T6PS*. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si na expressão relativa do gene nas condições controle e seca ($p > 0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si na expressão gênica relativa dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710 ($p > 0,05$).

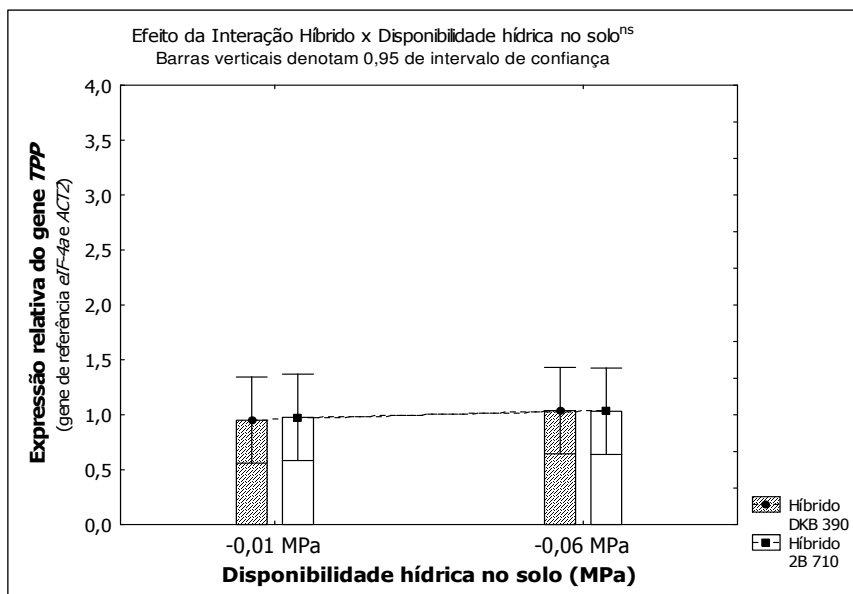


Figura 12. A interação HxDHS foi não-significativa ($p>0,05$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *TPP*. O fator DHS apresenta efeito semelhante sobre a expressão desse gene ($p>0,05$).

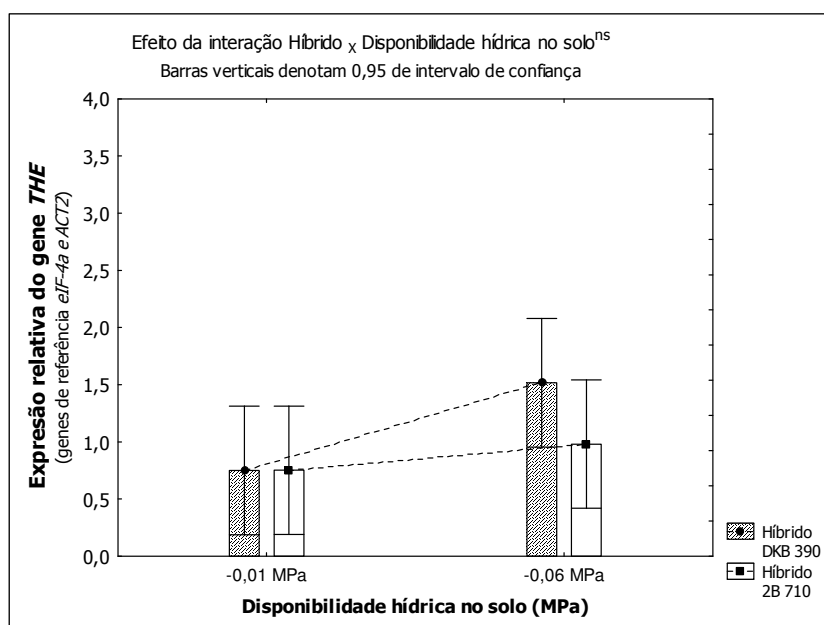


Figura 13. A interação HxDHS foi não-significativa ($p>0,05$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *THE*. O fator DHS apresenta efeito semelhante sobre a expressão desse gene ($p>0,05$).

Nos genes *T6PS*, *TPP* e *THE* não se detectaram variações significativas em seus padrões de expressão, pois a síntese de trealose nas plantas pode ser limitada, pois em excesso, pode causar efeitos deletérios no metabolismo (WIGLER, 2002). O metabólito T6P, um intermediário da via da trealose, é formado pela ação da enzima T6PS, indispensável para a utilização de carboidrato disponível durante o crescimento e desenvolvimento da planta e está intimamente relacionada com a percepção de estresses nutricionais, bióticos e abióticos (PAUL, et al. 2008). Há forte evidência de que a trealose-6-fosfato (*T6PS*) atuaria como uma molécula sinalizadora no metabolismo de carboidrato (PAUL, 2008).

Observou-se também que um gene, cujo produto está envolvido em outras vias metabólicas e funções celulares, são também positivamente regulados por açúcares solúveis, por exemplo, o gene que codifica a proteína de síntese da UDP-glicose pode ser regulado pelos genes que codificam as proteínas dos precursores S6PS e T6PS. Em contrapartida, muitos genes são regulados negativamente por açúcares que possivelmente reprimiram a expressão do gene *ADP-glicose*. Entretanto, nada se sabe sobre a possibilidade de um mecanismo comum responsável pela regulação dos metabólitos sacarose e trealose. Os sinais que desencadeiam estes processos, como a regulação do metabolismo de carbono pela fotossíntese interage com outros processos durante condições de estresse ainda necessitam ser mais elucidados.

Com isso, as alterações na expressão dos genes que codificam as proteínas de enzimas-chave desses açúcares não seguem um modelo estático e variam com o genótipo e tipo de estresse, conforme os resultados descritos no perfil de expressão gênica relativa no presente estudo (Figura 14). Além disso, também foram notificados que nem todos os açúcares solúveis desempenham papéis similares em eventos associados ao metabolismo de plantas estressadas. A sacarose e a trealose podem atuar como substratos para a respiração celular, ou como osmólitos para manter a homeostase celular, enquanto a frutose não está relacionada com osmoproteção e parece estar relacionada com a síntese de metabólitos secundários (ROSA et al., 2009). Ademais, a atividade de uma enzima poderia não corresponder linearmente a um

aumento da expressão do seu gene codificante, uma vez que podem ocorrer diversos fatores que atuam na atividade de uma enzima, a exemplo: a ausência de cofatores ou presença de inibidores enzimáticos.

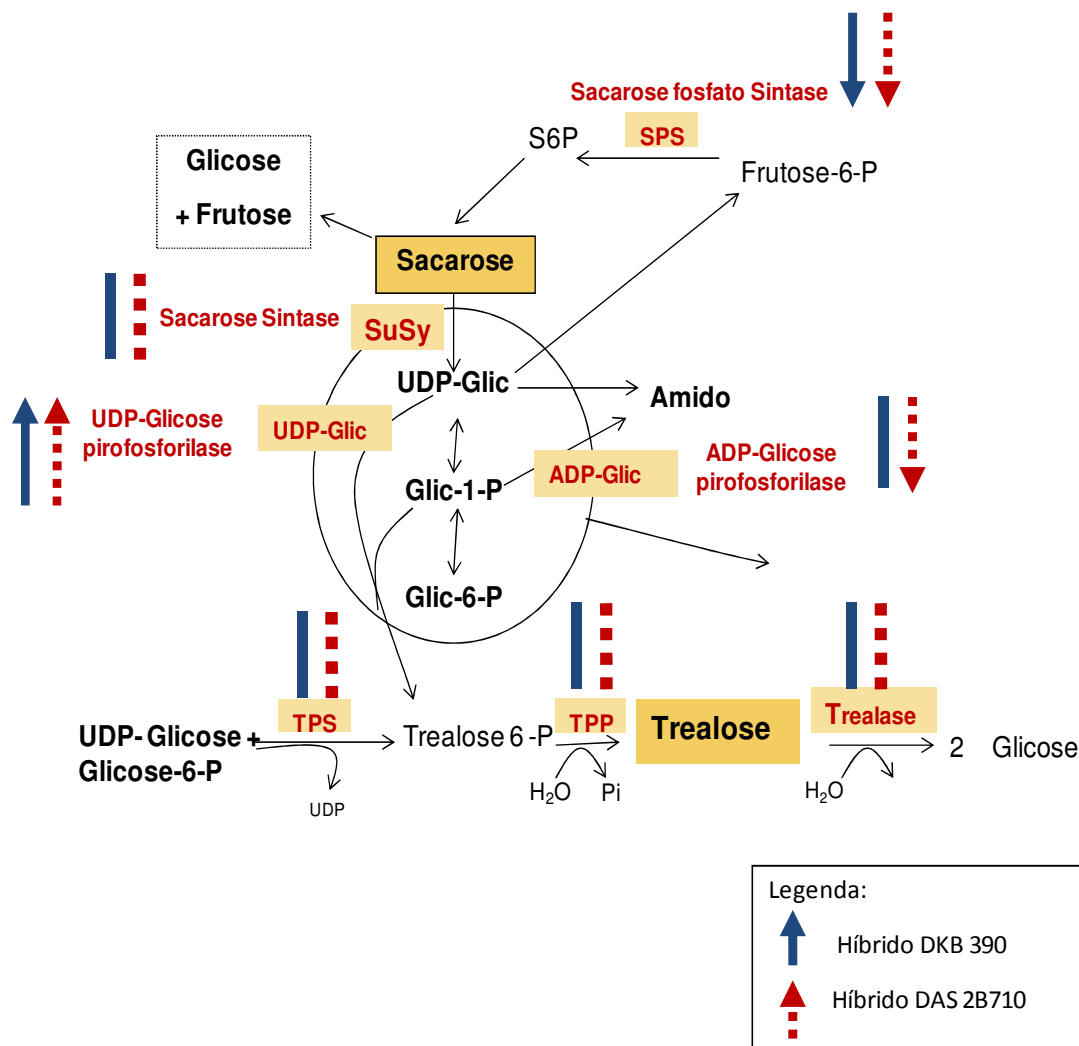


Figura 14. Perfil da expressão relativa de genes das enzimas-chave do metabolismo da sacarose e trealose em distintos híbridos de milho (DKB 390 e DAS 2B710) sob déficit hídrico (-0,06 MPa).

4.3.2.2. Metabolismo dos compostos nitrogenados

Como parte do metabolismo global das plantas, o metabolismo do nitrogênio é afetado pelo déficit hídrico. A conversão do nitrato a amônio, mediada pela nitrato redutase (NtR), a qual reduz nitrato a nitrito, e pela nitrito redutase, que converte nitrito a amônio, que por sua vez é assimilado nos aminoácidos glutamina e glutamato por meio da glutamina sintetase (GtSy) e glutamato sintase (GOGAT). Esses aminoácidos servem para translocar nitrogênio orgânico de fontes para drenos, bem como para a incorporação a outros aminoácidos por meio de reações de transaminações; é influenciado negativamente por fatores abióticos (TAIZ & ZEIGER, 2010). Como as plantas sintetizam seus componentes orgânicos a partir de nutrientes inorgânicos, evidenciou-se a necessidade de se quantificar a expressão gênica de enzimas que codificam a assimilação do nitrato (nitrato redutase) e do amônio (glutamina sintetase).

A expressão do gene que codifica a enzima nitrato redutase foi reduzida em ambos os híbridos sob estresse hídrico (Figura 15). Possivelmente, com o decréscimo do potencial hídrico no solo para -0,06 MPa, a absorção de NO_3^- foi reduzida, ocasionando modificações em níveis de transcrição e tradução do gene *nitrato redutase* (*NtR*). Em diferentes genótipos de milho a atividade da enzima apresentou redução sob condições de estresse hídrico (FERREIRA et al., 2002), evidenciando que fatores adversos como a seca regulam a atividade da enzima. A nível transcricional, FOYER et al. (1998) evidenciaram que no milho, através da northern-blot analysis, os níveis de transcrição da *NtR* é diminuído (em cerca de 80% nas folhas de milho) em condições de seca. Dessa forma, os resultados desta pesquisa aliados à literatura, sugerem que houve presumivelmente uma diminuição na síntese de proteínas, devido à inibição de processos envolvendo a transcrição e formação da proteína ativa nitrato redutase. Os decréscimos observados na expressão do gene *NtR* em ambos híbridos de milho podem ter sido causados por uma diminuição nos níveis de nitrato na folha.

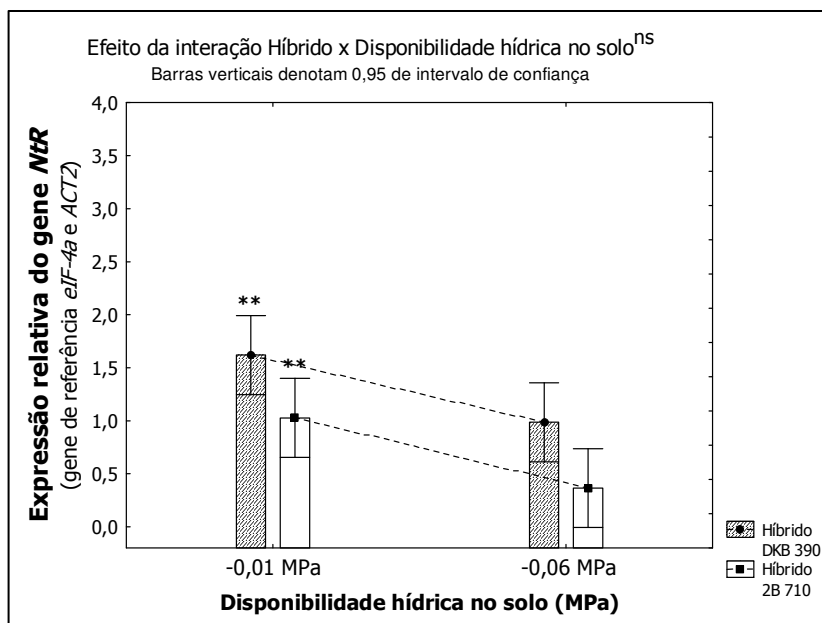


Figura 15. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbrido (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *NtR*. O fator DHS apresenta efeito distinto sobre a expressão desse gene ($p < 0,05$).

O gene *glutamina sintetase* (*GtSy*) manteve padrão de expressão inalterado em ambos os híbridos na condição adversa (Figura 16). Mesmo com a redução da disponibilidade hídrica no solo para -0,06 MPa, a conversão do NH_4^+ em glutamina foi mantida, ainda que todo o processo consuma o equivalente a 12 ATPs para cada nitrato assimilado (revisado por TAIZ & ZEIGER, 2010). Com isso, pode-se presumir que o amônio não foi mantido por meio da rota comum, quando o substrato NH_4^+ advém da redutase do NO_3^- , mas possivelmente por meio da proteólise, que é um processo desencadeado quando a plantas encontra-se em condição limitante, sugestionada, neste trabalho, pelo decréscimo da expressão do gene que codifica a enzima nitrato redutase.

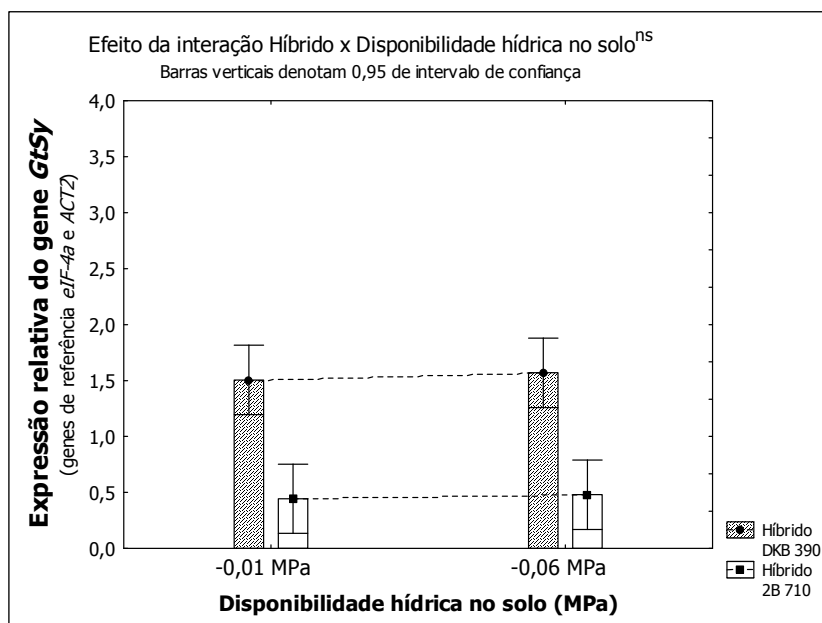


Figura 16. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *GtSy*. O fator DHS apresenta efeito semelhante sobre a expressão desse gene ($p > 0,05$).

De acordo com FERREIRA et al. (2002) e MEDICI et al. (2003), ao avaliarem a atividade da enzima glutamina sintetase em diferentes genótipos de milho sob seca, observaram que não houve diferenças significativas na atividade da proteína, independente do genótipo ou condição de disponibilidade hídrica estudada. Como a assimilação do nitrogênio é reduzida sob tais condições, pode-se supor que tal composto se origina da rotatividade de proteínas. É neste contexto que as enzimas envolvidas na incorporação do amônio a compostos orgânicos, os quais podem agir como precursores para diferentes metabólitos, podem ter importante papel na sobrevivência de plantas durante estresse (FERREIRA et al., 2002).

Em recente pesquisa, DÍAZ et al. (2010), comprovaram a importância da glutamina sintetase no metabolismo da prolina. Em mutantes de *Lotus japonicus* (GS2 mutante, Ljgln2-2) que subexpressam o gene *GtSy*, foi avaliada a resposta transcricional à seca através de qRT-PCR de linhagens mutantes e selvagem dessa espécie. Esses autores observaram que o Ljgln2-2 mutante apresentou sensibilidade ao estresse

hídrico, comparada à linhagem selvagem, obtendo diferenças significativas no padrão de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de prolina, bem como redução no acúmulo de prolina, tornando os mutantes mais sensíveis aos danos causados pela seca.

Ao se avaliar o padrão de expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina em genótipos de milho sob condição de estresse, observou-se têm padrão de expressão distintos (Figuras 17, 18 e 19).

Como o precursor Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato pode ser sintetizado diretamente e/ou indiretamente, observou-se que na via direta, a expressão do gene *P5CS* (Δ^1 pirrolina-5' carboxilato sintetase) é distinta entre os híbridos de milho. O híbrido DKB 390 apresentou expressão inalterada, independente da DHS. Já o DAS 2B710 duplicou, significativamente, a sua expressão na condição de limitação hídrica: -0,06 MPa comparado à planta controle (-0,01 MPa). Na condição limitante de umidade no solo, os níveis de transcrição da *P5CS* são quatro vezes maiores no híbrido DAS 2B710 que no DKB 390 (Figura 17). Já na via indireta, para ambos os híbridos, o gene *OAT* (*ornitina aminotransferase*) não apresentou alterações no padrão de expressão em nenhuma condição de DHS. No passo comum as duas vias, o qual a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato é reduzida a prolina através da enzima Δ^1 pirrolina-5' carboxilato redutase (*P5CR*), a expressão do gene que codifica essa enzima (*P5CR*) foi maior na condição limitante de água no solo para os híbridos de milho (Figura 19). De acordo com a literatura, embora as duas vias de síntese sejam igualmente importantes em condições normais, as evidências favorecem a via direta do glutamato em condições de estresse hídrico.

Ao sofrer deleção do gene *OAT*, plantas mutantes de *Arabidopsis* em condições de estresse hídrico acumularam prolina normalmente quando comparado com a linhagem selvagem, acumulou intermediários do ciclo da uréia, prejudicando o catabolismo dos aminoácidos ornitina e arginina para fins de fonte de nitrogênio (FUNCK et al. 2008). Esses autores afirmam ainda que a biossíntese de prolina em *Arabidopsis* seja praticamente ou exclusivamente realizada por meio da via glutamato (via direta) e que não depende do glutamato advindo do catabolismo da ornitina ou arginina.

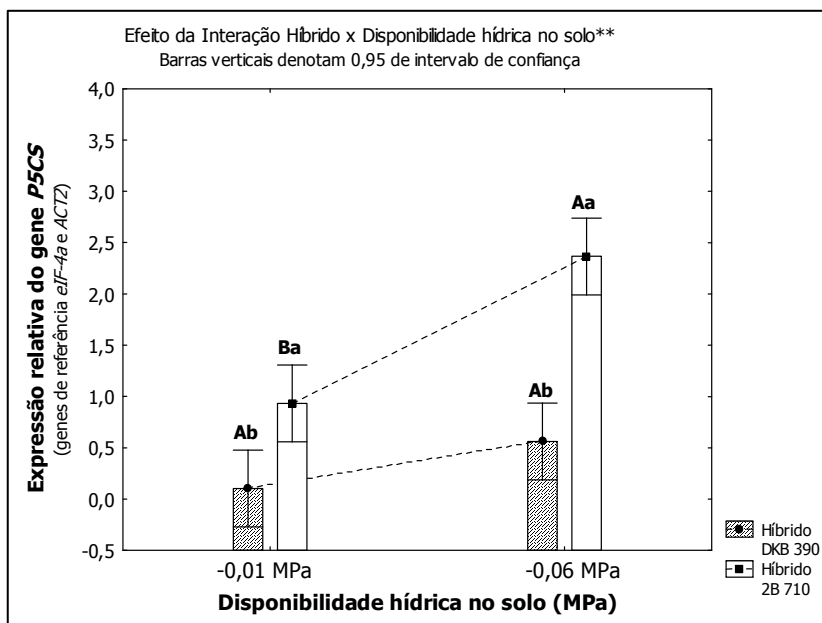


Figura 18. A interação HxDHS foi significativa ($p < 0,01$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene *P5CS*. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si na expressão relativa do gene nas condições controle e seca ($p > 0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si na expressão gênica relativa dos híbridos DKB 390 e DAS 2B710 ($p > 0,05$).

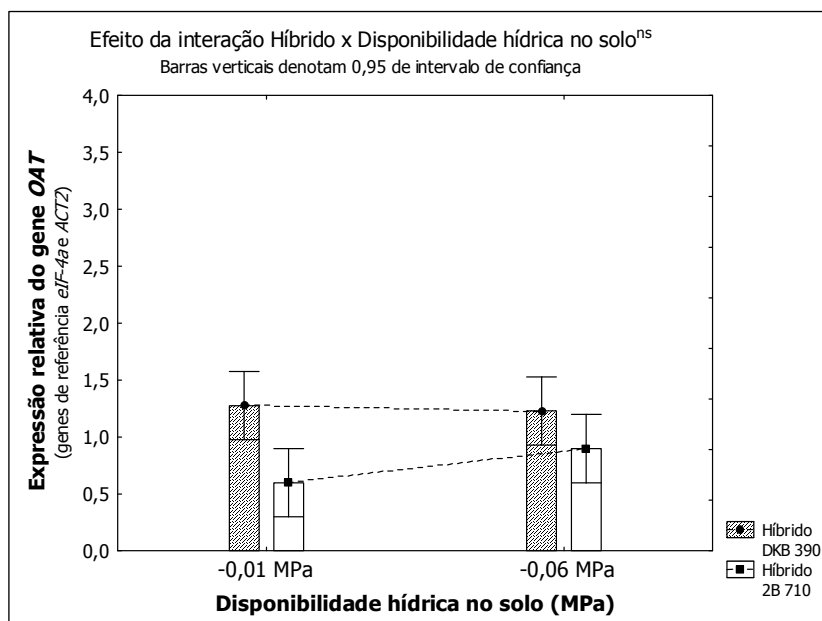


Figura 19. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *OAT*. O fator DHS apresenta efeito semelhante sobre a expressão desse gene ($p > 0,05$).

No caso deste trabalho, pode ser admitido que a prolina acumulada (vide capítulo 3) tenha sua origem no glutamato proveniente do N assimilado recentemente, ou seja, pela expressão dos genes que codificam as proteína nitrato redutase e glutamina sintetase, uma vez que as respostas à expressão dos genes dessas enzimas ao estresse hídrico foram coesas à expressão dos genes *P5CS* e *P5CR*. Consequentemente, a disponibilidade de glutamato necessária para síntese de prolina poderia ser explicada pela hidrólise de proteínas ou por transaminação a partir de outros aminoácidos. A hidrólise de proteínas, além de contribuir com o aminoácido precursor (glutamato), pode também contribuir com a própria prolina, favorecendo o seu aumento como aminoácido livre nos tratamentos sob estresse hídrico (MEDICI et al., 2003; DÍAZ et al. 2010).

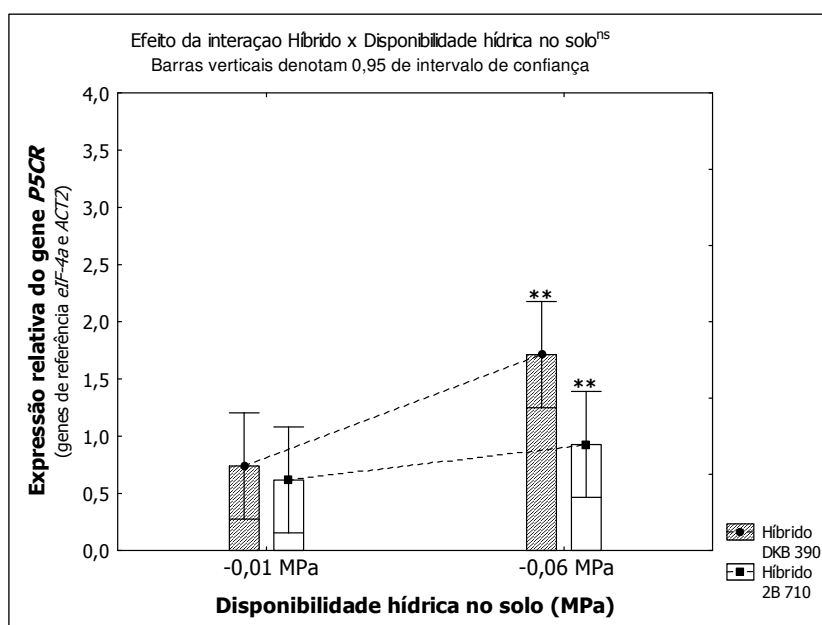


Figura 19. A interação HxDHS foi não-significativa ($p > 0,05$). Os efeitos dos fatores híbrido (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo independente sobre a expressão gênica relativa do gene *P5CR*. O fator DHS apresenta efeito distinto sobre a expressão desse gene ($p < 0,05$).

Ao se analisar a expressão do gene responsável pela degradação da prolina (*PROX*), demonstrou-se que os níveis de transcrição do híbrido DKB 390 são estáveis. Com relação ao DAS 2B710, houve redução significativa da expressão do gene *PROX* para 1/3 em condição de déficit hídrico quando comparado ao controle. Percebeu-se que os genes *P5CS* e *PROX* são altamente conexos, ocorrendo ciclagem do produto da rota metabólica. Calculando a razão *P5CS/PROX* da expressão desses genes, para cada híbrido sob distintas disponibilidades hídrica no solo, obtiveram-se os valores: híbrido DKB 390: 0,0 (controle) e 0,3 (déficit hídrico); híbrido DAS 2B710: 0,53 (controle) e 4,8 (déficit hídrico).

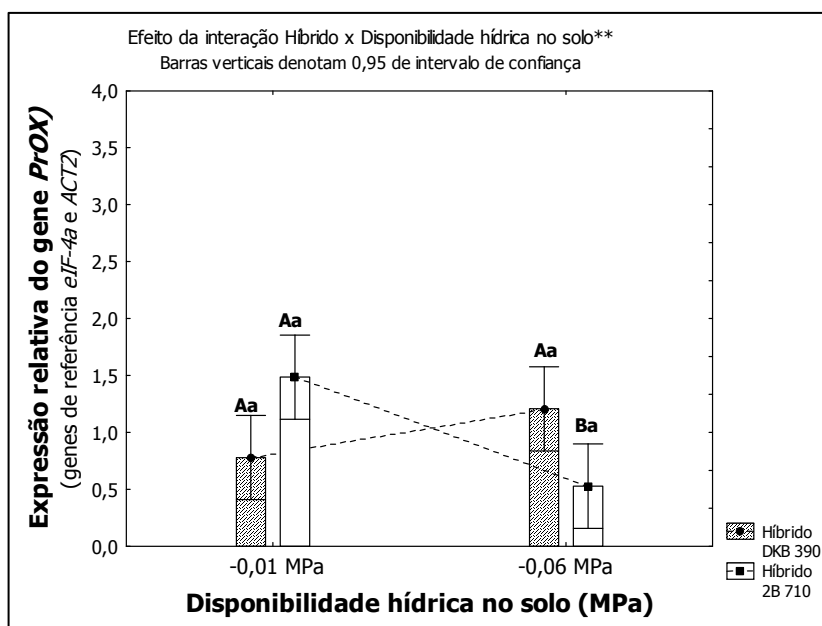


Figura 20. A interação HxDHS foi significativa ($p < 0,01$). Os efeitos dos fatores híbridos (H) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene *PROX*. Para cada híbrido, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si na expressão relativa do gene nas condições controle e déficit hídrico ($p > 0,05$). Para cada disponibilidade hídrica, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram entre si na expressão gênica relativa dos híbridos DKB 290 e DAS 2B710 ($p > 0,05$).

Neste estudo, também se revelou o aspecto inovador do metabolismo Pro em plantas mencionado por MILLER et al. (2009), o qual demonstra a existência de um ciclo P5C-Pro. Corroborando a ciclagem do metabólito nos genótipos DKB 390 e DAS 2B710, embasados nos resultados dos níveis de transcritos para os genes *P5CR* e *PROX* desta pesquisa. Esse ciclo citosólico-mitocondrial seria responsável pelo acúmulo preferencial de prolina, mantendo uma elevada razão celular de Pro para P5C e fluxo de elétrons para a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons.

Esses autores postulam que o ciclo P5C-Pro está intrínseco ao desenvolvimento e ao metabolismo de plantas sob estresse, onde os genes *PRODH* e *P5CDH* são altamente expressos em órgãos florais e zonas meristemáticas, bem como em partes vegetativas (heterotróficas) em regiões com depleção de luz e/ou de açúcar (MILLER et al., 2009). Evidenciam ainda que esse catabolismo é mais proeminente durante a recuperação de estresses abióticos.

A superexpressão do gene *PROX* em mutantes de alfafa, tabaco e *Arabidopsis* aumentaram a capacidade oxidante da Pro, mas não reduziram o teor de Pro, em comparação com as plantas selvagens, em condições normais, ou salinidade, ou condições de déficit hídrico. Além disso, nenhum aumento nos níveis de P5C ou hipersensibilidade à seca ou salinidade foram registrados. A manutenção dos níveis comparáveis Pro e P5C em linhagens selvagens e mutantes *PRODH-OE* indica que a compensação do excesso de produção de P5C é alcançada pela redução imediata a Pro e, assim, o equilíbrio entre os dois compostos é mantido como nas linhagens selvagens (MILLER et al., 2009). Teoricamente, tais apontamentos explicariam a diferença na razão *P5CS/PROX* da expressão dos genes de híbridos: aquele híbrido mais tolerante apresentaria uma razão *P5CS/PROX* menor, enquanto o de menor tolerância, uma razão maior.

Posto isso, o gene *PROX* pode ser considerado como um importante regulador das plantas, envolvido no controle da atividade do ciclo P5C-Pro, além de contribuir para o controle redox mitocondrial e à prevenção da superprodução de ROS.

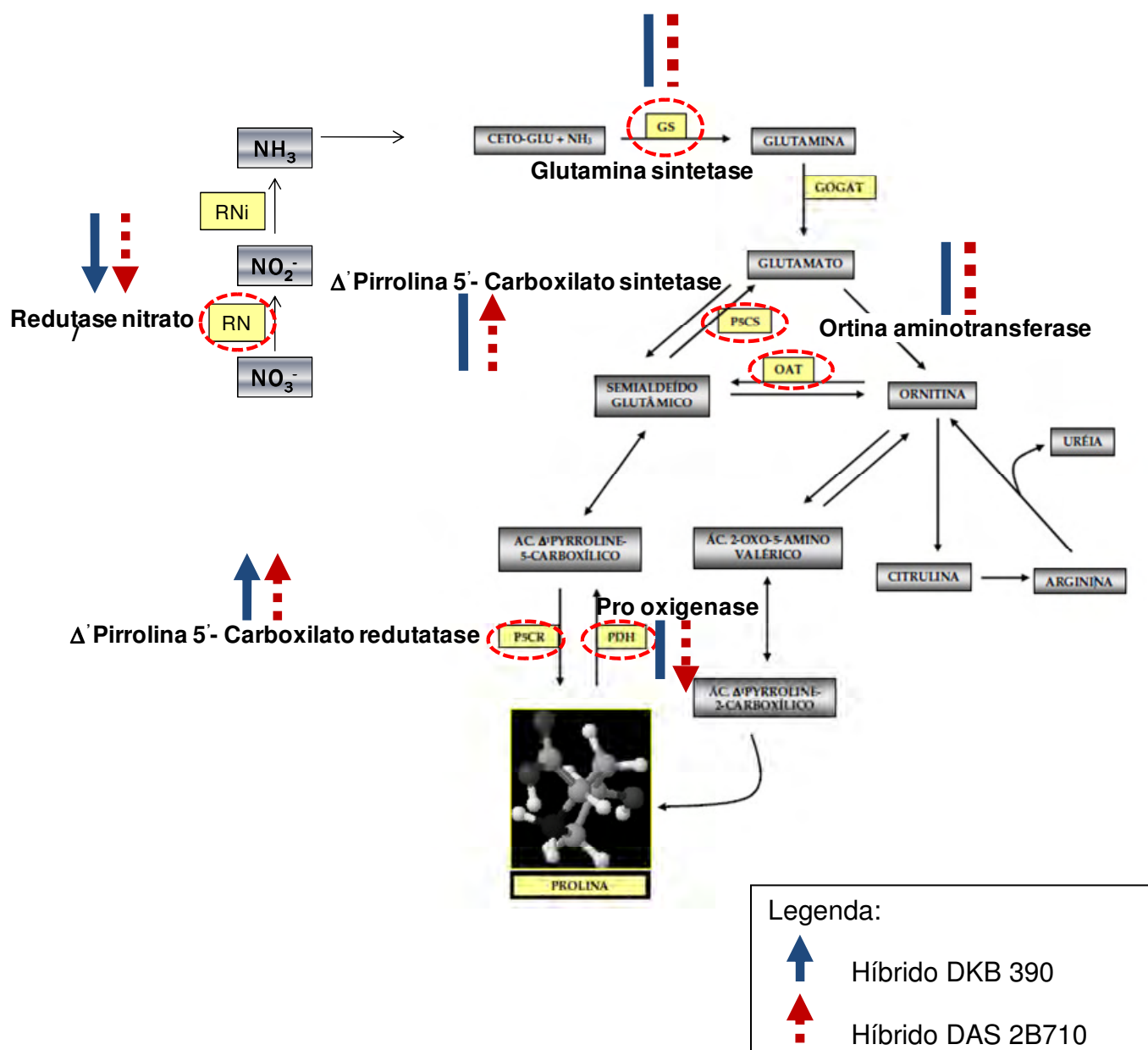


Figura 21. Perfil da expressão relativa de genes das enzimas-chave do metabolismo da prolina em distintos híbridos de milho (DKB 390 e DAS 2B710) sob déficit hídrico (-0,06 MPa).

As postulações anteriores podem explicar as diferenças em níveis de transcrição e tradução dos genes que regulam a biossíntese e a degradação da prolina: *P5CS*, *OAT*, *P5CR* e *PROX*. Em tese, em condições de estresse hídrico, há a predominância do uso da via direta pelos híbridos de milho, evidenciada pela expressão dos genes codificantes das enzimas *P5CS* e *P5CR*, mantendo o equilíbrio da razão *P5C/Pro* através da

expressão do gene *PROX*. Sendo esse gene importante para homeostase celular ao prevenir do estresse oxidativo.

Ademais, alguns genes evidenciaram diferenças fenotípicas entre os híbridos, podendo ser utilizados no *screening* de genótipos na avaliação do grau de tolerância ao déficit hídrico.

4.4. Conclusões

Os genes *ACT2* e *eIF-4a* foram utilizados como normalizadores para a análise de expressão relativa de milho sob diferentes disponibilidades hídricas no solo. Os dois genes apresentam menor variação na sua expressão entre os tratamentos testados.

Os genes identificados como responsivos à limitação hídrica foram: *S6PS*, *UDP-Glic* e *ADP-Glic* para metabolismo de carboidratos, e *NtR*, *P5CS*, *P5CR* e *PROX* para o metabolismo dos aminoácidos. Esses genes podem, ainda, ser potenciais marcadores moleculares para uso em programa de melhoramento genético de milho fundamentado em seleção assistida.

No conjunto das respostas transcricionais ao déficit hídrico, analisado através da técnica de qRT-PCR, evidenciou-se que o híbrido DKB 390 é mais tolerante às mudanças na disponibilidade hídrica no solo do que o híbrido DAS 2B710, classificando-os como tolerante e sensível ao déficit hídrico, respectivamente.

4.5. Referências Bibliográficas

ANAMI, S.; DE BLOCK, M.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTENS, M. Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 28, n. 1, p. 16-35, 2009.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. p. 1158-1203.

CIERESZKO I.; JOHANSSON, H.; KLECZKOWSKI, L. A. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, London, v. 354, p. 67–72, 2001.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W. R. Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 5–17, 2005.

DÍAZ, P.; BETTI, M.; SÁNCHEZ, D. H.; UDVARDI, M. K., MONZA, J.; MÁRQUEZ, A. J. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. **New Phytologist**, no. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03440.x, [versão on-line], Agosto, 2010.

DJILIANOV, D.; GEORGIEVA, T. MOYANKOVA, D.; ATANASSOV, A.; SHINOZAKI, K.; SMEEKEN, S. C. M.; VERMA, D. P. S.; MURATA, N. Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants – gene transfer approach. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 19, Special Issue, p. 64-71, 2005.

EASTMOND, P. J.; LI, Y.; GRAHAM, I. A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 533–537, 2003.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M. de. PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 13-17, 2002.

FOYER, C. H.; VALADIER, M-H; MIGGE, A; BECKER, T. W. Drought induced effects on nitrate reductase activity and mRNA on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology**, Boca Raton, v. 117, p. 283–292, 1998.

FUNCK, D.; STADELHOFER, B.; KOCH, W. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 40, p.1-14, 2008.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology: Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, Dordrecht, v. 37; p. 263-285, 2002.

ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R. S., CASU, R. E.; BONNETT, G, D.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 22, p. 325-337, 2004.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 345; n. 2, p. 646-651, 2006.

LESZEK, A.; KLECZKOWSKI, M.G., CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H. UDP-Glucose Pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. **Plant Physiology**, Boca Raton, v. 134, p. 912–918, 2004.

MEDICI, L. O.; MACHADO, A. T.; AZEVEDO, R. A.; PIMENTEL, C. Glutamine synthetase activity, relative water content and water potential in maize submitted to drought. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 2, p. 301-304, 2003.

MILLER, G.; HONIG, A.; STEIN, H.; SUZUKI, N.; MITTLER, R.; ZILBERSTEIN, A. Unraveling Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate-Proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 39, p. 26482–26492, 2009.

PAUL, M. J. Trehalose 6-phosphate: a signal of sucrose status. **Biochemical Journal**, London, v.412, especial issue, p.e1–e2, 2008.

PAUL, M. J.; PRIMAVESI, L. F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. Trehalose metabolism and signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 417-441, 2008.

ROSA, M.; PRADO, C. PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J. A., HILAL, M.; PRADO, F. E. Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, Bethesda, v. 4, n. 5, p. 388-393; 2009.

SILVA, J.M; ARRABAÇA, M.C. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C4 grass *Setaria sphacelata*: a comparison between rapidly and slowly imposed water stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.16, p.551-555, 2004.

SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; ALVES-FERREIRA, M.; CARNEIRO, V. T. C. Identificação de genes referência em *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf. para estudo de expressão gênica usando qRT-PCR. In: **II Simpósio Internacional de Melhoramento de Forrageiras**, 2009, Campo Grande. Anais. Campo Grande: Embrapa Gado de corte, 2009. P.1-3. Disponível em: <http://simf.cnpqg.embrapa.br/simf1/anais/resumos/biotecnologia/06.pdf>. Acesso em 26/10/09.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 739-774.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, Heidelberg, v. 20, p.1736–1737, 2008.

WINGLER, A.; The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 60, p. 437-440, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças nos teores de prolina e sacarose, bem como na expressão de genes que codificam enzimas-chave envolvidas no metabolismo desses compostos em plantas de milho submetidas à deficiência de água, constituem fortes indicadores do papel desses compostos na resposta à limitação hídrica e na aclimação dessas plantas ao estresse.

IMPACTO E PERSPECTIVAS FUTURAS DA PESQUISA

Apesar das pesquisas, que produzem uma infinidade de informações, dos diversos fenômenos chaves na tolerância ao estresse, ainda não está totalmente elucidada, pois apenas alguns componentes de diversas vias foram relacionados nos estudos. A prioridade, certamente, será a identificação de moléculas conectoras das diversas vias e dos componentes chaves de cada via de resposta à limitação hídrica. Portanto, os trabalhos de pesquisa voltados à identificação de espécies vegetais tolerantes à seca, determinação dos mecanismos de tolerância, a conservação e a transformação dos recursos genéticos das plantas mais tolerantes à seca, são fatores importantes para o equilíbrio ambiental, uma vez que cerca de 80% da água consumida no mundo é destinada à agricultura.

APÊNDICES

APÊNDICE CAPÍTULO 3 (A3)

A3.1. Instalação e Condução do experimento piloto

Inicialmente, foi determinada a curva de retenção hídrica para os solos propostos, com o intuito de se obter a umidade correspondente às diferentes tensões. Para isso, foram coletadas amostras do solo dos vasos com auxílio de anel volumétrico de 4,8 cm de diâmetro e 3,0 cm de altura (Figuras 1 e 2), para determinação da densidade e da capacidade de retenção de água por secamento, nas tensões de 0,001; 0,006; 0,01; 0,03; 0,06; 0,1 e 0,3 MPa (Tabela 4 e Figura 5), com o auxílio de uma câmara de pressão de Richards com placa porosa. As curvas de retenção foram ajustadas com base no modelo matemático proposto por van GENUCHTEN (1980) e, a partir dessas, foi estimada a retenção de água a 1,5 MPa, com vistas a calcular a capacidade de disponibilidade hídrica no solo (DHS).



Figura 1. Coleta das amostras do solo dos vasos com auxílio de anel volumétrico de 4,8 cm de diâmetro e 3,0 cm de altura para determinação da densidade e da capacidade de retenção de água por secamento.

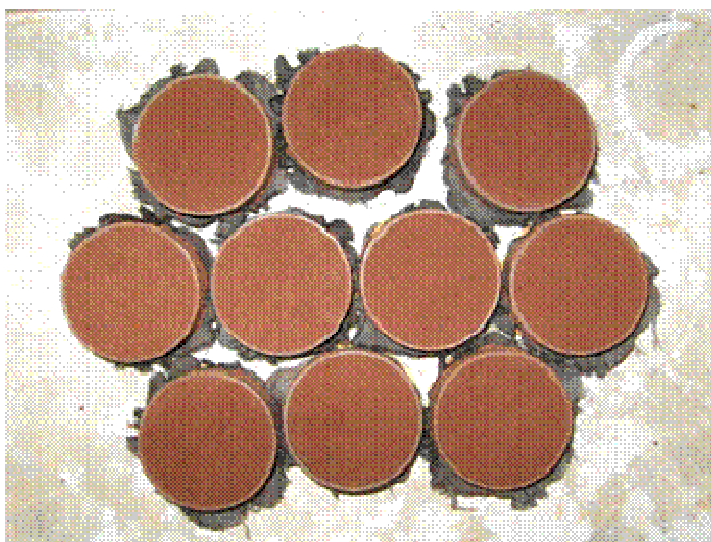


Figura 2. Amostras do solo indeformado em anel volumétrico de 4,8 cm de diâmetro e 3,0 de altura para determinação da densidade e da capacidade de retenção de água por secamento.

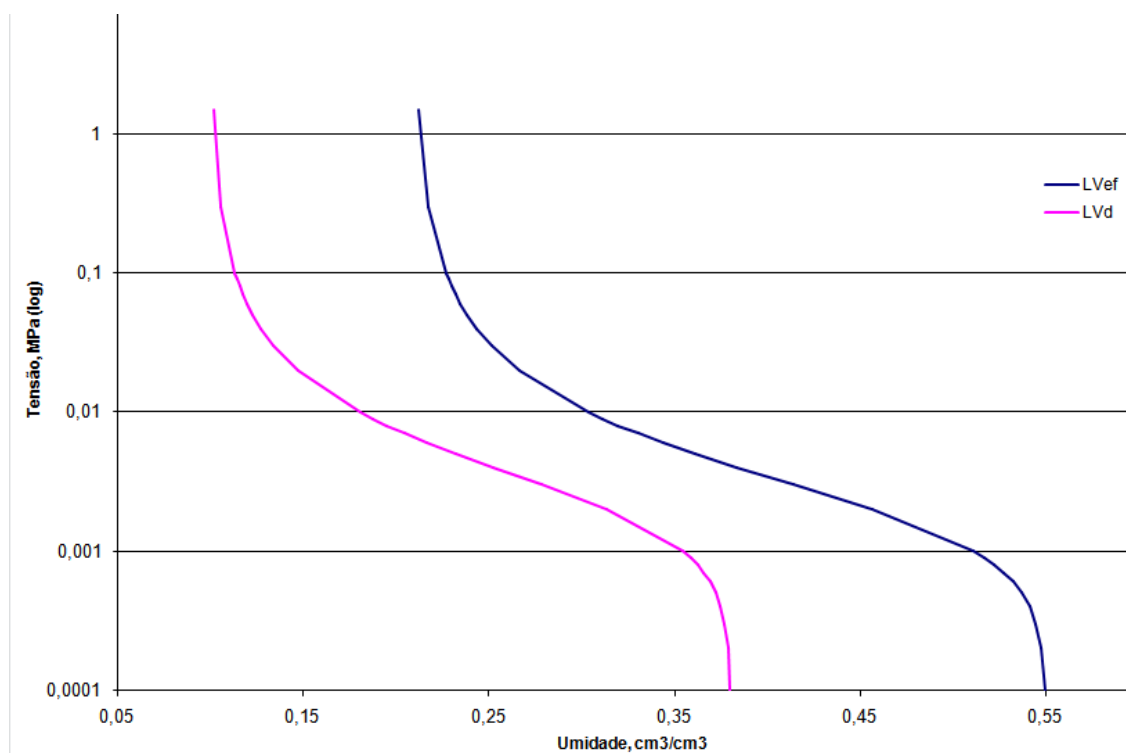
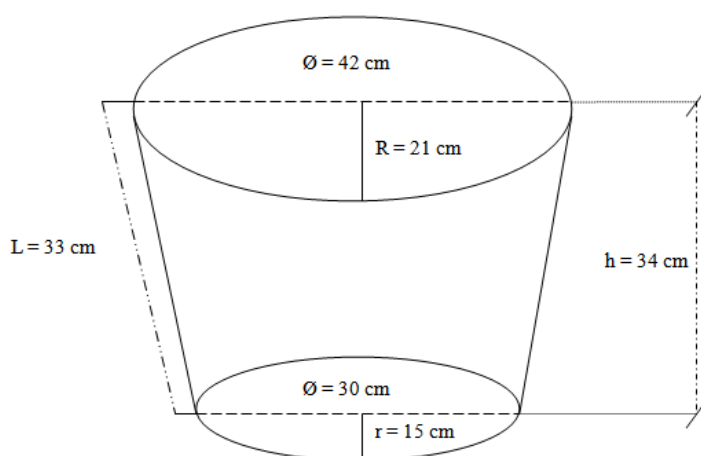


Figura 3. Curvas de retenção ajustadas com base no modelo matemático proposto por van GENUCHTEN (1980) e, a partir dessas, foi estimada a retenção de água a 1,5 MPa, com vistas a calcular a disponibilidade hídrica no solo (DHS).

Para calibração da curva, planejamento da adubação e análises bioquímicas foi montado um experimento piloto.

A partir das leituras no tensímetro, foi realizado o cálculo através dos dados da curva de retenção para os solos propostos no trabalho e do volume do vaso (Figura 4).



Volume do vaso:

$$V = 1/3 \pi h (R^2 + R.r + r^2)$$

$$V = 1/3 \times 3,1416 \times 34 (21^2 + 21 \times 15 + 15^2)$$

$$V = 34928,22712 \text{ cm}^3$$

Figura 4. Exemplo de cálculo para volume de um vaso.

Ex: Solo LVd com tensão hídrica de -0,03 MPa

Leitura diária da tensão do vaso (tensímetro digital): **860, 7 mBar $\equiv$ -0,08607 MPa**

Logo, o solo LVd com tensão hídrica de 0,03 MPa tem capacidade de água disponível de 0,1313 cm³/cm³.

Então, a quantidade de água reposta foi calculada por meio da diferença do valor de cm³/cm³ do tratamento e o valor de cm³/cm³ correspondente a leitura da tensão diária do vaso, multiplicado ao volume do vaso:

$$\text{DHS} = (0,1339 \text{ cm}^3/\text{cm}^3 - 0,1154 \text{ cm}^3/\text{cm}^3) \times 35000 \text{ cm}^3$$

DHS= 647,5 cm³ (quantidade reposta de água no vaso para manutenção da umidade concernente a tensão do tratamento.

cmca	MPa	Solo LVef	Solo LVd	
0	0	0,5500	0,3800	
1	0,0001	0,5492	0,3795	
2	0,0002	0,5472	0,3784	
3	0,0003	0,5444	0,3767	
4	0,0004	0,5408	0,3745	
5	0,0005	0,5367	0,3719	
6	0,0006	0,5321	0,3689	
7	0,0007	0,5271	0,3656	
8	0,0008	0,5218	0,3621	
9	0,0009	0,5163	0,3584	
10	0,001	0,5107	0,3545	
20	0,002	0,4560	0,3134	
30	0,003	0,4136	0,2785	
40	0,004	0,3830	0,2519	
50	0,005	0,3605	0,2320	
60	0,006	0,3434	0,2166	
70	0,007	0,3301	0,2046	
80	0,008	0,3194	0,1949	
90	0,009	0,3106	0,1870	
100	0,01	0,3032	0,1803	Capacidade de campo
200	0,02	0,2659	0,1468	
300	0,03	0,2512	0,1339	Vaso com solo LVd com tensão hídrica de 0,03 MPa
400	0,04	0,2431	0,1269	
500	0,05	0,2380	0,1225	
600	0,06	0,2344	0,1194	
700	0,07	0,2317	0,1171	Leitura diária do vaso com solo LVd com tensão hídrica de 0,07 MPa
800	0,08	0,2296	0,1154	
900	0,09	0,2279	0,1140	
1000	0,1	0,2265	0,1128	
3000	0,3	0,2172	0,1053	
15000	1,5	0,2121	0,1014	Ponto de Murcha Permanente

Caracterização física e química dos solos

Amostras de dois tipos de solos: 1) Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulinítico, hipoférrico (LVd) e, 2) Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulinítico-oxídico (LVef) (ANDRIOLI & CENTURION, 1999) foram coletados na profundidade de 0 a 20 cm, sendo retiradas alíquotas representativas, as quais foram homogeneizadas e submetidas à análise química e granulométrica (RAIJ & QUAGGIO, 1983). A partir dos resultados das análises, foi realizada a correção e a adubação (Figura 5), de acordo com as exigências nutricionais da cultura do milho (RAIJ et al. 1997; FORNASIERI FILHO, 1992).

Tabela 1. Resultado de análise química dos solos para o experimento: Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulínítico, hipoférrico (LVd) e, Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulínítico-oxídico (LVe).
Macronutrientes

Camada	pH*	M.O.	P(resina)	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
0-20 cm	CaCl₂	g dm⁻³	mg dm⁻³		-----mmol_c dm⁻³-----					%
LVef	5,6	20	45	3,0	35	13	22	51,0	73,0	70
LVd	5,3	12	17	1,4	14	7	18	22,4	40,4	55

Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo. E-mail: solos@fcav.unesp.br

Tabela 2 Resultado de análise química dos solos para o experimento: Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulínítico, hipoférrico (LVd) e, Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulínítico-oxídico (LVef).
Micronutrientes

Camada	B	Cu	Fe	Mn	Zn
0-20 cm	-----mg dm⁻³-----				
LVef	0,12	3,3	12,0	45,5	1,0
LVd	0,15	0,6	11,0	14,7	0,5

Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo. E-mail: solos@fcav.unesp.br

Tabela 3. Resultado de análise granulométrica dos solos para o experimento: Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulínítico, hipoférrico (LVd) e, Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulínítico-oxídico (LVef).

Camada	Argila	Limo	Areia fina	Areia grossa	Classe textural
0-20 cm	-----g Kg⁻¹-----				
LVef	540	270	120	70	Argilosa
LVd	300	30	290	380	Média

* Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo. E-mail: solos@fcav.unesp.br

A partir desses resultados, foi realizado o planejamento de adubação de acordo com as exigências nutricionais da cultura (RAIJ et al., 1997; FORNASIERI FILHO, 1992):

1. Calagem (MgCO_3 p.a): 0,48 t/h para o solo Lvd. Foi realizado o cálculo por vaso = 7g MgCO_3 /vaso.
2. Nitrogênio (uréia p.a): 18,18 g/vaso (aplicação parcelada)
3. Potássio (Sulfato de potássio p.a): 17,5 g/vaso (aplicação parcelada).
4. Fósforo (Superfosfato triplo): 82 g/vaso (aplicação única-semeadura).
5. Boro (ácido bórico p.a): 0,1029 g/vaso (aplicação única-semeadura).
6. Zinco (sulfato de zinco p.a): 0,2625 g/vaso (aplicação única-semeadura)
7. Molibdênio (Molibdato de amônio tetrahidratado p.a): 0,0065 g/vaso (aplicação única-semeadura).
8. Cobre (Sulfato de cobre pentahidratado p.a): 0,036 g/vaso (aplicação única-semeadura)

Quadro 1. Planejamento do manejo nutricional do Experimento

Macronutrientes (g/vaso/aplicação)				
Cronograma	N	P	K/S	Ca/Mg
Semeadura	2,27 g	82 g	2,19	7 g
A partir de 45 dias (Quinzenal)	2,27 g	-	2,19	-
Após 45 dias (Semanal)	2,27 g	-	2,19	-
Após 45 dias (Semanal, 1,5 x a dose)	3,40	-	3,29	-
Micronutrientes (g/vaso/aplicação)				
Cronograma	B	Zn	Mo	Cu
Semeadura	0,1029	0,2625	0,0065	0,036



Figura 5. Correção da acidez e a adubação, individualmente, dos vasos, de acordo com as exigências nutricionais da cultura. A terra foi seca a sombra e peneirada anteriormente.

Após a correção e adubação, os solos foram umedecidos e mantidos com umidade em torno de 60% da capacidade de campo por um período de 30 dias a fim de promover as reações de correção e a distribuição uniforme dos nutrientes. Após esse período, para comprovar o efeito das correções, realizou-se nova análise do solo (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4. Resultado de análise química dos solos para o experimento: Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulínítico, hipoférrico (LVd) e, Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulínítico-oxídico (LVef) após as correção e adubação mineral. Macronutrientes.

Camada 0-20 cm	pH* CaCl₂	M.O. g dm⁻³	P(resina) mg dm⁻³	K -----	Ca	Mg -----	H+Al mmol_c dm⁻³	SB -----	CTC -----	V %
LVef	5,7	21	300	4,1	63	22	28	89,1	117,1	76
LVd	5,6	11	260	3,6	46	28	25	77,6	102,6	76

Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo. E-mail: solos@fcav.unesp.br

Tabela 5. Resultado de análise química dos solos para experimento: Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulínítico, hipoférrico (LVd) e, Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulínítico-oxídico (LVef). após as correção e adubação mineral. Micronutrientes.

Camada 0-20 cm	B -----	Cu	Fe	Mn	Zn
	mg dm⁻³ -----				
LVef	0,54	4,6	10,0	37,8	2,1
LVd	0,50	2,6	9,0	22,4	2,1

* Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo. E-mail: solos@fcav.unesp.br

Tabela 6. Resultado de análise granulométrica dos solos para o experimento: Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, A moderado caulinitico, hipoférrico (LVd) e, Latossolo Vermelho distrófico, eutroférrico, típico, textura argilosa, A moderado, caulinitico-oxídico (LVef).

Camada	Argila	Limo	Areia fina	Areia grossa	Classe textural
0-20					
cm	-----g Kg⁻¹-----				
LVef	507	281	141	71	Argilosa
LVd	298	57	320	325	Média

* Análise realizada no Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Departamento de Solos e Adubos, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo. E-mail: solos@fcav.unesp.br

RESULTADOS PRELIMINARES-EXPERIMENTO PILOTO

Tabela 7. Análise de variância por meio do Teste F das respostas bioquímico-fisiológicas (*p value*) de híbridos de milho submetidos a diferentes disponibilidades hídricas no solo.

Causa da variação	G.L.	<i>p value</i> dos parâmetros bioquímico-fisiológicos												
		Fotost	C. Est	EFM	Alt.	A.I.E	Diam.	MST	Sac.	Tre.	Ac.Re d	Amido	AA	Pro
Híbridos (H)	1	0,81 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,01**	0,44 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,01**	0,18 ^{ns}
Disponibilidade hídrica no solo (DHS)	2	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,49 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,02*	0,01**	0,01**
Solo (S)	1	0,07 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,74 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,23 ^{ns}
Interação HxDHS	2	0,38 ^{ns}	0,02*	0,22 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,84 ^{ns}	0,01**	0,32 ^{ns}
Interação HxS	1	0,04*	0,37 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,82 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,01**	0,47 ^{ns}
Interação DHSxS	2	0,37 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,79 ^{ns}	0,01**	0,01**	0,11 ^{ns}	0,93 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,59 ^{ns}
Interação HxDHSxS	2	0,01**	0,12 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,01**	0,11 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,29 ^{ns}
(Tratamentos)	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resíduo	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	47													
C.V	-	18,22	19,03	16,85	18,6	21,83	14,06	19,23	13,71	10,33	18,07	18,07	17,06	24,44

**significativo ($p < 0,01$); *significativo ($p < 0,05$); ^{ns}não-significativo ($p > 0,05$).

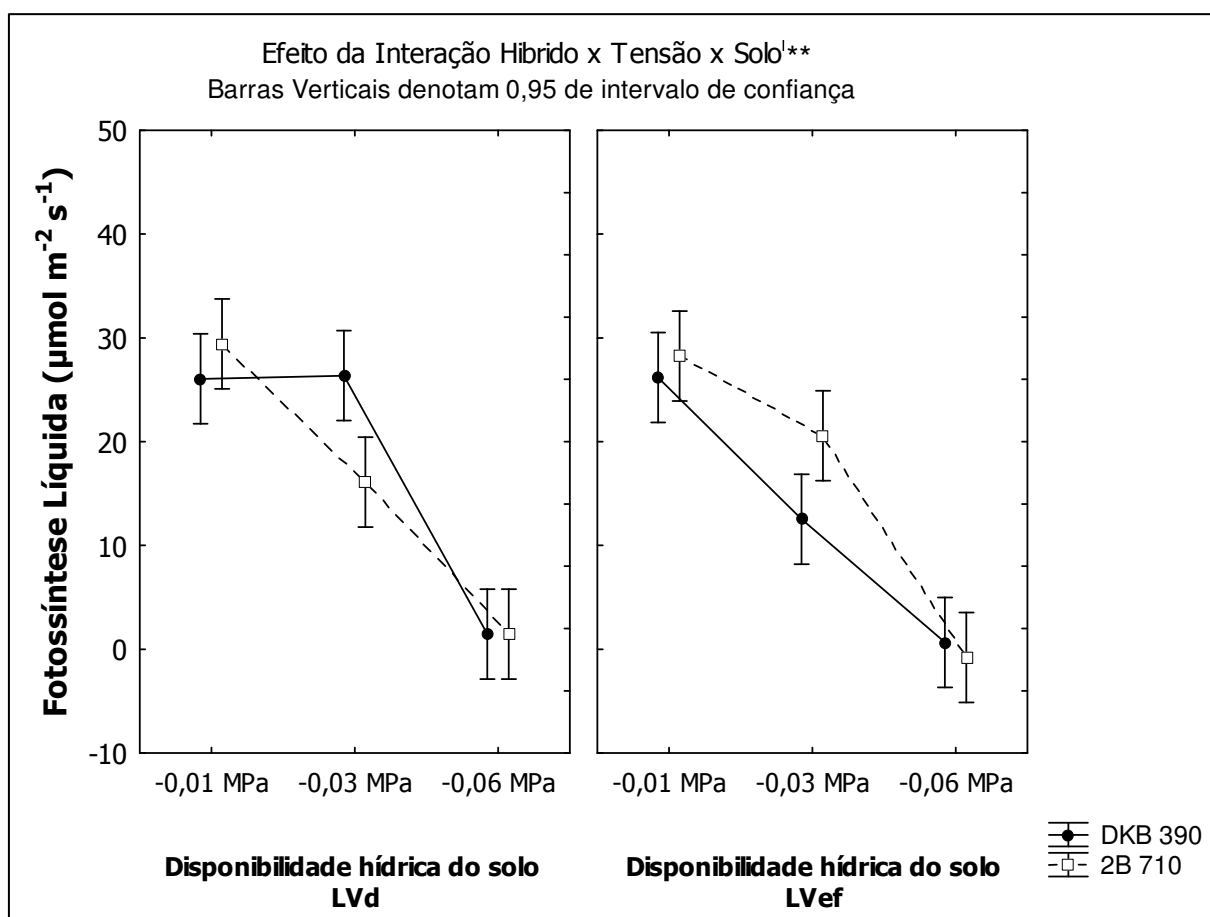


Figura 6. Fotossíntese líquida de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

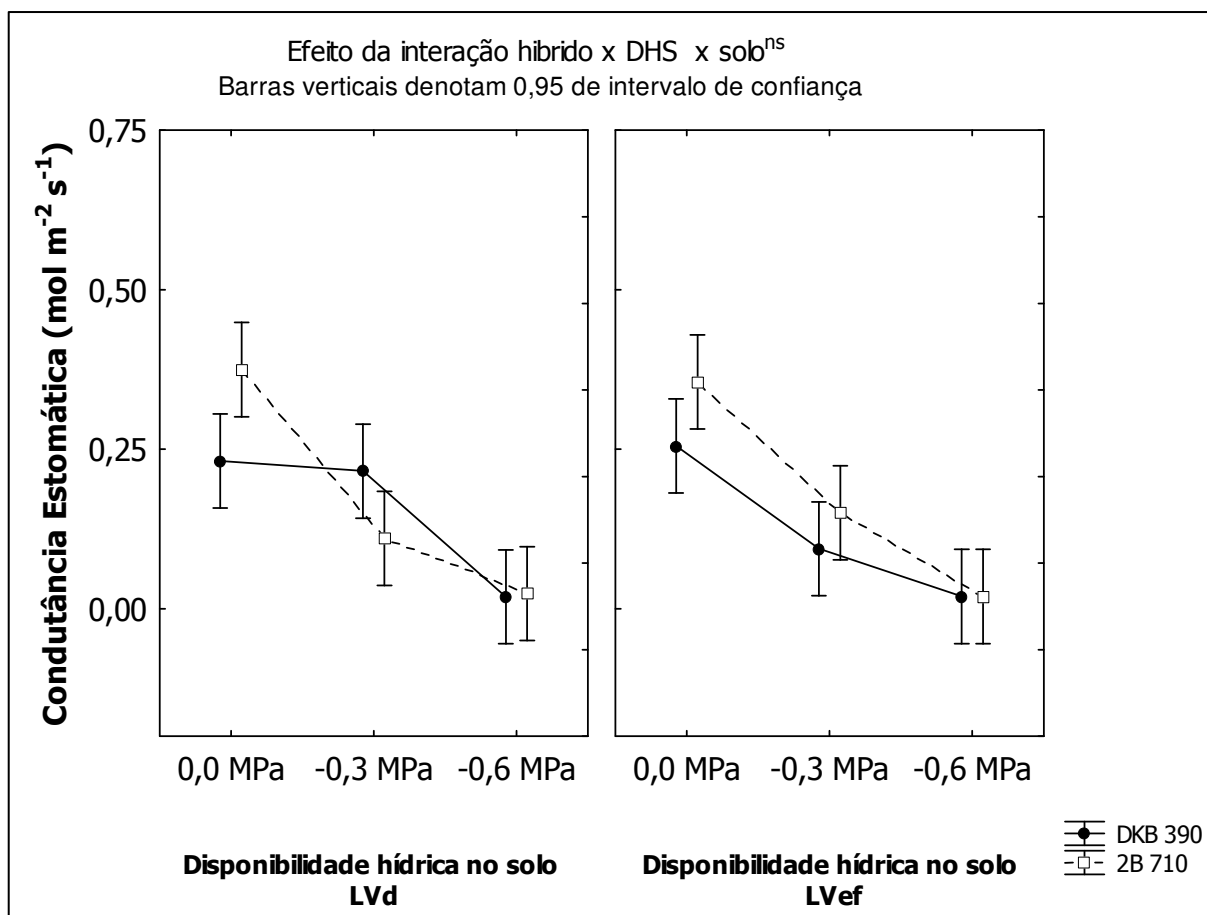


Figura 7. Condutância estomática de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

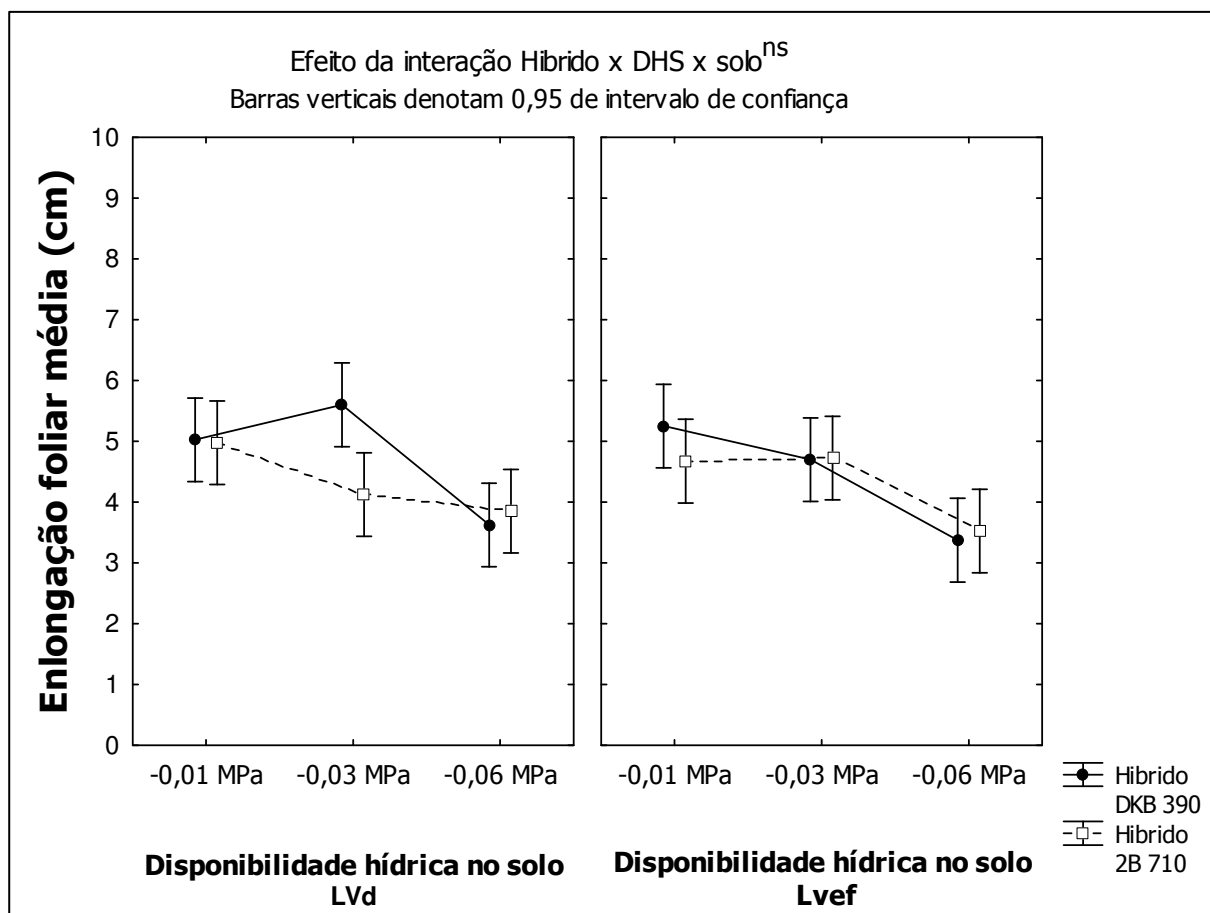


Figura 8. Elongação foliar de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

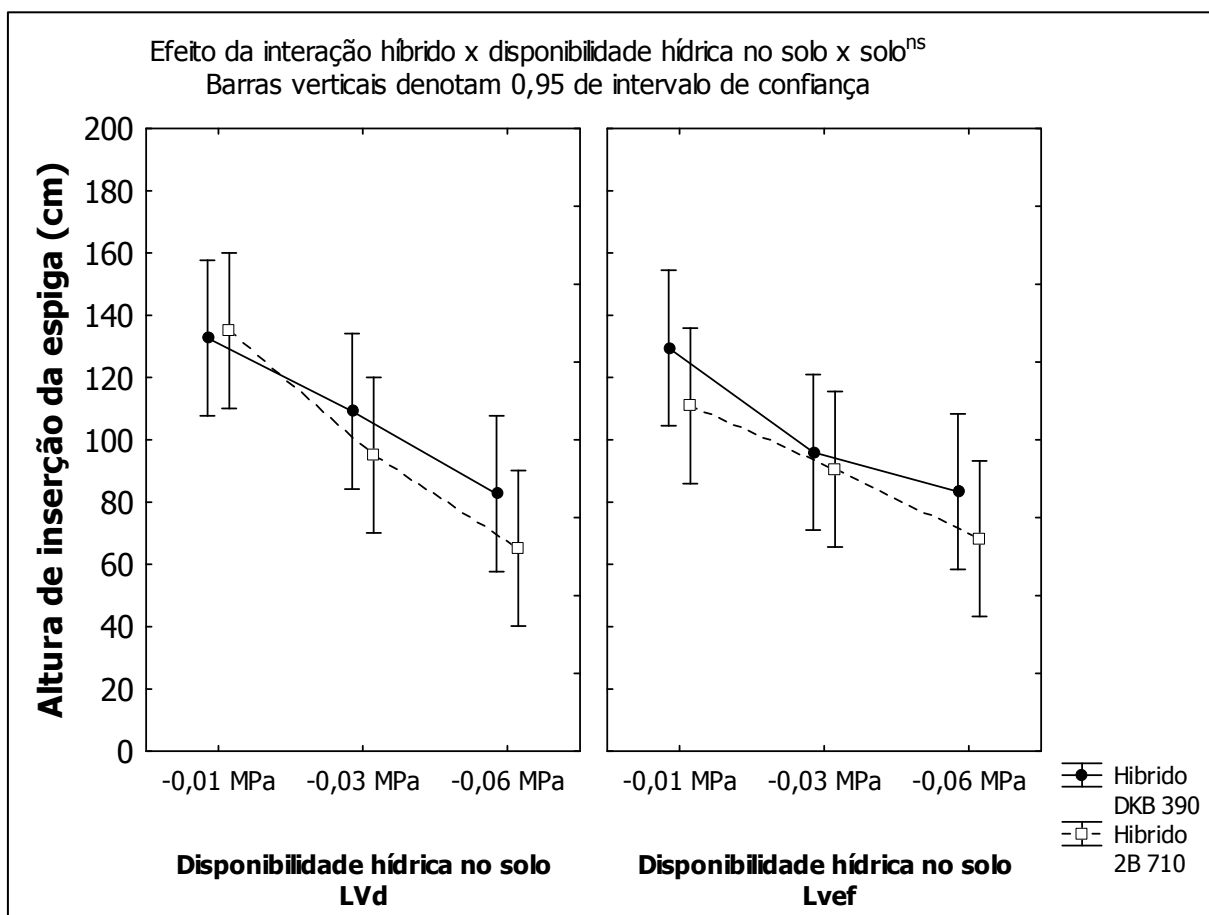


Figura 9. Altura de inserção de espiga de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

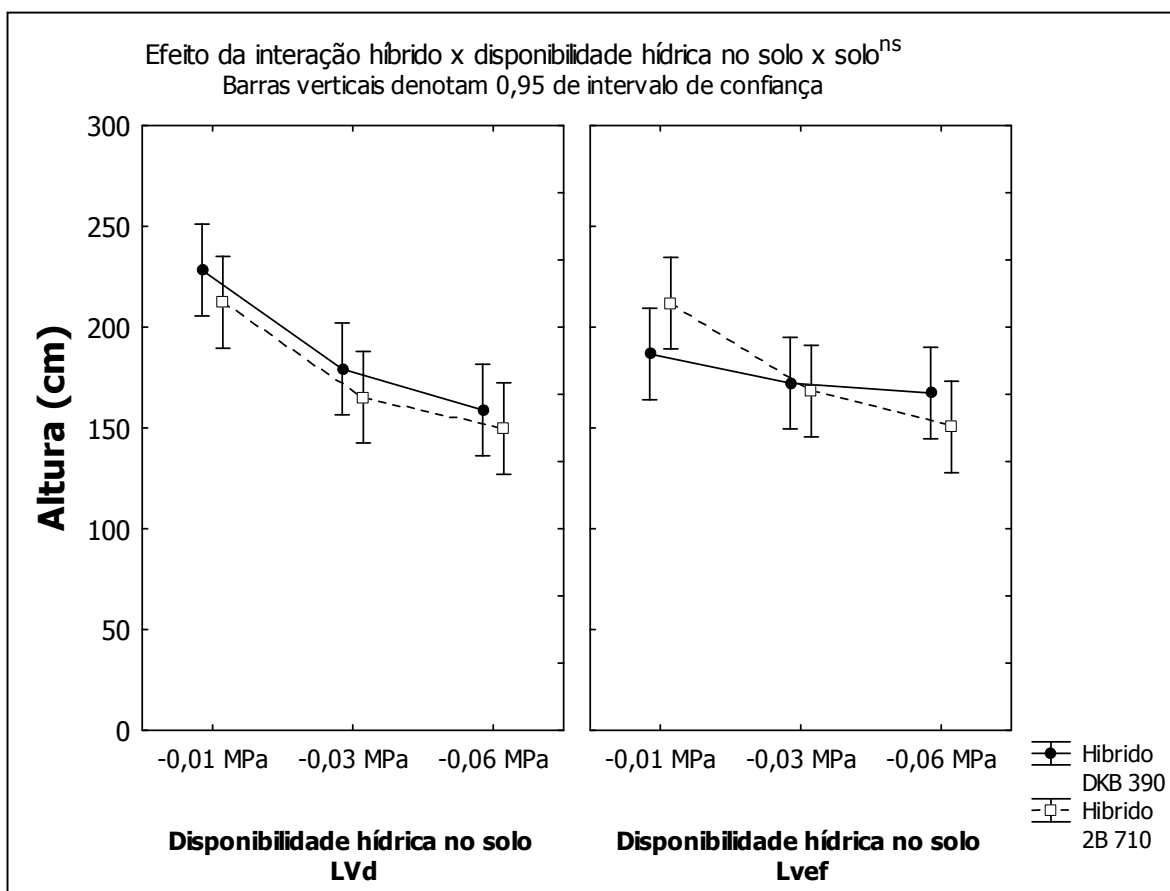


Figura 10. Altura da planta de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

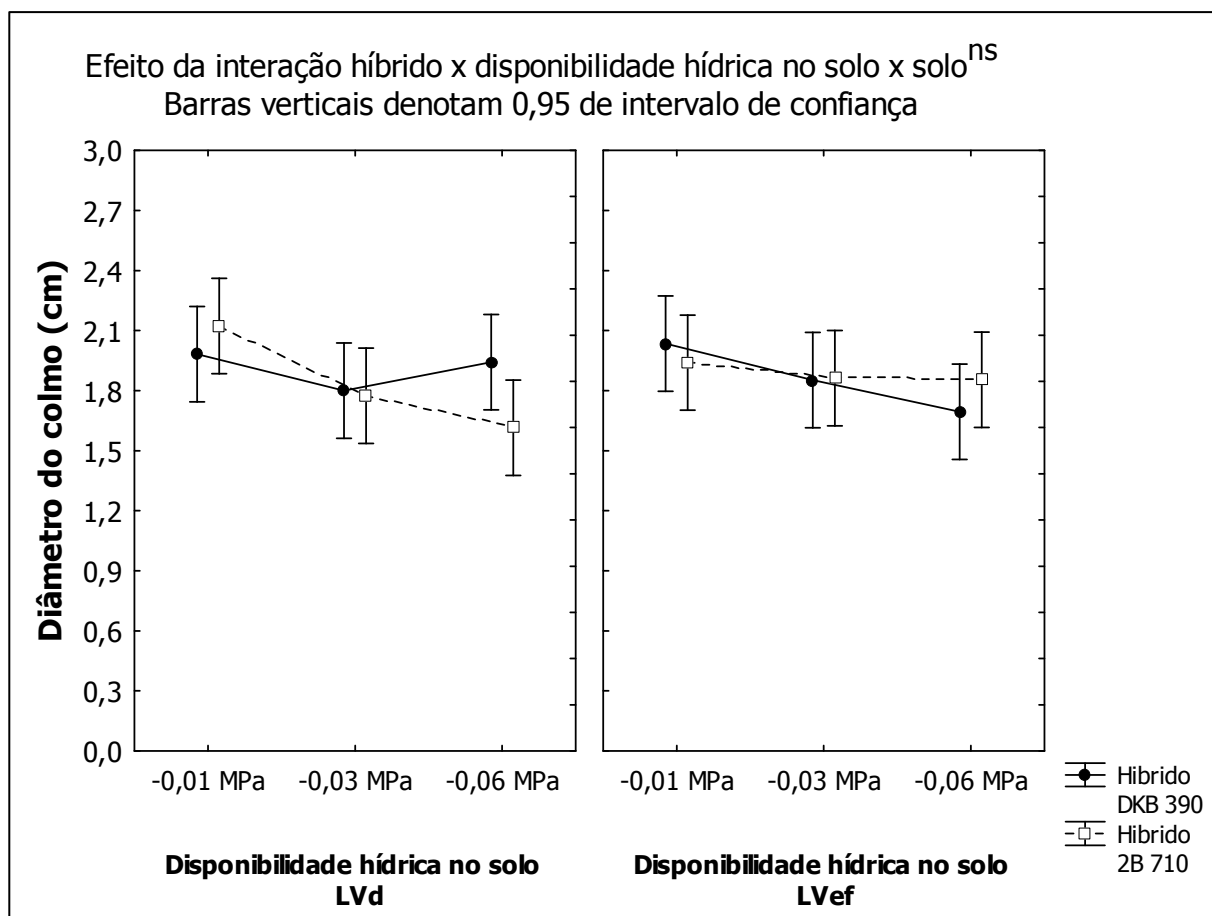


Figura 11. Diâmetro do colmo de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

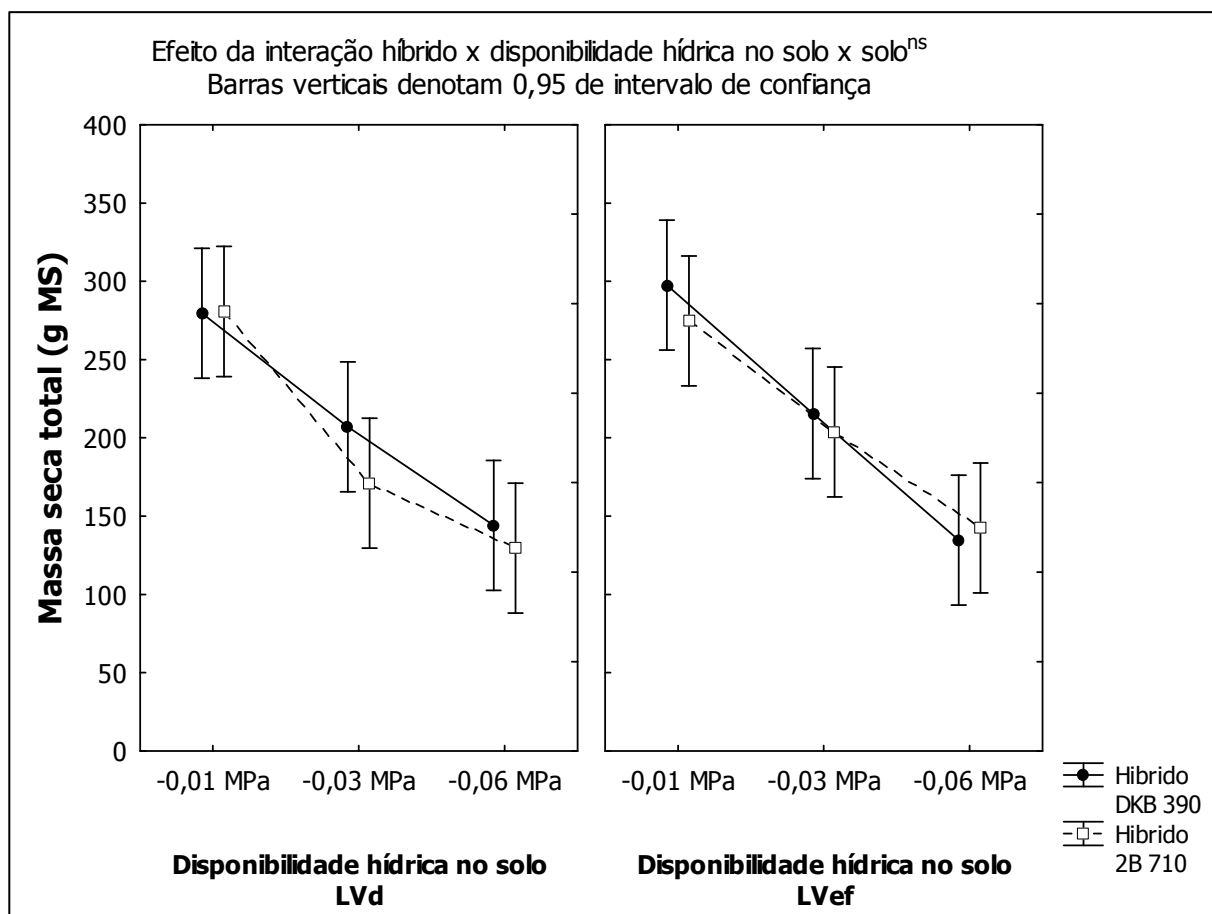


Figura 12. Massa seca total de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

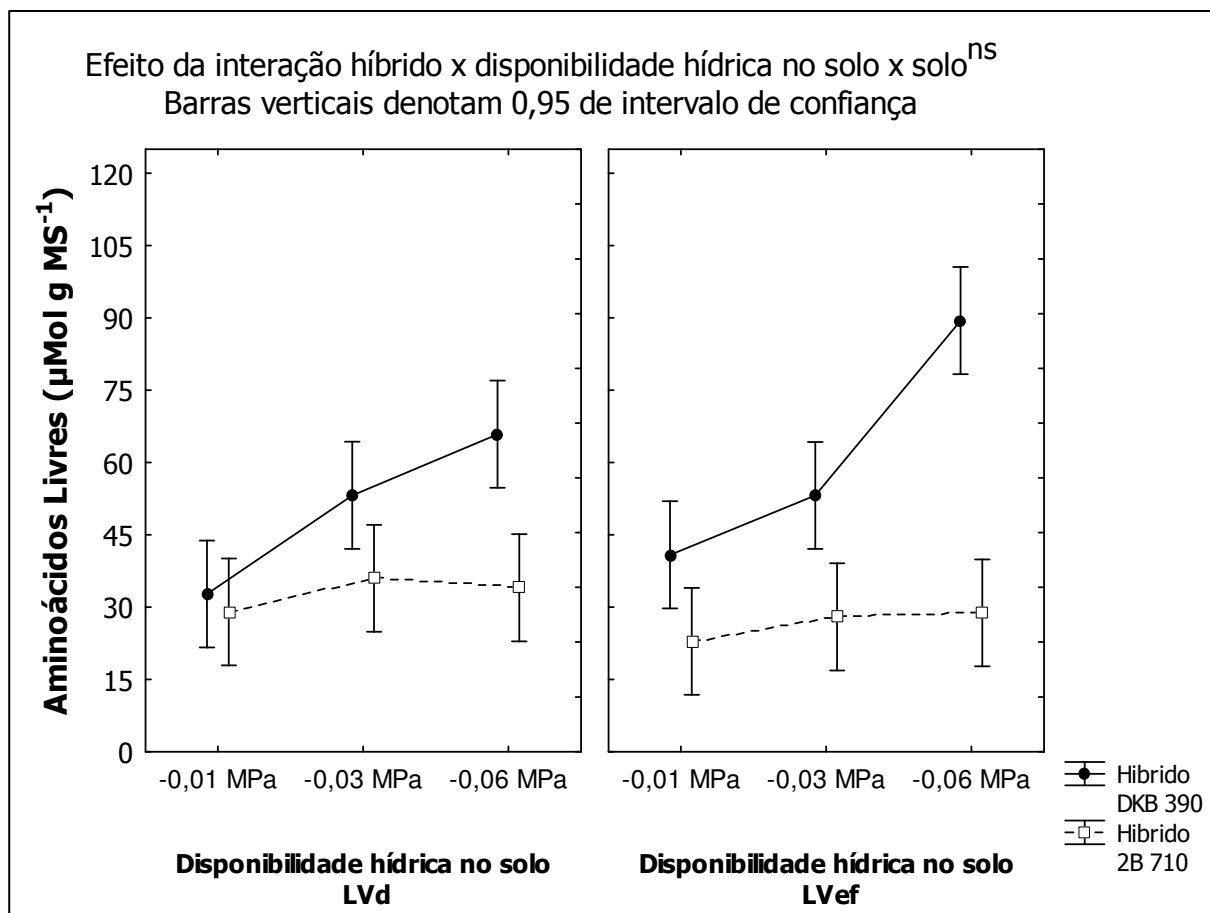


Figura 13. Teor de aminoácidos livres totais de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

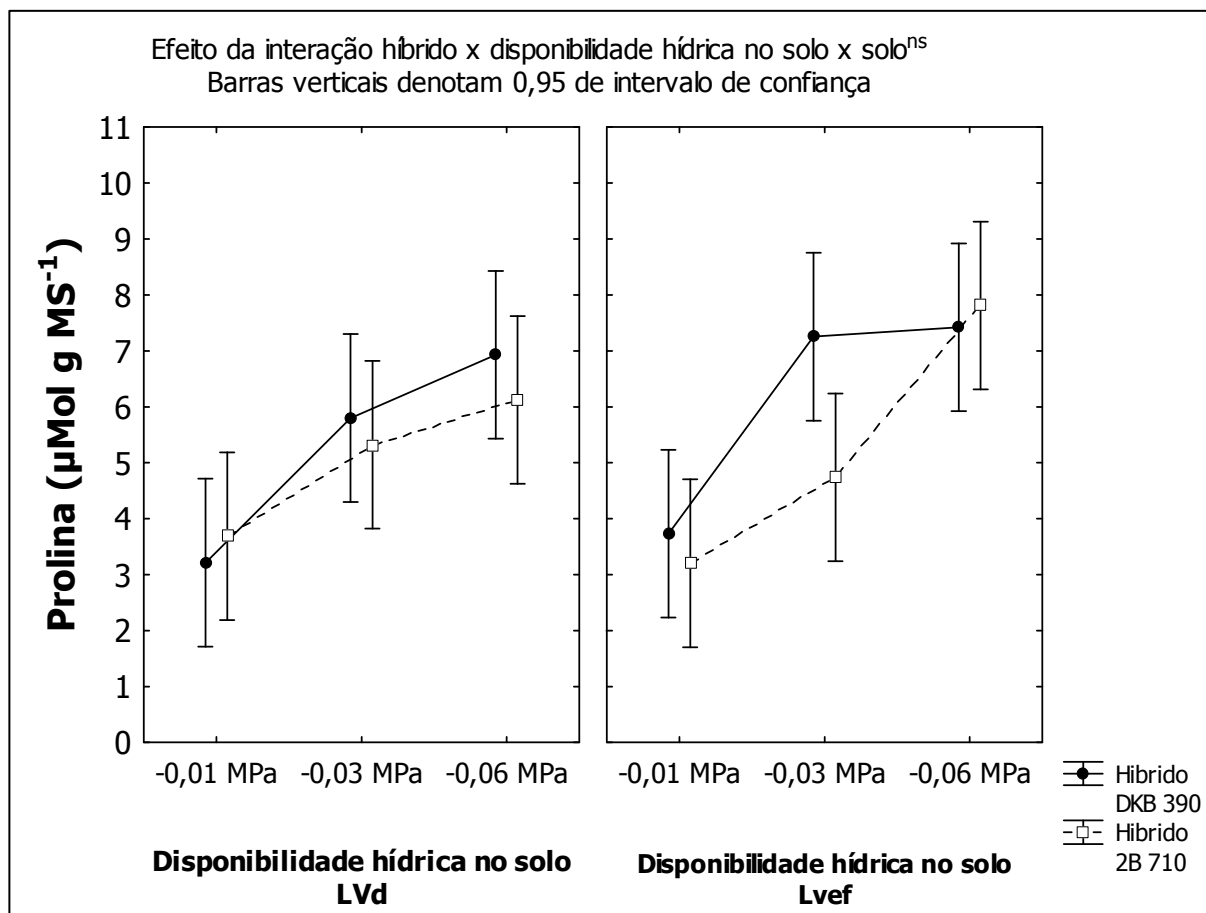


Figura 14. Teor de prolina de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

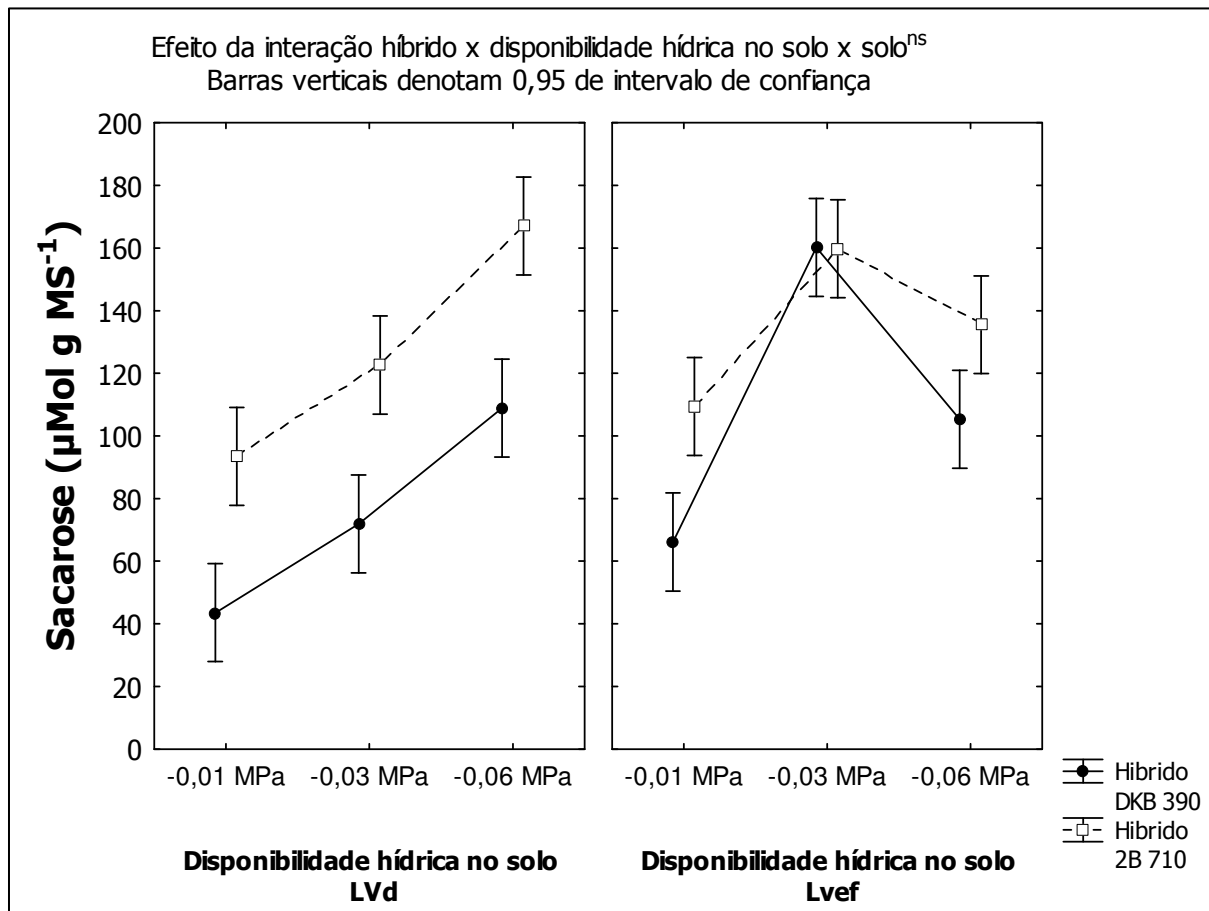


Figura 15. Teor de sacarose de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

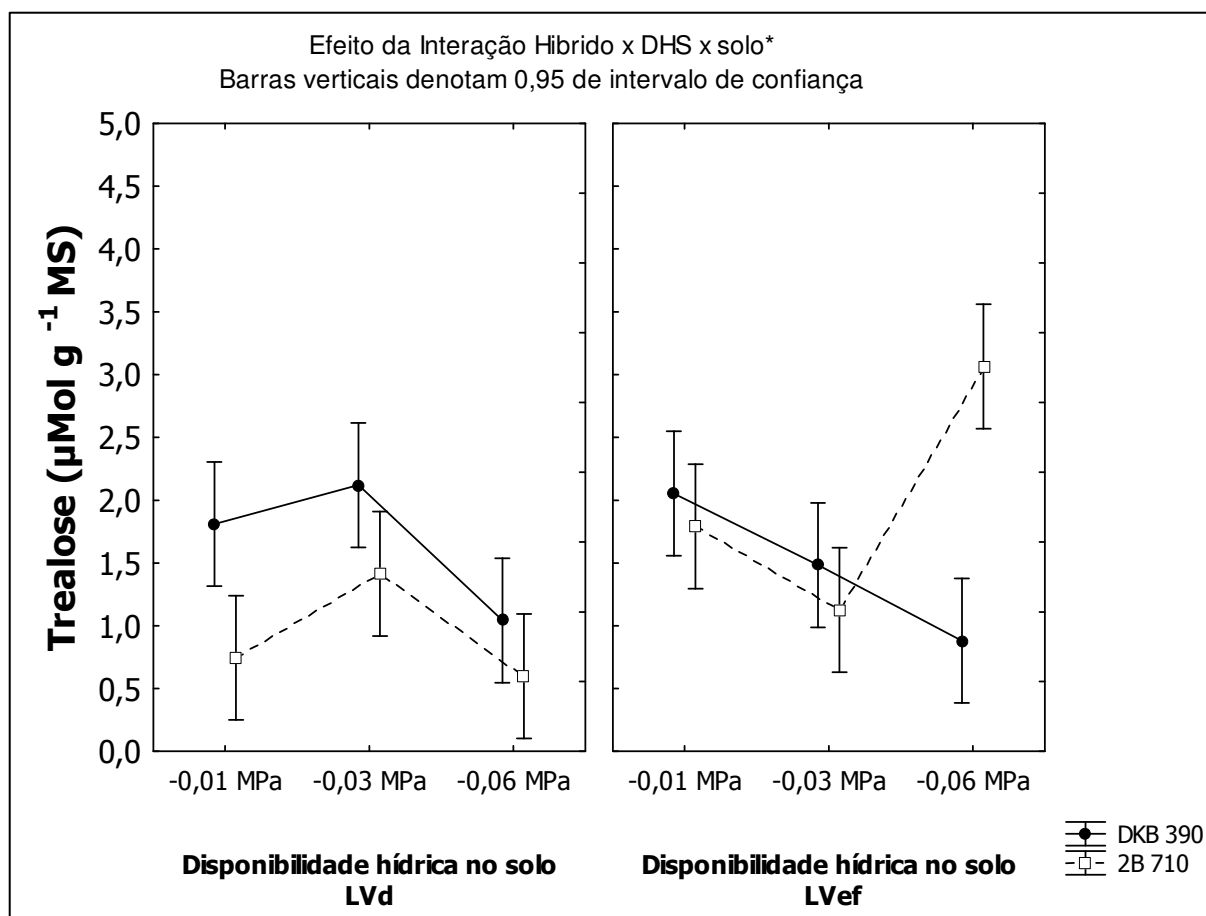


Figura 16. Teor de trealose de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

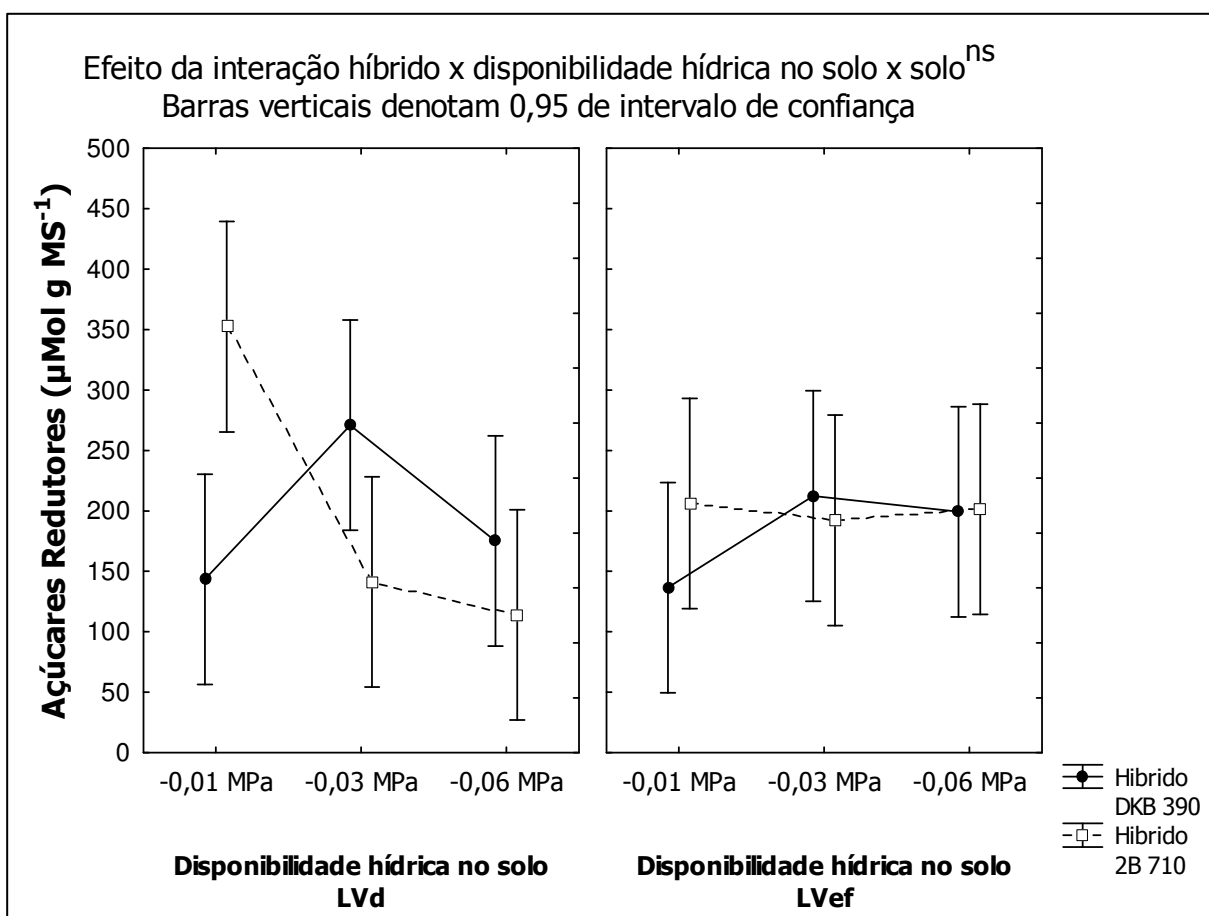


Figura 17. Teor de açúcares redutores de híbridos de milho em resposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

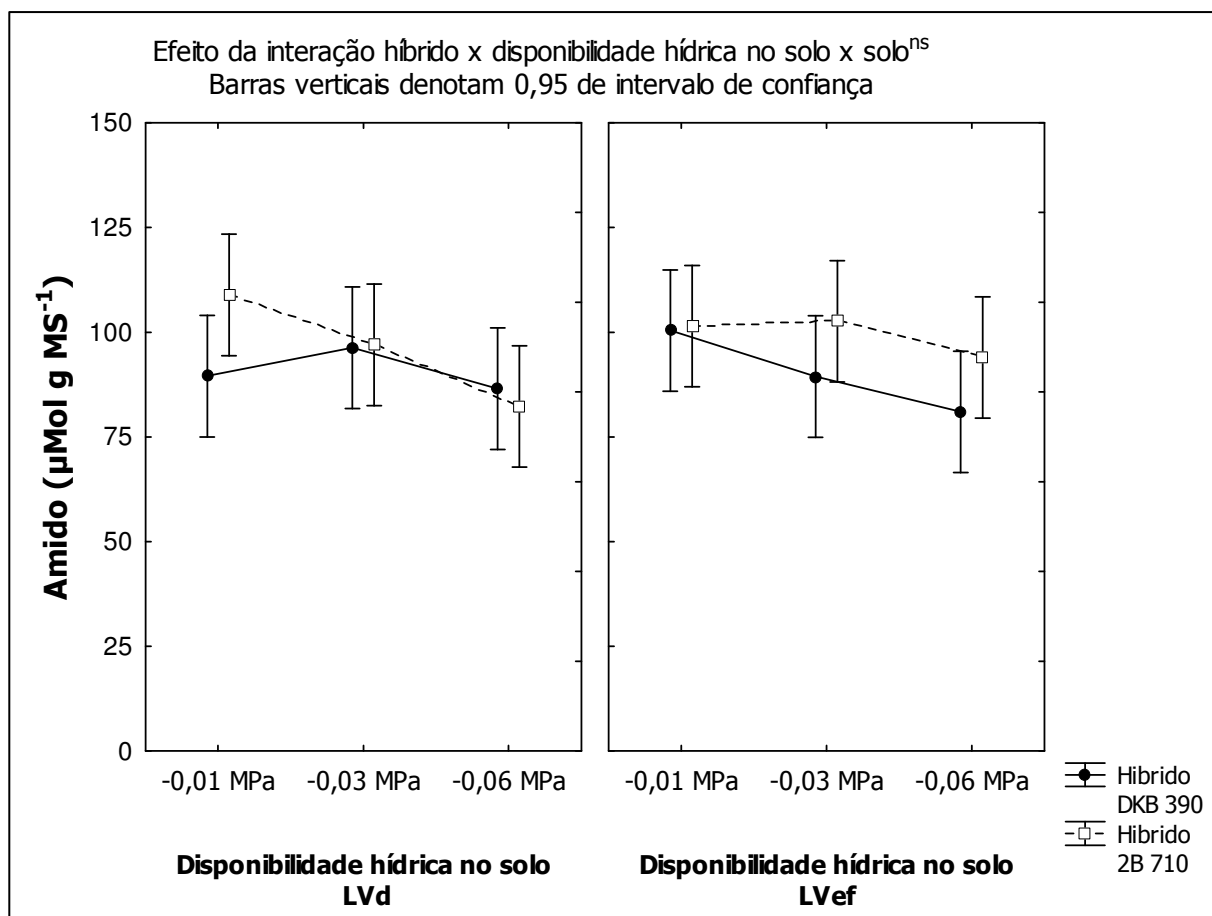


Figura 18. Teor de amido de híbridos de milho em reposta à limitação hídrica em diferentes tipos de solos.

Referências Bibliográficas

ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. p. 32.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273 p.

RAIJ, B. Van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas, Instituto Agrônômico & Fundação IAC (Boletim Técnico 100), 1997. p. 56-57.

van GENUCHTEN, M. T. A. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 44, p. 892-897, 1980.

A4. 1. DEMONSTRAÇÃO DO CÁLCULO PARA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR

Como os valores de quantidades relativas não seguem normalmente uma distribuição normal, foi necessária transformá-las numa escala logarítmica. Desse modo, os valores apresentaram uma distribuição normal, podendo assim efetuar-se a análise estatística. As expressões diferenciais (*fold differences*) foram obtidas com recurso ao logaritmo de base 2 (expressão 5)

$$FD = \log_2(Q_{\text{relativo}}) \quad (5)$$

Para esclarecer a origem da expressão 5 é oportuno apresentar a sua dedução. A quantidade do gene alvo normalizada em relação ao valor médio dos genes de referência e relativa à amostra de calibração (neste caso a amostra que apresentava o menor valor de expressão) e é dada pela expressão 6:

$$Q_{\text{relativo}} = 2^{CT_{\text{calibração}} - CT} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (6)$$

Esta expressão deriva do fato da reação de amplificação por PCR possuir um carácter exponencial, como se pode ver pela expressão 7.

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n \quad (7)$$

Em que

X_n é o número de moléculas de produto alvo no ciclo n

X_0 é o número inicial de moléculas de produto alvo

E_x é a eficiência de amplificação do gene alvo

N é o número de ciclos

O valor de C_T (*cycle threshold*) indica o número de ciclo em que a quantidade de produto amplificado atinge o *threshold* definido, ou seja, o sinal de fundo. Então, a expressão 7 transforma-se na expressão 8.

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,x}} = K_x \quad (8)$$

Em que,

X_T é o número de moléculas de produto do gene alvo no ciclo T

$C_{T,X}$ é o ciclo de amplificação do gene alvo

K_X é uma constante

A expressão para a referente à amplificação das moléculas do gene de referência é dada pela expressão 9:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (9)$$

Em que

R_T é o número de moléculas de produto do gene de referencia no ciclo T

R_0 é o número inicial de moléculas de produto do gene referência

E_R é a eficiência de amplificação do gene de referência

$C_{T,R}$ é o ciclo de amplificação do gene de referência

K_R é uma constante

Dividindo X_T por R_T obtém-se a expressão 10

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K \quad (10)$$

Assumindo que as eficiências do gene alvo e dos genes de referência são iguais, expressão 11:

$$E_x = E_R = E \quad (11)$$

Obtém-se a expressão 12 ou 13

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (12)$$

$$X_N \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (13)$$

Em que,

X_N é X_0/R_0 , a quantidade normalizada do gene alvo

Rearranjando a expressão 13 obtém-se a expressão 14

$$X_N = K \times (1 + E)^{C_{T,R} - C_{T,x}} \quad (14)$$

O último passo é a divisão de X_N de qualquer amostra q pelo X_N da amostra de calibração (cb), expressão 15:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{C_{T,R} - C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{C_{T,R} - C_{T,cb}}} = (1 + E)^{C_{T,R} - C_{T,q} - C_{T,R} + C_{T,cb}} = (1 + E)^{C_{T,cb} - C_{T,q}} \quad (15)$$

Esta amostra de calibração serve exatamente para o cálculo da expressão para cada gene relativa à amostra em que o gene apresenta o maior ou menor valor de expressão normalizada (dentro dos valores do mesmo gene). Para este caso fez-se em relação ao valor mínimo de expressão. Uma vez que o programa GenEx corrige os valores de eficiência para 100%, tendo em conta os valores reais de eficiências (expressão 7), a quantidade relativa de um fragmento de amplificação alvo, normalizada com os dois genes de referência e relativa a uma quantidade da amostra de calibração, é dada pela expressão 16:

$$Q_{\text{relativo}} = 2^{CT_{\text{calibração}} - CT_{\text{genealvo_normalizado}}} \quad (16)$$

A4. 2. QUALIDADE DO RNA DAS AMOSTRAS

Tabela 1. Resultados das avaliações espectrofotométricas de RNA total preparadas para análise de qRT-PCR.

Amostras de RNA	Abs₂₆₀	Abs₂₈₀	260/280	260/230	Concentração (ng/μL)
5	6,510	3,249	2,00	1,54	260,42
14	8,198	4,063	2,02	1,80	327,91
11	7,982	4,049	1,97	1,68	319,28
18	7,583	3,760	2,02	1,86	303,31
19	5,664	2,789	2,03	1,67	226,57
20	7,118	3,578	1,99	1,70	284,72
25	6,923	3,433	2,02	1,64	276,94
32	5,942	2,985	1,99	1,74	237,67
35	7,142	3,539	2,02	1,55	285,68
27	7,609	3,754	2,03	1,81	304,34
38	7,634	3,796	2,01	1,54	305,35
39	5,731	2,867	2,00	1,43	229,25

A4.3. ESPECIFICIDADE DOS GENES DE REFERÊNCIA: CURVAS DE DISSOCIAÇÃO

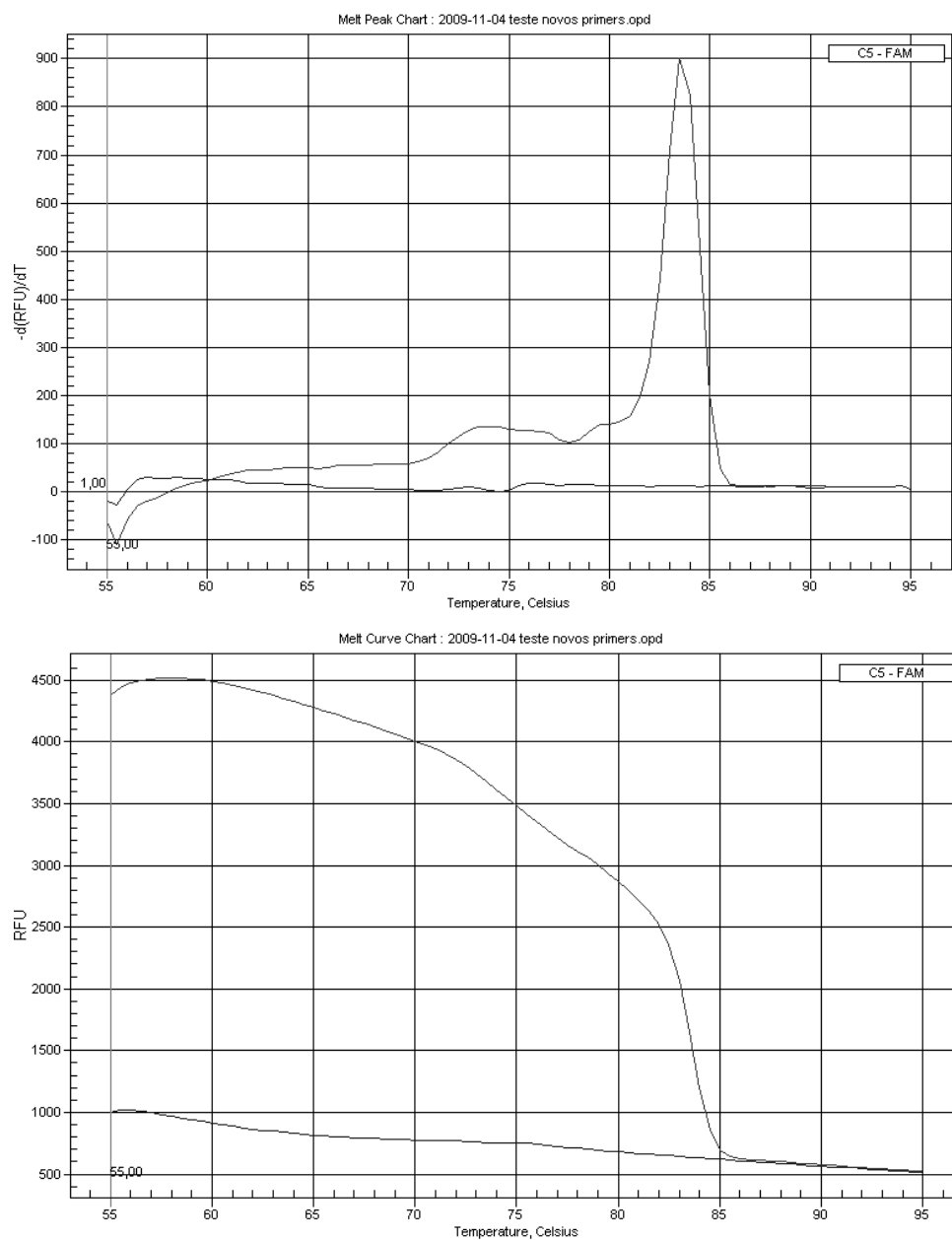


Figura 1. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação gen ACT2. Presença de pico único para o pool de cDNA das réplicas biológicas de Milho e ausência de pico no controle sem cDNA (No template control).

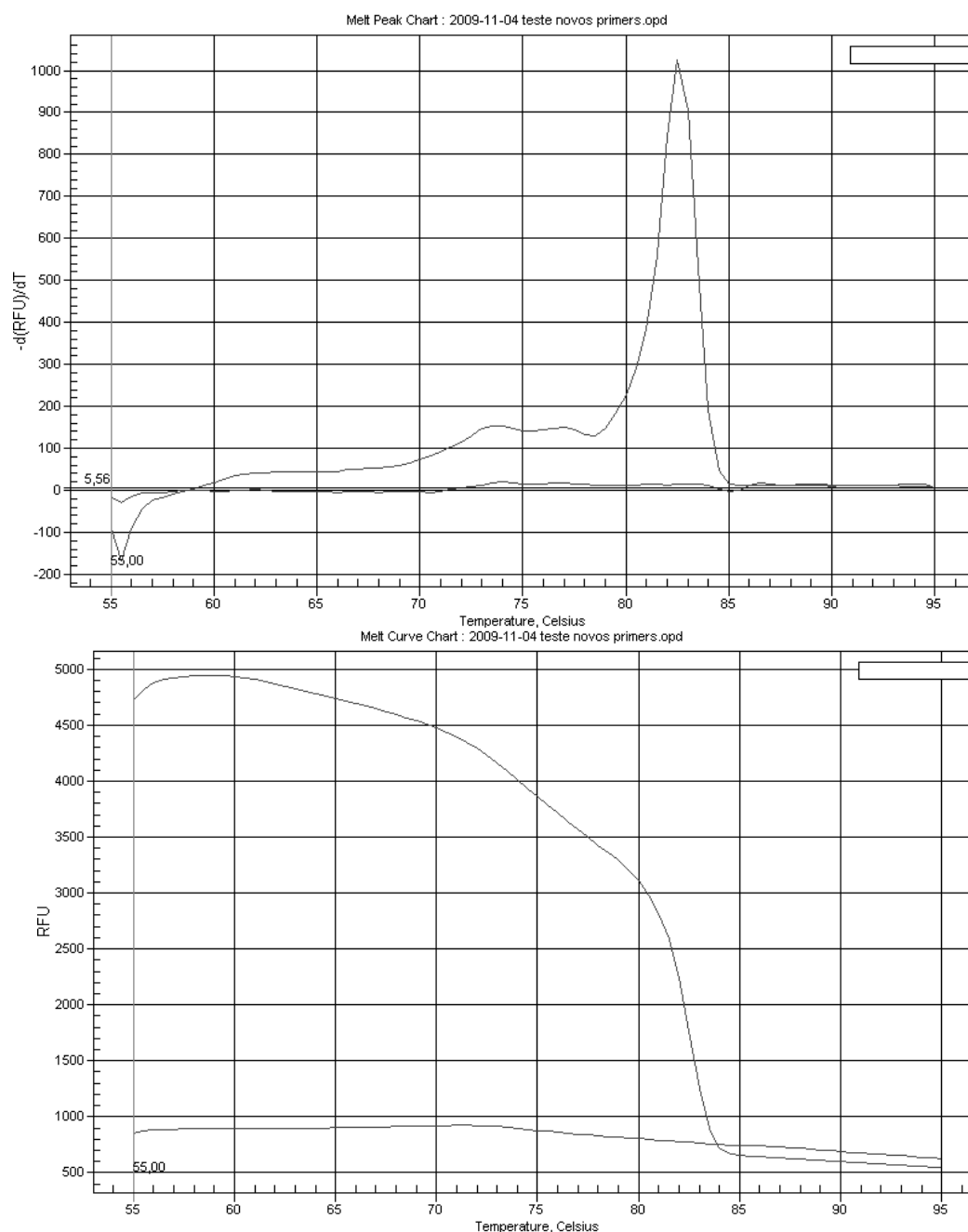


Figura 2. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação gen *Eef-1a*. Presença de pico único para o pool de cDNA das réplicas biológicas de Milho e ausência de pico no controle sem cDNA (No template control).

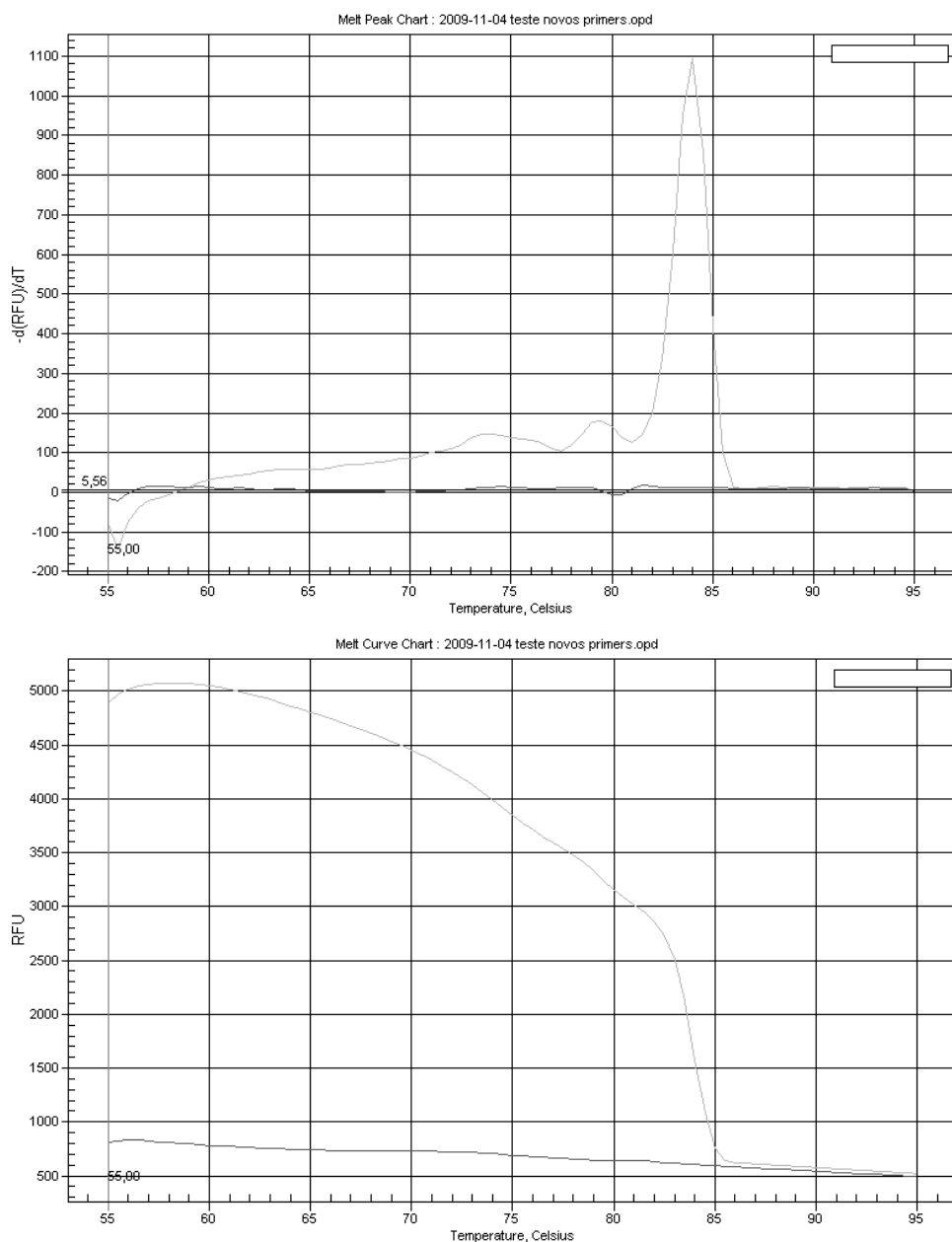


Figura 3. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação gen eIF-4α. Presença de pico único para o pool de cDNA das réplicas biológicas de Milho e ausência de pico no controle sem cDNA (No template control).

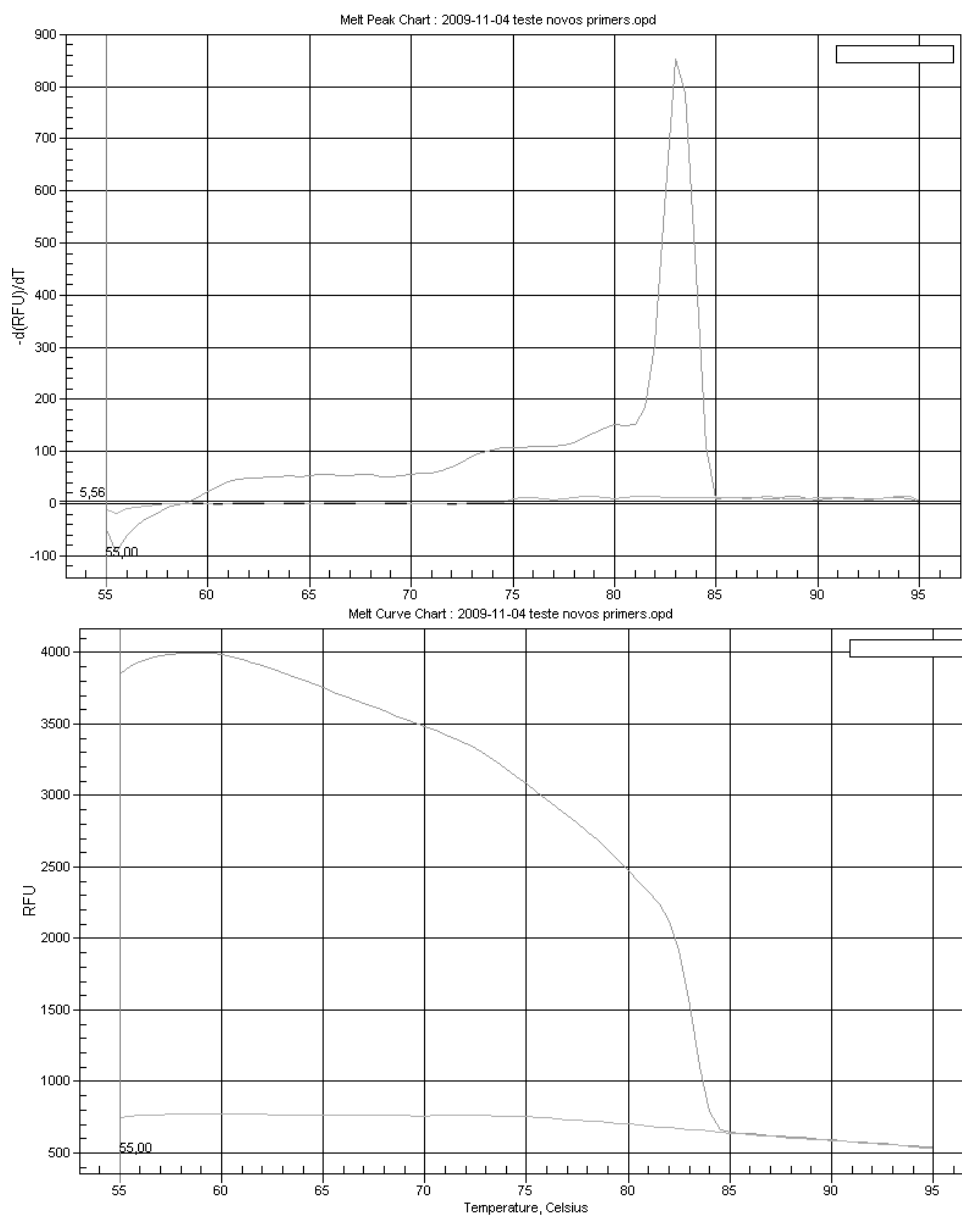


Figura 4. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação gen GADPH. Presença de pico único para o pool de cDNA das réplicas biológicas de Milho e ausência de pico no controle sem cDNA (No template control).

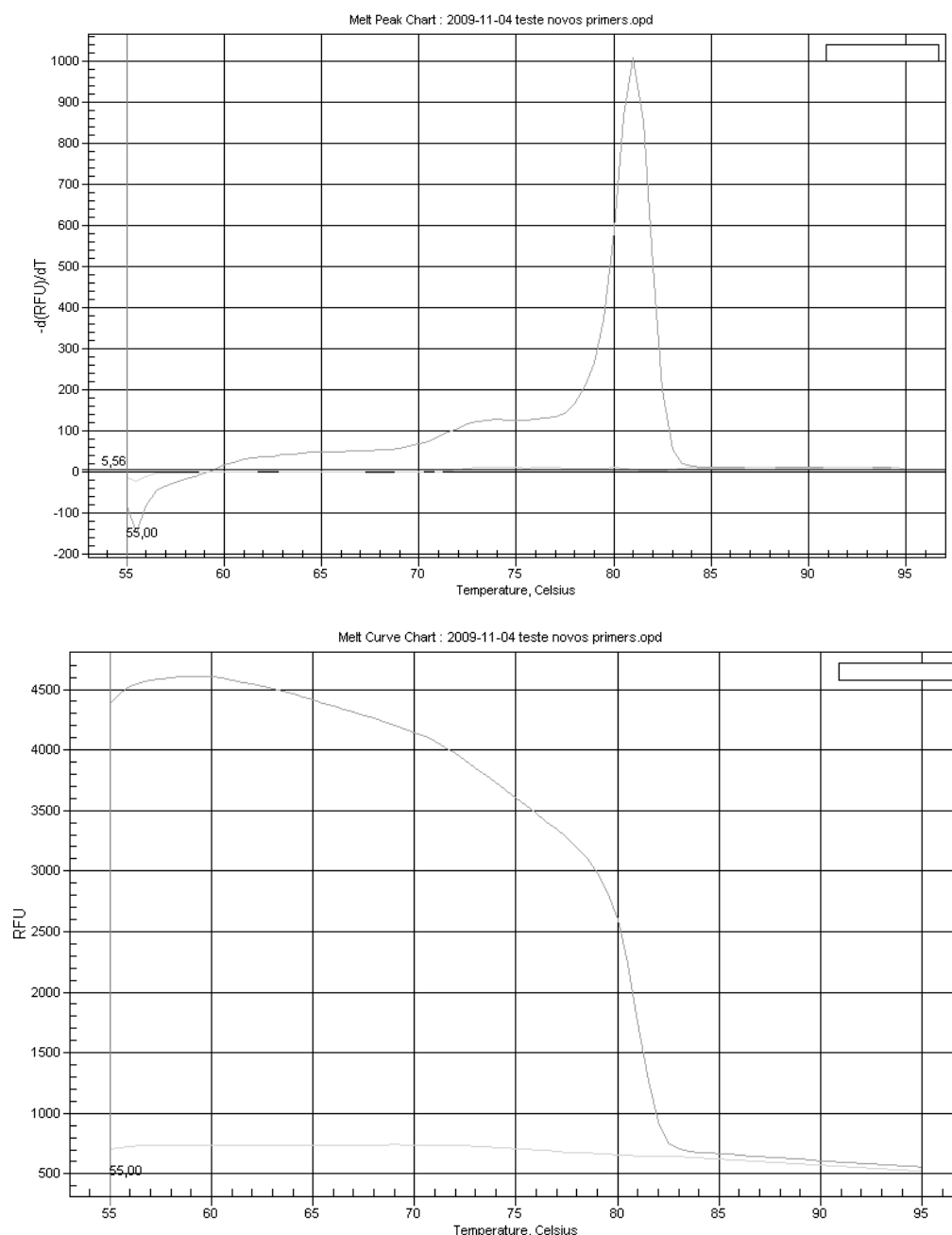


Figura 5. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação gen UBC. Presença de pico único para o pool de cDNA das réplicas biológicas de Milho e ausência de pico no controle sem cDNA (No template control).

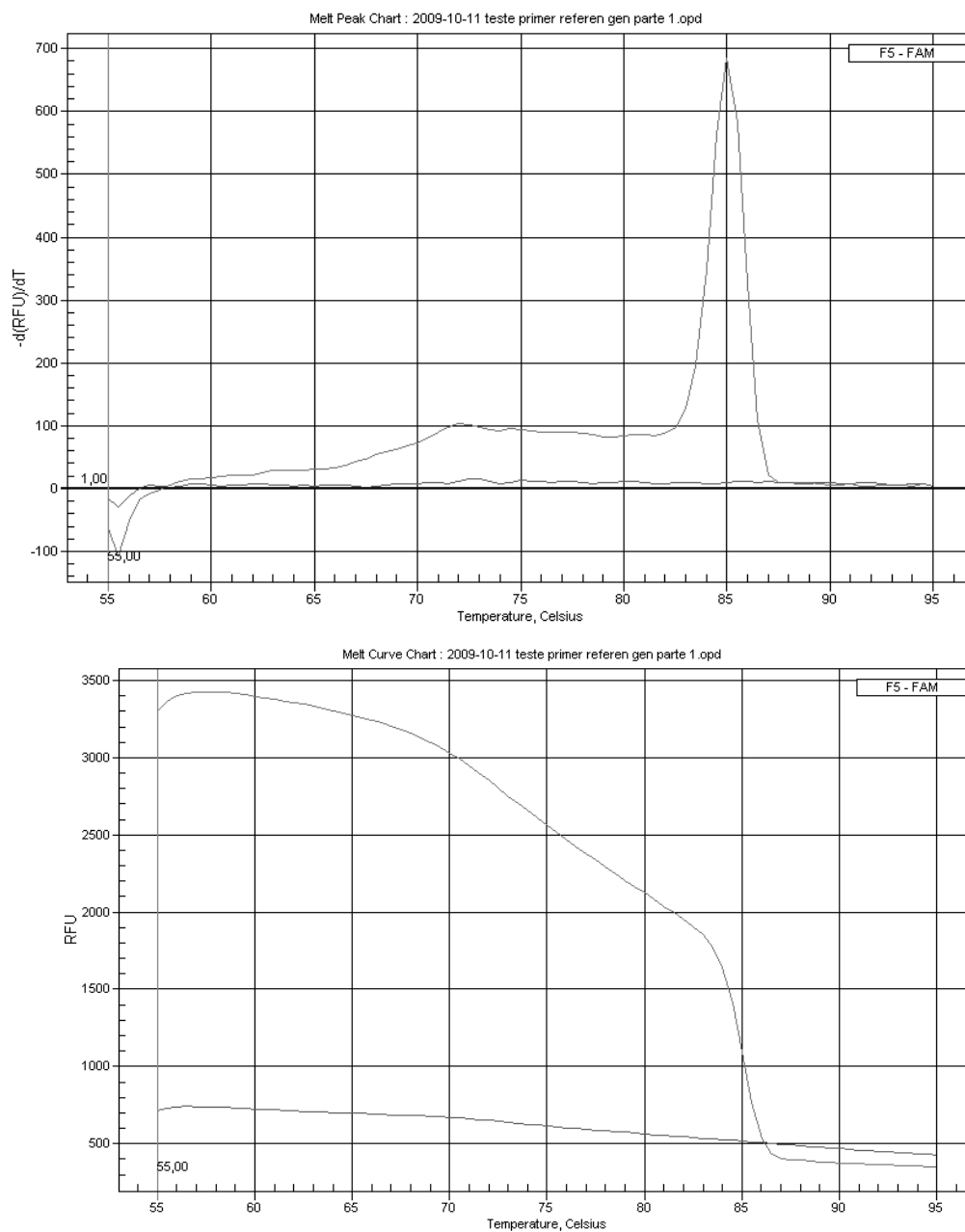


Figura 6. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação gen ClatAd. Presença de pico único para o pool de cDNA das réplicas biológicas de Milho e ausência de pico no controle sem cDNA (No template control).

A4.4. EFICIÊNCIA DOS GENES

Tabela 2. Valores Eficiência dos genes de referência.

GENE DE REFERÊNCIA			
Gene	No Gene/primer	Eficiência %	Eficiência
ACT2	1.2	98,9	0,988
Eef-1 α	4.2	92,3	0,923
eIF-4α	5.1	105,1	1,051
GADPH	6.1	94,9	0,949
UBC	7.1	90,0	0,900
ClatAd	10.1	100,3	1,003

Tabela 3. Valores Eficiência dos genes-alvo do metabolismo de solutos compatíveis.

GENE DE INTERESSE			
Gene	No Gene/primer	Eficiência %	Eficiência
ADP-Glu	11.2	100,3	1,003
UDP-Glu	12.2	92,9	0,920
S6PS	13.2	92,8	0,928
SUSY	14.2	89,2	0,892
T6PS	15.2	106,2	1,062
TPP	16.1	110,4	1,104
TRE	17.2	93,0	0,930
OAT	18.2	103,3	1,033
P5CR	19.2	119,8	1,198
P5CS	20.2	107,6	1,076
PrOX	21.1	87,6	0,876
GtSy	24.2	105,3	1,053
NtR	25.1	96,9	0,969