



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA PIÊTRA SOARES SILVA DE BRITO

**ANÁLISE *IN SILICO* DE RNA-SEQ DO MILHO (*ZEA MAYS L.*) SOB ESTRESSE
TÉRMICO: IMPACTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA VIABILIDADE DO
PÓLEN**

CAMPINA GRANDE

2024

ANA PIÊTRA SOARES SILVA DE BRITO

**ANÁLISE *IN SILICO* DE RNA-SEQ DO MILHO (*ZEA MAYS* L.) SOB ESTRESSE
TÉRMICO: IMPACTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA VIABILIDADE DO
PÓLEN**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo)
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Estadual
da Paraíba (UEPB), como requisito à obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Faria Lopes

CAMPINA GRANDE

2024

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B862a Brito, Ana Pietra Soares Silva de.
Análise in silico de RNA-Seq do milho (*Zea mays* L.) sob estresse térmico [manuscrito] : impacto das mudanças climáticas na viabilidade do pólen / Ana Pietra Soares Silva de Brito. - 2024.

18 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. Sérgio de Faria Lopes, Departamento de Biologia - CCBS. "

1. Estresse térmico. 2. RNA-Seq. 3. Viabilidade do pólen. I.
Título

21. ed. CDD 570

ANA PIÊTRA SOARES SILVA DE BRITO

**ANÁLISE *IN SILICO* DE RNA-SEQ DO MILHO (*ZEA MAYS L.*) SOB ESTRESSE
TÉRMICO: IMPACTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA VIABILIDADE DO
PÓLEN**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo)
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Estadual
da Paraíba (UEPB), como requisito à obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21 / 06 /2024.

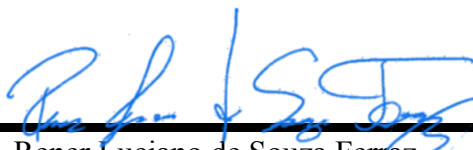
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio de Faria Lopes (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Alberto Soares de Melo
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Rener Luciano de Souza Ferraz
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus avós Vicente Soares e Maria José,
Genival Xavier (*in memoriam*) e Agaba Brito
(*in memoriam*), e minha bisavó Maria Bezerra,
com todo o meu amor, admiração e gratidão,
DEDICO.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	METODOLOGIA.....	7
3	RESULTADOS.....	8
3.1	IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.....	9
3.2	ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL.....	11
4	DISCUSSÃO.....	11
5	CONCLUSÃO.....	14
	REFERÊNCIAS.....	14
	AGRADECIMENTOS.....	17

ANÁLISE *IN SILICO* DE RNA-SEQ DO MILHO (*ZEA MAYS* L.) SOB ESTRESSE TÉRMICO: IMPACTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA VIABILIDADE DO PÓLEN

IN SILICO RNA-SEQ ANALYSIS OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.) UNDER HEAT STRESS: IMPACT OF CLIMATE CHANGE ON POLLEN VIABILITY

RESUMO

Ana Piêtra Soares Silva de Brito ¹

Sérgio de Faria Lopes ²

Em face às mudanças climáticas, o aumento das temperaturas globais tem se tornado um desafio para sistemas agrícolas e ecológicos. No tropical semiárido nordestino do Brasil, onde agricultores dependem do cultivo do milho (*Zea mays* L.) para sua subsistência, as alterações climáticas impactam negativamente a produção e a qualidade do milho. Diante disso, este estudo trata-se de uma pesquisa *in silico*, que busca explorar os mecanismos moleculares subjacentes às respostas do pólen de milho, para elucidar as implicações ecofisiológicas da fertilidade do pólen em condições de estresse térmico. Para isso, utilizou-se dados RNA-Seq disponíveis no banco de dados públicos SRA do NCBI, que foram analisados por meio das plataformas *online Galaxy*, *Degust* e *DAVID*, para expressão diferencial, visualização gráfica e enriquecimento funcional, respectivamente. Os resultados revelaram que o pólen do milho induz alterações transcricionais para se adequar e se defender do estresse causado pelas altas temperaturas, consideravelmente fatores de transcrição influenciam fortemente modulações na expressão gênica. Não obstante, BAG6 e proteínas quinases revelaram-se fundamentais na resposta adaptativa ao estresse térmico, por outro lado, notavelmente, genes associados a funções específicas da antera foram reprimidos, indicando que o estresse térmico reduz a fertilidade do pólen. Em conclusão, as alterações climáticas afetam a viabilidade do pólen, impactando a dinâmica das interações planta-polinizadores.

Palavras-Chave: estresse térmico; RNA-Seq; viabilidade do pólen.

¹ Graduanda em Ciências Biológicas – Bacharelado; Laboratório de Ecologia Integrativa (EcoTropics), CCBS, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB); Campina Grande, PB;
ana.soares@aluno.uepb.edu.br;

² Professor do Departamento de Biologia; Coordenador do Laboratório de Ecologia Integrativa (EcoTropics), CCBS, Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB
sergiolopes@servidor.uepb.edu.br.

ABSTRACT

In the face of climate change, rising global temperatures have become a challenge for agricultural and ecological systems. In the tropical semi-arid northeast of Brazil, where farmers depend on the cultivation of maize (*Zea mays* L.) for their subsistence, climate change negatively impacts corn production and quality. Therefore, this study is *in silico* research, which seeks to explore the molecular mechanisms underlying the responses of corn pollen, to elucidate the ecophysiological implications of pollen fertility under conditions of heat stress. For this, we used RNA-Seq data available in the NCBI public SRA database, which were analyzed using the online platforms *Galaxy*, *Degust* and *DAVID*, for differential expression, graphical visualization and functional enrichment, respectively. The results revealed that maize pollen induces transcriptional changes to adapt and defend itself from the

stress caused by high temperatures, considerably transcription factors strongly influence modulations in gene expression. Nevertheless, BAG6 and protein kinases proved to be fundamental in the adaptive response to heat stress, on the other hand, notably, genes associated with specific anther functions were repressed, indicating that heat stress reduces pollen fertility. In conclusion, climate change affects pollen viability, impacting the dynamics of plant-pollinator interactions.

Keywords: heat stress; RNA-Seq; pollen viability.

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas têm se tornado uma das preocupações mais prementes do nosso tempo, exercendo impactos alarmantes nos ecossistemas e sistemas naturais. O aumento das temperaturas e a perda da biodiversidade contribuem para fenômenos como a desertificação, uma das maiores questões ambientais na região semiárida brasileira (Tavares; Arruda; Silva, 2019). Dados e estatísticas descrevem os impactos das mudanças climáticas, incluindo o aumento da temperatura média global, a ocorrência de eventos climáticos extremos e as alterações nos padrões de precipitação (IPCC, 2023), fornecendo fundamentação para a necessidade de explorar as respostas das plantas diante desses desafios.

Nesse contexto, a biodiversidade vegetal emerge como componente central na manutenção do equilíbrio ambiental. O estado de saúde e adaptação das plantas assume um papel preponderante na sustentabilidade dos sistemas agrícolas e ecológicos, além de exercer influência direta na regulação do clima global (Beddington *et al.*, 2011). É de fundamental importância a compreensão da interação entre a ecofisiologia das plantas e as mudanças climáticas, com destaque para as adaptações das plantas a estresses ambientais. As plantas empregam diversos mecanismos em resposta a essas condições, incluindo ajustes fisiológicos, moleculares e bioquímicos para sobreviver e prosperar. Compreender essas respostas é crucial para buscar estratégias que minimizem os impactos na biodiversidade, bem como na agricultura (Dias, 2018).

O milho (*Zea mays* L.) é a segunda maior cultura agrícola no Brasil, cultivado em toda extensão do território brasileiro, no entanto sua produção é altamente suscetível às alterações climáticas, especialmente em regiões semiáridas. No nordeste do país a produtividade é menor, devido principalmente às características intrínsecas da vegetação, clima e solo da região, sendo cultivado por pequenos agricultores com limitações tecnológicas. Apesar disso, o milho mantém sua importância cultural e histórica na região (Francisco *et al.*, 2023).

Nesse sentido, as respostas do milho ao estresse térmico (ET) vêm sendo amplamente estudadas por meio de análise transcriptômica. Análises de RNA-Seq têm se mostrado uma ferramenta poderosa para estudar os mecanismos moleculares subjacentes à termotolerância do milho (Giachetto e Higa, 2014). Estudos anteriores demonstram que o ET é um fator limitante na produção do milho, impactando negativamente seu desenvolvimento. As altas temperaturas durante a formação de grão e pólen resultam em alterações nos processos metabólicos e fisiológicos da planta. Além disso, a desregulação de genes e vias metabólicas comprometem a germinação do pólen levando a perdas significativas no rendimento (Guo *et al.*, 2021; Begcy *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2018).

A compreensão dos mecanismos de adaptação da planta é fundamental para o estudo da relação entre a ecofisiologia e o ambiente. Desta forma, o presente estudo busca realizar uma análise *in silico* de RNA-Seq, para explorar os mecanismos moleculares de resposta pólen do milho (*Zea mays* L.) em condições de estresse térmico, para elucidar as implicações

ecofisiológicas da fertilidade do pólen. Essa análise pode orientar estratégias resilientes capazes de enfrentar os desafios das mudanças climáticas, que possam beneficiar especialmente os agricultores da região nordeste.

2 METODOLOGIA

Para este trabalho foram utilizados dados RNA-Seq obtidos do banco de dados *SRA - NCBI*, o conjunto de dados selecionado foi disponibilizado ao acesso público sob número de acesso PRJNA548548, contendo seis amostras, sendo que SRR9282928 (replicata 1), SRR9282930 (replicata 2) e SRR9282932 (replicata 3) representam amostras tratadas e SRR9282919 (replicata 1), SRR9282922 (replicata 2) e SRR9282925 (replicata 3) representam amostras controle, depositado por *University of Regensburg* em 12 de Junho de 2019, a partir do artigo de Bagcy K. *et al.*, (2019), intitulado “Male Sterility in Maize after Transient Heat Stress during the Tetrad Stage of Pollen Development”. Neste trabalho os autores utilizaram o cultivar B73 (*Zea mays*) e impuseram estresse térmico de 35°C/25°C no período claro/escuro por 48 horas, bem como mantiveram o grupo controle sob condições controladas de crescimento a 25°C/21°C no período claro/escuro. Para estudar o efeito de ET no desenvolvimento pólen, Bagcy *et al.*, (2019) analisaram seis amostras do pólen, três replicatas para cada condição (Tratamento vs Controle), e prepararam a biblioteca RNA-Seq utilizando *Illumina HiSeq 1000*.

O pipeline de análise RNA-Seq adotado no presente estudo foi montado a partir do trabalho de Conesa *et al.*, (2016). A avaliação de qualidade, montagem e expressão diferencial foi realizada na Plataforma Galaxy (The Galaxy Community, 2022), e para gerar visualizações utilizou-se a web ferramenta *Degust* (Powell, 2019), em seguida para o enriquecimento dos dados foi utilizado a Plataforma DAVID (Sherman *et al.*, 2022).

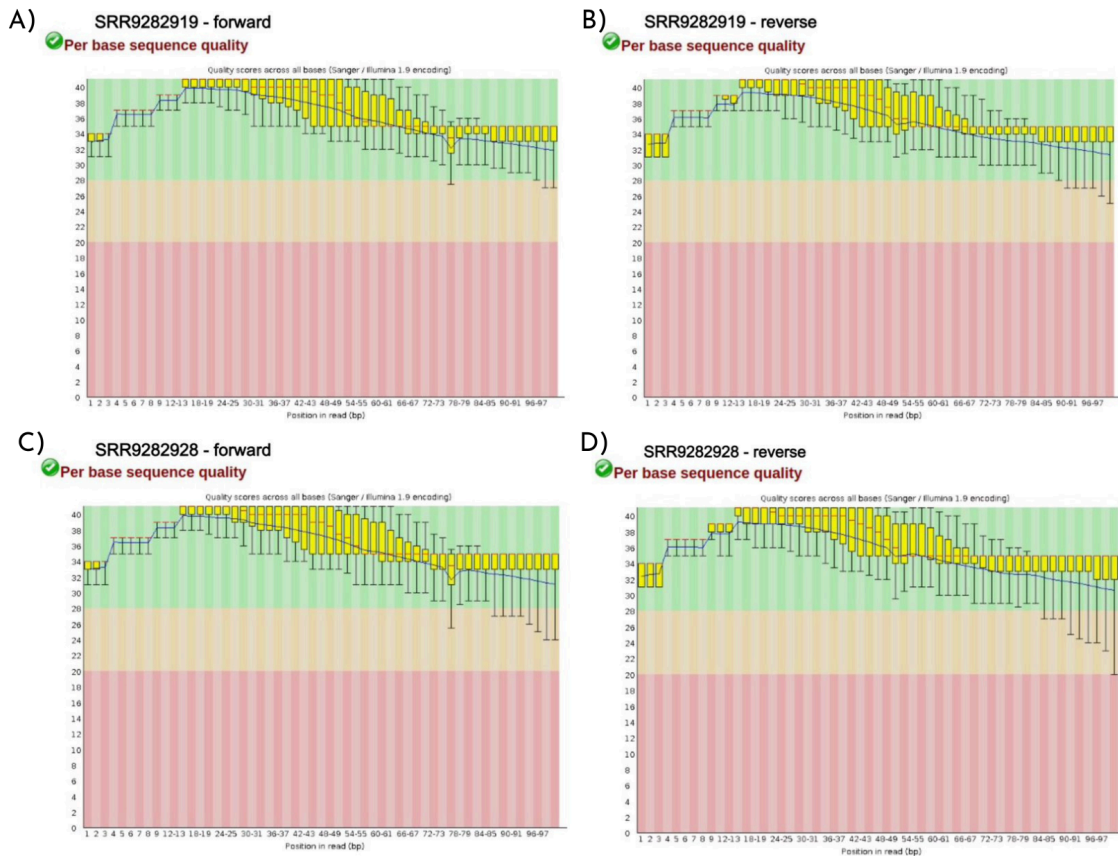
O conjunto de dados brutos (PRJNA548548) na Plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) foram obtidos no formato fastqsanger, e passados por controle de qualidade utilizando as ferramentas FastQC (Andrews, 2010) e MultiQC (Ewels *et al.*, 2016), e dado que as métricas resultantes demonstram alta qualidade, com *scores Phred* acima de 20 para a maioria das leituras, confirmando um sequenciamento bem sucedido, optou-se por não realizar o *trimming* das *reads*. Para o mapeamento empregou-se a ferramenta HISAT2 (Kim; Langmead; Salzberg, 2015) utilizando o genoma de referência GCA_902167145.1, acessado em 04 de abril de 2024, após mapeamento bem sucedido, a contagem de leituras foi conduzida por meio da ferramenta *FeatureCounts* (Liao; Smyth; Shi, 2014). E para identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizou-se a ferramenta *DESeq2* (Love; Huber; Anders, 2014), os resultados foram exportados para a web ferramenta *Degust* (Powell, 2019) onde foram normalizadas com *voom/limma* (Ritchie *et al.*, 2015), e utilizadas para calcular a diferença de expressão gênica entre os grupos Controle vs Tratamento, com critérios estabelecidos em p-value ajustado (FDR) < 0,05 e \log_2 *fold change* (\log_2 FC) > 0,58. Os genes que atendiam a esses critérios foram considerados diferencialmente expressos. E para visualização gráfica dos DEGs, na plataforma *Degust* foram obtidos os gráficos *Volcano* que mostra a magnitude estatística da expressão gênica e *Heatmap* para a distinção da expressão gênica entre as amostras tratadas e controle.

Para identificar as funções biológicas e os processos moleculares associados aos genes diferencialmente expressos, foi feita análise de enriquecimento funcional utilizando a Plataforma DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*). Primeiramente foi preparada uma lista de genes diferencialmente expressos, os quais foram submetidos ao DAVID (Sherman *et al.*, 2022).

3 RESULTADOS

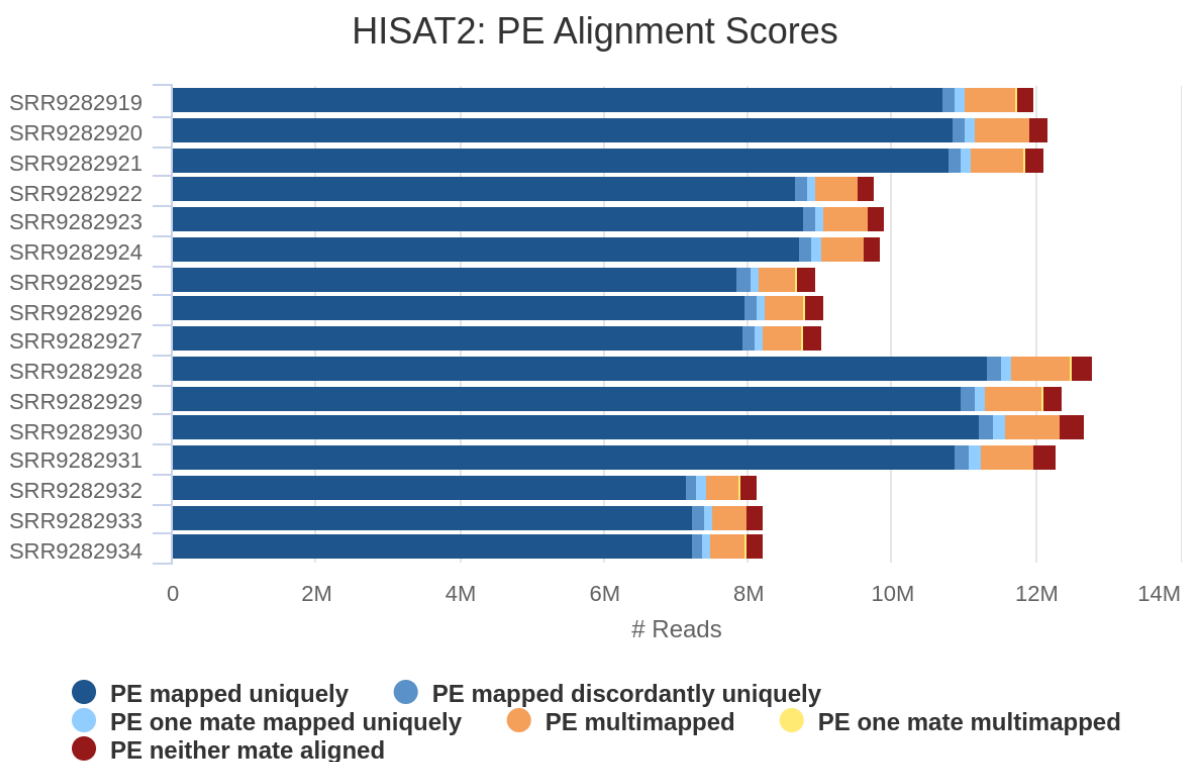
A avaliação da qualidade das bibliotecas foi baseada na qualidade das bases (*score Phred*), que apresentaram alta qualidade, segundo métricas FastQC (Andrews, 2010), com score de qualidade acima de 20 para todas as sequências das *reads* (Figura 1). E como observado na Figura 2, o mapeamento com HISAT2 (Kim; Langmead; Salzberg, 2015) foi bem sucedido, com mais de 97% das *reads* mapeadas ao genoma de referência GCA_902167145.1, validando a qualidade dos dados obtidos.

Figura 1. Qualidade *score Phred* das reads, controle A e B e tratamento C e D. O eixo x representa a posição da base ao longo da sequência, e o eixo y indica o score de qualidade. A faixa verde representa alta qualidade, a faixa laranja representa qualidade aceitável e a faixa vermelha baixa qualidade.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Figura 2. Qualidade do mapeamento das reads pareadas (PE). Mostra o número de reads mapeados, em milhões, variando de 0 a 14. Cada barra representa uma amostra.

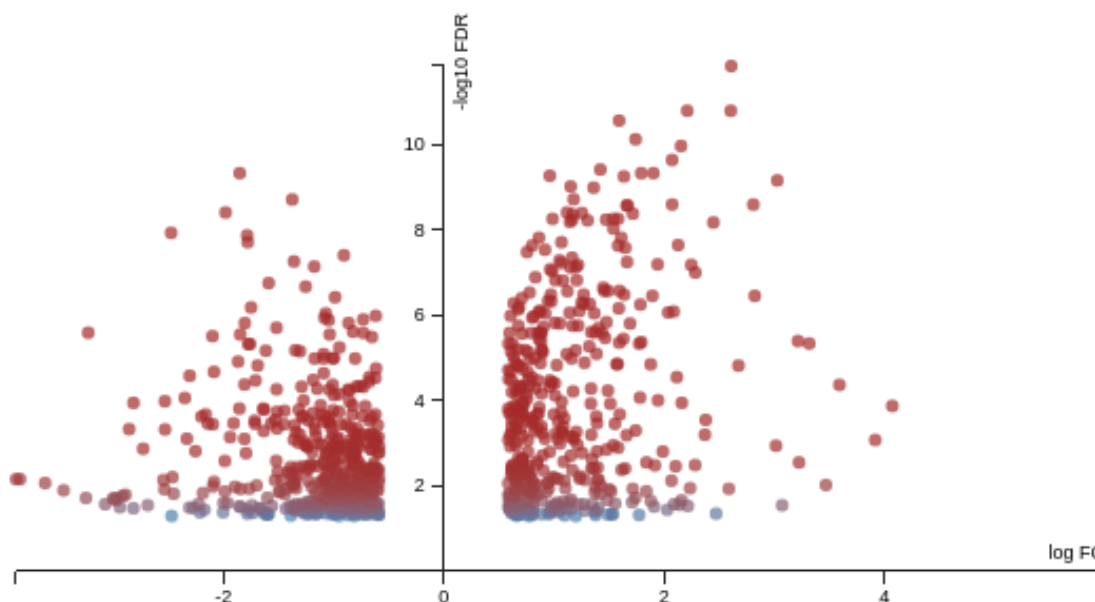


Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

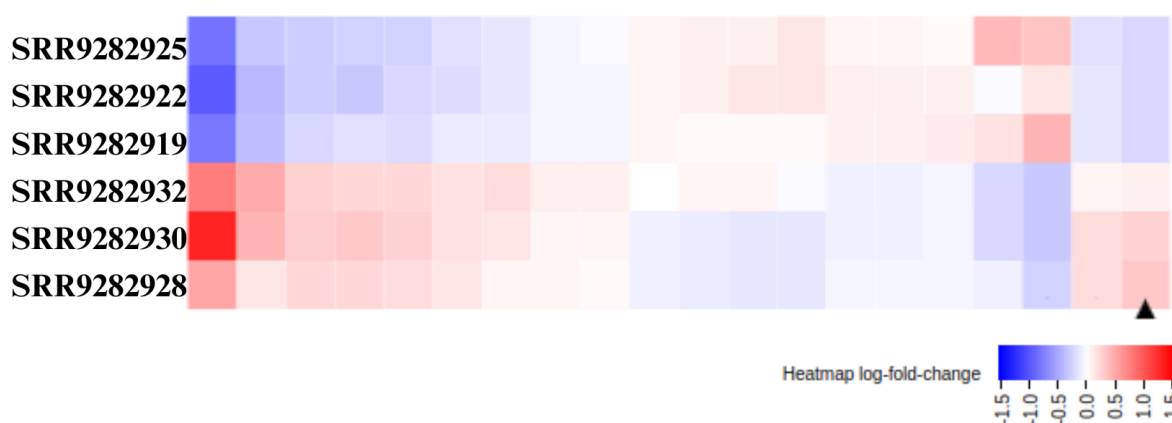
A análise de expressão gênica diferencial, com aplicação dos critérios estabelecidos em $(FDR) < 0,05$ e $(\log_2FC) > 0,58$, revelou 908 genes diferencialmente expressos (DEGs) entre as amostras de pólen de milho sob estresse térmico e condições de controle. Dentre esses, 430 foram regulados positivamente e 478 foram regulados negativamente, como mostrado na figura 3 por meio do gráfico volcano, é possível visualizar a significância estatística da expressão gênica, onde os genes representados em vermelho estão regulados positivamente e os genes representados em azul estão regulados negativamente. Além disso, pode-se observar os 20 principais DEGs representados no *heatmap* (Figura 4), evidenciando a distinção da expressão gênica entre as amostras tratadas com estresse térmico (ET) e amostras em condição de controle.

Figura 3. Volcano Plot representando a magnitude da expressão gênica. O eixo x mostra o log Fold Change e o eixo y mostra o $-\log_{10}$ (p-value). Os pontos em vermelho representam genes upregulados e em azul os genes downregulados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Figura 4. Heatmap representando a expressão gênica entre as amostras. Em vermelho os genes upregulados e em azul os genes downregulados.



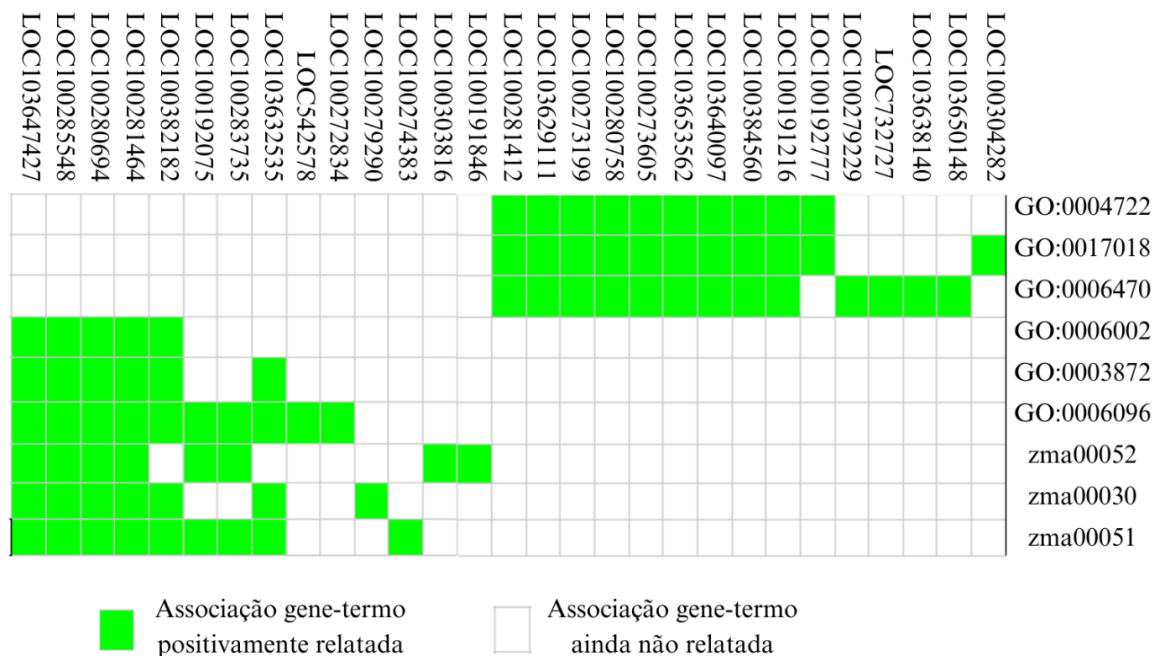
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Dentre os vinte genes mais significativos (figura 4), foram identificados os genes upregulados LOC541969 (MYB-IF35) com \log_2FC 4.07, LOC100273687 (Proteína quinase) com \log_2FC 3.47, LOC100383270 (Pseudogene de mucina) com \log_2FC 3.32 e LOC103626967 (BAG6) com \log_2FC 3.03, que atuam com distintos papéis na resposta do milho ao estresse térmico. Ademais, dentre os vinte DEGs mais significativos, foram identificados cinco genes downregulados, LOC542005 (Proteína específica da antera 3) com \log_2FC -3.88, LOC103638018 (ZmPK1) com \log_2FC -3.85 e LOC542404 (MFS14) com \log_2FC -3.45, LOC100284218 (Proteína específica da antera) com \log_2FC -3.18.

3.2 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

A análise de enriquecimento funcional realizada com a web ferramenta DAVID (figura 5), dos 908 genes diferencialmente expressos (DEGs) no pólen de milho sob estresse térmico, revelou seis termos Gene Ontology (GO) nomeadamente, atividade de proteína serina/treonina fosfatase (GO:0004722), atividade da miosina fosfatase (GO:0017018), desfosforilação de proteínas (GO:0006470), processo metabólico da frutose 6-fosfato (GO:0006002), atividade da 6-fosfofrutoquinase (GO:0003872) e processo glicólico (GO:0006096). E ainda, três vias KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) foram enriquecidas, metabolismo da galactose (zma00052), via de pentose fosfato (zma00030) e metabolismo da frutose e manose (zma00051).

Figura 5. Termos GO e vias KEGG enriquecidos. Em verde representam a quais genes os termos enriquecidos foram associados



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

4 DISCUSSÃO

Dentre os vinte genes mais significativos, doze foram classificados como “não caracterizados”, no entanto os outros oito genes identificados oferecem *insights* sobre a termotolerância do pólen. Como o fator de transcrição MYB-IF35 (LOC541969), conhecido por sua função na tolerância a estresses em plantas, sugerindo seu papel na regulação da expressão gênica durante o estresse térmico no pólen de milho (Bagcy *et al.*, 2019), bem como a proteína quinase receptora ZmPK1 (LOC103626967) evidenciada por estudos anteriores (Stone; Walker, 1995; Bagcy *et al.*, 2019), desempenha importante papel na sinalização celular na ativação de mecanismos de defesa. A regulação desses genes indica que o estresse térmico ativa vias de sinalização e mecanismos de defesa no pólen de milho. Além disso, o estresse térmico também induziu a expressão do gene LOC10362696, regulador de

chaperona molecular da família BAG6, que atua na regulação do estresse proteico em resposta ao estresse térmico (Wang *et al.*, 2004).

A superexpressão dos genes LOC541969, LOC103626967 e LOC10362696 em resposta ao estresse térmico no pólen do milho é consistente com os achados de Bagcy e colaboradores (2019), identificamos LOC541969 como um fator de transcrição MYB-IF35, sustentando a hipótese de que os fatores de transcrição MYB são cruciais na regulação da expressão gênica em condições de estresse térmico (Bagcy *et al.*, 2019; Roy, 2016; Li *et al.*, 2019). Do mesmo modo, a identificação do gene LOC10362696 (BAG6), uma chaperona de proteína de choque térmico HSP70, que dentre as HSPs desempenha significativa influência na tolerância ao estresse, reforça o conhecimento de que as HSPs são cruciais na regulação proteica e homeostase celular (Rana *et al.*, 2018; Corduan *et al.*, 2009; Bagcy *et al.*, 2019). Além disso, Bagcy *et al.* (2019) destacaram várias proteínas quinases em seus resultados, segundo os autores, a expressão diferencial dessas proteínas pode estar associada a redução na germinação do pólen e na capacidade de crescimento, igualmente, no presente estudo, identificou-se o gene LOC100273687, que codifica uma proteína quinase, constatando a relevância das quinases na adaptação do pólen ao estresse térmico.

Também observou-se que os genes LOC542005 e LOC100284218, codificadores de proteínas específicas da antera 3 e proteína AGP rica em prolina específica da antera, respectivamente, foram reprimidos, indicando a estratégia de realocar energia, para enfrentar o estresse, o milho pode estar investindo seus recursos metabólicos diferencialmente, prejudicando a fertilidade, uma vez que essas proteínas são associadas ao desenvolvimento e fertilidade do pólen (Khurana *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2023). Esses resultados estão em concordância com Bagcy e colaboradores (2019), que relataram redução na expressão de genes associados à biossíntese de amido, comprometendo o desenvolvimento do tubo polínico. A regulação negativa de LOC542005, reforça descobertas anteriores (Khurana *et al.*, 2012), sobre sua importância na reprodução vegetal, a redução na expressão de proteínas específicas da antera 3, afeta o desenvolvimento do pólen e a fertilização da planta sob estresse térmico. Similarmente, o gene LOC100284218, codificador de uma proteína AGP rica em prolina específica da antera, pode desempenhar um papel significativo (upregulado) ou crítico (downregulado) na resistência do pólen ao estresse (Jiao *et al.*, 2023), embora a sua função ainda não seja totalmente compreendida

Os resultados do enriquecimento funcional forneceram uma visão das vias metabólicas e processos biológicos modulados em estresse térmico, os termos GO relacionados à atividade de fosfatase de serina/treonina (GO:0004722) e a desfosforilação de proteínas (GO:0006470) podem sugerir estratégias adaptativas para regular a sinalização celular e atividade enzimática, pesquisas sobre as fosfatase de serina/treonina (PPs) destacam sua importância na regulação das respostas adaptativas a estresse, atuam na regulação do metabolismo, ciclo celular e sinalização hormonal (Farkas *et al.*, 2007; Singh; Prasad; Prasad, 2020), enquanto que a desfosforilação de proteínas, é um mecanismo central na modulação de atividades enzimáticas e sinalização celular durante o estresse térmico, a ativação de fosfatases específicas em resposta a estresse biótico e abiótico é bem evidenciada em diversos estudos (Krishnan e Pueppke, 1987; Zhang *et al.*, 2020; Luan, 2003).

E em relação as vias KEGG, o enriquecimento do metabolismo da galactose (zma00052), indica uma modulação significativa do metabolismo de carboidratos, os resultados de Bagcy e colaboradores (2019) corroboram com essa observação, demonstrando uma regulação dos genes envolvidos na biossíntese de energia e no metabolismo de carboidratos em condições de estresse térmico. Além disso, Bagcy *et al.* (2019) também

relatarem regulação negativa de genes associados à biossíntese de amido, e a regulação positiva de genes como a fosfofrutoquinase, envolvida no catabolismo da glicose, validando isto, foi observado o enriquecimento de via das pentoses fosfato (zma00030) e processo glicólico (GO:0006096), que é essencial para a produção de NADPH e defesa antioxidante.

Esses resultados indicam que a termotolerância do pólen do milho envolvem mecanismos de defesa já descritos por diversos pesquisadores, confirmando a relevância desses achados, consideravelmente MYB-IF35 é um gene candidato a alterações transcricionais da expressão gênica, dado que a expressão gênica é fortemente influenciada pelos fatores de transição (FTs), alterações nas condições normais que leve a grande mudanças na transição provavelmente são devidas a desregulação da atividade de FTs (Bagcy *et al.*, 2019). Notavelmente, os resultados indicam ainda que o estresse térmico compromete proteínas específicas da antera, o que pode afetar a qualidade do pólen, incluindo sua viabilidade, germinação e atratividade para polinizadores. Estudos demonstram que o estresse térmico prejudica o desenvolvimento do pólen, e afeta a visitação de polinizadores (Kolanowska; Michalska; Konowalik, 2021; Liu *et al.*, 2022; Gómez-Ruiz e Lacher, 2019). A interação planta-polinizadores é essencial não apenas para a fertilidade do milho, mas também para o funcionamento dos ecossistemas agrícolas. Isto é particularmente crítico em regiões tropicais, como o semiárido nordestino, onde as temperaturas elevadas são frequentes.

No contexto da estrutura de comunidade, a polinização por abelhas e outros insetos desempenha um papel crucial. A pesquisa de Wolff e Eicholz (2021) destaca a importância da floração masculina do milho como uma fonte significativa de pólen para abelhas melíferas e abelhas sem ferrão, contribuindo para a manutenção desses polinizadores nos agroecossistemas. A presença de uma comunidade diversificada de polinizadores não apenas melhora a polinização do milho, mas também sustenta a biodiversidade e a saúde dos ecossistemas naturais. A estrutura da comunidade é, portanto, influenciada pela disponibilidade de recursos florais e pelas condições ambientais. Em ambientes sujeitos a estresse térmico, a dinâmica entre plantas e polinizadores pode ser perturbada, afetando a resiliência do ecossistema.

Estratégias de manejo que promovam a diversidade de polinizadores e a adaptação das culturas às mudanças climáticas são essenciais para garantir a sustentabilidade da produção agrícola e a conservação dos serviços ecossistêmicos de polinização. Isso inclui práticas como a criação de habitats favoráveis aos polinizadores e o desenvolvimento de cultivares de milho mais resistentes ao calor.

Portanto, os resultados apresentados não apenas ampliam o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta do pólen do milho ao estresse térmico, mas também possuem implicações ecofisiológicas significativas. A termotolerância do milho envolve complexas interações de respostas ecológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Na literatura científica as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares são amplamente evidenciadas, enquanto que as respostas ecológicas do milho sob estresse térmico ainda são pouco exploradas, não obstante, diversos estudos sobre estresses abióticos em plantas foram conduzidos. Conforme descrito por Desaint *et al* (2020), o estresse térmico altera as interações planta-patógeno, tornando as plantas mais vulneráveis a patógenos, influenciando a saúde do ecossistema. Em contrapartida, outros estudos indicam que estresses ambientais mudam positivamente as interações das plantas, no sentido de facilitação ou na redução da competição (He; Bertness; Altieri, 2013; Maestre; Valladares; Reynolds, 2005). Ademais, outros autores demonstram que o estresse abiótico causa impactos significativos na estrutura e dinâmica das comunidades vegetais (Smithers *et al.*, 2020; MacTavish e Anderson,

2020), dessa forma as interações planta-ambiente são cruciais para sobrevivência e reprodução. As implicações ecológicas do estresse térmico no milho envolvem além das respostas transcriptômicas adaptativas, a compreensão da dinâmica e resiliência dos sistemas agrícolas e ecológicos.

5 CONCLUSÃO

À medida que se intensificam os efeitos das mudanças climáticas, presume-se que o milho (*Zea mays* L.) sofra redução em seu rendimento, principalmente em regiões semi-áridas, onde a co-ocorrência de altas temperaturas e fenômenos como a desertificação afligem essas regiões. Os resultados das análises deste estudo, demonstram que em condição de estresse térmico, o milho emprega abrangentes estratégias de resposta ao estresse, com implicações importantes para a viabilidade e fertilidade do pólen. Essas respostas transcriptômicas envolvem a manutenção da homeostase proteica, regulação da expressão gênica, modelação de vias de sinalização, regulação na biossíntese de energia e mecanismos de defesa para assegurar o funcionamento adequado das células.

Em consonância com Bagcy e colaboradores (2019), nossos resultados indicam que as alterações transcricionais na expressão gênica do pólen do milho sob estresse térmico podem ser causadas pela desregulação de genes de fatores de transcrição (FTs). Mais estudos destes genes podem elucidar a modulação de sua atividade para evitar a esterilidade. Ademais, o estresse térmico pode afetar a viabilidade do pólen, impactando a dinâmica das interações planta-polinizadores, e conseqüentemente, a estrutura de comunidades. Portanto, faz-se necessário mais estudos acerca das implicações ecológicas do estresse térmico no milho, visto que compreender as interações ecológicas é essencial para fortalecer a resiliência dos sistemas agrícolas, particularmente no cultivo do milho por agricultores do semiárido brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, S. (2010). **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data** [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- BEDDINGTON J, ASADUZZAMAN M, FERNANDEZ A, CLARK M, GUILLOU M, JAHN M, ERDA L, MAMO T, VAN BO N, NOBRE CA, SCHOLERS R, SHARMA R, WAKHUNGU J. (2011). **Alcançar segurança alimentar face às mudanças climáticas: Resumo para decisores políticos da Comissão para Agricultura Sustentável e Mudanças Climáticas**. CGIAR Programa de Pesquisa sobre Mudanças Climáticas, Agricultura e Segurança Alimentar (CAAFS). Copenhaga, Dinamarca. Disponível online em: www.ccafs.cgiar.org/commission
- BEGCY K, NOSENKO T, ZHOU L, FRAGNER L, WECKWERTH W, DRESSELHAUS T. **Male Sterility in Maize after Transient Heat Stress during the Tetrad Stage of Pollen Development**. *Plant Physiology*, Volume 181, Issue 2, October 2019, Pages 683–700, <https://doi.org/10.1104/pp.19.00707>
- CHENG W, WANG Z, XU F, AHMAD W, LU G, SU Y, XU L. (2021). **Genome-Wide Identification of LRR-RLK Family in *Saccharum* and Expression Analysis in Response to Biotic and Abiotic Stress**. *Current Issues in Molecular Biology*; 43(3):1632-1651. <https://doi.org/10.3390/cimb43030116>

CONESA, A., MADRIGAL, P., TARAZONA, S. ET AL. **A survey of best practices for RNA-seq data analysis.** *Genome Biol* 17, 13 (2016).
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>

CORDUAN, A., LECOMTE, S., MARTIN, C., MICHEL, D., & DESMOTS, F. (2009). **Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock.** *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1998–2004. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9198-z>

DESAINT, H., AOUN, N., DESLANDES, L., VAILLEAU, F., ROUX, F., & BERTHOMÉ, R. (2020). **Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress.** *The New phytologist.* <https://doi.org/10.1111/nph.16965>

DIAS, J.P.T. **Ecofisiologia De Culturas Agrícolas.** Editora da Universidade do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

FARKAS, I., DOMBRÁDI, V., MISKEI, M., SZABADOS, L., & KONCZ, C. (2007). **Família Arabidopsis PPP de serina/treonina fosfatases.** *Trends in plant science*, 12 4, 169-76. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2007.03.003>

FRANCISCO, P. R. M. *et al.* **Uso Do Sig Para Avaliação Do Potencial Da Produção Agrícola Irrigada Do Milho (*Zea Mays L.*) Em Região Semiárida.** Em: *Agrociências: Natureza & Conservação.* [s.l.] Eptec, 2023. p. 18–33.

GÓMEZ-RUIZ, E.P., LACHER JR., T.E. **Climate change, range shifts, and the disruption of a pollinator-plant complex.** *Sci Rep* 9, 14048 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50059-6>

GU, X. *et al.* **Effects of short-term heat stress at the grain formation stage on physicochemical properties of waxy maize starch.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 98, n. 3, p. 1008-1015, 2018. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8549>

GUO J., GU X., LU W., LU D., **Multiomics analysis of kernel development in response to short-term heat stress at the grain formation stage in waxy maize,** *Journal of Experimental Botany*, Volume 72, Issue 18, 30 September 2021, Pages 6291–6304,
<https://doi.org/10.1093/jxb/erab286>

HE, Q., BERTNESS, M., & ALTIERI, A. (2013). **Global shifts towards positive species interactions with increasing environmental stress.** *Ecology letters*, 16 5, 695-706 .
<https://doi.org/10.1111/ele.12080>

IPCC. (2023). *Climate change 2023: Synthesis report. A report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* IPCC.

KOLANOWSKA, M., MICHALSKA, E., & KONOWALIK, K. (2021). **The impact of global warming on the niches and pollinator availability of sexually deceptive orchid with a single pollen vector.** *Science of The Total Environment*, 795, 148850.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148850>

KHURANA, R., KAPOOR, S. E TYAGI, A. (2012). **Anthology of Anther/Pollen-Specific Promoters and Transcription Factors.** *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 359 - 390.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2012.664986>

KIM, D., LANGMEAD, B. & SALZBERG, S. **HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements.** Nat Methods 12 , 357–360 (2015).

<https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>

KRISHNAN, H. E PUEPPKE, S. (1987). **Heat shock triggers rapid protein phosphorylation in soybean seedings.** Biochemical and biophysical research communications, 148 2, 762-7. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90941-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90941-7)

LI, J., HAN, G., SUN, C. E SUI, N. (2019). **Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding.** Plant Signaling & Behavior, 14.

<https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1613131>

LIU, M., DONG, X., ZHANG, Y., GU, M., YU, Y., XIE, H., ... & HUANG, S. (2022). **Heat stress on maize with contrasting genetic background: Differences in flowering and yield formation.** Agricultural and Forest Meteorology, 319, 108934.

<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.108934>

LOVE, M.I., HUBER, W. & ANDERS, S. **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** Genome Biol 15, 550 (2014).

<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

LUAN, S. (2003). **Protein phosphatases in plants.** Annual review of plant biology, 54(1), 63-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743>

MAESTRE, F., VALLADARES, F., & REYNOLDS, J. (2005). **Is the change of plant–plant interactions with abiotic stress predictable? A meta-analysis of field results in arid environments.** Journal of Ecology, 93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2005.01017.x>

MACTAVISH R, ANDERSON JT. **Resource availability alters fitness trade-offs: implications for evolution in stressful environments.** Am J Bot. 2020 Feb;107(2):308-318. doi: 10.1002/ajb2.1417. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31943133

PHILIP EWELS, MÅNS MAGNUSSON, SVERKER LUNDIN, MAX KÄLLER, **MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report,**

Bioinformatics, Volume 32, Issue 19, October 2016, Pages 3047–3048,

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

POWELL D. (2019). **Degust: interactive RNA-seq analysis.** Zenodo.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3501067>

RANA, R., IQBAL, A., WATTOO, F., KHAN, M. E ZHANG, H. (2018). **HSP70 Mediated Stress Modulation in Plants.** In: Asea, A., Kaur, P. (eds) Heat Shock Proteins and Stress. Heat Shock Proteins, vol 15. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90725-3_13

RITCHIE, ME, PHIPSON, B, WU, D, HU, Y, LAW, CW, SHI, W, AND SMYTH, GK (2015). **limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.** Nucleic Acids Research 43 (7), e47.

ROY, S. (2016). **Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome.** Plant Signaling & Behavior, 11.

<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1117723>

SHERMAN, B.T., HAO, M., QIU, J., JIAO, X., BASELER, M.W., LANE, H.C., IMAMICHI, T., CHANG, W. **DAVID: a web server for functional enrichment analysis**

and functional annotation of gene lists (2021 update), *Nucleic Acids Research*, Volume 50, Issue W1, 5 July 2022, Pages W216–W221, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>

SINGH, R.K., PRASAD, A., PRASAD, M. (2020). **Protein Phosphatases of Cereals and Millets: Identification, Structural Organization, and Their Involvement in the Regulation of Abiotic Stresses**. In: Pandey, G.K. (eds) *Protein Phosphatases and Stress Management in Plants*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48733-1_13

SMITHERS BV, OLDFATHER MF, KOONTZ MJ, BISHOP J, BISHOP C, NACHLINGER J, SHETH SN. **Community turnover by composition and climatic affinity across scales in an alpine system**. *Am J Bot.* 2020 Feb;107(2):239-249. doi: 10.1002/ajb2.1376. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31721149

STONE, J. E WALKER, J. (1995). **Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction**, *Plant Physiology*, Volume 108, Issue 2, June 1995, Pages 451–457. <https://doi.org/10.1104/pp.108.2.451>

TAVARES, V. C.; ARRUDA, Í. R. P.; DA SILVA, D. G. **Desertificação, mudanças climáticas e secas no semiárido brasileiro: uma revisão bibliográfica**. *Geosul*, v. 34, n. 70, p. 385–405, 2019.

The Galaxy Community , **The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update**, *Nucleic Acids Research*, Volume 50, Issue W1, 5 July 2022, Pages W345–W351, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>

WANG, W., VINOCUR, B., SHOSEYOV, O., & ALTMAN, A. (2004). **Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response**. *Trends Plant Sci.* May;9(5):244-52. doi: 10.1016/j.tplants.2004.03.006

WOLFF, L., & EICHOLZ, E. (2021). **Visitantes florais associados à floração de milho**. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Clima Temperado*, ISSN 1678-2518 ; 356.

YANG, H., GU, X., DING, M. et al. **Heat stress during grain filling affects activities of enzymes involved in grain protein and starch synthesis in waxy maize**. *Sci Rep* 8, 15665 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33644-z>

YANG L, GORDON K.S., WEI S, **featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features**, *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 7, April 2014, Pages 923–930, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>

ZHANG, X., ZHUANG, L., LIU, Y., YANG, Z. E HUANG, B. (2020). **Protein phosphorylation associated with drought priming-enhanced heat tolerance in a temperate grass species**, *Horticulture Research*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00440-8>

AGRADECIMENTOS

Nesta jornada acadêmica trilhei um caminho entrelaçado por diversas mãos e mentes generosas. Cada apoio, cada palavra de incentivo, cada contribuição foi importante para minha formação.

Ao meu orientador Sérgio, agradeço a maestria com que orientou meus passos. Sua sabedoria, paciência e entusiasmo foram guias luminosos no meu caminho, agradeço por ter acreditado em meu potencial e por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos meus pais, Claudivone e Pedro Rogério, agradeço alicerces inabaláveis de amor e apoio. Vocês são os pilares que sustentam minha vida, me inspirando a perseguir meus sonhos. Agradeço por todos os esforços que fazem pelas minhas realizações.

Aos meus irmãos, Ágaba, Pierre e Pedro, agradeço pela presença constante, companheirismo e apoio incondicional. Vocês são minha segunda metade, partes que me completam.

Aos meus avós, Vicente e Maria, pilares da nossa família, fontes de sabedoria e amor incondicional. Agradeço por seus ensinamentos valiosos e pela minha infância repleta de afeto. E aos meus avós, Genival (*in memoriam*) e Agaba (*in memoriam*), presenças eternas em meu coração, a saudade apertada, mas a gratidão transborda por cada memória que me acalenta. Este trabalho é um pequeno tributo ao amor e apoio que sempre me deram.

Aos meus tios e tias, Claudinebia e Tarcyanno, Claudete e Tacio, que sempre abriram suas portas e me acolheram com carinho. Foram mais do que tios, amigos e lar, agradeço o apoio inabalável.

Aos meus colegas e amigos, companheiros de jornada acadêmica, especialmente a Lucas e Livian, agradeço pelas alegrias, tristezas, aprendizagem e sonhos compartilhados, e pela constante presença, motivação e apoio.

Agradeço a Universidade Estadual da Paraíba, e ao corpo docente pela imensa contribuição ao meu processo de formação pessoal e profissional.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação acadêmica.