METILAÇÃO DO DNA NAS FASES DA GERMINAÇÃO DO MILHO DURANTE O ESTRESSE SALINO

Ingrid Belchior dos Santos Silva, Maria Augusta Andrade, João de Paula Monteiro de Castro, Maria Clara Pereira Amorim, Isabella Sobreira Alexandre Assis, Marcia Flores da Silva Ferreira, Liana Hilda Golin Mengarda

[1]Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário, s/n, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, ingrid.b.silva@edu.ufes.br, maria.andrade.39@edu.ufes.br , joao.m.castro@edu.ufes.br, maria.c.amorim@edu.ufes.br, isabellasobreira_a_assis@hotmail.com, marcia.ferreira@ufes.br, liana.mengarda@ufes.br

Resumo

Objetivou-se estudar o perfil global de metilação do DNA durante a germinação de sementes de milho sob estresse salino. Durante o teste de germinação em água e em solução salina (-1,2 MPa de NaCl), foram coletadas amostras das sementes que foram dissecadas em embrião e endosperma, e a metilação do DNA foi estimada por HPLC. Houve redução significativa no vigor das sementes sob estresse salino, com menor porcentagem e velocidade de germinação. O tecido de embrião apresentou maior porcentagem de 5-metilcitosina (5-mC) que do endosperma, indicando maior metilação do DNA; sob estresse salino houve maior metilação global do DNA nas fases iniciais da germinação, sugerindo redução na ativação de genes. Na pós-germinação, as diferenças entre tratamentos tornaram-se não significativas. Conclui-se que o estresse salino induz alterações dinâmicas na metilação do DNA, com maior metilação sob salinidade durante as fases iniciais da germinação do milho e nos tecidos do embrião, evidenciando modulação epigenética da tolerância ao estresse.

Palavras-chave: Epigenética, estresse salino, metilação global, milho.

Área do Conhecimento: 5.01.03.06-7 Fisiologia de Plantas Cultivadas

Introdução

A salinização dos solos representa um dos maiores desafios da agricultura contemporânea, afetando aproximadamente 20% das áreas irrigadas do planeta, com projeções de crescimento nos próximos anos (Shahid et al., 2018). O estresse salino impõe um duplo impacto sobre as plantas: por um lado, causa estresse osmótico, dificultando a absorção de água; por outro, provoca estresse iônico, decorrente do acúmulo tóxico de íons como sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), os quais afetam o balanço nutricional e desencadeiam disfunções metabólicas severas (Munns, 2002; Deuner et al., 2011). A salinidade também afeta negativamente a germinação e o estabelecimento inicial de espécies cultivadas como o milho. A fase de germinação das sementes e o estabelecimento inicial das plântulas são particularmente sensíveis à salinidade, resultando em atrasos na emergência, redução do estande inicial e plântulas com vigor comprometido (Carvalho & Nakagawa, 2012). Acredita-se que as fases iniciais da germinação sejam cruciais para ajustes metabólicos que possibilitam a tolerância às condições de salinidade.

Nos últimos anos, a atenção da pesquisa em fisiologia vegetal tem se voltado não apenas para os mecanismos genéticos clássicos, mas também para os processos epigenéticos que modulam a resposta das plantas ao ambiente. Entre os mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é um dos mais estudados e consiste na adição de um grupo metil à citosina, originando a 5-metilcitosina (5-mC). Essa modificação não altera a sequência de nucleotídeos, mas regula a expressão gênica, influenciando processos como silenciamento de transposons, estabilidade genômica e ativação de vias metabólicas relacionadas à adaptação ao estresse (Xu et al., 2018; Richards et al., 2017). Durante a germinação de sementes, a dinâmica da metilação do DNA ainda é pouco

estudada; acredita-se que alterações epigenéticas estejam relacionadas com a ativação de vias de tolerância ao estresse, influenciando a germinação, o vigor e a sobrevivência das plântulas.

Evidências recentes mostram que a salinidade pode induzir alterações dinâmicas no perfil de metilação, configurando uma espécie de "memória epigenética" que prepara a planta para condições adversas subsequentes (Louis et al., 2023; Akhter et al., 2021). Acredita-se que a metilação do DNA atua como um mecanismo regulador central na interface entre o estresse abiótico e o desenvolvimento inicial das plântulas. Contudo, ainda são escassos os estudos que avaliam simultaneamente os diferentes tecidos da semente (eixo embrionário e tecidos de reserva) ao longo das fases da germinação sob estresse salino. Assim, objetivou-se caracterizar o perfil global da metilação do DNA nas diferentes fases da germinação durante o estresse salino em milho (*Zea mays*), por meio da quantificação de 5-metilcitosina (5-mC).

Metodologia

As análises foram realizadas no Laboratório 2 do NEBES, nos Laboratórios do Departamento de Agronomia e da Pós-graduação em Genética e Melhoramento, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, na cidade de Alegre-ES. Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays*) cv. Imperador, fornecidas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural (INCAPER), cultivadas na Fazenda Experimental de Viana, situada em Viana, Espírito Santo, sendo disponibilizadas em fevereiro de 2024.

As sementes foram submetidas ao teste de germinação em água e em solução salina de NaCl no potencial de -1,2 MPa. Foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes; as sementes foram dispostas em rolos de papel embebidos em água e/ou solução salina, acondicionados em câmaras tipo BOD a 25ºC por 7 dias. Concomitantemente, foram montados rolos contendo sementes para as coletas de amostras nas diferentes fases de germinação: pré-germinação, fase 1, fase 2 e pós-germinação. No tempo inicial, após 2 e 7 horas da montagem dos rolos, e após 2 dias e 7 dias, foram coletadas amostras de tecido vegetal, imediatamente congeladas em N líquido, e armazenadas em freezer; em seguida as amostras foram liofilizadas (desidratação por sublimação) utilizando nitrogênio líquido para garantir a integridade estrutural e a estabilidade dos compostos presentes nos tecidos vegetais, permitindo análises posteriores com mínima degradação.

Após a desidratação, o material foi dissecado para separação do eixo embrionário do endosperma, identificado, pesado e armazenado em sílica para as análises moleculares. Em seguida, foi moído em almofariz com nitrogênio líquido para obter um pó fino para a extração do DNA. Como as porções, especialmente do eixo embrionário da semente intacta e nas fases iniciais da germinação, representam pouco material biológico, cada amostra foi composta por um "bulk" de 20 indivíduos homogeneizados, a fim de representar cada tratamento (cada fase da germinação, com ou sem estresse).

A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), com modificações para o milho. Inicialmente, cerca de 100 mg de tecido fresco foram macerados em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se o tampão de extração contendo NaCl, Tris-HCl, EDTA, CTAB e β-mercaptoetanol, e as amostras foram incubadas a 65 °C por 45 minutos. Posteriormente, realizou-se a purificação com clorofórmio:álcool isoamílico, seguida de centrifugação para recuperação da fração aquosa. A precipitação foi conduzida com isopropanol e etanol absoluto, formando o pellet de DNA, o qual foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c, avaliando-se as razões A260/A280 (ideal próximo a 1.8-2.0) e A260/A230 (ideal superior a 2.0).

Para a quantificação do teor global de 5-metilcitosina (5-mC), foi seguido o protocolo de Chen et al. (2013). Inicialmente, 30 µg de DNA genômico de cada amostra foram hidrolisados com 70% de ácido perclórico ($HClO_4$) a 100°C por 1 hora. Após a hidrólise, o pH foi ajustado entre 3 e 5 com KOH. As bases livres (citosina e 5-metilcitosina) foram separadas e quantificadas por HPLC (Shimadzu LC-20AT com detector SPD-M20A e coluna C18), sob condições isocráticas com fase móvel de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 4.5) e metanol (99:1, v/v), vazão de 1,0 mL/minuto e detecção a 270 nm. O teor de metilação foi expresso como porcentagem de 5-mC em relação à citosina total, calculada pela fórmula: %5mC = [A5mC / (A5mC + AC)] × 100.

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso. Para teste de germinação e vigor, os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no software R.

Para as análises moleculares, foi adotado um esquema fatorial 2 x 5 (estresse x fases da germinação), com uma amostra composta por 20 indivíduos homogeneizados (bulk), sem repetição, e os resultados apresentados de forma descritiva. Foram processadas e analisadas com êxito as amostras de endosperma e do eixo embrionário de milho nos tempos 0 hora (pré-germinação), 7 horas (fase 1 da germinação), 48 horas (fase 2 da germinação) e 7 dias (pós-germinação), em água e sob estresse salino (-1,2 MPa de NaCl).

Resultados

O estresse salino promoveu alterações significativas no desempenho germinativo e no crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays*) cv. Imperador. A porcentagem de germinação foi reduzida de 76%, no tratamento controle, para 58% sob NaCl a -1,2 MPa. O índice de velocidade de germinação (IVG) apresentou redução ainda mais acentuada, passando de 16,47 para 1,81, com diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$), indicando que a salinidade reduziu tanto a germinação quanto sua velocidade. A massa seca da raiz (MSR) foi de 0,2259 g no controle e 0,1035 g sob estresse salino, sem diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, a massa seca da parte aérea (MSPA) foi significativamente reduzida de 0,2252 para 0,0382 g, demonstrando maior sensibilidade da parte aérea à condição salina (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) de milho (*Zea mays*) cv. Imperador sob ausência (água) e presença de estresse salino (NaCl a -1,2 MPa), avaliados aos 7 dias de germinação.

Água	NaCl	Água	NaCl
G%		**IVG**	
76 a	58 b	16,47 a	1,81 b
MSR (g)		**MSPA (g)**	
0,2259 a	0,1035 a	0,2252 a	0,0382 b

Letras minúsculas representam diferença significativa pelo teste F ($p \leq 0,05$) entre ausência e presença de estresse (Água e NaCl).

Fonte: próprios autores

As amostras apresentaram concentrações de DNA entre 333,2 e 4741,3 ng μL^{-1}, com parâmetros de pureza adequados para a realização das análises de metilação. Os valores de A260/A280 permaneceram entre 1,8 e 2,0, enquanto a relação A260/A230 foi superior a 1,8 para a maioria das amostras.

Foram observadas variações no teor global de 5-metilcitosina (5-mC) entre tecidos, períodos de avaliação e condições experimentais. De modo geral, o tecido embrionário apresentou maior metilação sob estresse salino, sugerindo resposta diferencial à presença de NaCl ao longo do processo germinativo (Tabela 2; Figura 1).

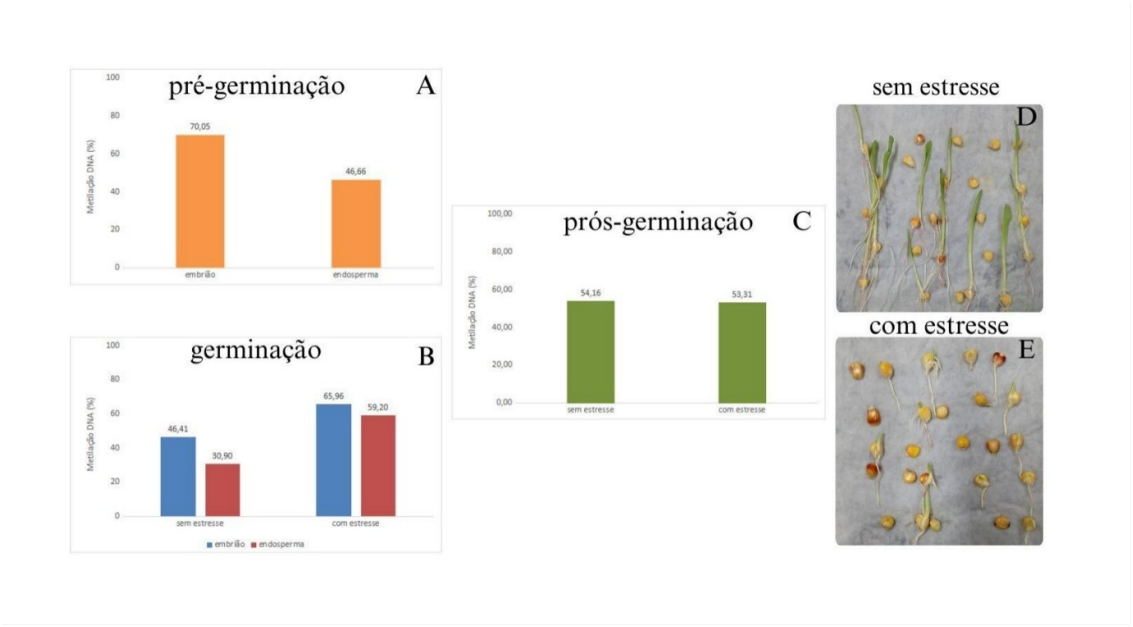
Tabela 2 - Quantificação do DNA genômico e teor global de 5-metilcitosina (5-mC) no DNA nos tecidos do embrião e endosperma de milho (*Zea mays*) cv. Imperador nas fases de pré-germinação (0 horas), germinação (7 horas) e pós-germinação (7 dias), sob condições sem estresse (água) e com estresse salino (NaCl -1,2 MPa).

	Tempo	Tecido	Estresse	n.acid (ng/ul)	n.acid/ 1000	qtd.DNA (µL)	METILAÇÃO (%)
Pré-germinação	0 horas	eixo embrionário	-	2773	2,77	10,82	70,05
		endosperma		1420,8	1,42	21,11	46,66
Germinação (fase 1)	7 horas	eixo embrionário	água	289,9	0,29	103,48	46,41
			NaCl	14518,3	14,52	2,07	65,96
		endosperma	água	1643,3	1,64	18,26	30,90
			NaCl	1174,7	1,17	25,54	59,20
Germinação	48	eixo	água	581,5	0,58	51,59	50,37

(fase 2)	horas (1 dia)	embrionário	NaCl	1332,1	1,33	22,52	**56,01**
Pós-germinação	168 horas (7 dias)	plântula	água	559,2	0,56	53,65	**54,16**
			NaCl	1156,1	1,16	25,95	**53,31**

Fonte: próprios autores

Figura 1 - Teor global de 5-metilcitosina (5-mC) no DNA de embrião e endosperma de milho (*Zea mays*) nas fases de pré-germinação (A), germinação (B) e pós-germinação (C, D, E);1D sem estresse (água); 1E- com estresse salino (NaCl -1,2 MPa).



Fonte: próprios autores

Discussão

Os resultados demonstram que o estresse salino compromete a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de milho cv. Imperador. A redução da porcentagem de germinação e, principalmente, do IVG evidencia que a salinidade não apenas diminuiu o número de sementes germinadas, mas também retardou expressivamente o processo germinativo. Esse comportamento pode estar associado à redução do potencial hídrico do meio, que dificulta a absorção de água pelas sementes, além dos efeitos tóxicos decorrentes do acúmulo de Na^+ e Cl^- nos tecidos. Esses fatores podem interferir na atividade enzimática, na mobilização das reservas e no crescimento do embrião (Munns, 2002).

A redução mais expressiva do índice de velocidade de germinação (IVG) em comparação à porcentagem de germinação indica que o vigor das sementes foi especialmente afetado pelo estresse salino. Resultados semelhantes foram observados em sementes de feijão e milho submetidas a estresses osmótico e salino, nas quais houve redução do desempenho germinativo e do vigor (Machado Neto et al., 2006; Deuner et al., 2011).

O crescimento da parte aérea também foi significativamente prejudicado, enquanto a massa seca da raiz não apresentou diferença estatística. A maior redução da massa seca da parte aérea (MSPA) pode estar associada à limitação da expansão e divisão celular provocada pelo déficit hídrico e pelo desequilíbrio iônico. A manutenção relativa do sistema radicular pode representar uma resposta fisiológica que favorece a absorção de água em condições adversas.

Além das alterações fisiológicas, verificaram-se mudanças no teor global de 5-metilcitosina. A metilação do DNA constitui um importante mecanismo epigenético associado à regulação da atividade gênica e à resposta das plantas a estresses ambientais (Richards et al., 2017; Xu et al., 2018). O maior teor de metilação observado no embrião sob estresse salino sugere que esse tecido apresentou resposta epigenética à presença de NaCl.

As diferenças entre eixo embrionário e endosperma podem estar relacionadas às funções distintas desses tecidos. Enquanto o eixo embrionário apresenta elevada atividade metabólica e participa diretamente da formação da plântula, o endosperma atua principalmente como tecido de reserva. Assim, as alterações na metilação podem ocorrer de forma tecido-específica durante a germinação.

De maneira geral, os resultados indicam que o estresse salino afetou negativamente a germinação, o vigor e o crescimento inicial do milho, ao mesmo tempo em que promoveu alterações no padrão global de metilação do DNA. Entretanto, como a análise de 5-mC é global, não é possível identificar quais genes foram diretamente afetados, sendo necessárias análises moleculares mais específicas para compreender a relação entre metilação e resposta ao estresse salino.

Conclusão

O estresse salino imposto na germinação foi capaz de induzir uma resposta fisiológica ao estresse claramente observável pelo teor de metilação da 5-metilcitosina (5-mC) nas fases iniciais da germinação em tecidos de embrião e de endosperma de milho cv. Imperador, a destacar: 1- o tecido de embrião apresentou maior porcentagem de metilação do que o de endosperma, reforçando a importância da regulação epigenética do endosperma para o controle da germinação; 2- O estresse salino aumentou a metilação e, logo, reduziu a expressão gênica, principalmente nas fases iniciais da germinação; 3- na pós-germinação as diferenças não foram evidentes, o que pode indicar a ocorrência de ajustes epigenéticos compensatórios. Conclui-se que o teor global de 5-mC do DNA de embriões e do endosperma de sementes de milho pode estar atuando como marcador epigenético do desenvolvimento inicial das plantas, evidenciando sua importância na regulação de genes essenciais para a germinação e para resposta à salinidade.

Referência

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012.

CHEN, Q. et al. Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. **Am. J. Mol. Biol.** v. 3, p. 98-101. 2013. http://dx.doi.org/10.4236/ajmb.2013.32013

DEUNER, C.; MAIA, M. S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELLO, G. E Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n .4, p. 711-720, 2011. https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000400013

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, v. 19, p. 11-15, 1987.

JOHNSON, J.W.; et al. HPLC analysis of plant DNA methylation: A study of critical methodological factors. **Plant Physiol. Biochem.** v. 43, p. 844-853, 2005. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.015

LOUIS, N.; DHANKHER, O. P.; PUTHUR, J. T. Seed priming can enhance and retain stress tolerance in ensuing generations by inducing epigenetic changes and trans-generational memory. **Physiologia Plantarum,** v. 175, n. 2, e13881, 2023. https://doi.org/10.1111/ppl.13881

MACHADO NETO, N. B. et al. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 142-148, 2006. https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000100020

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell and Environment, v. 25, p. 239-250, 2002. https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x

RICHARDS, C. L. et al. Ecological plant epigenetics: evidence from model and non-model species. Ecology Letters, v. 20, p. 1576-1590, 2017. https://doi.org/10.1111/ele.12858

SHAHID, S. A. et al. Soil salinity: historical perspectives and a world overview. In: GUIDI, S.; KAMAL, H. (org.). Salinity and water stress. Dordrecht: Springer, 2018. p. 43-53. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-96190-3_2

XU, J. et al. Epigenetic mechanisms in plant responses to abiotic stress. Journal of Experimental Botany, v. 69, p. 321-337, 2018. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01048

Agradecimentos

À UFES, à FAPES e ao CNPq pelo apoio institucional e financeiro; aos laboratórios do Prrograma de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do CCAE – UFES.