



**MILENA CHRISTY SANTOS**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À  
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO EM  
SEMENTES E EM TECIDOS DE PLÂNTULAS  
DE MILHO**

**LAVRAS – MG  
2016**

**MILENA CHRISTY SANTOS**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE HÍDRICO EM SEMENTES E EM TECIDOS DE  
PLÂNTULAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS - MG  
2016**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos  
Técnicos da**

Santos, Milena Christy.

Expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico em sementes e em tecidos de plântulas de milho / Milena Christy Santos. – Lavras : UFLA, 2016.

79 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

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

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. Expressão gênica. 3. Estresse hídrico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**MILENA CHRISTY SANTOS**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE HÍDRICO EM SEMENTES E EM TECIDOS DE  
PLÂNTULAS DE MILHO**

**GENE EXPRESSION RELATED TO WATER STRESS TOLERANCE  
ON SEEDS AND MAIZE SEEDLING TISSUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de setembro de 2016

Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Dra. Marcela Pedroso Mendes Resende

UFG

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2016**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e me dar forças.

Aos meus pais, Rosemara e Maurício por todo amor e apoio.

A toda minha família, por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado.

Ao meu namorado Thiago, pelo companheirismo, amizade, apoio e incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelo exemplo de pessoa, dedicação e amor à profissão.

A coorientadora Heloisa Oliveira Santos, por todo auxílio.

A professora Marcela e Aline, por toda ajuda e disponibilidade.

Aos professores e funcionários do Setor de Sementes, por todo conhecimento transmitido que muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de pós-graduação em Fitotecnia, pela minha formação profissional e oportunidade.

Aos amigos em especial, Édila, Izabel, Viviane, Noêmia, Mayara, Camila, Roberta, Érika, pelo apoio, compreensão e por compartilhar comigo as mesmas angústias e alegrias.

Aos amigos da Pós-graduação, Michele, Bárbara, Raquel, Marcela, Ariadne e demais, pelas risadas na salinha.

Aos estagiários do laboratório de sementes, em especial Danielle e Rucyan, pela grande ajuda e amizade.

A todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

O estresse hídrico é um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento da cultura do milho, e o conhecimento de genes relacionados a este estresse em sementes secas e em plântulas pode ser uma importante ferramenta para acelerar o processo de seleção. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar a expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico em sementes e em diferentes tecidos de plântulas de milho em diferentes genótipos. A qualidade inicial das sementes foi avaliada por meio do teste de envelhecimento acelerado. Para as análises proteômicas e transcriptômica, sementes de quatro genótipos tolerantes (91-T, 32-T, 91x75-T, 32x75-T,) e quatro não tolerantes (37-NT, 57-NT, 37x57-NT e 31x37-NT) previamente selecionados quanto à tolerância ao estresse hídrico foram semeadas em substrato contendo 70 e 10% de capacidade de retenção de água no solo, caracterizando condição sem e com estresse respectivamente. A expressão gênica foi avaliada em semente seca, parte aérea e raiz de plântulas submetidas ou não ao estresse. Foi avaliada a expressão das enzimas Catalase (CAT), Peroxidase (PO), Superóxido dismutase (SOD), Esterase (EST), e das proteínas resistentes ao calor (PRC), por meio de eletroforese, e também a expressão dos genes associados à tolerância à seca, *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmPP2C*, *ZmCPK11*, *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmDREB2.7*, *ZmDBP3*, *ZmAN13* e *cAPX*, pela técnica de qRT-PCR. A expressão da CAT, PO, SOD, EST e PRC variaram entre os genótipos avaliados e também em sementes, raiz e parte aérea de plântulas de milho. Maior expressão das enzimas CAT e SOD foram observadas em linhagens, e ainda maior expressão da CAT na parte aérea de plântulas de híbridos de milho. A expressão da enzima PO foi maior na parte aérea quando comparada à da raiz sob condição de estresse. Houve maior expressão da enzima EST nos genótipos classificados como intolerantes ao estresse hídrico. As PRC se expressaram apenas em sementes. A expressão dos genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmPP2C*, *ZmCPK11*, *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmDBP3*, *ZmAN13* e *cAPX*, variaram entre os genótipos avaliados e também em sementes, raiz e parte aérea de plântulas de milho. Maior expressão dos genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmCPK11* foram observados na parte aérea de plântulas de milho, classificadas como tolerantes e ainda dos genes *ZmAN13*, *ZmPP2C* e *cAPX*. Houve maior expressão dos genes *ZmAN13* e *ZmDREB2A/2.1S* em raízes sob condição de estresse.

Palavras-chave: *Zea mays*. Expressão gênica. Estresse hídrico.

## ABSTRACT

Water stress is one of the limiting factors for the development of corn, and the knowledge of genes related to this stress in dry seeds and seedlings can be an important tool to accelerate the selection process. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression of genes related to tolerance to water stress in different tissues and seeds of corn in different genotypes. The initial quality of the seeds were evaluated by the accelerated aging test. For proteomic and transcriptomic analyzes, seeds from four tolerant genotypes (91-T, 32-T, 91x75-T, 32x75-T,) and four non-tolerant (37-NT, 57-NT, 37x57-NT and 31x37-NT) previously selected for tolerance to drought stress were sown in substrate containing 70% and 10% of soil water retention capacity, characterized without and with stress respectively. Was evaluated the expression in dry seed, shoot and root seedlings under stress or not. The expression of catalase (CAT), horseradish peroxidase (PO), superoxide dismutase (SOD), esterase (EST), and heat-resistant protein (CRP), were evaluated by electrophoresis, as well as the expression of genes associated with drought tolerance, *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmPP2C*, *ZmCPK11*, *ZmDREB2A/2.1s*, *ZmDREB2.7*, *ZmDBP3*, *ZmAN13* and *cAPX* by qRT-PCR. Expression of CAT, PO, SOD, EST and PRC differed between genotypes and in seeds, roots and shoots of corn seedlings. Increased expression of the enzymes SOD and CAT were observed in inbred lines, and even greater expression of CAT in shoots of seedlings of corn hybrids. The expression of the enzyme PO was higher in the shoot when compared to the root under stress condition. There was a higher expression of the enzyme in EST genotypes classified as intolerant to water stress. The PRC is expressed only in seeds. The expression of genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmPP2C*, *ZmCPK11*, *ZmDREB2A/2.1s*, *ZmDBP3*, *ZmAN13* and *cAPX* differed between genotypes and in seeds, roots and shoots of corn seedlings. Greater expression of genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmCPK11* were observed in the shoots of corn plants, classified as tolerant and even the genes *ZmAN13*, *ZmPP2C* and *cAPX*. There was a greater expression of the genes *ZmAN13* *ZmDREB2A/2.1S* in roots under stress condition.

Keywords: *Zea mays*. Gene expression. Water stress.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Cultura do milho.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Estresse hídrico.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4</b>	<b>Expressão de genes relacionados ao estresse à seca.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Expressão de genes em diferentes tecidos da plântula e semente ....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Localização.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Seleção de linhagens e híbridos de milho contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Determinação da qualidade inicial das sementes.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Avaliações da qualidade fisiológica de sementes e características de plântulas em condições contrastantes quanto ao estresse hídrico ...</b>	<b>30</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Emergência e índice de velocidade de emergência (IVE).....</b>	<b>30</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Avaliação do comprimento da parte aérea e da raiz.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Procedimentos estatísticos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5</b>	<b>Análises proteômicas.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Análise das enzimas CAT, SOD, PO, e EST por meio da técnica de eletroforese.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Análise de proteínas resistentes ao calor.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise da expressão de transcritos por meio da técnica de qRT-PCR.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Extração e Purificação do RNA.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Transcrição reversa para síntese do cDNA.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Desenho dos primers.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Análise dos resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Qualidade inicial das sementes.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Qualidade fisiológica e características de plântulas.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Expressão das enzimas SOD, CAT, EST, PO e da proteína resistente ao calor em diferentes tecidos da plântula e semente de milho.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Expressão de genes em diferentes tecidos de plântulas e semente de milho.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil tem sido observado o aumento da área cultivada com milho na segunda safra. Nesta condição é comum a incidência de estresse hídrico o que implica em alterações do desenvolvimento de plântulas e plantas e na redução da produção de grãos. Também em cultivos de verão tem sido verificado estresse hídrico em várias regiões produtoras de grãos de milho com reflexos diretos na produção.

Há vários relatos de que a seca é o principal fator responsável por perdas na produção agrícola brasileira (FARIAS et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2001). Neste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de cultivares que apresentam tolerância à seca, uma vez que a disponibilidade de água interfere, de maneira geral, no desenvolvimento e crescimento de plantas, germinação das sementes, nos processos de fotossíntese e respiração, translocação de fotoassimilados, nos processos de macroesporogênese e microesporogênese, desenvolvimento de sementes e grãos, maturação de sementes e grãos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No entanto, tem sido observado que os mecanismos envolvidos na tolerância à seca são complexos. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, a exemplo dos associados à tolerância ao estresse hídrico.

Estes estudos auxiliam na identificação e compreensão dos mecanismos de tolerância ao estresse hídrico que são fundamentais para o desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento. Genótipos que diferem em tolerância ao estresse hídrico devem apresentar diferenças quantitativas na expressão de genes associados a esta característica.

Diversos trabalhos foram realizados visando relacionar a expressão de certos genes à tolerância ao estresse hídrico (ONETO et al 2016, LIU et al. 2013; ZHOU et al., 2012; HU et al., 2010; LIU et al., 2013; XUAN, 2011; CAVERZAN et al., 2012; KOUSSEVITZKI et al., 2008; WANG et al., 2009). Sabe-se que em resposta ao estresse hídrico ocorre a expressão de genes que conferem às plantas melhor adaptação a esta condição. Os genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmPP2C*, *ZmCPK11*, *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmDBP3*, *ZmAN13* e *cAPX* têm sido estudados para esta característica (LIU et al. 2013; ZHOU et al., 2012; HU et al., 2010; LIU et al., 2013; XUAN, 2011; CAVERZAN et al., 2012; KOUSSEVITZKI et al., 2008; WANG et al., 2009).

Embora avanços tenham ocorrido em relação à identificação de genes associados à tolerância à seca, pouco se conhece sobre a expressão destes em sementes e plântulas de milho. Diante disso, o objetivo neste trabalho foi estudar a expressão de genes relacionados ao estresse causado pelo estresse hídrico em sementes e tecidos de plântulas de milho por meio de análises proteômica e transcriptômica.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Cultura do milho**

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo. A cultura está disseminada numa ampla região do planeta, em altitudes que vão desde o nível do mar até três mil metros. (MAGALHÃES et al., 2002; LERAYER, 2009). Este cereal é plantado em todos os estados brasileiros e em todos os tipos e finalidades de propriedades rurais, da agricultura familiar à produção em larga escala, visando à exportação (VILARINHO, 2010).

Na maioria das propriedades agrícolas a cultura do milho é explorada, desde a pequena propriedade rural, onde é produzido com baixa tecnologia para subsistência, tornando-se alimento básico da população, até em grandes áreas, com emprego de alta tecnologia e com elevada produtividade, sendo matéria prima destinada para a agroindústria (SILOTO, 2002).

A cultura do milho possui uma elevada diversificação de usos como para a fabricação de óleos, xaropes e margarina, até a produção de farinha (CANCELLIER et al 2011). É ainda o principal macro ingrediente para a produção de rações (MÔRO; FRITSCHÉ 2015). Dada a importância da competitividade do mercado brasileiro de carnes, a produção do grão tem aumentado gradativamente, especialmente na segunda safra.

A produção estimada de milho para a safra 2015/2016 é de cerca de 76 milhões de toneladas em uma área plantada de 15,7 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016). A taxa de utilização de sementes é de aproximadamente 90% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2014), valor considerado alto quando comparado ao observado em outras espécies.

No Brasil, o processo de desenvolvimento de novas cultivares de milho é dinâmico. Nesta cultura tem sido observado o maior número de cultivares registradas para a comercialização de sementes, com reflexos diretos no aumento da produtividade de grãos. Segundo a Embrapa na safra 2015/16, foram disponibilizadas 477 cultivares de milho, sendo 193 cultivares convencionais e 284 cultivares transgênicas, sendo a maioria de híbridos simples (CRUZ et al., 2016).

Esse novo cenário de investimentos em tecnologias de produção de sementes é prioritário nas empresas, por ser a semente o veículo de toda tecnologia gerada seja nos programas de melhoramento convencional ou utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Isso faz com que as empresas produtoras de sementes adotem, muitas vezes, padrões de qualidade mais rígidos do que os estabelecidos por órgãos oficiais (GOMES et al., 2000), visando garantir a comercialização de sementes com alta qualidade associados a sistemas produtivos rentáveis.

O cultivo de milho tem sido realizado em grande parte do território nacional, em diversos níveis de tecnologia e investimento e em duas épocas de semeadura (PEREIRA FILHO et al., 2011). A semeadura de verão, ou primeira safra, é realizada na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste (no Nordeste, esse período ocorre no início do ano). A safrinha, ou segunda safra, refere-se ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente, em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais. O cultivo do milho na época da safrinha tem menor potencial de produtividade, o ciclo da cultura geralmente é maior (SHIOGA et al., 2011) e os riscos aumentam em razão do menor índice pluviométrico e temperaturas mais baixas, existentes nesta época (VON PINHO et al., 2002),

especialmente para a região Sul. Na região Centro Oeste o principal fator é a seca, o que torna o componente climático o fator mais limitante ao desenvolvimento e reprodução da cultura.

## **2.2 Estresse hídrico**

A produtividade das culturas e até mesmo restrição do cultivo de determinada espécie, podem ser afetadas por vários tipos de estresse como a alta e baixa temperatura, a salinidade e a restrição hídrica, pois qualquer fator de influência externa, biótico ou abiótico, que causa danos à planta, pode ser considerado um estresse, (TAIZ; ZEIGER, 2009; SONG et al., 2005).

A adaptação às condições de estresse, como a seca, resulta de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, envolvendo modificações morfoanatômicas, celulares e moleculares (NOGUEIRA et al., 2005).

A tolerância das plantas à seca é uma característica em que mecanismos trabalham isoladamente ou em conjunto para evitar ou tolerar períodos de estresse hídrico. Plantas que mostram crescimento continuado ou melhorado sob condições hídricas limitadas são consideradas tolerantes à seca.

Como existe variabilidade na adaptação à seca entre espécies e dentro da espécie, deve-se avaliar o comportamento de diferentes materiais genéticos, em condições de seca, para a recomendação de cultivo (BLUM, 1996). O milho tem significativa sensibilidade aos estímulos ambientais (interação genótipo x ambiente), o que dificulta a identificação de cultivares realmente adaptadas de acordo com o genótipo (STORCK et al., 2014).

Todas as mudanças fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento em plantas têm uma base molecular/genética (TEIXEIRA et al. 2008). Em resposta à incidência de um determinado estresse, uma série de eventos acontece nas

plantas, o qual se inicia pela percepção desse estresse e finaliza com a expressão de um conjunto de genes-alvo, por meio de rotas e componentes comuns em resposta ao estresse, conferindo a essas plantas uma adaptação a essa determinada condição adversa (PASTORI; FOYER, 2002).

Embora seja sabido que cada espécie vegetal possua um padrão de desenvolvimento instituído, ou seja, de acordo com seu genótipo, os fatores abióticos possuem expressiva influência, atuando sobre os genes e modificando a sua expressão em múltiplos sentidos (RIZZINI, 1997). A expressão de genes em genótipos tolerantes ao estresse hídrico pode ser usada no estudo de mecanismos de tolerância este fator e para identificar outros genótipos com características similares.

O estresse hídrico é uma consequência para as plantas não irrigadas e uma variedade de mecanismos evoluiu para regular a perda de água, manter a pressão de turgescência, e reduzir a transpiração (CHAI et al., 2016). Assim, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais para o desenvolvimento de novas cultivares comerciais mais tolerantes o estresse hídrico. A expressão de genes em genótipos tolerantes a seca pode ser usada em estudos relacionados aos mecanismos de tolerância à seca e para identificar outros genótipos com características similares.

A seca é um importante fator de estresse ambiental que afeta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas (RIBAUT et al., 2012). De modo geral, as respostas das plantas à seca variam de acordo com a espécie e com a intensidade e duração do estresse, do genótipo, do estágio de desenvolvimento e da natureza do estresse, podendo se manifestar em níveis morfológicos, fisiológicos e moleculares (KRAMER, 1983; WANGXIA et al., 2003).

No plantio de milho na segunda safra a ocorrência de estresse hídrico é um fato relevante e as plantas sofrem consequências na germinação, no

desenvolvimento, no florescimento e ainda interfere na produção de grãos e sementes. Segundo o levantamento feito pela Conab (2016), vários problemas podem ser causados pela falta de chuva durante a segunda safra, tais como: germinação de sementes no sudeste do PA, leste de TO, sul do MA, sudoeste do PI, oeste da BA, regiões pontuais do noroeste e leste de MG, norte de MG, regiões pontuais do norte, centro e leste de GO; desenvolvimento vegetativo no sudeste do PA, regiões pontuais do noroeste e leste de MG, norte de MG, regiões pontuais do norte, centro e leste de GO.

A água desempenha um papel fundamental na vida vegetal. De todos os recursos que as plantas precisam para crescer e desenvolver, a água é o mais abundante e, muitas vezes o mais limitante. Nas plantas a água é responsável por diversas reações metabólicas.

A restrição hídrica no solo reduz a germinação e o desenvolvimento das plântulas em razão da interferência no processo de embebição e de alongamento celular (MARCOS FILHO, 2015), pois é essencial para a retomada de atividades metabólicas da semente após a maturidade. Além disso, sob condições de estresse hídrico, o desenvolvimento inicial das plantas depende da qualidade fisiológica das sementes. A velocidade de germinação também é afetada pelo estresse hídrico. À medida que o teor de água do solo diminui, verifica-se inicialmente a redução da velocidade de germinação e restrições mais severas passam a prejudicar o desenvolvimento das plântulas (MARCOS FILHO, 2015).

Em condições de estresse hídrico, a planta pode sofrer inúmeros sintomas, dentre os quais, a diminuição da área foliar, em consequência da redução da pressão de turgor celular, é uma das primeiras respostas ao estresse. O retardamento da expansão foliar em condições de estresse hídrico é consequência da redução da expansão celular e com isso observa-se aumento do fechamento estomático, menor transpiração, fazendo com que a planta possa suportar essa condição por um tempo maior (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em condições de estresse hídrico, ocorre um acentuado declínio na expansão das folhas, na taxa de crescimento e desenvolvimento da cultura, na altura da planta, na matéria seca e no índice de colheita (SIVAKUMAR; SHAW, 1978; HERRERO; JOHNSON 1981; PANDEY et al, 2000), e pode ocasionar o enrolamento das folhas, com redução do índice de área foliar e da fotossíntese refletindo negativamente na produção de sementes e grãos (JORDAN, 1983). A baixa disponibilidade de água causa redução do crescimento, pela diminuição da expansão e do alongamento celular, devido ao decréscimo da turgescência (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O estresse hídrico moderado também pode afetar o desenvolvimento do sistema radicular. Observa-se também em condições de seca um estímulo no crescimento radicular (PINHEIRO et al., 2005), podendo este ser considerado um mecanismo de aclimatação ou tolerância ao estresse hídrico. O investimento no crescimento de raízes, em detrimento da parte aérea, favorece a exploração de maior área de solo em busca de água, cuja disponibilidade é maior em regiões mais profundas dos solos secos (RODRÍGUEZ-GAMIR et al., 2010).

O estresse hídrico, especialmente sob alta intensidade de luz ou em combinação com outros tipos de estresse, afeta a fotossíntese e aumenta a fotorespiração, alterando a homeostase das células e causando um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) (MILLER et al., 2010). Plantas sob estresse hídrico controlada podem alterar o seu metabolismo e invocar vários mecanismos de defesa como o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (CHAI et al., 2016).

No início do estresse hídrico, pode haver redução de algumas atividades antioxidantes, contribuindo para um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS são formadas como subproduto do metabolismo aeróbico e participam de uma sofisticada rede de vias de sinalização em plantas, em resposta a situações de estresse. (BARBOSA et al., 2014). EROS são altamente

tóxicas para células de plantas e, na ausência de qualquer mecanismo de proteção, podem reagir com proteínas, lípidos e DNA, podendo inativar um sistema de defesa antioxidante (EL-SHABRAWI et al. 2010). As plantas têm vias enzimáticas e não enzimáticas de eliminação ou sistemas de desintoxicação que trabalhando juntos funcionam como um sistema extremamente eficiente para combater os efeitos deletérios de EROs (YAO et al 2009;. HOSSAIN et al 2010).

A capacidade antioxidante resulta da habilidade das plantas de desintoxicar espécies reativas a oxigênio (EROs) como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $OH\cdot$ ) e oxigênio "singlet" ( $^1O_2$ ), os quais são gerados normalmente pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, porém aumentam durante a seca devido a danos no aparato fotossintético. A eliminação de EROs é realizada por compostos antioxidantes como a glutatona reduzida (GSH), ascorbato (AsA), tocoferol, vitaminas e pigmentos carotenóides, os quais agem em conjunto com as enzimas antioxidantes superoxidase dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (GRATÃO et al., 2005). Em plantas sob estresse hídrico, observa-se um aumento da atividade dessas enzimas relacionado ao aumento na tolerância à seca (XIONG, et al. 2002).

Segundo Dwivedi et al., (2016), a expressão das enzimas antioxidantes pode ser avaliada em diferentes estádios do desenvolvimento da planta de milho, submetidos ao estresse hídrico, auxiliando no desenvolvimento e na escolha de híbridos de milho tolerantes ao estresse.

A CAT é uma enzima comumente encontrada nos organismos, está presente em glioxissomos e peroxissomos (WILLEKENS et al., 1995), juntamente com as peroxidases, é responsável pela conversão do  $H_2O_2$  em  $O_2$ . A expressão da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de  $H_2O_2$ , por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de

EROs, especialmente em condições de estresse severo, quando há altos níveis de  $H_2O_2$  (DUBEY, 2011). Noctor e Foyer (1998) afirmam que a catalase possui baixa afinidade pelo substrato ( $H_2O_2$ ), porém apresentam alta atividade catalítica. Apesar disso, o papel da CAT na proteção oxidativa é extremamente importante, por estar localizada em pontos estratégicos da célula como os glioxissomos, em sementes, em que ocorre a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e a produção do  $H_2O_2$ .

Algumas peroxidases são constitutivamente expressas, existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares. Além de participarem juntamente com as catalases do sistema antioxidativo elas também usam o  $H_2O_2$  e compostos fenólicos como doadores de elétrons para outros sistemas (LOCATO et al., 2010).

A SOD é considerada a primeira enzima no processo de defesa antioxidante. Ela atua anulando a ação dos superóxidos ( $O_2^-$ ), catalisando sua conversão a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é um composto menos reativo (CARNEIRO et al., 2011). O aumento na atividade da SOD é conhecido por conferir tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007).

A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólises de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios de membrana (SANTOS et al., 2005). A esterase é um dos sistemas isoenzimáticos mais polimórficos em plantas. Atua em reações de hidrólise de ésteres e, portanto, atua diretamente no metabolismo de lipídios (MERTZ et al., 2009).

As proteínas resistentes ao calor são hidrofílicas e abundantes, extraídas em condições de altas temperaturas, e são armazenadas nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes. Segundo Boucher et al. (2010) uma característica importante da sobrevivência no estado seco é a capacidade de proteger as membranas em fase de transição, impedindo a perda de integridade.

Estas proteínas possuem importante papel protegendo as células no processo de deterioração.

Pelo exposto observa-se que há diferentes formas de adaptação de plantas às condições de estresse hídrico. Uma estratégia é a expressão de um conjunto de genes que conferem tolerância nestas condições.

#### **2.4 Expressão de genes relacionados ao estresse à seca**

A expressão gênica é um processo pelo qual a informação contida em um gene é traduzido em estruturas presentes em um determinado tipo celular (mRNA ou proteínas). Em organismos multicelulares a expressão gênica controlada regula um programa genético fundamental para o desenvolvimento embrionário e a diferenciação do indivíduo. Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica.

A tradução de genes pode ser estudada em nível proteico e também de transcritos das células. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN et al., 2001).

A resposta das plantas ao estresse hídrico é muito complexa e envolve a expressão de muitos genes e caminhos para diversos mecanismos e interações com os ambientes. Os níveis de moléculas osmoprotetoras geralmente aumentam durante o estresse. De maneira geral, os produtos gênicos induzidos pelo estresse podem ser classificados em três grandes grupos:

- 1) aqueles que protegem a planta contra os estresses ambientais: incluem as proteínas que funcionam protegendo as células da desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores tais como

prolina e betaínas, proteínas LEA (“*late embryogenesis abundant*”), chaperonas e enzimas detoxificadoras. Vários genes codificam enzimas envolvidas na biossíntese dessas moléculas já foram isolados, como colina desidrogenase e colina oxidase (síntese de glicina betaína), manitol-1-fosfato desidrogenase (síntese de manitol); trehalose-6-fosfato desidrogenase (síntese de trehalose); e D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (síntese de prolina). Genes que codificam enzimas que sintetizam moléculas osmoprotetoras podem ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas com maior tolerância a estresses abióticos (SERRAJ; SINCLAIR, 2002; MOLINARI et al., 2004);

2) aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses: estão as proteínas quinases e fatores de transcrição envolvidos na transdução de sinais que desempenham papel fundamental na resposta da planta ao estresse (SEKI et al., 2002). Até o momento foram descritas quatro vias de transdução de sinais envolvidas na resposta da planta ao estresse hídrico, sendo duas vias ABA dependentes (I e II) e as outras duas ABA não dependentes (III e IV) (; SEKI et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005);

3) e genes de funções desconhecidas (SEKI et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). O hormônio Acido Abiscisico (ABA) é conhecido por mediar respostas das plantas em condição de diversos estresses ambientais, tais como seca, frio, calor e salinidade. O acúmulo de ABA nas células de plantas sob estresse hídrico estimula o fechamento dos estômatos e regula a expressão de vários genes, aumentando a capacidade das plantas em suportar as condições de estresse (CUTLER et al., 2010; DING 2013).

Em nível celular, alterações na expressão de determinados genes induzem alterações metabólicas em resposta ao estresse. Um dos elementos que participam dessa resposta são as proteínas resistentes ao calor. Sob condições de

estresse hídrico, as plantas acumulam uma série de proteínas, tais como as LEAs proteínas (late embryogenesis abundant proteins) e proteínas *heat shock*, (MIN et al., 2012).

As LEAS proteínas têm sido amplamente estudadas e relatadas como participantes em vários processos de desenvolvimento e acumuladas em resposta a estresses tais como: seca, salinidade, baixas temperaturas ou tratamento com o fitohormônio ABA (SHAO et al, 2005).

O gene *ZmLEA3* que se expressa em condições de estresse biótico e abiótico também é importante e é pertencente ao grupo LEA 3 do milho (LIU et al. 2013) e de acordo com os autores, uma superexpressão desse gene em tabaco resultou em um aumento da tolerância ao estresse osmótico e oxidativo.

Estresses ambientais podem dar origem a diversos compostos tóxicos para as plantas, como no caso dos aldeídos, os quais podem ser quimicamente reativos e tóxicos em altas concentrações (ZHOU et al., 2012). Para reverter esse processo, a enzima Aldeído Desidrogenase (ALDH) pode desintoxicar os aldeídos por oxidação de seus ácidos carboxílicos correspondentes. Em milho, 28 genes de *ZmALDHs* foram identificados e estudados sob várias condições de estresse. Dentre os genes identificados, *ZmALDH9*, *ZmALDH13* e *ZmALDH17* estavam envolvidos com o estresse hídrico (ZHOU et al., 2012).

A transdução de sinais celulares nas plantas, especialmente as proteínas de fosforilação e desfosforilação desempenham importante papel nos processos de mudanças fisiológicas e metabólicas quando expostas a um determinado tipo de estresse. As proteínas fosfatases, por exemplo, exercem uma função chave na modulação e reversibilidade desses mecanismos regulatórios e podem ser divididas em dois tipos, proteína tirosina fosfatase e proteína serina/treonina fosfatase. Essa última pode ainda ser classificada em tipo 1 (PP1), tipo 2A (PP2A), tipo 2B (PP2B), e tipo 2C (PP2C) (HU et al., 2010). A proteína do tipo 2C fosfatase (PP2C) tem sido bastante estudada ultimamente como sinalizadora

de estresses abióticos em plantas. Em milho poucos genes dessa proteína já foram identificados, como o *ZmPP2C*, o qual é altamente expresso em raízes e em brotos estiolados.

Em condições de estresse por frio, foi observada em plantas de *Arabidopsis* com superexpressão do gene *ZmPP2C*, alta taxa e velocidade de germinação, alta atividade de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase. Assim, de acordo com os autores, o gene *ZmPP2C* pode atuar como um regulador positivo na resistência a estresse abióticos. (HU et al., 2010). Em outro estudo (LIU et al. 2009), a superexpressão do gene *ZmPP2C* também em plantas de *Arabidopsis* expostas o estresse hídrico e salino, diminuiu significativamente a inibição por ABA na germinação das sementes e no crescimento das raízes das plantas transgênicas. Com esses resultados, os autores concluíram que esse gene está envolvido na transdução de sinais em plantas sobre estresse.

Em diversos estudos tem sido observado que o aumento da tolerância ao estresse hídrico por intermédio do ABA está associado com a indução de diferentes sistemas de defesa antioxidantes, tais como as enzimas escavengers (SOD, POX, CAT) e antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, glutatona e carotenoides (DING et al., 2013). O hormônio ABA ainda induz a atuação de vários componentes importantes na defesa antioxidante, como Cálcio ( $Ca^{2+}$ ), calmodulina, proteína quinase ativada por nitrogênio (MAPK) e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CCaMK).

A maioria dos genes responsivos ao estresse é regulado por ABA, porém existem alguns genes que não são, indicando a existência de diferentes mecanismos moleculares reguladores na expressão de genes responsivos aos estresses, um ABA-Dependente e outro ABA-Independente.

Na via independente de ABA, foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de fatores de transcrição conhecida como DREB (Dehydration

Responsive Element Binding protein – Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação). O gene DREB, codifica para uma proteína regulatória, a proteína DREB, a qual é um fator de transcrição que está envolvido na ativação de outros genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico.

Por participarem de etapas iniciais do processo de percepção e sinalização, os fatores de transcrição acabam regulando a expressão de vários grupos de genes. Isto torna interessante o uso de fatores de transcrição em trabalhos de engenharia genética onde se busca aprimorar características de tolerância a estresses como seca, salinidade, congelamento, entre outros.

As proteínas DREB atuam no topo da cascata de eventos moleculares, induzindo respostas de defesa contra a desidratação celular. Genes homólogos a essa família tem sido identificados em canola, cevada, trigo, arroz (OsDREB1A, OsDREB1B, OsDREB1C, OsDREB1D e OsDREB2A), soja (GmDREBa, GmDREBb e GmDREBc, GmDREB2A) e milho (ZmDREB1A e ZmDREB2A).

A proteína DREB1A atua como um fator de transcrição e possui em sua estrutura o domínio ERF/AP2 (ethylene responsive factor – fator responsivo ao etileno/APETALA) que interage especificamente com uma região conservada denominada DRE (Dehydration Responsive Element - elemento responsivo à desidratação), um elemento cis-atuante presente na região promotora de vários genes ativados durante condições de seca (MARUYAMA et al., 2009).

As respostas ascorbato peroxidase (APX) está directamente envolvido na protecção de células de plantas contra as condições ambientais adversas. Além disso, em plantas mutantes com gene APX houve alterações no crescimento, fisiologia e metabolismo antioxidante revelando as enzimas envolvimento no desenvolvimento normal da planta.

As diferentes isoformas da APX são classificados de acordo com sua localização subcelular: isoformas solúveis são encontradas no citossol (cAPX),

mitocôndria (mitAPX) e estroma do cloroplasto (sAPX), enquanto que as isoformas ligadas à membrana são encontrados em microcorpo (incluindo peroxissoma e glioxissomo) (MapX) e tilacóides de cloroplastos (tAPX). (CAVERZAN et al., 2012).

O estresse hídrico imposta em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) discrepantes quanto à tolerância a seca induziu diferentes acúmulos de genes de transcrição para APX. Na cultivar considerada tolerante observou-se que a expressão dos genes de APX nos cloroplastos foi estimulada mais precocemente quando comparada com a variedade suscetível, em condições de estresse hídrico (D'ARCY-LAMETA et al., 2006).

Em níveis relativos de transcritos APX houve mudanças distintas em dois genótipos de trigo submetidas estresse hídrico moderado. Os níveis de expressão *cAPX1* aumentaram em ambos os genótipos, enquanto *cAPX2* foi regulada apenas no genótipo tolerante à seca. O gene *cAPX1* pode, assim, desempenhar um papel chave na aclimação das plantas ao estresse, tais como seca e calor combinados (KOUSSEVITZKI et al., 2008).

## **2.5 Expressão de genes em diferentes tecidos da plântula e semente**

De acordo com os trabalhos iniciais na área de expressão, as análises proteômicas em plantas foram divididas em duas categorias: 1) estudo do proteoma específico de determinados órgãos ou tecidos e conseqüente elaboração de mapas proteômicos de referência e; 2) análise proteômica comparativa de diferentes proteomas (ROSE et al., 2004). Este último ainda pode ser dividido de acordo com o objetivo do estudo em: 1) avaliação entre diferentes genótipos; 2) avaliação da influência da aplicação de sinais no metabolismo vegetal, como por exemplo, a adição ou supressão de reguladores

de crescimento e; 3) comparação entre diferentes tecidos e/ou estádios de desenvolvimento vegetal.

Os tecidos vegetais possuem significativa quantidade de água e baixa relação proteína/matéria fresca, além de possuir substâncias que interferem na análise protéica, como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenóides, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos. Após a extração, geralmente as proteínas são precipitadas em soluções salinas, tamponantes e/ou solventes orgânicos, visando à eliminação da maioria dos interferentes (CARPENTIER et al., 2005).

Todos os tecidos da planta são afetados pelo estresse hídrico, entretanto, a raiz é o primeiro órgão a detectar variações no conteúdo de água disponível no solo. Com a percepção do estresse hídrico, as raízes podem sinalizar para o fechamento dos estômatos, cuja condutância estomática está diretamente relacionada com o status hídrico do solo (LOCY et al. 2006).

Como resposta ao estresse hídrico, o crescimento da raiz primária é estimulado, possivelmente regulado pelo aumento do conteúdo de ABA, que também é relacionado na sinalização entre os tecidos (SHARP et al. 2004). A detecção precoce do estresse hídrico e a transdução de sinal é uma etapa muito importante para a resposta da planta ao estímulo ambiental. Proteínas quinases, fosfatases e calmodulinas (GUO et al. 2002; YOSHIDA et al. 2006) estão diretamente envolvidas neste processo metabólico.

Em resposta ao estresse hídrico, as plantas induzem modificações morfológicas, observadas na parte aérea da planta, e bioquímicas, para proteção contra a dessecação (DACOSTA; HUANG; RACHMILEVITCH, 2006). Assim, para a proteção contra os efeitos do estresse hídrico, vários genes são induzidos: transcritos que codificam para proteínas osmoprotetoras, de detoxificação, de transporte de água e de regulação, além de outros genes (GORANTLA et al. 2007; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007).

Os efeitos do estresse hídrico foram avaliados em raízes (POROYKO et al. 2007) e tecidos reprodutivos de milho (ZHUANG et al. 2007). No estudo com raízes foi observado que as diferentes regiões de crescimento são influenciadas de diferentes maneiras pela seca, e que os genes expressos exercem funções distintas em cada região da raiz, como por exemplo, os genes do metabolismo de defesa prevalentes nas zonas de crescimento opostas ao ápice. De maneira semelhante, os mecanismos de resposta ao estresse hídrico foram diferentes em cada órgão reprodutivo analisado, apresentando apenas um pequeno conjunto de genes expressos em ambos tecidos, os quais estão envolvidos principalmente no metabolismo de açúcares, entre outros processos celulares.

As plantas são constituídas por uma grande família multigenica a qual esta relacionada com as respostas a diversos tipos de estresses abióticos. De acordo com Ding et al, 2013, o gene *ZmCPK11* está claramente envolvido na expressão e atividades de enzimas antioxidantes em folhas de milho.

Em pesquisa realizada por Liu et al., (2013), dezoito genes de milho *ZmDREB1* e *ZmDREB2* foram clonados e analisados para determinar o padrão de expressão gênica em resposta ao estresse hídrico. Esses genes foram renomeados como *ZmDREB1.1* e *ZmDREB2.1*, respectivamente. Os genes do tipo *ZmDREB1* foram altamente expressos em raízes, e outros genes *ZmDREB2* exibiram um baixo nível de expressão em diferentes tecidos na variedade B73 de milho desenvolvidos em condições sem estresse.

A associação entre a variação genética de cada gene *ZmDREB* com tolerância à seca foi avaliada utilizando uma população diversificada de milho que consistia de 368 variedades de regiões tropicais e temperadas. A expressão de todos os genes *ZmDREB* foi examinado experimentalmente em folhas e raízes de plântulas de milho com 3 semanas sob estresse, por análises de PCR quantitativo em tempo real, e uma regulação positiva de todos os genes

*ZmDREB1* foi observada em resposta à desidratação, especialmente nas raízes. A maior resposta gene de desidratação-indutível foi observada em *ZmDREB1.7*, cuja expressão foi regulada positivamente mais do que 400 vezes nas raízes, e 300 vezes nas folhas, em relação à expressão sob condições de crescimento normais. Entre os genes *ZmDREB2*, o gene *ZmDREB2.8* exibiu a maior resposta de desidratação-indutível com cerca de um aumento de 80 vezes na expressão de raiz. No entanto, não foi altamente expresso nas folhas.

Para avaliar a expressão diferencial do gene *AtDREB2A* CA de duas linhagens de soja geneticamente modificada (GM) - P1397 e P2193 - foram analisadas folhas e raízes submetidas a vários tratamentos de desidratação. Em ambas as linhagens de soja GM foram observadas elevada expressão do gene, com os mais altos níveis de expressão durante estresse hídrico, em raízes da linhagem P2193 (ENGELS et al., 2013).

O gene *AtDREB2A* codifica uma proteína em resposta à desidratação celular, uma defesa da planta contra danos causados pela perda de água. Em plantas transgênicas de milho com esse gene, houve maior estabilidade e produção de grãos sob estresse de seca em casa de vegetação. (ALVES et al., 2014).

CBF/DREBs (C-repeat/dehydration-responsive element binding factors) são fatores de transcrição que se ligam a uma região específica presente em diversos genes relacionados com a tolerância ao estresse hídrico. Essa região possui uma sequência conservada -GCCGAC- denominada de CRT/DREs (C-repeat/dehydration-responsive elements).

A superexpressão do gene *ZmDBP3*, membro do subgrupo A1 da família CBF/DREBs, extraído de plântulas de milho aumentou a tolerância ao frio e a seca em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (WANG et al., 2009). A transcrição do gene *ZmDBP2* foi altamente induzida pela seca, e a

superexpressão deste melhora a tolerância ao estresse hídrico em plantas transgênicas de *Arabidopsis*. (WANG; YANG; WANG, 2011).

A caracterização funcional do gene *ZmAN13*, membro da família ZNF-AN1 em plantas de milho foi feita por Xuan (2011), cuja expressão é induzida por um ou vários estresses abióticos. A expressão desse gene foi mais elevada em folha do que em outros órgãos, e é induzida pelo frio e por tratamento de ABA e também sob estresse à seca. Já a superexpressão de *ZmAN13* em *Arabidopsis* apresenta tolerância conferida ao frio, mas causou em linhagens transgênicas mais sensibilidade à seca.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Localização**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Sementes na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### **3.2 Seleção de linhagens e híbridos de milho contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico**

A escolha dos materiais genéticos utilizados nesta pesquisa foi feita após análise do trabalho desenvolvido por Abreu et al., 2016. Foram selecionadas quatro linhagens contrastantes sendo duas linhagens tolerantes (T), 91-T e 32-T, e duas linhagens não tolerantes (NT), 57-NT e 37-NT, ao estresse hídrico. Também foram selecionados quatro híbridos simples, sendo dois híbridos tolerantes, 91x75-T e 32x75-T, e dois híbridos não tolerantes, 37x57-NT e 31x37-NT, ao estresse hídrico.

#### **3.3 Determinação da qualidade inicial das sementes**

A qualidade inicial das sementes das linhagens e dos híbridos selecionados foi avaliada pelo teste do envelhecimento acelerado. O método utilizado foi o de mini câmaras do tipo "gerbox". As sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas, numa temperatura de 41°C, e em seguida foi efetuado o teste de germinação como descrito na RAS - Regras para Análises de Sementes (2009).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas nos dados de porcentagem de plântulas emergidas e avaliadas por meio do software Sisvar (Sistema de Análise de Variâncias) para Windows (FERREIRA, 2000) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

### **3.4 Avaliações da qualidade fisiológica de sementes e características de plântulas em condições contrastantes quanto ao estresse hídrico**

As sementes das linhagens e dos híbridos selecionados foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica de sementes e características de plântulas sob condições com e sem estresse hídrico.

#### **3.4.1 Emergência e índice de velocidade de emergência (IVE)**

As sementes foram semeadas em bandejas de plástico (20 cm x 22 cm x 12 cm) contendo areia como substrato, em quatro repetições de 25 sementes, e foram expostas a duas condições, com estresse e sem estresse. Como forma de imposição do estresse hídrico, a capacidade de retenção de água do substrato foi ajustada para 10% e para a condição sem estresse, controle, 70%. A reposição da água foi feita diariamente, com base no peso inicial de cada bandeja, e colocadas para germinar em câmara de crescimento a 25°C.

A emergência foi avaliada considerando-se o percentual de plântulas emergidas no sétimo dia, após a semeadura.

O índice de velocidade de emergência (IVE) foi realizado avaliando-se o número de plântulas emergidas por dia, realizado em conjunto com o teste de emergência. O IVE foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962).

### **3.4.2 Avaliação do comprimento da parte aérea e da raiz**

A avaliação do comprimento da parte aérea e de raiz foram realizadas em plântulas oriundas do teste de emergência em bandeja nas condições contrastantes quanto à disponibilidade de água, entre as sementes germinadas. Mediram-se os tecidos, parte aérea e raiz, com auxílio de régua graduada. As plântulas foram armazenadas em *deep-freezer* para posterior análise proteômica e transcriptômica.

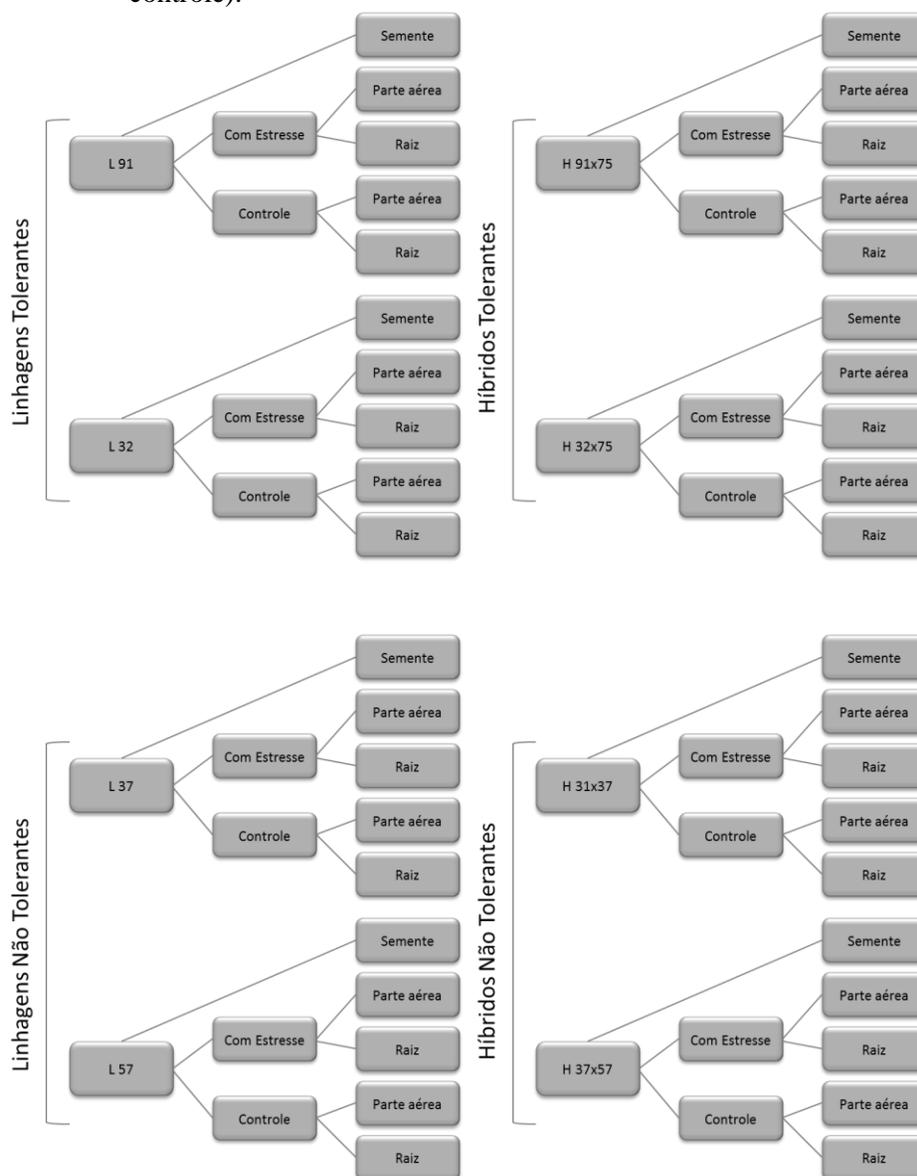
### **3.4.3 Procedimentos estatísticos**

O delineamento experimental utilizado foi esquema fatorial 8x2, sendo oito genótipos e duas condições de disponibilidade hídrica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Sisvar (Sistema de Análise de Variâncias) para Windows (FERREIRA, 2000) e o agrupamento das médias foi feita pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

### **3.5 Análises proteômicas**

Para as análises de proteínas e de transcritos sementes dos oito genótipos foram semeadas substrato contendo 70% e 10% de capacidade de retenção de água no solo, constituindo as condições de controle e estresse, respectivamente. Após sete dias da semeadura, as plântulas foram removidas do substrato, lavadas e separadas em parte aérea e raiz. Os tratamentos utilizados no ensaio foram sementes secas dos oito genótipos selecionados, parte aérea e raiz nas sob as duas condições contrastantes dos oito genótipos, conforme Figura 1.

Figura 1 - Tratamentos utilizados no ensaio: oito genótipos (tolerantes - L91-T, L32-T, H 91x75-T, H 32x75-T, e não tolerantes - L37-T, L57-T, H 31x37-NT e H 37-Tx57-NT), três tecidos (semente seca, parte aérea e raiz) e as plântulas submetidas a duas condições (estresse e controle).



### **3.5.1 Análise das enzimas CAT, SOD, PO, e EST por meio da técnica de eletroforese**

Para a análise da expressão das enzimas catalase, superóxido desmutase, peroxidase, e esterase, as sementes, raiz e parte aérea de plântulas foram trituradas na presença de PVP (Polivinilpirrolidona) e nitrogênio líquido em mortar de porcelana sobre gelo e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de -80°C.

Para a extração das enzimas, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido overnight, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi efetuada a 120 V por 5 horas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados conforme Alfenas et al. (2006), com modificações. Foi realizado ainda a quantificação das enzimas pelo software ImageJ®, em pixel<sup>2</sup> (2016).

### **3.5.2 Análise de proteínas resistentes ao calor**

Para a análise da expressão proteínas resistentes ao calor os embriões das sementes, raiz e parte aérea de plântulas, foram trituradas na presença de

PVP e nitrogênio líquido em mortar de porcelana sobre gelo e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, foi adicionado às amostras, já maceradas, a solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e transferidos para microtubos de capacidade de 1500 $\mu\text{L}$ . Os homogeneizados foram centrifugados a 14000rpm por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante foi incubado em banho-maria a  $85^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet, descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 70 $\mu\text{L}$  de extrato + 40 $\mu\text{L}$  de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50 $\mu\text{L}$  do extrato com proteínas resistentes ao calor + tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006). Foi realizado ainda a quantificação das proteínas pelo software ImageJ®, em pixel<sup>2</sup> (2016).

### **3.6 Análise da expressão de transcritos por meio da técnica de qRT-PCR**

A expressão dos transcritos envolvidos no processo de tolerância ao estresse hídrico por meio da técnica de qRT-PCR foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do RNA, Transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e Análise dos resultados.

### **3.6.1 Extração e Purificação do RNA**

Para a extração do RNA as sementes e as partes das plântulas de milho, parte aérea e raiz, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente Pure Link RNA Plant® (Invitrogen), seguindo as especificações do manual do fabricante.

A integridade e pureza do RNA foram avaliadas em todas as etapas com a utilização da eletroforese em gel de agarose 1,5% (corados com GelRed™ Nucleic Acid Stain, 10,000X in Water) e em espectrofotômetro (BioTek™ Eon™ Microplate Spectrophotometer).

Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com DNaseFree para evitar qualquer contaminação com DNA. Para isso foi utilizado o KitDNase Turbo Free® AMBIOM de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para comprovar a eficiência do tratamento com DNase foi realizada reação de PCR convencional. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA genômico de milho. O primer utilizado foi o correspondente ao gene constitutivo Ubiquitina. Foi preparado um gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo para a visualização das possíveis amplificações.

### **3.6.2 Transcrição reversa para síntese do cDNA**

Após o processo de extração e purificação, os RNAm foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Foi utilizado kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA® da Applied Biosystems, segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio de PCR convencional. Nessa análise foi utilizado como controle positivo a amostra de DNA genômico de milho, e o primer correspondente ao

gene constitutivo Ubiquitina. Foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização das ampliações.

### **3.6.3 Desenho dos primers**

Os genes-alvo foram escolhidos por sua importância conhecida na tolerância ao estresse hídrico na cultura do milho, após revisão bibliográfica.

As sequências dos genes-alvo escolhidos foram encontradas por meio de busca no banco de dados do genoma milho sequenciado no GenBank. Com base nessas sequências foram desenhados os primers utilizando-se o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). As sequências dos *primers* utilizados estão apresentadas na Tabela 1. Como genes de referência foram utilizados os genes da Ubiquitina e ADH. (LIVAK; SCMITTGEN, 2001; SCHOLDBERG et al., 2009).

Tabela 1 - *Primers* utilizados na análise de qRT-PCR.

Gene	Função		Sequência 5'-----3'
<i>ZmLea 3</i>	Biossíntese de osmoprotetores	F	CCACGAGACCACCTACAA CT
		R	CCTTTCTGGAGG AGCAAC
<i>ZmALDH9</i>	Desintoxicar os aldeídos por oxidação de seus ácidos carboxílicos correspondentes	F	CATCTACGTGCAGGAAGG GAT
		R	TTGGCTGACACTCGGGTT G
<i>ZmPP2C</i>	Regulador positivo na resistência a estresses abióticos	F	GGAAGCTCCGATAACATC ACAGT
		R	TCTTTGTGTCGTCGCTGATT TC
<i>ZmCPK11</i>	Expressão e atividades de enzimas antioxidantes	F	CCTCCACGACCCCGACAA TG
		R	ACCTCTCCGAG CACCCCAAC
<i>ZmDREB2 A/2.1S</i>	Proteínas de elemento de ligação que respondem a desidratação	F	GCAGCCCGGAAGGAAGAA
		R	GATGACAGTGCCACTGA CGTA
<i>ZmDBP3</i>	Proteínas de elemento de ligação que respondem a desidratação	F	CATGAGCTGGGATCTATA CTAC
		R	CAAGGTATCAACGTCCTC A
<i>ZmAN13</i>	Função reguladora em resposta ao estresse abiótico	F	AGCTGTTGCCCAAGTCGA GTT
		R	GCTGGGTCCGGCAACAT
<i>cAPX</i>	Expressão e atividades de enzimas antioxidantes	F	TGAGCGACCAGGACATTG
		R	GAGGGCTTTGTCACTTGGT AAGGCCAAGATCCAGGAC
<i>UBI</i>	Gene de referência	F	AA
		R	TTGCTTTCCAGCGAAGAT GA
<i>ADH</i>	Gene de referência	F	AGGACGCTGAGTTAAGAC C
		R	CACATTTGGCAGATCAGT GC

(F) sequência do *primer forward* e (R) sequência do *primer reverse*.

### 3.6.4 Análise dos resultados

Para a análise de expressão dos genes selecionados foi utilizado o aparelho ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), com método de detecção via SYBR Green. Foram utilizadas amostras de cDNA obtidas de semente, parte aérea e raiz de oito genótipos de milho, em duplicatas biológicas. A eficiência dos primers desenhados foi determinada pela curva de diluição por quantificação absoluta.

No ensaio de expressão, em cada reação utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (diluído 1:5), 0,4  $\mu\text{L}$  de primer forward/reverse (10 $\mu\text{M}$ ) e 5  $\mu\text{L}$  de Master MixSYBR green (Applied Biosystems) totalizando um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As amostras foram pipetadas em triplicatas técnicas, e um controle sem cDNA (NTC) foi incluído para cada par de primers. Os resultados foram normalizados usando CTs (Ciclo de threshold) obtidos pela expressão dos genes de referência Ubiquitina (UBI) e Desidrogenase Alcoólica (ADH). O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (threshold cycle, CT). A expressão relativa foi analisada pelo método Pfaffl (2001).

As condições térmicas da reação foram: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C para iniciação, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando-se com 15 minutos a 95°C. Ao fim da ciclagem, uma curva de desnaturação de 60-95°C mostrou a especificidade da reação de PCR. Os dados foram coletados, exportados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.1) e analisados em planilha Excel (Microsoft).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Qualidade inicial das sementes

As sementes dos genótipos selecionados foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado para a avaliação da qualidade fisiológica inicial. Os resultados permitiram classificar os lotes em dois grupos (Tabela 2). Pode-se observar na Tabela 2 que a linhagem 91-T e os híbridos 91x75-T e 32x75-T se sobressaíram no teste de envelhecimento acelerado. Esses genótipos foram selecionados como tolerantes ao estresse hídrico e apresentaram alto vigor.

Tabela 2 - Valores médios de vigor, de sementes de oito genótipos de milho submetidas ao teste de envelhecimento acelerado.

Genótipo	Envelhecimento acelerado
91-T	99 a
32-T	95 b
91x75-T	98 a
32x75-T	99 a
37-NT	91 b
57-NT	93 b
31x37-NT	95 b
37x57-NT	91 b

\*Agrupamento de médias, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

### 4.2 Qualidade fisiológica e características de plântulas

Quanto aos resultados observados para qualidade fisiológica de sementes e características avaliadas em plântulas submetidas à condição estresse e controle, foi observada interação significativa entre os genótipos e as duas condições (controle e estresse) apenas para a característica de comprimento de parte aérea. Para todas as características observou-se diferença significativa para

os genótipos. Não houve diferença significativa entre as condições controle e estresse em relação à emergência de plântulas.

No teste de emergência das plântulas houve efeito significativo, no nível 5% de probabilidade para os genótipos, dividindo-se em dois grupos de médias. Dessa forma, para os quatro híbridos e linhagem 91-T foram observados maiores médias para emergência de plântulas em relação aos demais (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios de emergência de plântulas de oito genótipos de milho sob duas condições: controle e estresse.

Genótipo	Emergência		Média
	Controle	Estresse	
91-T	98	100	99 a
32-T	93	92	93 b
91x75-T	97	96	97 a
32x75-T	99	99	99 a
37-NT	89	98	94 b
57-NT	96	92	94 b
31x37-NT	100	98	99 a
37x57-NT	99	97	98 a

\*Agrupamento de médias, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Em outro estudo, Abreu et al., (2014) observou maior vigor de sementes da linhagem 91-T sob condições de restrição hídrica. Os híbridos por apresentarem heterose, possuem média superior a dos seus parentais, fato este que pode ser observado nos resultados de comprimento de raiz. A heterose pode ser devida à dominância, sobredominância ou outras causas. Gomes et al., (2000) observaram que a heterose também é expressa na qualidade fisiológica das sementes de milho.

Para o índice de velocidade de emergência houve um maior número de plântulas emergidas por dia em condição controle (Tabela 4). Nesta condição não há restrição hídrica e no processo de germinação a água é essencial para a

retomada de atividades metabólicas da semente após a maturidade fisiológica. A velocidade de emergência também é influenciada, e à medida que a umidade do solo diminui, verifica-se inicialmente a redução da velocidade de germinação e restrições mais severas passam a prejudicar a porcentagem de germinação (MARCOS FILHO, 2015). Como observado nos resultados do teste de emergência de plântulas, houve maior vigor em sementes híbridas de milho. Não houve diferença estatística dos valores observados em sementes híbridas e em sementes das linhagens 91-T e 57-NT. Menores valores foram observados em sementes das linhagens 37-NT e 32-T.

Tabela 4 - Valores do índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) de oito genótipos de milho sob duas condições: controle e estresse.

Genótipo	IVE		Média
	Controle	Estresse	
91-T	6,31	4,94	5,62 a
32-T	5,46	4,32	4,89 b
91x75-T	7,05	5,25	6,15 a
32x75-T	7,58	5,33	6,45 a
37-NT	5,68	4,88	5,28 b
57-NT	6,61	4,83	5,72 a
31x37-NT	6,93	5,31	6,12 a
37x57-NT	6,98	4,92	5,95 a
Média	6,588 A	4,97 B	

\*Agrupamento de médias, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Observa-se que os genótipos selecionados tiveram maior média do comprimento de raízes na condição controle (Tabela 5). A restrição hídrica no solo reduz a germinação e o desenvolvimento das plântulas em razão da interferência no processo de embebição das sementes e de alongamento celular (MARCOS FILHO, 2015).

Também foram verificados maiores comprimentos de raízes em plântulas provenientes de sementes dos híbridos 91x75-T e 32x75-T, seguidos dos observados para as linhagens 91-T, 32-T e híbrido 37x57-NT. Menores comprimentos de raízes foram observados em plântulas da linhagem 37-NT. Ressalta-se que os híbridos 91x75-T e 32x75-T, foram classificados anteriormente como tolerantes.

Tabela 5 - Valores médios de comprimento de raiz (cm) de oito genótipos de milho sob duas condições: controle e estresse.

Genótipo	Comprimento de raiz		Média
	Controle	Estresse	
91-T	21,5	15,1	18,3 b
32-T	19,9	15,1	17,5 b
91x75-T	26,8	19,7	23,3 a
32x75-T	26,3	19,6	22,9 a
37-NT	15,6	12,8	14,2 d
57-NT	19,6	12,7	16,1 c
31x37-NT	18,7	14,3	16,5 c
37x57-NT	21,5	16,5	19,0 b
Média	21,2 A	15,7 B	

\*Agrupamento de médias, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados observados para o comprimento da parte aérea de plântulas. Na condição controle para os híbridos tolerantes e responsivos 32x75-T e 91x75-T foram observados os valores de comprimento de parte aérea das plântulas e em plântulas das linhagens 32-T, 37-NT e do híbrido 31x37-NT os menores valores. Já na condição de estresse plântulas da linhagem 32-T e do híbrido 32x75-T apresentaram-se com menos comprimento de parte aérea em relação ao dos demais genótipos. A maioria dos genótipos apresentou média do comprimento de parte aérea maior quando em condição controle, exceto para a linhagem 32-T e o híbrido 31x37-NT. Nesta

linhagem não houve diferença significativa entre os valores de comprimento de parte aérea das plântulas sob condição de estresse e controle. Para o híbrido 32x75-T maior comprimento de parte aérea foi observado em condição de estresse.

Tabela 6 - Valores médios de comprimento de parte aérea (cm) de oito genótipos de milho sob duas condições: controle e estresse.

Genótipo	Parte aérea	
	Controle	Estresse
91-T	15,9 bA	9,3 aB
32-T	12,1 cA	7,2 bA
91x75-T	19,7 aA	10,8 aB
32x75-T	14,1 aB	8,5 bA
37-NT	12,5 cA	8,2 aB
57-NT	15,0 bA	8,1 aB
31x37-NT	11,2 cA	9,8 aA
37x57-NT	15,0 bA	9,6 aB

\*Agrupamento de médias, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

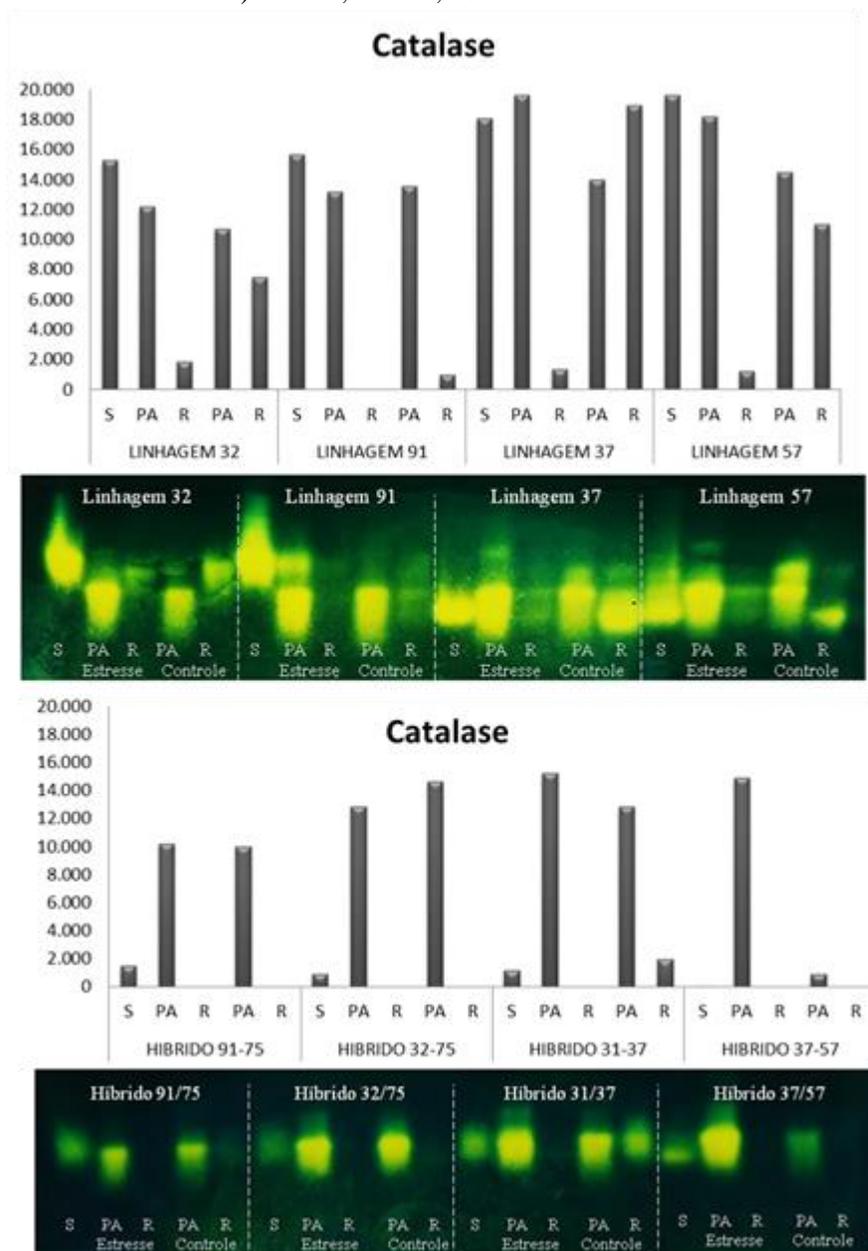
No geral, o desenvolvimento de plântulas foi reduzido em condição de estresse causado pelo estresse hídrico. Em estudos realizados com híbridos de milho, Khodarahmpour (2011) também observou que o estresse hídrico reduziu severamente o crescimento inicial das plântulas. Oliveira et al., (2014) em trabalho com objetivo de avaliar o efeito do estresse hídrico e salino sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de milho doce sob diferentes potenciais osmóticos do substrato, observaram que em condições de estresse, o crescimento da parte aérea demonstra ser mais sensível que o crescimento radicular. Isso também foi observado neste trabalho, pois o crescimento da parte aérea dos diferentes genótipos foi influenciado de forma diferente em cada uma das duas condições.

Ao comparar os resultados observados nos testes de emergência de plântula, IVE, e nas relacionados ao comprimento de raiz e da parte aérea verifica-se, de uma maneira geral, maiores valores de vigor em sementes da linhagem 91-T e do híbrido 91x75-T. A linhagem 91-T tem sido relacionada em algumas pesquisas (ABREU et al., 2014; DUTRA et al., 2015; SILVA NETA et al., 2015) como tolerante às condições de estresse hídrico, temperaturas altas e baixas. No entanto, nesta pesquisa observa-se que o sistema radicular de plântulas é comprometido principalmente em condições de estresse hídrico. Mas em combinação com a linhagem 75-T, híbrido 91x75-T, observou-se valor significativo e superior em relação aos observados na maioria dos genótipos avaliados. Já em sementes da linhagem 32-T observou-se os menores valores e índices de vigor.

#### **4.3 Expressão das enzimas SOD, CAT, EST, PO e da proteína resistente ao calor em diferentes tecidos da plântula e semente de milho**

Na Figura 2, observa-se menor expressão da enzima catalase em raízes das linhagens e híbridos de milho nas duas condições, controle e estresse, com exceção da expressão observada em raízes do híbrido 31x37-NT e da linhagem 37-NT na condição controle. A expressão em raízes foi maior, em condição de estresse, nas quatro linhagens avaliadas. Apenas em raízes do híbrido 31x37-NT houve maior expressão na condição controle. De uma maneira geral, para as sementes híbridas foi observada menor expressão desta enzima quando comparada com as linhagens independente do tecido avaliado.

Figura 1 - Expressão da catalase (CAT) em sementes (S), parte aérea (PA) e raiz (R) de oito genótipos de milho sob duas condições (Estresse e Controle). UFLA, Lavras, 2016.



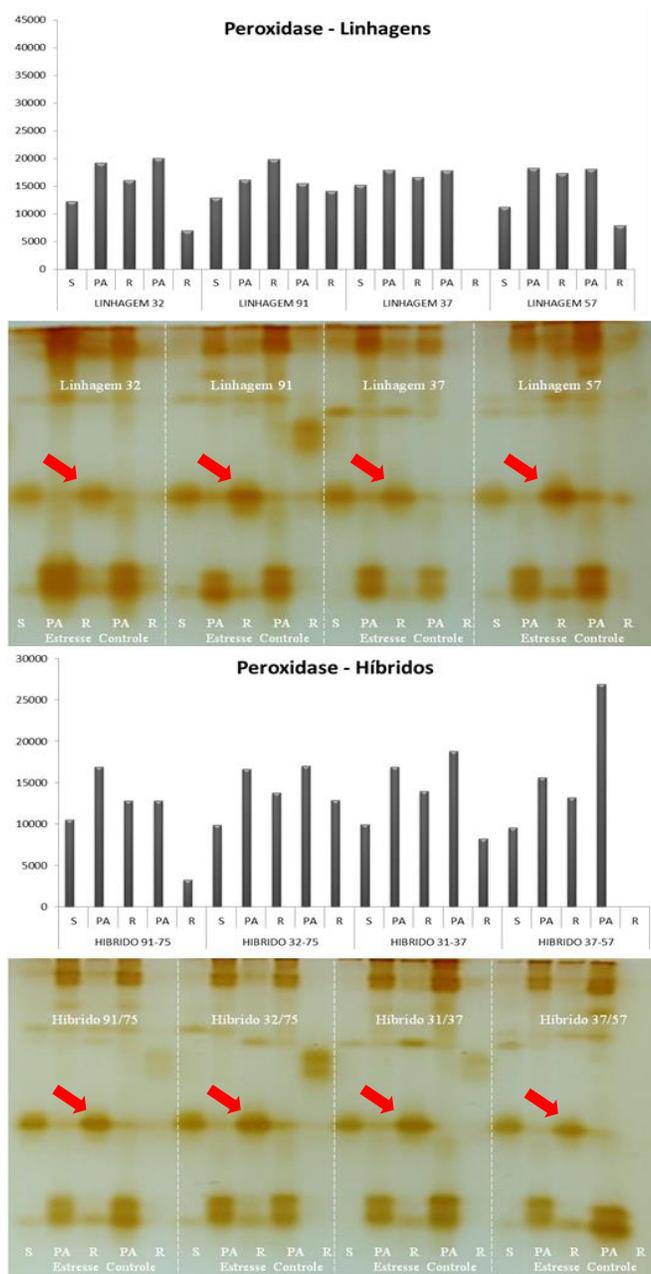
Nas linhagens 32-T, 91-T e 57-NT maior expressão da enzima catalase foi observada em sementes. Também há maior expressão desta enzima na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse hídrico. No entanto, em raízes também submetidas ao estresse hídrico, a expressão foi menor quando comparada à observada no ambiente controle. Já nos genótipos híbridos maior expressão desta enzima foi verificada na parte aérea das plântulas, independentemente de terem sido submetidas ao estresse, ou não. Importante ressaltar que dos oito genótipos avaliados houve aumento da expressão da catalase na parte aérea de plântulas submetidas à condição de estresse em seis destes.

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ), e sua menor atividade pode estar associada à diminuição de mecanismos de prevenção de danos oxidativos (DUTRA, 2014). Por outro lado, tem sido observado em outras pesquisas, em diferentes espécies, aumento da expressão desta enzima sob condições de estresse (VEIGA, 2014).

Ao comparar a expressão da enzima catalase nos diferentes tecidos de todos os genótipos avaliados observa-se menor expressão no genótipo 91x75-T. Nas avaliações relacionadas ao vigor em sementes e plântulas este genótipo mostrou-se promissor, mesmo sob condições de estresse. Outra observação refere-se à expressão relativamente constante desta enzima na parte aérea de plântulas dos genótipos 91-T e 91x75-T, independentemente da condição de estresse.

Assim como a catalase, a peroxidase (PO) age transformando o  $H_2O_2$  em  $O_2$ . Na Figura 3 pode-se observar que a enzima peroxidase se expressa mais na parte aérea de plântulas. Em todos os genótipos foi observada maior expressão da enzima peroxidase em raízes de plântulas sob condição de estresse quando comparada à observada em plântulas em condição controle.

Figura 2 - Expressão da peroxidase (PO) em sementes (S), parte aérea (PA) e raiz (R) de oito genótipos de milho sob duas condições (Estresse e Controle). UFLA, Lavras, 2016.



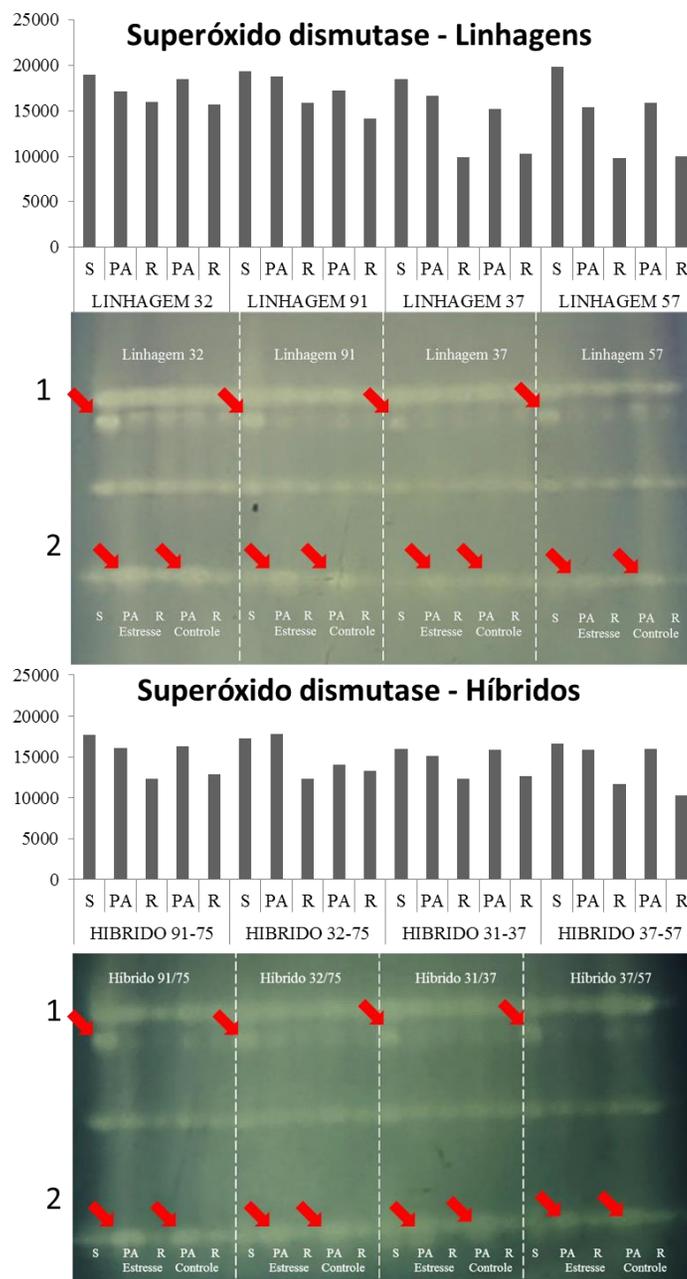
Para todos os genótipos pode ser observada também uma isoforma da enzima, identificada por meio de seta que se expressou mais em raízes sob condição de estresse. Também houve mais expressão desta enzima em raízes de plântulas submetidas ao estresse que em sementes secas.

Com exceção da expressão da enzima peroxidase observada em raízes sob condição de estresse, maior expressão desta enzima foi observada na parte aérea independentemente da capacidade de retenção de água utilizadas. Esse fato pode ser explicado devido maior respiração, que implica em maior produção de radicais livres e conseqüentemente maior ativação dos sistemas antioxidantes, como as enzimas peroxidases. (SILVA NETA, 2014)

A enzima superóxido dismutase atua na primeira linha de defesa contra os radicais livres. O radical superóxido produzido sob condições de estresse é tóxico, tendo uma meia-vida de menos de um segundo e, geralmente, é dismutado de forma rápida pela SOD à  $H_2O_2$ , um produto relativamente estável que pode ser detoxificado por catalases e peroxidases (MORAIS, 2015).

Na Figura 4, observa-se maior expressão da SOD em sementes das linhagens 32-T, 91-T, 37-NT e 57-NT e menor em sementes dos híbridos. A expressão da SOD variou entre os genótipos utilizados. Houve expressão variável desta em sementes, raízes e parte aérea, em função do genótipo utilizado. Algumas isoformas se expressam mais em sementes e outras na parte aérea de plântulas. A isoforma identificada como 1 se expressa em sementes de todos os genótipos e a identificada como 2 na parte aérea de plântulas submetidas à condição de estresse ou não. Entre as quatro linhagens avaliadas, maior expressão desta enzima foi observada nas linhagens 32-T e 91-T, independentemente do tecido avaliado, as quais foram classificadas como tolerante à condição de estresse hídrico.

Figura 4 - Expressão da superóxido dismutase (SOD) em sementes (S), parte aérea (PA) e raiz (R) de oito genótipos de milho sob duas condições (Estresse e Controle). UFLA, Lavras, 2016.

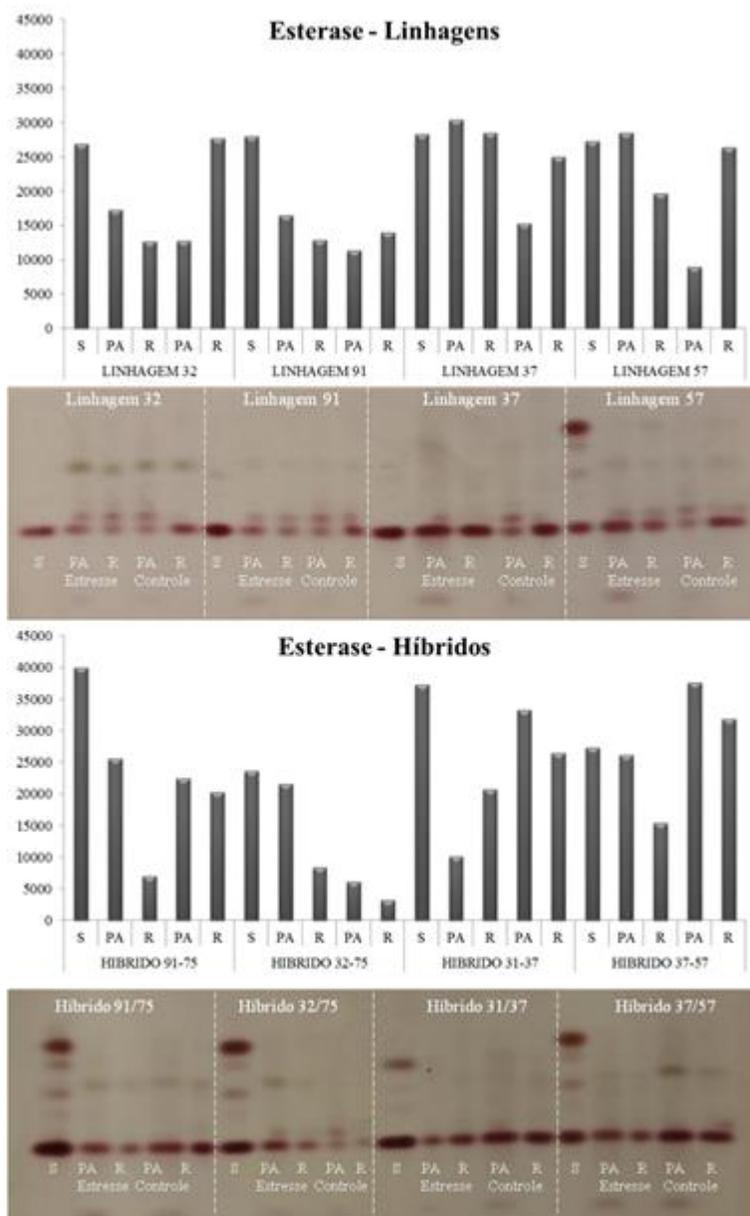


A enzima esterase (EST) é um dos sistemas isoenzimáticos mais polimórficos em plantas. A EST é uma enzima que está envolvida em reações de hidrólise de estéres, a qual está diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios de membrana. Na Figura 5, estão apresentados os padrões isoenzimáticos da enzima esterase para as linhagens e híbridos. Maior expressão foi observada em sementes, para os genótipos 91x75-T, 32x75-T, 31x37-NT, 32-T e 91-T.

Em relação aos genótipos, observa-se, de maneira geral, maior expressão da EST nas plântulas para as linhagens 37-NT e 57-NT e nos híbridos que possuem estas linhagens como parentais (31x37-NT e 37x57-NT). Estes genótipos foram classificados como intolerantes ao estresse hídrico. Menor expressão desta enzima foi observada nas linhagens 32-T e 91-T, independentemente da condição de capacidade de retenção de água no substrato.

Em condições sem estresse, observa-se maior expressão desta enzima em raízes das linhagens e em parte aérea dos híbridos. No entanto, na presença de estresse por estresse hídrico, houve mais expressão da esterase na parte aérea de plântulas, tanto para as linhagens quanto para os híbridos, com exceção do híbrido 31x37-NT, no qual houve maior expressão em raízes, nessas condições.

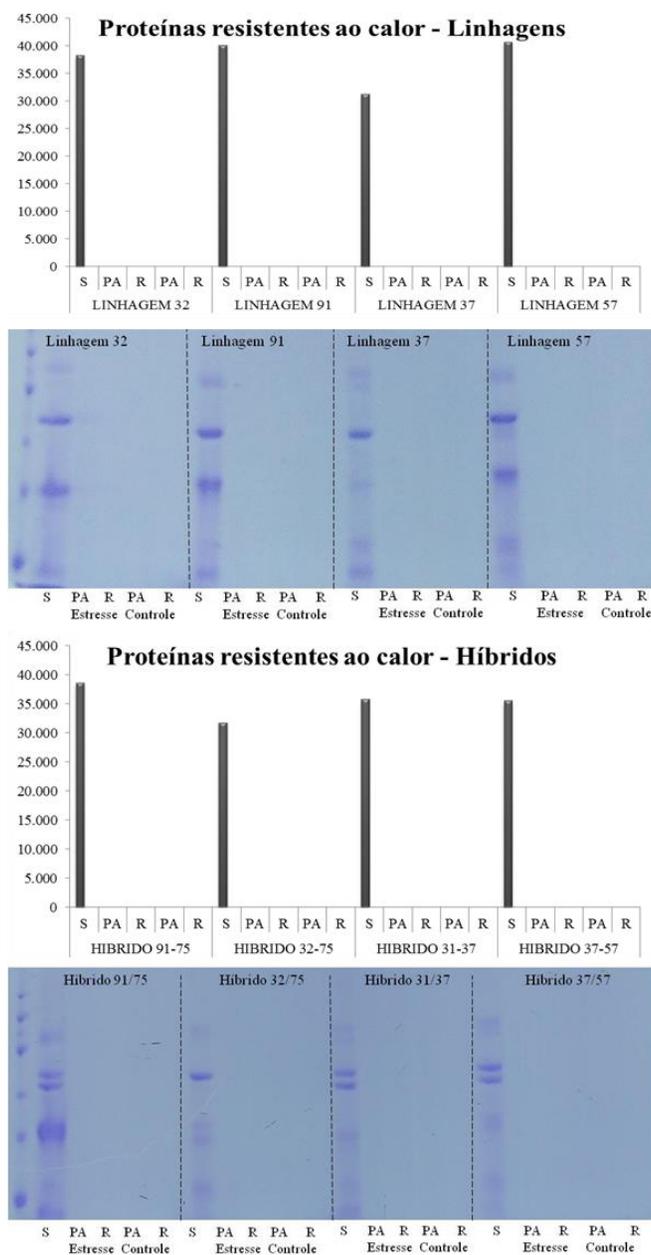
Figura 5 - Expressão da esterase (EST) em sementes (S), parte aérea (PA) e raiz (R) de oito genótipos de milho sob duas condições (Estresse e Controle). UFLA, Lavras, 2016.



Proteínas resistentes ao calor são acumuladas no final da maturidade fisiológica das sementes, e estão envolvidas na tolerância a dessecação. Na Figura 6, observou-se expressão destas proteínas apenas em sementes. Andrade et al., (2013) concluíram que as proteínas resistentes ao calor se expressam diferencialmente nos diferentes genótipos e nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes. Observou ainda que a maior expressão é observada em embriões de sementes de milho. Menor expressão destas proteínas foi observada em sementes da linhagem 37-NT e do híbrido 32x75-T. Houve mais expressão desta proteína em sementes da linhagem 91-T e 57-NT, mas, não muito discrepante da observada em sementes do híbrido 91x75-T e das linhagens 57-NT e 32-T.

Abreu et al. (2016) avaliou a expressão de proteínas resistentes ao calor, sob condições de estresse hídrico durante a germinação de sementes de linhagens de milho contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico e verificou que há diferença na expressão de proteínas resistentes ao calor entre as linhagens discrepantes quanto à tolerância ao estresse hídrico. No mesmo trabalho foi observada maior expressão de proteínas resistentes ao calor é observada em sementes da linhagem 91-T, quando submetida a condições de estresse hídrico por um maior período de embebição.

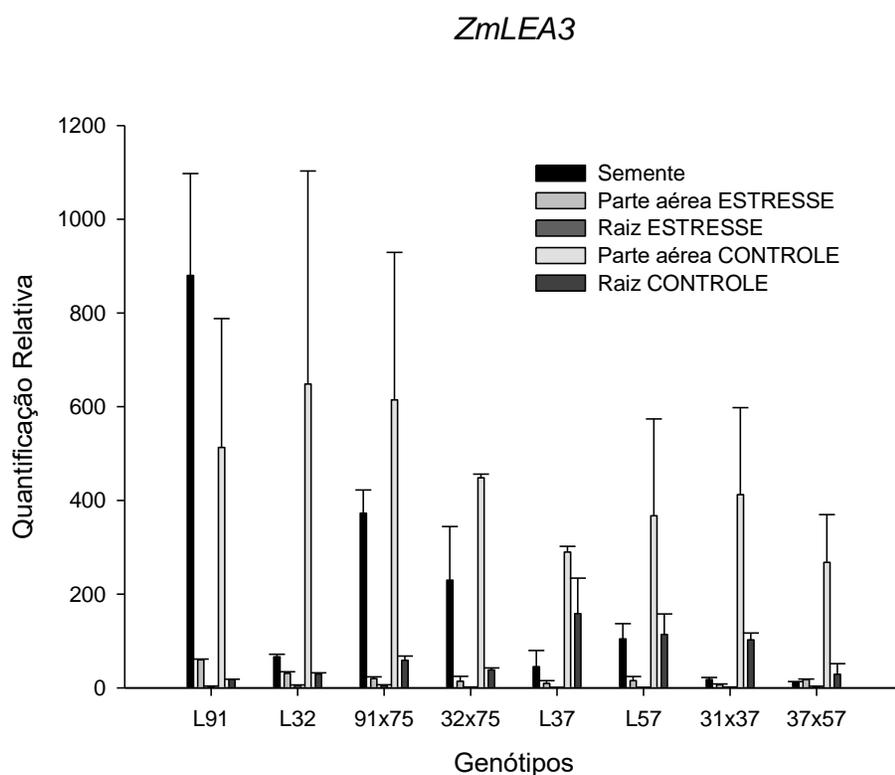
Figura 6 - Expressão das proteínas resistentes ao calor (PRC) em sementes (S), parte aérea (PA) e raiz (R) de oito genótipos de milho sob duas condições (Estresse e Controle). UFLA, Lavras, 2016.



#### 4.4 Expressão de genes em diferentes tecidos de plântulas e semente de milho

Na Figura 7 está representada a expressão relativa do gene *ZmLEA3*. No geral, o gene teve maior expressão na parte aérea na condição controle, exceto na linhagem 91-T em que a expressão foi maior em sementes. De acordo com Liu et al., (2013) uma superexpressão do gene *ZmLEA3* em folhas de tabaco resultou em um aumento da tolerância ao estresse osmótico e oxidativo.

Figura 7 - Expressão do gene *ZmLEA3* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.



Ao avaliar a expressão do gene *ZmLEA3* na parte aérea de plântulas em condição controle, verifica-se mais expressão para os genótipos 91-T, 32-T,

91x75-T, cujos valores não se diferenciam estatisticamente entre si. Estes genótipos foram classificados como tolerantes ao estresse hídrico. Menores valores foram observadas em sementes dos genótipos 37-NT e 37x57-NT, os quais foram classificados como não tolerantes.

Importante ressaltar que em todos os genótipos houve redução da expressão do gene *ZmLEA3* em raízes e parte aérea, sob condição de estresse.

A seleção dos materiais tolerantes utilizando-se a análise em sementes é importante considerando-se a economia de tempo e espaço, uma vez que não é necessária a avaliação em plântulas.

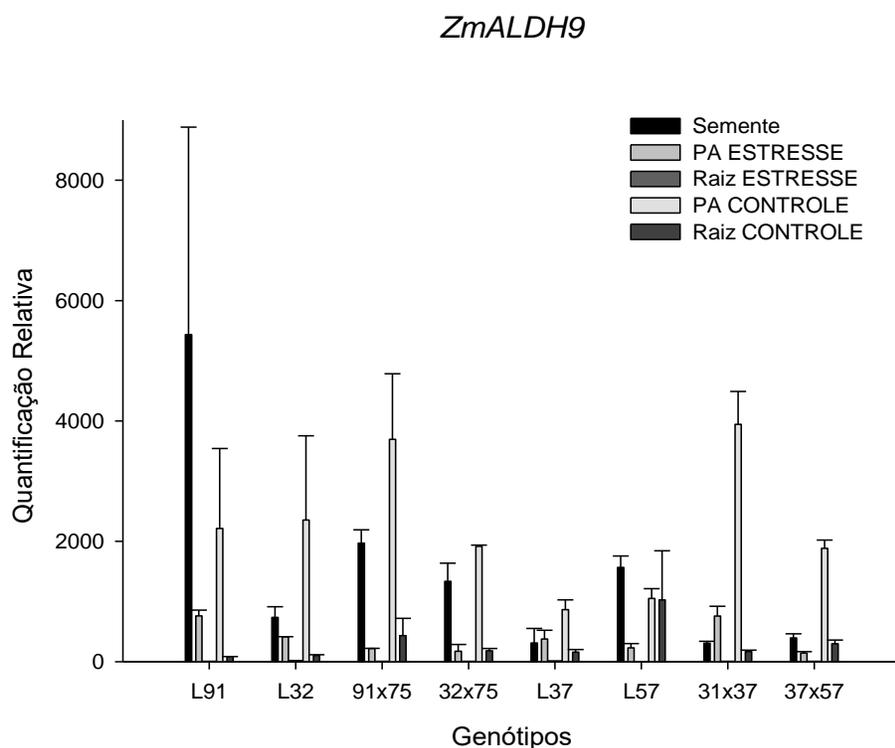
Nesta pesquisa, considerando os genótipos avaliados, a maior expressão foi observada em sementes na linhagem 91-T, nos híbridos 91x75-T e 32x75-T, com destaque para a expressão na linhagem 91-T. Menor expressão do gene foi observada em sementes dos genótipos 32-T, 37-NT, 57-NT, 31x37-NT e 37x57-NT.

A quantificação relativa de expressão do gene *ZmALDH9* está representado na Figura 8. Assim como observado para o gene *ZmLEA3* a maior expressão foi observada em sementes da linhagem 91-T, também houve maior expressão deste na parte aérea de plântulas na condição controle comparando com os demais tratamentos. No geral, esse gene não se expressa em raiz em condição de estresse. Com exceção das linhagens 91-T e 57-T maior expressão do gene *ZmALDH9* foi observada na parte aérea de plântulas desenvolvidas em substrato com 70% de capacidade de retenção de água.

Em todos os genótipos foi observada redução da expressão deste gene e, raízes e parte aérea de plântulas desenvolvidas em condição de estresse hídrico. Menor expressão do gene, na parte aérea de plântulas desenvolvidas em substrato com 70% de capacidade de retenção de água, foi observada nos genótipos 37-NT, 57-NT e 37x57-NT, sendo estas classificadas como menos tolerantes ao estresse hídrico. No entanto, no híbrido 31x37-NT, também

classificado como menos tolerante, foi observada expressão maior deste gene em plântulas desenvolvidas em condição controle. Segundo Zhou et al., (2012), esse gene é potencialmente útil no melhoramento genético de milho para seleção de cultivares com tolerância à seca.

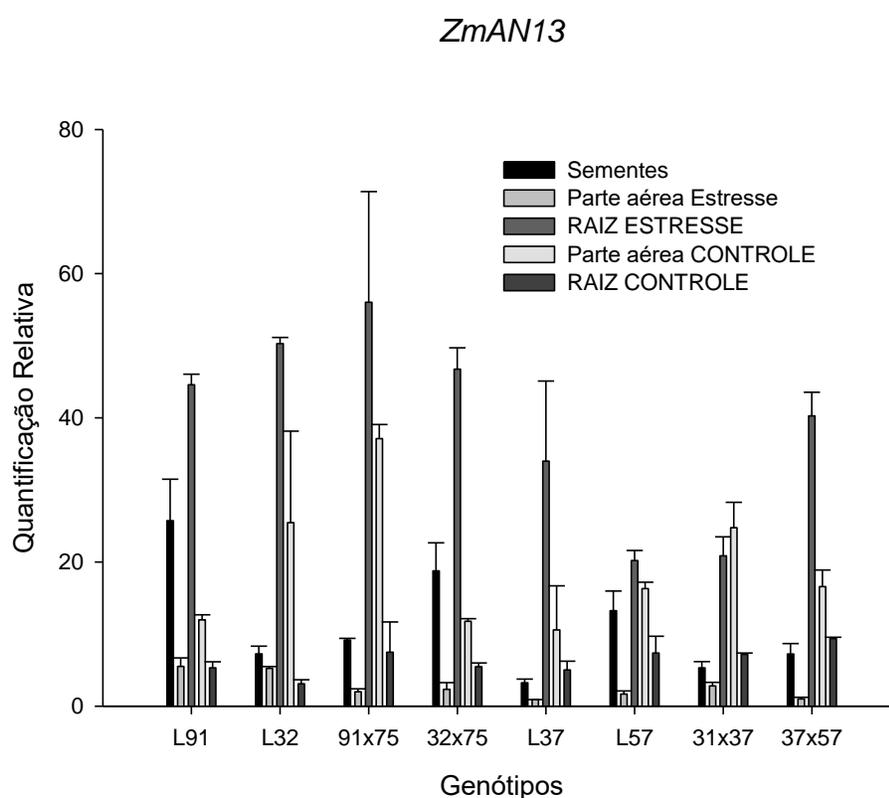
Figura 8 - Expressão do gene *ZmALDH9* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.



Na Figura 9 está representada a expressão relativa do gene *ZmAN13*. Na condição de estresse pode-se observar aumento da expressão em raízes das plântulas. Ressalta-se que nos genótipos tolerantes e responsivos (91-T, 32-T, 91x75-T e 32x75-T) expressão em raízes, na condição de estresse superior que nas raízes dos demais genótipos. Em sementes, a maior expressão foi observada na linhagem 91-T. Em pesquisa realizada por Xuan et al., (2011) foi observada

mais expressão desse gene em folhas de milho. Neste trabalho a expressão deste gene também foi avaliada em raiz, caule, coleótilo, estame, estilo estigma e flor feminina.

Figura 9 - Expressão do gene *ZmAN13* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.

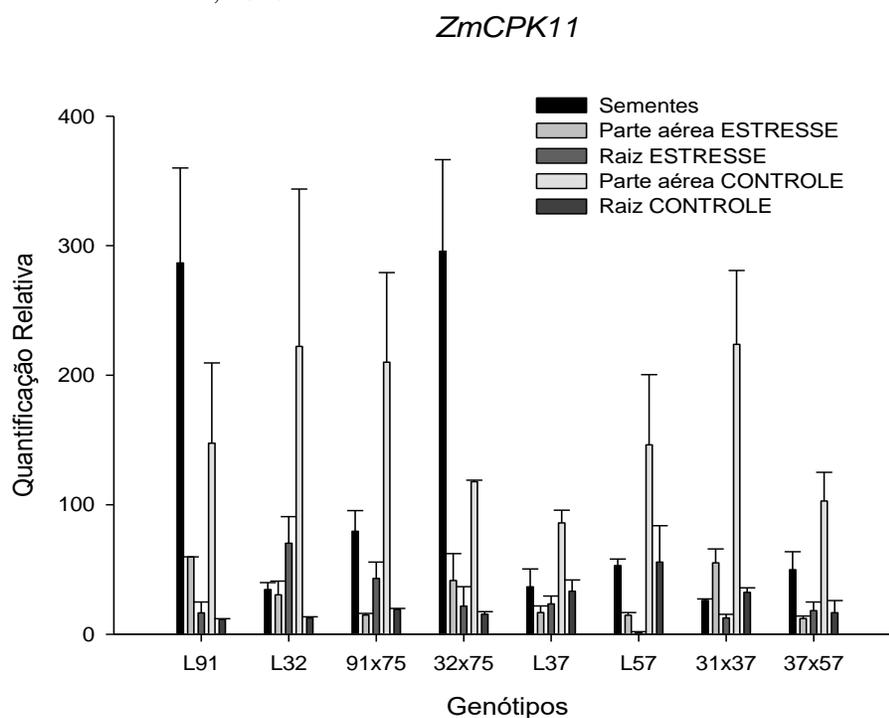


Em todos os genótipos, menor expressão foi observada na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse, quando comparada à expressão observada na parte aérea controle. Nesta condição maior expressão foi observada em plântulas das linhagens 91-T e 32-T e menor expressão na linhagem 37-T e no híbrido

37x57-NT. Em condição controle maior expressão, deste gene, na parte aérea de plântulas dos genótipos 32-T e 91x75-T. Também nestes dois genótipos foi observada maior expressão do gene em raízes desenvolvidas sob estresse hídrico.

Na Figura 10 está representada a expressão relativa do gene *ZmCPK11*. Este gene está envolvido na indução da defesa antioxidante. Elevada expressão relativa do gene foi observada em sementes da linhagem 91-T e do híbrido 32x75-T seguido do híbrido 91x75-T que são classificados como genótipos tolerantes e responsivos.

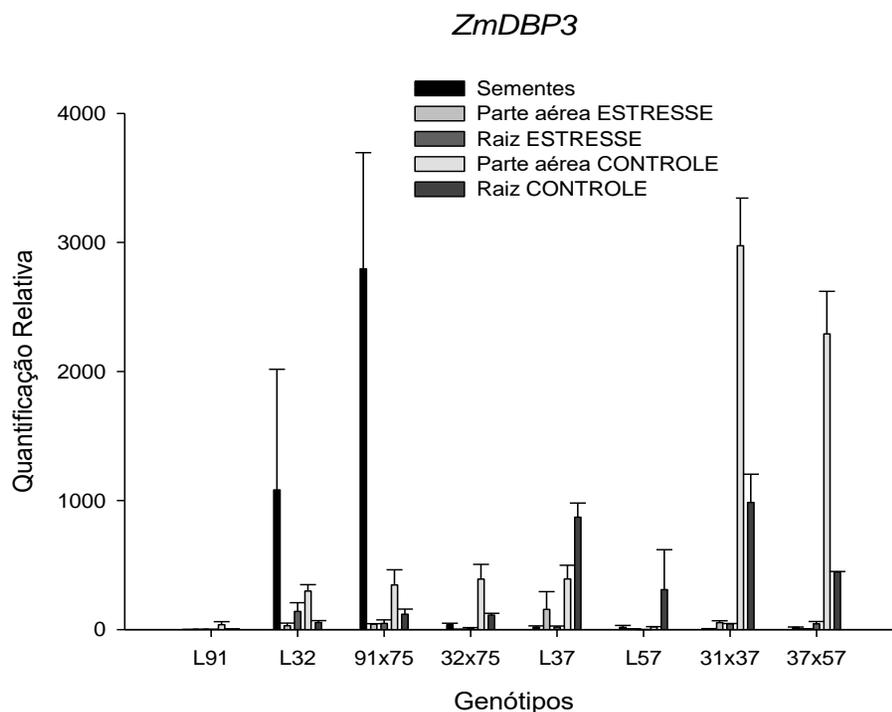
Figura 10 - Expressão do gene *ZmCPK11* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.



Na Figura 11 está representada a expressão relativa do gene *ZmDBP3*. Menor expressão foi observada na linhagem 91-T. Entre os genótipos classificados como tolerantes, houve maior expressão em sementes da linhagem 32-T e do híbrido 91x75-T. Nos demais genótipos a expressão deste gene em sementes foi pequena ou nula. Em todos os genótipos houve expressão deste gene na parte aérea de plântulas desenvolvidas na condição controle, com destaque da expressão nesta condição nos genótipos 31x37-NT e 37x57-NT.

A superexpressão do gene *ZmDBP3*, extraído de folhas de plântulas de milho aumentou a tolerância ao frio e a seca em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (CHANG-TAO et al., 2009).

Figura 11 - Expressão do gene *ZmDBP3* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.

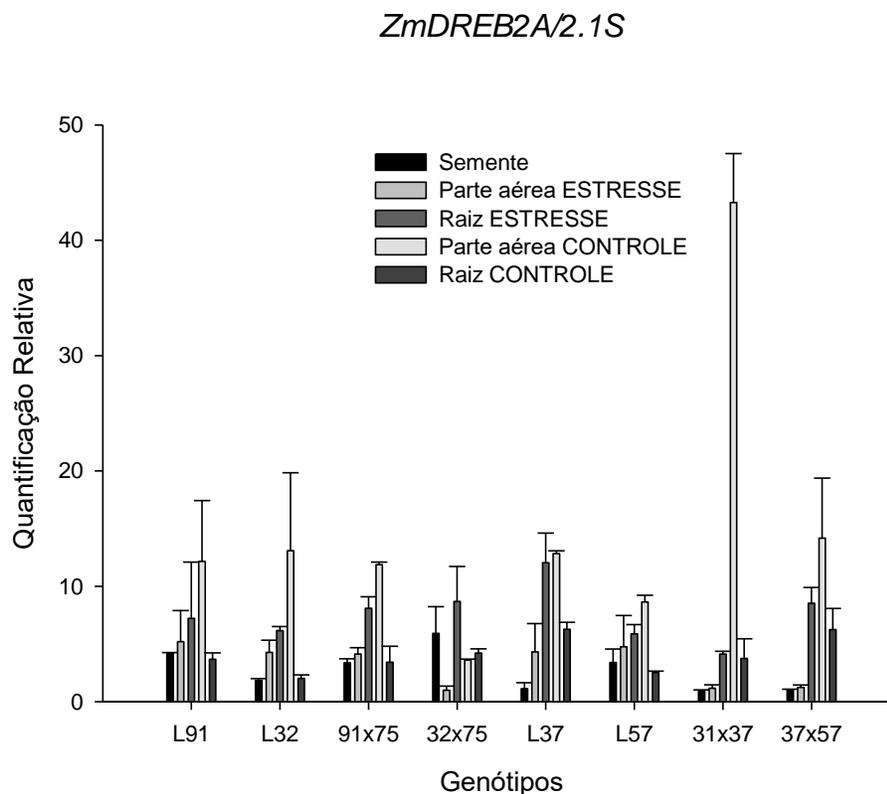


Em todos os genótipos houve redução da expressão do gene *ZmCPK11* na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse. Esta redução também foi observada em raízes dos genótipos 37-NT, 57-NT, 31x37-NT, sob condição de estresse, sendo estes três classificados como intolerantes ao estresse hídrico.

Szczegielniak et al., (2005) observaram que transcritos de *ZmCPK11* estavam presentes em todos os órgãos testados da planta, semente seca e embebida, plântulas, raízes, caule e folha em condição de estresse ou não. Os autores observaram ainda que a expressão foi relativamente maior em sementes e plântulas e menor nos caules, raízes e folhas.

Na Figura 12 está representada a expressão relativa do gene *ZmDREB2A/2.1S*. De uma maneira geral, houve baixa expressão deste nos diferentes tecidos. Para a maioria dos genótipos a expressão foi relativamente maior na parte aérea de plântulas na condição controle. Liu et al., (2013), verificaram que os genes do tipo *ZmDREB1* foram significativamente expressos em raízes, observaram ainda que outros genes, *ZmDREB2*, se expressaram pouco em diferentes tecidos da variedade B73 de milho crescido sob condições favoráveis de cultivo. Na presente pesquisa, maior expressão em raízes foi maior quando desenvolvidas sob condição de estresse. Engels et al., 2013, inseriu o gene *rd29A: AtDREB2A CA* de *Arabidopsis thaliana* em soja. Duas linhagens de soja geneticamente modificadas (P1397 e P2193) foram analisadas para avaliar a expressão diferencial do gene *AtDREB2A CA* em folhas e raízes submetidas a várias tratamentos de desidratação. Em ambas as linhagens de soja geneticamente modificada houve significativa expressão do gene, em raízes da linhagem P2193 sob condições de estresse hídrico. Esta análise de expressão *AtDREB2A CA* em soja geneticamente modificada permitiu que os autores selecionassem linhagem P2193 quanto à maior estabilidade em condições de estresse hídrico.

Figura 12 - Expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.

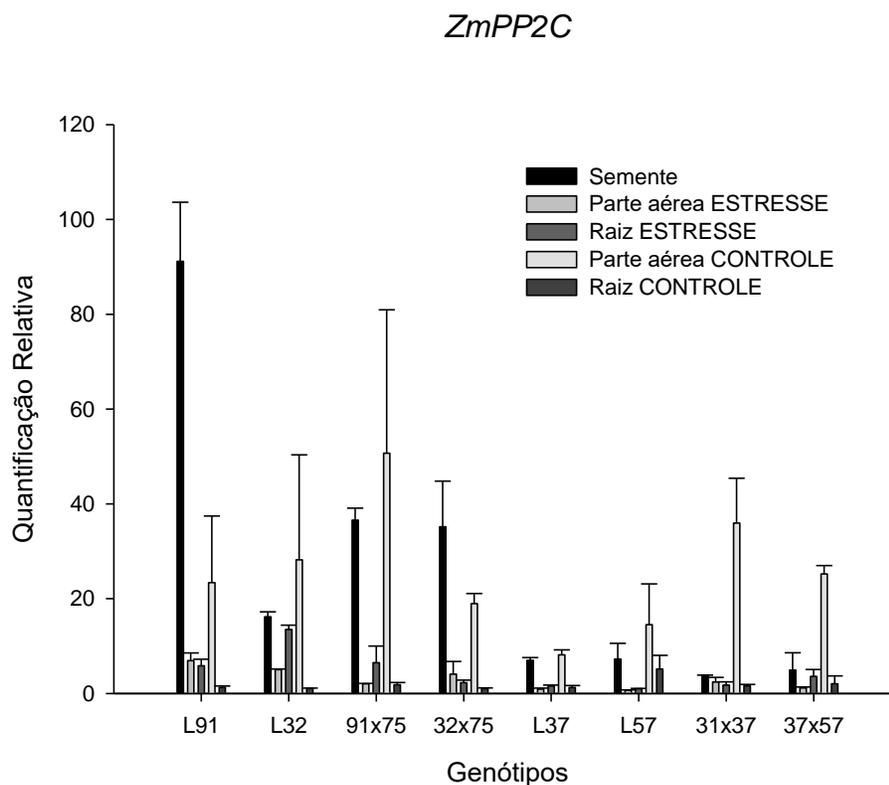


Em todos os genótipos houve menor expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* na parte aérea de plântulas e maior em raízes em plântulas desenvolvidas sob condição de estresse.

Na Figura 13 está representada a expressão relativa do gene *ZmPP2C*. Em genótipos tolerantes e responsivos, 91-T, 32-T, 91x75-T e 32x75-T, houve maior expressão relativa em sementes, com destaque para a linhagem 91-T, em relação à expressão deste em sementes dos genótipos classificados como intolerantes ao estresse hídrico, 37-NT, 57-NT, 31x37-NT e 37x57-NT. Liu et

al. (2009) observaram a superexpressão do gene *ZmPP2C* também em plantas de *Arabidopsis* expostas aos estresses hídrico e salino. A expressão deste gene diminuiu significativamente com a inibição por ABA da germinação das sementes e do crescimento das raízes das plantas transgênicas.

Figura 13 - Expressão do gene *ZmPP2C* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.

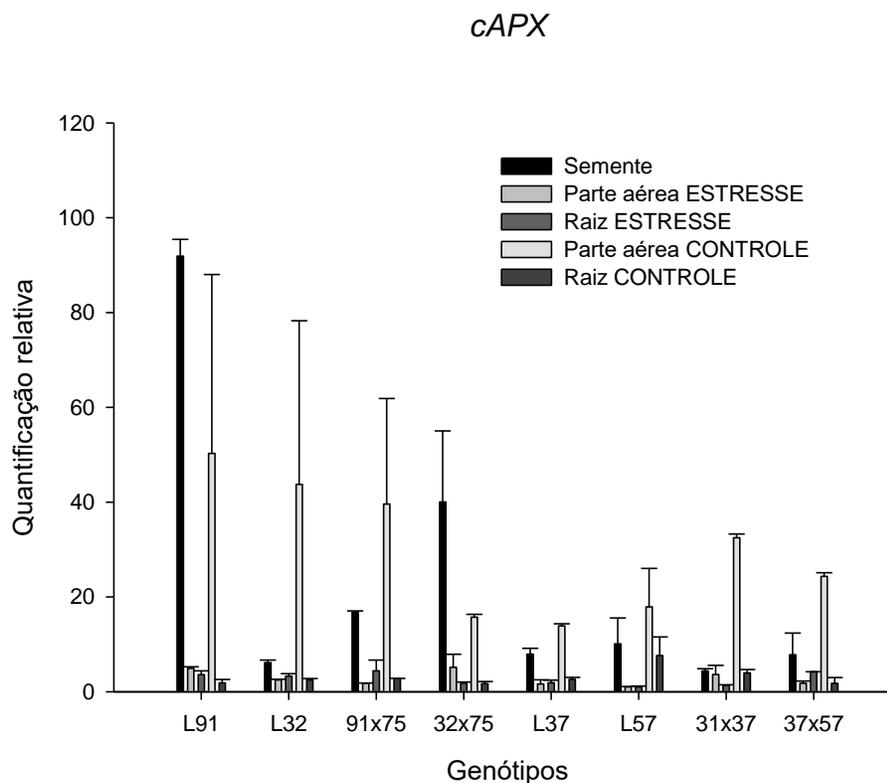


Em todos os genótipos houve redução da expressão do gene *ZmPP2C* na parte aérea de plântulas desenvolvidas sob estresse hídrico. Nos genótipos

classificados como tolerantes houve mais expressão deste gene sob condições de estresse em relação à observada em raízes desenvolvidas em condição controle.

Na Figura 14 está representada a expressão relativa do gene *cAPX*. Este gene está directamente associado à protecção de células de plantas contra as condições ambientais adversas. Pode-se observar que a expressão desse gene foi maior em sementes da linhagem 91-T, seguida da expressão em sementes dos genótipos 32x75-T, 91x75-T, classificados também como tolerantes ao estresse hídrico.

Figura 14 - Expressão do gene *cAPX* em sementes, parte aérea e raiz de oito diferentes genótipos em duas condições: estresse e controle. UFLA, Lavras, 2016.



Em todos os genótipos foi observada menos expressão na parte aérea de plântulas desenvolvidas sob estresse hídrico. Também foi observada maior expressão na parte aérea de plântulas em relação à observada em raízes.

Em estudo com dois genótipos de trigo, Sečenji et al., (2010) verificou que os níveis de expressão *cAPX I*, e *cAPX II* aumentou significativamente em *Plainsman V* (tolerante à seca) em relação à *Cappelle Desprez* (sensível à seca).

Na linhagem 91-T foi observada maior expressão dos genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmAN13*, *ZmCPK11*, *ZmPP2C* e *cAPX* em sementes. Abreu (2013) também avaliou esta linhagem e considerou-a promissora quanto à tolerância à seca pelas avaliações de produção, prolificidade e intervalos entre florescimentos feminino e masculino. Ao avaliar genótipos com diferentes níveis de tolerância a altas temperaturas, Dutra et al., (2015) concluiu que a linhagem 91-T é mais tolerante em condição de altas temperaturas. Considerando estes resultados infere-se que a linhagem 91-T é promissora quanto à tolerância à seca e a altas temperaturas.

A expressão das proteínas catalase, peroxidase, superóxido dismutase e proteína resiste ao calor, varia entre genótipos e também nos diferentes tecidos avaliados. A catalase e a superóxido dismutase foram expressas mais em linhagens que em híbridos. Também foi observada expressão da catalase na parte aérea de plântulas, principalmente na condição de estresse. Já em raízes, de uma maneira geral, a expressão desta enzima foi menor na condição de estresse.

A peroxidase também se expressou mais na parte aérea de plântulas. Ao comparar os dois ambientes, com e sem estresse, houve maior expressão desta enzima em raízes quando as plântulas foram desenvolvidas sob condição de estresse.

Em relação à esterase, houve significativa variação da expressão entre genótipos e tecidos. Sob condição de estresse a expressão foi maior na parte

aérea de plântulas. Já no ambiente controle, em linhagens a expressão foi maior em raízes e nos híbridos foi maior na parte aérea de plântulas.

Por meio da análise proteômica não foi possível associar um marcador à tolerância ao estresse hídrico, considerando a classificação dos genótipos.

Em relação à expressão de transcritos, houve maior expressão dos genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9* e *ZmCPK11* na parte aérea de plântulas. No entanto na linhagem 91-T a expressão destes genes foram maiores em sementes. Também o gene *ZmCPK11* se expressou mais em sementes do genótipo 32x75-T.

Para o gene *ZmANI3*, foi observada maior expressão em raízes desenvolvidas na condição de estresse e também em sementes da linhagem 91-T. Nos genótipos 91x75-T e 32-T, houve maior expressão em raízes e parte aérea de plântulas.

Maior expressão do gene *ZmDBP3* foi observada na parte aérea de plântulas de todos os genótipos avaliados. Menor expressão foi observada em sementes das linhagens 91-T, 32-T e 91x75-T, sendo estas classificadas como tolerantes ao estresse causado pelo estresse hídrico.

De uma maneira geral foi observada menor expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* em todos os genótipos avaliados. Entretanto, sob condição de estresse a expressão deste foi maior em raízes.

Importante ressaltar a expressão do gene *ZmPP2C* em sementes dos genótipos classificados como tolerantes, com destaque para a maior expressão na linhagem 91-T. Este gene se expressa menos na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse causado pelo estresse hídrico.

Para o gene *cAPX* também foi observada maior expressão em sementes da linhagem 91-T e do híbrido 32x75-T, classificados como tolerantes ao estresse hídrico. Importante ressaltar que este gene também se expressou em parte aérea de plântulas não submetidas ao estresse, com maior expressão nos

genótipos 91-T, 32-T e 91x75-T, classificados como tolerante ao estresse hídrico.

A possibilidade de avaliar a expressão de genes, visando à seleção de materiais com característica de interesse, é importante em função do menor trabalho, tempo e espaço, quando comparado às análises em plântulas. Nesta pesquisa foi observado que a maioria dos genes avaliados se expressa na parte aérea de plântulas, desenvolvidas em substrato com a capacidade de retenção de água favorável para o desenvolvimento de plântulas, 70% da capacidade de retenção de água. No entanto, vale ressaltar a expressão em sementes dos genes *ZmPP2C* e *cAPX* em sementes da linhagem 91-T a qual foi classificada como tolerante ao estresse hídrico.

## 5 CONCLUSÕES

Há variação da expressão da catalase, peroxidase, superóxido dismutase, esterase e proteínas resistentes ao calor entre os genótipos avaliados e também em sementes, raiz e parte aérea de plântulas de milho.

Há maior expressão das enzimas CAT e SOD em linhagens;

Há maior expressão da CAT na parte aérea de plântulas de híbridos de milho;

Há maior expressão da enzima PO na parte aérea quando comparada à raiz sob condição de estresse;

Há maior expressão da enzima EST nos genótipos classificados como intolerantes ao estresse;

Há variação da expressão dos genes estudados nos genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmPP2C*, *ZmCPK11*, *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmDBP3*, *ZmAN13* e *cAPX*, entre os genótipos avaliados e em sementes, raiz e parte aérea de plântulas de milho.

Há maior expressão dos genes *ZmLEA3*, *ZmALDH9*, *ZmCPK11* na parte aérea de plântulas de milho;

Há maior expressão dos genes *ZmAN13* e *ZmDREB2A/2.1S* em raízes sob condição de estresse.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. et al. Heat-resistant protein expression during germination of maize seeds under water stress. **Genetics and molecular research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, 2016.
- ABREU, V. M. et al. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 57-T4 p.
- ALVES, P. A. et al. **Transformação genética de milho utilizando o gene AtDREB2A visando tolerância à seca**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30.; SIMPÓSIO SOBRE LEPTÓPTEROS COMUNS A MILHO, SOJA E ALGODÃO, 1. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014.
- ANDRADE, T. et al. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto v. 12, n. 3, p. 3630-3642, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. Anuário 2014. Londrina, 2014. 34 p.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, n. 2, p. 135-148, 1996.
- BOUCHER, V. et al. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant, cell & environment**, Logan, v. 33, n. 3, p. 418-430, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília, 2009. 399 p.

CANCELLIER, L. L. et al. Adubação orgânica na linha de semeadura no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32-T, n. 2, p. 527-540, 2011.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 752-761, 2011.

CARPENTIER, S. C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, Weinheim v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.

CAVERZAN, A. et al. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 4, p. 1011-1019, 2012.

CHAI, Q. et al. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. Paris, v. 36, n. 1, p. 1-21, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: nono levantamento da safra 2015/2016. Brasília, 2016. 174 p.

CRUZ, J. C. et al. Milho – Cultivares para 2015/2016. Embrapa CNPMS. Disponível em: < <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>>. Acesso em fevereiro. de 2016.

CUTLER, S. R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Reviews Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 651-679, 2010.

D'ARCY-LAMETA, A. et al. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. **Annals of Botany**, London, v. 97, p. 133-140, 2006.

DACOSTA, M.; HUANG, B.; RACHMILEVITCH, S. Physiological and biochemical indicators for stress tolerance. In: HUANG, B. **Plant–environment interactions**, 3rd edn. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 321-355.

DING, Y. et al. ZmCPK11 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 871-884, 2013.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Boca Raton, FL: Science Publishers, 2011. cap. 9, p. 177-203.

DUTRA, S. M. F. et al. Genes related to high temperature tolerance during maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 4, p. 18047-18058, 2015.

DUTRA, S. M. F. **Expressão de genes relacionados à tolerância a altas temperaturas e germinação em sementes de milho**. 2014. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DWIVEDI, N. et al. Differential response of antioxidant enzymes to water deficit stress in maize (*Zea mays*) hybrids during two leaf stage. **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 86, n. 6. 2016.

EL-SHABRAWI, H. et al. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. **Protoplasma**, New York, v. 245, n. 1-4, p. 85-96, 2010.

ENGELS, C. et al. Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 556-565, 2013.

FARIAS, J. R. B. et al. Restrições de disponibilidade hídrica à obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. In: **Congresso Brasileiro de Soja**. 2006. Londrina, p. 32-T-33.

FERREIRA, D. F. Sistema SISVAR para análises estatísticas: manual de orientação. **Lavras: Universidade Federal de Lavras/Departamento de Ciências Exatas**, 2000.

GOMES, M. S. et al. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho, **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.

GORANTLA, M. et al. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 253-265, 2007.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stress plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.32-T, p. 481-494, 2005.

GUO, Y. et al. A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. **Developmental cell**, Cambridge v. 3, n. 2, p. 233-244, 2002.

HALLAUER, A. R. et al. **Quantitative genetics in maize breeding**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2010. v. 1, 500 p

HERRERO, M. P.; JOHNSON, R. R. Drought stress and its effects on maize reproductive systems. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 1, p. 105-110, 1981.

HOSSAIN, M. et al. Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 16, n. 3, p. 259-272, 2010.

HU, X. et al. Enhanced tolerance to low temperature in tobacco by over-expression of a new maize protein phosphatase 2C, ZmPP2C2. **Journal of plant physiology**, Moscow, v. 167, n. 15, p. 1307-1315, 2010.

ImageJ, Image Processing and Analysis in Java. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em 19/05/2016.

JALEEL, C. A. et al. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 60, p. 110-116, 2007.

JORDAN, W. R. Whole plant response to water deficits: An overview. **Limitations to efficient water use in crop production**, n. limitationstoef, Texas, p. 289-317, 1983.

KHODARAHMPOUR, Z. Effect of drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) on germination indices in corn (*Zea mays* L.) hybrids. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.10, n.79, p.18222-18227, 2011.

KOUSSEVITZKY, S. et al. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, 2008.

- KRAMER, P. J. Water deficits and plant growth. In.: HRAMER, P.J. (ed). Water relations of plants. New York: Academic Press, 1983. p. 342-389.
- KUHN, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, East Lansing v.27, n.6, p.503-528, 2001.
- LERAYER, A. Milho: Tecnologia do campo à mesa. Brasília: Embrapa sorgo e milho. Sete Lagoas, 2009. 16p.
- LIU, T. et al. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. **Acta physiologiae plantarum**, Poznań, v. 35, n. 2, p. 501-513, 2013.
- LIU, Y. et al. A maize early responsive to dehydration gene, ZmERD4, provides enhanced drought and salt tolerance in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 27, n. 4, p. 542-548, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression. Data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta Ct) Method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbateglutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Boca Raton, FL: Science Publishers, 2010. cap. 3, p. 45-64.
- LOCY, R. D. et al. Stress Physiology. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. p. 24382442.
- MAGALHÃES, P. C. et al. Fisiologia do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2002. 23p. (Circular técnica).
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. Ed. Piracicaba: ABRATES, 2015. 659 p.
- MARUYAMA, K. et al. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. **Plant physiology**, Bethesda, v. 150, n. 4, p. 1972-1980, 2009.

MERTZ, L. et al. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, 2009.

MILLER, G. A. D. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, cell & environment**, Logan, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MOLINARI, H. B. et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, Limerick, v.167, p.137-T5-1381, 2004.

MORAIS, T. C. et al. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de girassol submetidas ao estresse hídrico e à deterioração**. 2015. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J.C.C.; PIMENTEL, M. A. **Milho do plantio à colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2015. p. 09-25.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-79, 1998.

NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.

NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2005.

OLIVEIRA, E. A. P. et al. Potencial osmótico do substrato na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho doce. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 9, n. 4, p. 477-482, 2014.

ONETO, C. D. et al. Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an isopentenyltransferase (IPT) gene driven by a stress-and maturation-induced promoter. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 220, p. 66-77, 2016.

PANDEY, R. K. et al. Deficit irrigation and nitrogen effects on maize in a Sahelian environment: I. Grain yield and yield components. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 1-13, 2000.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid –mediated controls. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 460-468, 2002.

PEREIRA FILHO, I.; CRUZ, J.C. Cultivo do milho. Sistemas de Produção 1, Sete Lagoas EMBRAPA, CNPS: 2011. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/plantespaca.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 101-108, 2005.

POROYKO, V. et al. Comparing regional transcript profiles from maize primary roots under well-watered and low water potential conditions. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 279-289, 2007.

RIBAUT, J. M. et al. Drought tolerance in maize. In: **Handbook of maize: its biology**. Springer New York, 2009. p. 311-344.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1997. 747 p.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J. et al. Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 95-102, 2010.

ROSE, J. K. C. et al. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, East Lansing, v. 39, p. 715-733, 2004.

SANTOS, C. M. R. et al. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SCHOLDBERG, T. A. et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 57, n. 7, p. 2903-2911, 2009.

SEČENJI, M. et al. Transcriptional differences in gene families of the ascorbate–glutathione cycle in wheat during mild water deficit. **Plant cell reports**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 37-50, 2010.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. **Plant, cell & environment**, Logan, v. 25, n. 2, p. 333-341, 2002.

SHAO, H. et al. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 131-135, 2005.

SHARP, R. E. et al. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2343-2351, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 221-227, 2007

SHIOGA, P. S. et al. Avaliação Estadual de Cultivares de Milho Safrinha. 1a Ed. Londrina: IAPAR, 2011. 78p.

SILOTO, R. C. **Danos e biologia de *Spodoptera frugiperda*** (J. E. Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae) **em genótipos de milho**. 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.

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

- SILVA-NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.
- SIVAKUMAR, M. V. K.; SHAW, R. H. Methods of growth analysis in field-grown soya beans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Annals of Botany**, London, v. 42, n. 1, p. 213-222, 1978.
- SONG, S. Q. et al. Proline metabolism and cross -tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds . **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 52, n. 6, p. 897-904, 2005.
- STORCK, L. et al. Análise conjunta de ensaios de cultivares de milho por classes de interação genótipo x ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.49, n.3, p.163-172, 2014.
- SZCZEGIELNIAK, J. et al. A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. **Plant physiology**, Bethesda, v. 139, n. 4, p. 1970-1983, 2005.
- TAIZ, E.; ZEIGER, L. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de Nutrientes. Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Sunderland: Sinauer Associates, Plant Physiology. 4nd ed Inc. Publishers, 2009. 848 p.
- TEAM, R. Core. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. R Foundation for Statistical Computing. 2015.
- TEXEIRA, L. R. et al. Avaliação de cultivares de soja quanto à tolerância ao estresse hídrico em substrato contendo polietileno glicol. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 217-223, 2008.
- VEIGA, P. O. A. Qualidade de mudas e aspectos fisiológicos, bioquímicos e biofísicos de sementes de café armazenadas. 2014. 95 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- VILARINHO, A. A. **A importância do melhoramento genético na cultura do milho**. Disponível em:

<<http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?id=8315>>. Acesso em: 18 set. 2016.

VON PINHO, R.G. et al. Efeito de métodos de adubação e épocas de semeadura em características agrônômicas de cultivares de milho cultivadas na “safrinha”. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, v.26, n.4, p.719-730, 2002.

WANG, C. et al. Overexpression of maize ZmDBP3 enhances tolerance to drought and cold stress in transgenic Arabidopsis plants. **Biologia**, Bratislava v. 64, n. 6, p. 1108-1114, 2009.

WANG, C.; YANG, Q.; WANG, C. Isolation and functional characterization of ZmDBP2 encoding a dehydration-responsive element-binding protein in Zea mays. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 29, n. 1, p. 60-68, 2011.

WANGXIA, W. et al. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WILLEKENS, H. et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, p. 207-228, 1995.

XIONG, L. et al. Cell Signaling during Cold, Drough, and Salt Stress. **The Plant Cell**, Berlin, p. 165-183, 2002.

XUAN, N. et al. A putative maize zinc-finger protein gene, ZmAN13, participates in abiotic stress response. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 101-112, 2011.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Philadelphia, v. 10, p. 88-94, 2005.

YAO X, et al. Effects of drought stress and selenium supply on growth and physiological characteristics of wheat seedlings. **Acta physiologiae plantarum**. Poznań, v. 31, n. 5, p. 1031-1036, 2009.

YOSHIDA, R et al. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 8, p. 5310-5318, 2006.

ZHOU, M. L. et al. Aldehyde dehydrogenase protein superfamily in maize. **Functional & integrative genomics**, Berlin, v. 12, n. 4, p. 683-691, 2012.

ZHUANG, Y. et al. Effects of water-deficit stress on the transcriptomes of developing immature ear and tassel in maize. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 2137-T-2147, 2007.

## APÊNDICE A -

Tabela 1A Resumo da análise de variância para envelhecimento acelerado de sementes de oito genótipos de milho contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico.

Fatores	GL	QM
Genótipo	7	<b>41,4564*</b>
Erro	24	11,61111
Total	31	
CV (%)	3,59	

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste Scott Knott ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2A Resumo da análise de variância para porcentagem de emergência (E%), índice de velocidade de emergência (IVE), e comprimento de raiz (CR) de sementes de oito genótipos de milho contrastantes quanto à disponibilidade hídrica (DH).

Fatores <sup>1</sup>	GL	QM			
		E%	IVE	CR	PA
G	7	<b>57-T,3804*</b>	<b>2,0597*</b>	<b>81,7173*</b>	<b>24,3438*</b>
DH	1	0,0436	<b>41,2282*</b>	<b>486,4782*</b>	<b>482,0769*</b>
G*DH	7	30,6618	0,4624	4,6778	<b>9,6355*</b>
Erro	48	26,0295	0,3397	3,0735	4,2142
Total	63				
CV (%)		5,29	10,1	9,49	17,58

<sup>1</sup>G=genótipos; DH=disponibilidade hídrica. \*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste Scott Knott ( $p < 0,05$ ).