



JUARA RODRIGUES CARDOSO SANTOS

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RELACIONADAS AO DÉFICIT HÍDRICO EM
MILHO.**

**LAVRAS - MG
2022**

JUARA RODRIGUES CARDOSO SANTOS

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS AO DÉFICIT HÍDRICO EM MILHO.**

Tese 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 Doutor.

Prof.^a Dr.^a Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Heloísa Oliveira dos Santos
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Juara Rodrigues Cardoso.

Características agronômicas e expressão de proteínas relacionadas ao déficit hídrico em milho: Agronomic characteristics and expression of proteins related to water deficit in maize / Juara Rodrigues Cardoso Santos. - 2022.

91 p.

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

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Déficit hídrico. 3. Proteômica. I. Von Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Santos, Heloisa Oliveira dos. III. Título.

JUARA RODRIGUES CARDOSO SANTOS

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS AO DÉFICIT HÍDRICO EM MILHO.**

**AGRONOMIC CHARACTERISTICS AND EXPRESSION OF PROTEINS RELATED
TO WATER DEFICIT IN MAIZE**

Tese 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 Doutor.

Aprovada em de 20 de abril de 2022.

Dr ^a Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Dr ^a Marcela Carlota Nery	UFVJM
Dr. Tiago Zanatta Aumonde	UFPel
Dr ^a Raquel Maria De Oliveira Pires	UFLA
Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA

Prof.^a Dr^a Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Prof.^a Dr^a Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

“Carrego seu coração comigo.

Eu o carrego no meu coração”

Aos meus pais, João e Edicássia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos.

Ao meu pai, João Alcione Cardoso Santos (*In memoriam*), agradeço ao senhor por ter sido o melhor pai do mundo e a pessoa mais maravilhosa que eu conheço!

À minha mãe, Edicássia Rodrigues de Moraes Cardoso, você é meu castelo forte, meu exemplo de vida, uma das pessoas mais dedicada e amorosa que eu conheço. Que levou o “cuidar” para a profissão, família e vida.

Pais, obrigada por serem meu mundo, meu porto seguro, meus maiores incentivadores e investidores do meu sonho (não importando o tamanho e qual fosse esse sonho), pelo grande amor que sempre me deram e por serem meus exemplos de honestidade, profissionais dedicados, funcionários públicos exemplares e por não me deixarem desistir, em nenhum momento, do meu sonho.

A meu amor, Alex, pelo companheirismo, ajuda nos experimentos, apoio e incentivo, por estar presente em todas as suas férias e nos fins de semana me dando força no meu experimento, por ensaiar apresentações comigo, por me ajudar a estudar, nas estatísticas, por me levantar quando estava desanimada e por me ajudar a conquistar meus sonhos, sempre com uma cervejinha na mão.

Aos meus queridos avós, Celina, Gercino, Luzia e João (*In memoriam*), que lutaram sempre para que minha mãe, filha de pedreiro e costureira, e meu pai, filho de fazendeiro e dona de casa, se dedicassem, estudassem, formassem e criassem quatro filhas maravilhosas. As minhas irmãs, Fabíola, Joema e Jaína, que estão sempre me apoiando a buscar meus sonhos e por estarem presentes até quando eu não posso. Aos meus tios Fatima e Celso (*In memoriam*), Marly e Miron, que estão sempre estiveram presentes com muito amor e carinho. Aos meus primos Celsinho, Camila e Carlinha, que são primos-irmãos e que muitas vezes acudiram meus pais como os seus. Aos meus sobrinhos maravilhosos, Amanda, Cecília, Don, Isabela, Isaque, Felipe, Júlia, Max e Rodriguinho. Aos meus padrinhos queridos, Karla Simone, Relmut, Mario e Ana, que sempre estiveram presentes em minha vida e a toda minha família maravilhosa, obrigada pela união, amor e respeito.

A minha orientadora, Prof.^a Dr^a Édila Von Pinho, cito a frase de Rubi Kaur: “Todas nós seguimos em frente quando percebemos como são fortes e admiráveis as mulheres à nossa volta”. Obrigada por ser todo exemplo de mulher forte, dedicada, inteligente, elegante e mesmo

com toda a correria de vice-reitoria, filhos, aulas, sempre esteve presente orientando, aconselhando, ajudando, com total confiança, dedicação, paciência e comprometimento com o desenvolvimento do trabalho.

A minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Heloísa Oliveira dos Santos, quero agradecer por ser primeira pessoa que me ligou para contar que eu tinha sido selecionada, por estar sempre presente, pela oportunidade de me integrar a essa equipe maravilhosa, pela orientação e amizade.

A Prof.^a Dr.^a Raquel Maria de Oliveira Pires, pela grande amizade, por ser essa pessoa maravilhosa que sempre depositou em mim muita confiança e carinho, que me deu oportunidade de coorientar em tantos trabalhos e por me sempre me apoiar (até mesmo sonhos internacionais). Por estar presente me ajudando no experimento (até mesmo no natal), por ser meu exemplo de dedicação e força de vontade para correr atrás dos sonhos.

Agradeço, ao professor Adriano Valentim e Rubinho, pelos empréstimos dos vasos para condução do experimento, por toda ajuda, explicação e conselhos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Setor de Sementes, ao Departamento de Agricultura e ao programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de realização do doutorado, pela contribuição na minha formação profissional, por toda ajuda e aprendizado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo financiamento dos materiais utilizados durante os experimentos.

Aos membros da banca de defesa, Prof.^a Dr.^a Marcela Carlota Nery, Prof.^a Dr.^a Raquel Maria de Oliveira Pires, Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho, Prof. Dr. Tiago Zanatta Aumonde, pela disponibilidade, confiança e sugestões no trabalho.

Aos professores do Setor de Sementes, Dr.^a Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dr. Everson Reis Carvalho, Dr.^a Heloísa Oliveira dos Santos, Dr. João Almir Oliveira, Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho, Dr.^a Raquel Maria de Oliveira Pires e Dr. Renato Mendes Guimarães e a pesquisadora da Embrapa Café, Dr.^a Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, por serem grandes exemplos e por todo conhecimento adquirido.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Jaque, Dalvinha, Geraldo, Rafa, Rose e Vivi, e à secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Marli, pela disposição e auxílio.

Aos técnicos do DAG, em especial, Arnaldi Japa, Taumar, Sté, Manguinho (*In memoriam*) por toda ajuda, carinho e dedicação com o trabalho. A técnica de microscopia (cunhada maravilhosa), Aline e a Eng. agrônoma Elisa, que sempre me ajudaram muito, a técnica da Entomologia, Léinha, por me disponibilizar tantos produtos e ajuda no meu experimento.

A melhor e mais animada equipe: Bruno, Carol, Danielle, Dayliane, Edlânia, Elisa, Elise, Giovana, Giovanni, Humberto, Isadora, Iolanda, Larissa, Lucas, Monique, Ranuelli, Renato, Rubens, Pedro, Thamires, Túlio, Vander e Victória, agradeço por toda amizade, apoio, companheirismo, “crossfit” de vasos, capinas, noites viradas avaliando experimentos e secando sementes, caixas de cervejinhas na colheita. Vocês são as pessoas mais dedicadas que conheço, a equipe mais engajada que já conheci, que ajudam mesmo com braço quebrado, no natal, feriado, ano novo e estão ali presentes sempre dando o seu melhor. Tenho certeza que não teria conseguido sem vocês!

Aos meus amigos da “seeds”, Ana Maria, Ana Reale, Cristiane, Débora, Graciele, Janaína, Joyce, Leandro, Marina, Matheus, Michele, Nathalia e Thaísa, por muitas vezes deixarem seus experimentos de lado e irem ajudar no meu, dias e noites de estudo, cadernos compartilhados, pela amizade, carinho e confiança.

Ao Alex e Renato pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos doutores de Goiás/UFLA/UFG/UFPel (e tantas estradas juntos): Dayanne, Fabiano, Marianne, Nara e Rafaella, agradeço por ter compartilharem esse sonho comigo.

As minhas amigas companheiras de casa e república (Seu Pernambuco/Cortiço), Ana Luísa, Bárbara, Beatriz, Camila, Jéssica, Ludmila e Nadya, por estar ao meu lado dividindo alegrias e contas comigo.

Ao GCIA – Grupo colaborativo de inglês agro e família NESEM - Núcleo de estudos em Sementes, que eu tive uma oportunidade imensa de participar, coordenar, aproveitar eventos, fazer grandes amigos, dividir sonhos e muitas festinhas.

Aos meus coorientados de TCC, Bruno, Leonardo, Livia e Ranuelli, pela amizade, ajuda, confiança, apoio, experiência e aprendizado.

Aos meus amigos (e irmãos) de Goiânia, Gabriela, Gleyciane, Hugo, Joyce, Lari, Lorena Rover, Lorena Arruda, Marianne, Morgana e Renatinho, que muitas vezes se fizeram presentes quando eu não podia estar e estavam presentes na fase mais difícil de minha vida. Amo muito vocês!

A todos os amigos e amigas que conquistei durante esse período. Vocês foram fundamentais nessa fase. Saibam que serei eternamente grata por toda amizade, ajuda, apoio, confiança, conselhos e todos os momentos compartilhados!

A todos que, de algum modo, me apoiaram durante esse período.

MUITO OBRIGADA!

*“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente,
o que fazemos para mudar o que somos.”*

Eduardo Galeano

RESUMO GERAL

A seca é um dos fatores que mais limita o desenvolvimento da planta e a produtividade de grãos de milho. Compreender as características do déficit hídrico é fundamental para a identificação e a seleção de genótipos tolerantes a seca. Na seleção de um genótipo podem ser utilizadas múltiplas estratégias, dentre essas, os marcadores fenotípicos e moleculares. Assim, objetivou-se avaliar a influência do déficit hídrico sobre algumas características agronômicas e a expressão das enzimas do sistema antioxidante em folhas, raízes e sementes de plantas de linhagens e híbridos de milho. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas duas linhagens (L91 e L31) e dois híbridos de milho (31/91 e 91/31), contrastantes quanto à tolerância a seca, classificados em trabalhos anteriores. No primeiro experimento, foram avaliados os caracteres agronômicos: altura de planta, tamanho de pendão, o intervalo entre os florescimentos feminino e masculino e número de sementes por planta. Foram observadas diferenças estatísticas em todas as características, exceto para número de sementes. Conclui-se que caracteres agronômicos relacionados ao florescimento de plantas de milho e comprimento de pendão, podem estar associados à tolerância ao déficit hídrico e podem ser utilizados como caracteres para a escolha de novas cultivares tolerantes à seca. O segundo experimento foi realizado com os mesmas linhagens e híbridos e foram avaliadas as expressões das enzimas, catalase (CAT), esterase (EST), peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e proteínas totais, pela técnica de eletroforese e a quantificação das proteínas CAT, SOD, EST, ascorbato peroxidase (APX) e proteínas totais, pela técnica de espectrofotometria de microplacas, em folhas, raízes e sementes de milho submetidas à dois regimes hídricos (sem e com déficit hídrico). Foram observadas variações das expressões das enzimas catalase, esterase, peroxidase e superóxido dismutase, avaliadas pela técnica de eletroforese, nas diferentes linhagens e híbridos e nos tecidos avaliados, em função do regime hídrico utilizado. Quanto à quantificação, pela técnica de espectrofotometria de microplacas, houve variações dos valores das proteínas, em função da linhagem e híbrido, tecido e regime hídrico. Para maioria dos genótipos avaliados, há maior expressão das proteínas sob condição de deficiência hídrica. A maior atividade das enzimas SOD, CAT, POX, foram observados em folhas e raízes, de plantas submetidas ao déficit hídrico e a maior atividade da enzima esterase foram observadas em folhas, raízes e sementes, independentemente de o crescimento das raízes ocorrer sob deficiência hídrica ou não. Assim, marcadores de proteínas e características agronômicas podem estar associadas à tolerância à seca em milho.

Palavras-chave: Seleção indireta. Enzimas antioxidantes. ROS. Tolerância a seca.

GENERAL ABSTRACT

Drought is one of the factors that limits the most the development of plants and maize grain yield. Understanding the characteristics of water deficit is fundamental for the identification and selection of drought-tolerant genotypes. When selecting a genotype, many strategies can be used, including phenotypic and molecular markers. Therefore, the objective was to evaluate the influence of water deficit on agronomic characteristics and the expression of enzymes of the antioxidant system in leaves, roots and seeds in inbred lines and hybrids of maize. The experiment was carried out in a greenhouse at the Department of Agriculture of the Universidade Federal de Lavras (UFLA). Two inbred lines (L91 and L31) and two maize hybrids (31/91 and 91/31) were used, contrasting in terms of drought tolerance, classified in previous works. In the first experiment, the agronomic characters evaluated were: plant height, tassel size, the interval between female and male flowering and number of seeds per plant. Statistical differences were observed in all characteristics, except for number of seeds. It is concluded that agronomic characteristics related to the flowering of maize plants and tassel length may be associated with tolerance to water deficit and can be used as an indicator to select new drought-tolerant cultivars. The second experiment was carried out with the same inbred lines and hybrids and it was measure the expressions of the enzymes, catalase (CAT), esterase (EST), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) and total proteins, by the electrophoresis technique and the quantification of CAT, SOD, EST, ascorbate peroxidase (APX) and total proteins, by the technique of the microplate spectrophotometry, in leaves, roots and seeds of maize submitted to two water regimes (with and without water deficit). Variations in the expressions of catalase, esterase, peroxidase and superoxide dismutase were observed, evaluated by the electrophoresis technique, in the inbreds and hybrids and in the evaluated tissues, depending on the water management used. As for quantification, by the microplate spectrophotometry technique, there were variations in protein values, depending on the inbred and hybrid, tissue and water regime. For most of the evaluated genotypes, there is greater expression of proteins under water deficit condition. The highest activity of SOD, CAT, POX enzymes were observed in leaves and roots of plants submitted to water deficit and the highest activity of the esterase enzyme were observed in leaves, roots, and seeds, regardless of whether the roots growth occurred under water deficit or not. Therefore, protein markers and agronomic traits may be associated with drought tolerance in maize.

Keywords: Indirect selection. Antioxidant enzymes. ROS. Drought tolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Atividade da enzima catalase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da CAT e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.....58
- Figura 2 - Atividade da enzima catalase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da CAT e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.....59
- Figura 3 - Atividade da enzima catalase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da CAT e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm² pelo ImageJ. 60
- Figura 4 - Atividade da enzima esterase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da EST e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.....61
- Figura 5 - Atividade da enzima esterase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da EST e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.....62
- Figura 6 - Atividade da enzima esterase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da EST e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ. 63
- Figura 7 - Atividade da enzima peroxidase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da POX e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.64
- Figura 8 - Atividade da enzima peroxidase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da POX e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.65

Figura 9 - Atividade da enzima peroxidase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da POX e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ. 66

Figura 10 - Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da SOD e b) quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ..... 67

Figura 11 - Atividade da enzima superóxido dismutase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da SOD e b) quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ..... 68

Figura 12 - Atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da SOD e b) quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ..... 69

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 1

Gráfico 1 - Dados climáticos de Temperatura Média (°C) e Umidade relativa do ar (%), no período de novembro de 2018 a abril de 2019, coletados de casa de vegetação, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras - MG..... 32

CAPÍTULO 2

Gráfico 1 - Dados climáticos de Temperatura Média (°C) e Umidade relativa do ar (%), no período de novembro de 2018 a abril de 2019, coletados de casa de vegetação, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG..... 52

Gráfico 2 – Quantificação da atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX), por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): 70

Gráfico 3 - Quantificação da atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX), por meio da espectrofotometria de microplacas, em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): 71

Gráfico 4 - Quantificação da atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX), por meio da espectrofotometria de microplacas, em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): 72

Gráfico 5 - Quantificação da atividade enzimática de catalase (CAT), por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): 73

Gráfico 6- Quantificação da atividade enzimática de catalase (CAT), por meio da espectrofotometria de microplacas, em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): 73

Gráfico 7 - Quantificação da atividade enzimática de catalase (CAT), por meio da espectrofotometria de microplacas, em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): 74

Gráfico 8 - Quantificação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):	75
Gráfico 9 - Quantificação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), por meio da espectrofotometria de microplacas, em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):	76
Gráfico 10 - Quantificação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), por meio da espectrofotometria de microplacas, em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):	77
Gráfico 11 - Quantificação da atividade de proteínas totais, por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas, raízes e sementes linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):	78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Graus-dia acumulados e número de dias correspondente a cada subperíodo fenológico da cultura do milho, Lavras, novembro de 2018 a abril de 2019.	33
Tabela 2 - Genótipos de milho selecionados quanto a tolerância ao déficit hídrico.	33
Tabela 3 - Resultados médios de altura das plantas (ALP), em centímetros, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico), em linhagens e híbridos de milho.	36
Tabela 4 - Resultados médios de comprimento de pendão (CP), em centímetros, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico), em linhagens e híbridos de milho.	38
Tabela 5 - Resultados médios de número de Sementes (NS), em centímetros, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico), em linhagens e híbridos de milho.	39
Tabela 6 - Resultados médios, em dias, de florescimento feminino, em linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico).	40
Tabela 7 - Resultados médios, em dias, de florescimento masculino, em linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico).	41

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Graus-dia acumulados e número de dias correspondente a cada subperíodo fenológico da cultura do milho, Lavras, novembro de 2018 a abril de 2019.	53
Tabela 2 - Genótipos de milho selecionados quanto a tolerância ao déficit hídrico.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO SUBMETIDOS AO DEFICIT HÍDRICO	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 METODOLOGIA.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADAS A TOLERÂNCIA A SECA EM LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO.	47
1 INTRODUÇÃO	49
2 METODOLOGIA.....	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho é a maior cultura de grãos do mundo, sendo que na safra 2020/2021 foi produzido cerca de 1,2 bilhões de toneladas em nível global (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2022). Os três maiores produtores mundiais de milho são os EUA, China e Brasil, que juntos produzem mais de 60% de todo o milho produzido no mundo anualmente (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2022).

No Brasil, o milho é a segunda cultura mais cultivada, sendo que o cultivo na segunda safra representa 70% da produção (CONAB, 2021). Na segunda safra (safrinha) é comum instabilidades do regime de chuvas, estiagens, temperaturas extremas, baixa umidade relativa do ar e alta irradiação solar, o que pode comprometer a produtividade e a qualidade dos grãos.

Além disso, como o milho safrinha é plantado após uma cultura de verão, a sua data de plantio depende da época do plantio dessa cultura antecessora e de seu ciclo. Assim, o planejamento do milho safrinha inicia com a cultura de verão, visando liberar a área o mais cedo possível. Quanto mais tarde for o plantio, menor será o potencial e maior o risco de perdas por adversidades climáticas (seca e/ou geadas) (Fancelli & Dourado, 2001). Segundo Sawazaki *et al.* (1998) isso a torna uma cultura de alto risco, uma vez que a estação chuvosa se encontra no fim, o que proporciona uma variabilidade espacial e temporal muito grande e, como consequência, uma variabilidade de produção.

O relatório *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (SOLAW - 2021), constata que a mudança climática é um dos fatores que mais interfere na produção de alimentos e, conseqüentemente, compromete a segurança alimentar em várias regiões do mundo. As principais mudanças no ciclo da água, particularmente os padrões de chuva e períodos de estiagem, demandam ajustes no sistema de produção de sequeiro e irrigado.

O déficit hídrico é considerado o principal fator que limita o desenvolvimento da planta de milho. O milho é uma cultura que apresenta extrema sensibilidade a estresses hídricos, principalmente durante a sua fase reprodutiva (BÄNZINGER *et al.*, 2000). O déficit hídrico interfere também em outras características relacionadas à morfologia, fisiologia e bioquímica da planta (BERGAMASCHI *et al.*, 2004).

A seca pode afetar as plantas de milho em qualquer estágio de crescimento (KONDWAKWENDA, *et al.*, 2021), uma vez que a disponibilidade de água interfere, de maneira geral, no desenvolvimento e crescimento das 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).

A primeira consequência do déficit hídrico é o fechamento estomático que ocorre com a diminuição do potencial hídrico nas folhas, que invariavelmente coincide com a redução da fotossíntese e da transpiração (ROCHA *et al.*, 2021). A redução do crescimento da parte aérea sob condições de estresse é uma das importantes causas da baixa produtividade, reflexo da redução fotossintética (LISAR *et al.*, 2012). Assim que o déficit hídrico se intensifica, o potencial de água das folhas decresce, há redução do volume celular, inibição das enzimas do Ciclo de Calvin, o que impede o acréscimo da concentração de solutos estomáticos, e, por conseguinte, há a inibição da fotossíntese (SUN *et al.*, 2017).

Além das respostas fisiológicas, há modificações na anatomia de plantas em resposta ao déficit hídrico. A alta produção de açúcares promove aumento da área do floema, já que a alta concentração de solutos eleva a pressão osmótica a fim de diminuir o volume de água no xilema, que seria destinado à transpiração (SEVANTO, 2018).

Segundo Clemente (2017), o déficit hídrico também compromete o desenvolvimento vegetativo do milho, com redução da altura de plantas, da massa seca da parte aérea e das raízes. Segundo o mesmo autor, a altura de plantas pode ser uma ótima característica para a identificação de genótipos tolerantes a seca, porém a eficiência da utilização desta, como indicativo de tolerância, vai depender do nível de estresse e do número de genótipos estudados.

Como já abordado sob condições de deficiência hídrica, tem sido observado menor desenvolvimento do sistema radicular das plantas. Além de sustentar fisicamente a planta, o sistema radicular do milho absorve significativas quantidades de água e nutrientes e, portanto, tem influência na produtividade da cultura e uma estreita relação com a tolerância à seca (YAMAGUCHI; SHARP, 2010). A tolerância da raiz ao déficit hídrico depende de sua capacidade de manter o potencial osmótico simplástico adequado, a composição proteica da

parede celular, o metabolismo de carboidratos e as vias metabólicas envolvidas em resposta ao estresse oxidativo (AVRAMOVA *et al.*, 2016).

Segundo Tardieu, Simonneau e Muller (2018) e Rocha *et al.* (2021), além do estresse hídrico poder retardar ou até mesmo paralisar o crescimento vegetativo, ele também pode retardar o desenvolvimento reprodutivo das plantas. O período de maior sensibilidade à deficiência hídrica é durante as duas semanas que antecedem a floração, pois, a seca nesse período diminui o vingamento de espigas e grãos, e induz a senescência precoce das folhas durante o enchimento de grãos (BÄNZINGER *et al.*, 2000). Outro período crítico desta cultura é o da pré-floração ao início do enchimento de grãos (MORIZET; TOGOLA, 1984). A seca durante esse período pode inibir o florescimento, provocar falhas na fertilização e aborto dos embriões, o que resulta na queda da produção (WESTGATE, 1994).

O déficit hídrico causa o retardamento no florescimento feminino e, conseqüentemente, aumenta o comprimento do intervalo entre florescimentos masculino e feminino (IFMF). O assincronismo entre florescimentos masculino (FM) e feminino (FF) tem sido associado com um decréscimo no rendimento de grãos sob seca (BASSETTI; WESTGATE, 1993; BETRÁN *et al.*, 2003; BOLAÑOS *et al.*, 1993; DURÃES *et al.*, 2004). Assim, o intervalo entre os florescimentos masculino e feminino (IFMF) é uma das características mais importantes a ser avaliada visando o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao déficit hídrico (AGRAMA; MOUSSA, 1996; BÄNZINGER *et al.*, 2000; BOLAÑOS; EDMEADES, 1996; XIAO, 2004).

Informações sobre as correlações destes caracteres à deficiência hídrica, são de fundamental importância para a seleção de genótipos de milho com tolerância a seca (OYEKUNLE *et al.*, 2015). Um caractere ideal deve ser geneticamente associado com a produção de grãos sob estresse, ter variabilidade, ter avaliação rápida e barata, e ser estável durante o período de avaliação (EDMEADES *et al.*, 2008).

Diferentes genótipos reagem a deficiência hídrica por meio de diferentes mecanismos e intensidades, o que permite seleções aos melhoristas (KONDWAKWENDA *et al.*, 2021). Nos programas de melhoramento, cada vez mais tem-se visado genótipos que toleram, em diferentes estádios de desenvolvimento, a deficiência hídrica. O desenvolvimento de cultivares de milho tolerantes ao déficit hídrico representa uma das principais prioridades para aumentar a produtividade e diminuir os riscos de produção em diferentes regiões e de plantio.

Os mecanismos envolvidos na tolerância a seca são complexos e a caracterização precoce de genótipos por meio do estudo dos caracteres associados à tolerância à deficiência hídrica podem fornecer parâmetros que auxiliarão na seleção de novas cultivares em programas de melhoramento (ABREU et al, 2017).

Sabe-se que o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência das plantas são influenciadas pelo genótipo e ambiente. Sob condições de estresse as plantas têm o seu metabolismo e crescimento alterados. Nestas condições estão envolvidas enzimas antioxidantes, conhecidas como *scavengers*, que estão associadas à remoção das espécies reativas de oxigênio - EROs (GUPTA *et al.*, 2018). Em eventos relacionados ao estresse biótico e abiótico, as EROs desempenham sua função sinalizadora e quando em excesso, tem efeito tóxico nas plantas provocando danos nos ácidos nucléicos, lipídeos, metabólitos e proteínas, que podem levar a morte celular (VAN RUYSKENSVELDE *et al.*, 2018).

A produção de EROs é importante em diversos processos da célula como a sinalização celular e defesa contra estresses bióticos e abióticos (POSPÍŠIL, 2009). As concentrações aumentadas de EROs, quando não neutralizadas, podem causar danos às membranas, proteínas, moléculas de DNA e RNA, em um processo denominado estresse oxidativo. Entretanto, enzimas desintoxicantes de EROs que atuam nas células atenuam esse processo. Dentre as principais EROs destacam-se: os radicais superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH^-), oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MEWARD *et al.*, 2018).

As plantas protegem suas células e compartimentos subcelulares dos efeitos tóxicos causados por EROs usando compostos protetores e várias enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase, peroxirredoxina e polifenol oxidase (CHOUDHURY *et al.*, 2017). Enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR) atuam nessa defesa contra as EROs. A SOD é a responsável por um papel central na defesa contra o estresse oxidativo em todos os organismos aeróbicos (SHARMA, 2012).

O peróxido de hidrogênio produzido pela enzima superóxido dismutase pode ser convertido em água e oxigênio pela enzima catalase, ou em água, pela enzima ascorbato peroxidase. Em relação ao metabolismo lipídico, a enzima esterase é uma enzima degradativa

que atua nas reações de hidrólise do éster (TURNER; HUMPHREYS, 2018) e a GR, retira os H₂O₂ de diversos compartimentos celulares (MEWARD *et al.*, 2018).

Conhecer os mecanismos associados à expressão de enzimas antioxidantes podem auxiliar nos trabalhos que visam o desenvolvimento de materiais genéticos mais tolerantes aos estresses abióticos (DIAS *et al.*, 2010). Assim, objetivou-se, nesta pesquisa avaliar a influência do déficit hídrico sobre as características agronômicas e na expressão e quantificação das enzimas catalase (CAT) e esterase (EST), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e de proteínas totais em folhas, raízes e sementes de linhagens e híbridos de milho submetidos à restrição hídrica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V.M.; VON PINHO, E.V D.R.; DE CARVALHO, M.R.; NAVES, G.M.D.F.; VON PINHO, R.G.; DOS SANTOS, H. O. **Indirect selection for drought tolerance in maize through agronomic and seeds traits**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 16, n. 2, p. 287-296, 2017.
- AGRAMA, H. A.; MOUSSA, M. E. **Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize** (*Zea mays* L.) Euphytica, Wageningen, v. 91, n. 1, p. 89-97, 1996.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL. **Agrianual 2015**. São Paulo: Informa Economics FNP, 362 p. 2016.
- AVRAMOVA, V.; NAGEL, K.A.; ABDELGAWAD, H.; BUSTOS, D.; DUPLESSIS, M.; FIORANI, F.; BEEMSTER, G.T.S. **Screening for drought tolerance of maize hybrids by multi-scale analysis of root and shoot traits at the seedling stage**. J. Exp. Bot. 67, 2453–2466. 2016.
- BÄNZINGER, M. *et al.* **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice**. Mexico: CIMMYT, 68 p. 2000.
- BASSETTI, P.; WESTGATE, M.E. **Senescence and receptivity of maize silks**. Crop Science 33, 275-278. 1993.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; JOAO ITO BERGONCI, J.I.; BIANCHI, C.A.M.; MULLER, A.G.; FLAVIA COMIRAN, F.; HECKLER, B.M.M.; **Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos**. Agrometeorologia. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39 (9). Set. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000900001>.
- BETRÁN, F.J.; BECK, D.; BÄNZIGER, M.; EDMEADES, G.O. **Secondary traits in parental inbreds and hybrids under stress and non-stress environments in tropical maize**. Field Crops Research 83, 51- 65, 2003.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. **Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass, and radiation utilization**. Field Crops Research, Amsterdam, v. 31, p. 233-252. 1993.
- BOLAÑOS J.; EDMEADES, G. O. **The importance of the anthesis– silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize**. Field Crops Research, v. 48, n. 1, p. 65–80. 1996.
- CHOUDHURY, F. K. *et al.* **Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination**. The Plant Journal, 90(5):856-867, 2017.
- CLEMENTE, D.I, **Estresse hídrico sobre caracteres morfofisiológicos e agronômicos em populações de milho**. Orientador: Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis; coorientador Dr. Antônio Paulino da Costa Netto. 2017. 109 f.: il. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Jataí, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sétimo levantamento: safra 2020/21.** Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; FLOH, E.I.S. **Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species.** Brazilian Journal of Plant Physiology, Campo dos Goytacazes, v. 22, n. 1, p. 23-33, 2010.

DURÃES, F.O.M.; SANTOS, M.X.; GAMA, E.E.G.; MAGALHÃES, P.C.; ALBUQUERQUE, P.E.P.; GUIMARÃES, C.T. **Fenotipagem associada a tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores.** Embrapa Milho e Sorgo, Embrapa Milho e Sorgo - Circular Técnica No. 39. 17 p. 2004.

EDMEADES, G. **Drought Tolerance in Maize: An Emerging Reality.** A Feature in James Clive, 2008. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA Brief, n. 39, 2008.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho.** 1. ed. Guaíba: Agropecuária, v. 1. 360 p. 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS –. **The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture: Systems at breaking point (SOLAW 2021).** Synthesis report Rome. 2022.

GUPTA, D.K.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J. (Eds.). **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants.** [S.l.]: Springer International Publishing, 2018.

KONDWAKWENDA, ALECK; SIBIYA, JULIA; ZENGENI, REBECCA; MUSVOSVI, COUSIN; **Aspects in breeding maize for drought tolerance: Progress and modern breeding approaches,** Australian Journal of Crop Science AJCS 15(04):510-517. 2021. doi: 10.21475/ajcs.21.15.04. p2779.

LISAR, S.Y.S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M.M.; RAHMAN, I.M.M.; **Water Stress in Plants: Causes, Effects and responses.** In book: Water Stress (pp.1–14) Chapter: 1 Publisher: In Tech: Rijeka, Croatia. Editors: Ismail M. M. Rahman, Hiroshi Hasegawa January 2012. DOI:10.5772/39363.

MEWARD, A. R. M. A.; DESOKY, E. S. M.; RADY, M. M. **Response of water deficit stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application.** Scientia Horticulturae, v. 228, p.132–144, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.008>.

MORIZET, J.; TOGOLA, D. **Effect et arrière-effect de la sécheresse sur la croissance de plusieurs génotypes de maïs.** In: CONFÉRENCE INTERNATIONALE DES IRRIGATIONS ET DU DRAINAGE, 1984, Versailles. Les besoins en eau des cultures Paris: INRA, 1984. p.351-360.

OYEKUNLE, M.; BADU-APRAKU, B.; HEARNE, S.; FRANCO, J. **Genetic diversity of tropical early-maturing maize inbreds and their performance in hybrid combinations under drought and optimum growing conditions.** *Field Crops Research*, v. 170, p. 55-65, 2015.

POSPÍŠIL, P. **Production of reactive oxygen species by photosystem II.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1787, n. 10, p. 1151-1160, 2009.

ROCHA, D.S.; RODRIGUES, C.S.; GALLO, P.B.; TICELLI, M.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. **Drought tolerance in intervarietal maize hybrids.** *Agronomy, Rev. Caatinga* 34 (1), Jan/Mar 2021. <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n109rc>.

SAWAZAKI, E *et al.* (1998) **Potencial de linhagens de populações de milho pipoca para síntese de híbridos,** *Bragantia, Campinas*, v.59, n.2, p – 143-151, 1998.

SEVANTO, S. **Drought impacts on phloem transport.** *Current Opinion in Plant Biology*, v. 43, p. 76–81. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.002>.

SHARMA, P. *et al.* **Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions.** *Journal of Botany*, v.2012, p.1- 26, 2012.

SUN, J. *et al.* **The inhibition of photosynthesis under water deficit conditions is more severe in flecked than uniform irradiance in rice (*Oryza sativa*) plants.** *Functional Plant Biology*, v. 44, n. 4, p. 464-472, 2017.

TAIZ, E.; ZEIGER, L. **Fisiologia vegetal.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 954 p. 2013.

TARDIEU F.; SIMONNEAU, T.; MULLER, B. **The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach.** *Annual review of plant biology*, 69: 733-759, 2018.

TURNER, N. J.; HUMPHREYS, L. **Biocatalysis in organic synthesis: The retrosynthesis approach.** CPI Group, 29p. 2018.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. Economic Research Service. **Corn and other feed grains.** Washington, 2022. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/corn-and-other-feedgrains>.

VAN RUYSKENSVELDE, V.; BREUSEGEM, F.V.; KELEN, K.V.D.; **Post-transcriptional regulation of the oxidative stress response in plants.** *Free Radical Biology and Medicine* Volume 122, Pages 181-192, July 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.032.

WESTGATE, M. E. **Seed formation in maize during drought.** In: BOOTE, K. J. *et al.* (Ed.). *Physiology and determination of crop yield.* Madison: Wisconsin, p. 361- 364, 1994.

XIAO, Y. N.; ZHANG, S. H.; LI, M. S. **Identification of quantitative trait loci (QTLs) for flowering time using SSR marker in maize under water stress.** *Korean Journal of Genetics*, Seoul, v. 26, n. 4, p. 405- 413, 2004.

YAMAGUCHI, M.; SHARP, R. E.; **Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses.** Volume33, Issue4, Pages 590-603, Special Issue: Special Issue on Drought and Salinity Stress. 2010. *Plants, Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02064>.

CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo e apresenta elevada importância no mercado, sendo a segunda cultura mais cultivada no Brasil. A deficiência hídrica, durante o desenvolvimento das plantas, compromete a produção de alimentos e conseqüentemente a segurança alimentar em todo o mundo. Este tema tem ganhado importância em todo o mundo e pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de materiais genéticos tolerantes à seca, a exemplo do milho. A seleção indireta por meio de caracteres é de fundamental importância para a seleção de genótipos de milho tolerantes à seca. Caracteres como altura da planta, comprimento de pendão, intervalo entre florescimentos masculino e feminino (IFMF), florescimento masculino (FM) e feminino (FF), número de sementes, podem auxiliar na seleção de genótipos tolerantes à seca. Assim, nesse experimento, objetivou-se avaliar a influência do déficit hídrico sobre características agronômicas de linhagens e híbridos de milho. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas duas linhagens (L91 e L31) e dois híbridos de milho (31/91 e 91/31), contrastantes quanto à tolerância a seca, classificados em trabalhos anteriores. Sob condições de déficit hídrico não foi possível diferenciar as linhagens L31, classificada como não tolerante e L91, classificada como tolerante, pelas características de altura de plantas, comprimento do pendão, número de sementes por planta e florescimento masculino. Na condição de déficit hídrico, o florescimento feminino da linhagem 31 foi mais precoce que o da linhagem 91. Nesta condição, tanto para o florescimento masculino, quanto para o florescimento feminino, a maior precocidade foi observada em materiais híbridos (31/91 e 91/31), quando comparada à das linhagens.

Palavras-chave: *Zea mays*. Estresse abiótico. Caracteres indiretos. Expressão enzimática.

CHAPTER 1 - AGRONOMIC CHARACTERISTICS OF MAIZE INBRED LINES AND HYBRIDS SUBMITTED TO WATER DEFICIT

ABSTRACT

Maize is one of the most cultivated cereals in the world and is highly important in the market, being the second most cultivated crop in Brazil. Water deficiency, during plant development, compromises food production and consequently food security worldwide. This subject has gained importance around the world and researches are increasing aiming the development of genotypes tolerant to drought, as in maize. Indirect selection through characters is of fundamental importance for the selection of drought-tolerant maize genotypes. Characters such as plant height, tassel length, interval between male and female flowering (IFMF), male flowering (FM) and female flowering (FF), and number of seeds, can help in the selection of drought-tolerant genotypes. Therefore, in this experiment, the objective was to evaluate the influence of water deficit on agronomic characteristics of maize inbred lines and hybrids. The experiment was carried out in a greenhouse at the Department of Agriculture of the Universidade Federal de Lavras (UFLA). Two inbred lines (L91 and L31) and two maize hybrids (31/91 and 91/31) were used, contrasting in terms of drought tolerance, classified in previous works. Under water deficit conditions, it was not possible to differentiate the lines 31, classified as intolerant and L91, classified as tolerant, by the characteristics of plant height, tassel length, number of seeds per plant and male flowering. In the water deficit condition, the female flowering of inbred line 31 was earlier than that of inbred line 91. In this condition, for both male and female flowering, the highest precocity was observed in hybrid materials (31/91 and 91 /31), when compared to the inbreds.

Keywords: *Zea mays*. Abiotic stress. Indirect characters. Enzymatic expression.

1 INTRODUÇÃO

É frequente, durante o estágio de desenvolvimento de plantas, a ocorrência de estresses bióticos e abióticos, como o excesso de luminosidade, temperaturas muito extremas, falta ou excesso de água, deficiência nutricional, pragas, doenças, plantas daninhas, entre outros, limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas.

O estresse hídrico juntamente com o aumento da temperatura, provocam impactos negativos no rendimento das culturas. Estima-se que até 2050, o estresse hídrico atinja 52% da população mundial (4,7 bilhões de pessoas), aproximadamente 49% da produção global de grãos e 45% (US\$ 63 trilhões) do PIB total (ROSEGRANT, 2016).

As mudanças climáticas, indicam a necessidade de aumento da oferta de produtos agrícolas com maior eficiência do uso de recursos, principalmente em ambientes onde a água é limitante. Estudos das modificações morfofisiológicas das plantas associadas ao estresse causado pelo déficit hídrico tornam-se de extrema importância nesse cenário (GUIMARÃES *et al.* 2019).

Os efeitos negativos do estresse hídrico são, geralmente, a supressão do crescimento e do desenvolvimento das plantas (ZHANG *et al.*, 2020), que são influenciadas pelo genótipo e pelo ambiente (GUPTA *et al.*, 2018). A resposta fisiológica em relação à tolerância a seca pode variar de acordo com a severidade e a duração de imposição do estresse, estágio fenológico e material genético (SHAO *et al.* 2008; MAGALHÃES *et al.* 2009).

A escassez de água afeta vários processos no crescimento e desenvolvimento das plantas (CRAMER *et al.*, 2011; BENEŠOVÁ *et al.*, 2012; NURMBERG *et al.*, 2022), reduz os componentes de rendimento do milho, tais como grãos por m², números de espigas por m² e rendimento de grãos, em função da influência sobre os processos de polinização, fertilização dos óvulos e maturação dos grãos (SOUSA, 2015).

Sob condições de seca, caracteres como, florescimento feminino e masculino, intervalo entre o florescimento masculino e feminino, altura de plantas, entre outros, podem correlacionar a tolerância ao déficit hídrico com rendimento de grãos (OYEKUNLE *et al.* 2015). De acordo com Zhao *et al.* (2018), quando o estresse hídrico ocorre durante as fases vegetativas, há redução na altura da planta, na expansão foliar e na massa seca da parte aérea, em comparação com plantas bem irrigadas. A identificação de genes relacionados à altura da planta é importante

nos processos de seleção de plantas tolerante ao déficit hídrico (ADHIKARI *et al.*, 1999). No entanto, a altura da planta é uma característica complexa e afetada por fitohormônios, sendo controlada por muitos genes (ENQUIST; NIKLAS, 2001).

As características morfológicas do pendão são importantes em programas de melhoramento de milho, nos quais linhagens endogâmicas são selecionadas no sentido de reduzir o tamanho e o número de pendões e manter a produção de pólen satisfatória (DUVICK, 2005; FISCHER; EDMÉADES, 2010).

O milho exhibe grande variação natural quanto à morfologia do pendão (XU *et al.* 2017), mas durante os últimos 80 anos de melhoramento, uma das mudanças pronunciadas no fenótipo foi a diminuição do tamanho do pendão ao longo do tempo (DUVICK, 2005; XU *et al.* 2017). Pendões menores, mostram-se negativamente associados ao rendimento de grãos (QIN *et al.*, 2021; BROWN *et al.*, 2011; GERALDI *et al.*, 1985; LAMBERT; JOHNSON, 1978). Por outro lado, para garantir a produção de sementes de alta qualidade, o genitor masculino ideal deve ter um pendão relativamente grande, que libere pólen suficiente por um longo período. Assim, a identificação e caracterização de genes que controlam precisamente as características do pendão é importante para o melhoramento genético da produtividade do milho (Qin *et al.*, 2021).

O estresse hídrico duas semanas antes e até duas semanas após o florescimento pode causar redução significativa na produção de grãos. Porém, a maior redução na produção poderá ocorrer com déficit hídrico na emissão dos estilo-estigmas (início de R1) (MAGALHÃES *et al.*, 1995). O retardamento da emissão dos estilo-estigmas, observado sob incidência do déficit hídrico durante o florescimento, provoca assincronia entre os florescimentos femininos e masculinos (BOLAÑOS; EDMÉADES, 1996; RIBAUT *et al.*, 1996), em função disso, o intervalo entre os florescimentos masculino e feminino (IFMF) tem sido considerada uma das características mais importantes a ser avaliada, visando o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao déficit hídrico (AGRAMA; MOUSSA, 1996; BÄNZINGER *et al.*, 2000; BOLAÑOS; EDMÉADES, 1996; XIAO, 2004).

O IFMF é uma característica singular e de alta herdabilidade, fácil mensuração e totalmente independente das diferenças de maturação entre as cultivares (BOLAÑOS; EDMÉADES, 1993). O sincronismo do florescimento masculino e feminino em milho, sob estresse hídrico, pode garantir a produção de sementes (XIE *et al.*, 2010) e é uma das

características mais importantes para selecionar genótipos à tolerância ao estresse hídrico (SPITKÓ *et al.*, 2014).

Também deve ser considerado que a deficiência hídrica pode influenciar nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura, a exemplos de germinação, velocidades de germinação das sementes e emergência de plântulas, o que pode comprometer o estabelecimento da cultura no campo (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

A tolerância ao déficit hídrico é uma característica conferida à planta por meio de vários genes, sendo, portanto, de difícil manuseio pelo melhoramento genético (BEEVER, 2000). Segundo Abreu *et al.* (2017), os mecanismos envolvidos na tolerância a seca são complexos e a caracterização precoce de genótipos, por meio do estudo dos caracteres associados à tolerância à deficiência hídrica, podem fornecer parâmetros que auxiliarão na seleção de novas cultivares em programas de melhoramento.

Assim, tem-se que características agronômicas avaliadas como germinação, altura das plantas, inflorescência masculina, inflorescência feminina, intervalo entre inflorescência masculina e feminina, número de sementes, entre outras, podem auxiliar em processos seletivos visando o desenvolvimento de cultivares com tolerância ao déficit hídrico.

Objetivou-se com este trabalho, avaliar linhagens contrastantes e híbridos de milho, quanto à tolerância à seca, por meio de parâmetros agronômicos.

2 METODOLOGIA

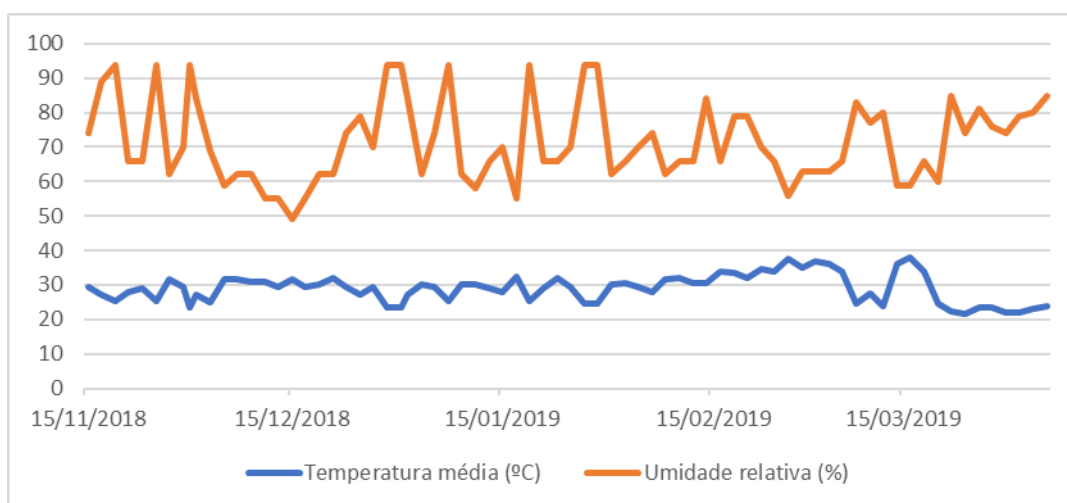
2.1 Localização

A pesquisa foi conduzida em condição de casa de vegetação e no Laboratório Central de Sementes da UFLA, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Esta região apresenta clima tipo Cwa da classificação de Koppen (DANTAS *et al.*, 2007).

2.2 Dados climáticos durante a condução do experimento

O experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2018 e abril de 2019. Os dados de temperatura média e umidade relativa do ar durante a condução do experimento, em casa de vegetação, estão apresentados no Gráfico 1. A temperatura máxima, temperatura mínima e a umidade relativa do ar foram monitoradas diariamente (Tabela 1A, APÊNDICE A) no mesmo horário, por meio de um termômetro digital e higrômetro digital para medição de umidade do ar, coletados na casa de vegetação, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

Gráfico 1 - Dados climáticos de Temperatura Média (°C) e Umidade relativa do ar (%), no período de novembro de 2018 a abril de 2019, coletados de casa de vegetação, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras - MG.



Fonte: Da Autora (2022).

2.3 Dados de graus-dia e graus-dia acumulado, na cultura do milho.

Para a determinação do cálculo de graus-dia, foi utilizado o método proposto por Arnold (1959). Considerou-se apenas a temperatura basal inferior (T_b) no cálculo dos graus-dia Equação (1).

$$GD = \frac{TM + Tm}{2} - Tb \quad (1)$$

Em que: GD = graus-dia, °C; TM = temperatura máxima do dia, °C; Tm = temperatura mínima do dia, °C; Tb = temperatura basal inferior, °C.

A temperatura basal inferior foi considerada 10°C. Também foi realizada o cálculo dos graus-dia acumulados (GDA). Os dados (Tabelas 1B e 2B, APÊNDICE B) obtidos pelos cálculos de graus-dia e graus-dia acumulado foram utilizados para a elaboração dos dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Graus-dia acumulados e número de dias correspondente a cada subperíodo fenológico da cultura do milho, Lavras, novembro de 2018 a abril de 2019.

Genótipos	Subperíodos fenológicos (Dias)		GDA (Graus-dia acumulados)		
	Semeadura a pendoamento	Pendoamento a colheita	Semeadura a pendoamento	Pendoamento a colheita	Semeadura a colheita
	L31	87	54	1520	1003
L91	84	57	1503	1070	2573
91/31	81	60	1486	1137	2623
31/91	82	59	1492	1115	2606

Fonte: Da Autora (2022).

2.4 Seleção de linhagens e híbridos de milho contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico.

A escolha dos materiais utilizados na pesquisa foi realizada de acordo com os resultados obtidos por Abreu *et al.* (2019). Foram utilizadas, nesta pesquisa, duas linhagens contrastantes quanto ao déficit hídrico, a linhagem 91, tolerante e a linhagem 31, não tolerante, e seu respectivos híbridos de milho (91/31 e 31/91), apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Genótipos de milho selecionados quanto a tolerância ao déficit hídrico.

Linhagens	Híbridos
L91	91/31
L31	31/91

Fonte: Da autora (2022).

2.5 Instalação

Após a seleção das linhagens contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, foi implantado um experimento em casa de vegetação para a produção de sementes das linhagens e híbridos de milho, durante a safra 2018/2019. Foi realizado previamente teste de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009) e verificou-se 99% de germinação nos lotes utilizados.

As sementes foram previamente tratadas com o fungicida VITAVAX®-THIRAM 200, na dosagem de 250 ml por 100 kg⁻¹ de sementes. Em cada vaso, foram germinadas 6 sementes e após 2 semanas foi realizado o desbaste, restando apenas 1 planta por vaso. As plantas foram desenvolvidas em vasos contendo o substrato de latossolo, com dois grupos de tratamentos diferentes, realizados do plantio a colheita. O primeiro grupo de tratamento, as plantas foram desenvolvidas em vasos com retenção de água de 30%, simulando a restrição hídrica. O segundo grupo de tratamento, a retenção de água no solo foi ajustada para 70%, ou seja, sem restrição hídrica.

Em ambos os grupos de tratamentos, a reposição da água foi realizada diariamente, com base no peso inicial de cada vaso com os substratos. Após os vasos serem pesados, era reposta a água, conforme o tratamento e os vasos eram pesados novamente para verificação do peso final. A adubação de cobertura, assim como os demais tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com as necessidades da cultura.

As espigas oriundas das autofecundações das linhagens, dos híbridos e dos cruzamentos foram colhidas com teor de água de 35%. Após a colheita, as espigas foram despalhadas manualmente e distribuídas em secadores de madeira, de acordo com Navratil e Burris (1984). As espigas despalhadas, inicialmente foram pré-condicionadas durante o processo de secagem à 35 °C até as sementes atingirem 20% do teor de água. Posteriormente, houve o aumento da temperatura para 42 °C até as sementes alcançarem o teor de água de 13%.

2.6 Avaliação de caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca

Foram avaliados os seguintes caracteres:

a) **Altura das plantas (ALP):** Com o auxílio de uma régua métrica, foram medidas as alturas das plantas, em centímetros, da base da planta até a inserção do pendão, aos 70 dias após a semeadura.

b) **Comprimento de pendão (CS):** Com o auxílio de uma régua métrica, foram medidos os tamanhos dos pendões, em centímetros, da inserção do pedúnculo até o final do pendão, aos 70 dias após a semeadura.

c) **Florescimento Masculino (FM):** Foi determinado pelo número de dias da semeadura até que 50% das plantas, de cada parcela, estivessem liberando pólen (ABREU *et al.*, 2019).

d) **Florescimento Feminino (FF):** Foi determinado pelo número de dias da semeadura até que 50% das plantas, de cada parcela, tivessem estilo-estigmas visíveis, com no mínimo 1 cm de comprimento (ABREU *et al.*, 2019).

e) **Intervalo entre os florescimentos feminino e masculino em dias (IFMF):** O intervalo entre os florescimentos foi determinado pela diferença do número de dias da semeadura e dos florescimentos feminino e masculino. Para eliminar os possíveis valores negativos, os quais dificultariam a análise de variância, foi adicionado aos valores de IFMF uma constante de valor 100 (ABREU *et al.*, 2017)

f) **Número de Sementes (NS):** Número médio de sementes por planta. Para facilitar a análise de variância, foi adicionado aos valores de NS uma constante de 100.

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o de inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x2), sendo quatro materiais genéticos e dois níveis de retenção de água no solo (30% de retenção de água no solo e 70% de retenção de água no solo). Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando necessário, foram realizadas as transformações dos dados. As análises foram realizadas com o auxílio do Software R[®] (R Development Core Team, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância houve interação significativa para os fatores genótipos (linhagens e híbridos) e níveis de retenção de água no solo (com e sem deficiência hídricas), para todas as variáveis estudadas.

Para a variável altura de plantas, para as linhagens L31, L91 e híbrido 91/31, os maiores valores foram observados em plantas desenvolvidas sob condições favoráveis de água no solo, sem déficit hídrico. Já o híbrido 31/91 não houve diferença na altura das plantas quando submetidas ou não ao déficit hídrico (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados médios de altura das plantas (ALP), em centímetros, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico), em linhagens e híbridos de milho.

	L31	L91	31/91	91/31
Sem déficit hídrico	131Ab	116 Ab	198 Aa	204 Aa
Com déficit hídrico	108 Bc	97 Bc	187 Aa	136 Bb
CV %	22.75			

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da Autora (2022).

Em relação as plantas dos genótipos desenvolvidas em solos com retenção de água de 70%, as maiores alturas foram observadas nos híbridos 31/91 e 91/31, os quais não diferenciam entre si. Os menores valores de altura de plantas, nesta condição, foram observados nas linhagens (L31 e L91), sendo os valores estatisticamente iguais.

Já sob déficit hídrico, maior altura de planta foi observada para híbrido 31/91 seguido pelo híbrido 91/31. Nesta condição menores valores de altura de plantas foram observados para as linhagens L31 e L91, que não diferenciaram entre si.

Os maiores valores da altura das plantas híbridas de milho era esperado em função do vigor híbrido ou heterose presente nestas plantas quando comparadas às plantas das linhagens que são endogâmicas. Importante ressaltar que, tanto sob deficiência hídrica quanto em condições favoráveis, não foi possível separar a linhagem tolerante (91) da não tolerante (31). Na presente pesquisa, não podemos considerar a altura como uma variável determinante para

selecionar genótipos tolerantes a deficiência hídrica. Esse mesmo resultado foi encontrado por Wang *et al.* (2018), onde selecionou-se três híbridos para tolerância a seca, cuja altura de plantas foi considerada nesta seleção. A altura das plantas foi medida na fase de período de crescimento vegetativo e na fase de pendoamento, durante a parte do dia com mais luminosidade. Os materiais classificados em altura de plantas: baixa, média e alta não apresentaram diferenças visíveis na arquitetura da planta ou número de folhas, mas, foram diferenciados quanto à altura da planta no estágio de crescimento vegetativo, sendo as diferenças mais na fase de pendoamento. Esse resultado também foi encontrado por Silva (2018), onde não foi observado o efeito significativo dos tratamentos para a variável altura de planta para nenhum dos híbridos de milho, avaliados para tolerância a seca, em duas épocas de semeadura (safra de verão e segunda safra em casa de vegetação).

Dass *et al.* (2001), ao avaliarem 166 genótipos de milho, compreendidos por linhagens e híbridos, sob diferentes condições de estresse (sem déficit hídrico, déficit hídrico leve, déficit hídrico intermediário e déficit hídrico severo), observaram que a altura da planta foi afetada severamente sob restrição hídrica. Houve aumento do intervalo entre os florescimentos masculino e feminino sob déficit hídrico e observaram, ainda, que para a maioria dos genótipos avaliados, os híbridos foram mais tolerantes à seca em comparação com linhagens na fase da floração e espigamento.

Em relação à variável comprimento de pendão, sem déficit hídrico, maiores valores foram observados em plantas híbridas, cujos valores não diferiram estatisticamente. Menor comprimento do pendão foi observado para a linhagem 31 que não diferiu estatisticamente da linhagem 91. Também sob déficit hídrico os maiores pendões foram observados em plantas híbridas, sem diferença estatística entre eles. Já os menores valores foram observados em linhagens, cujos valores também não diferiram entre si (Tabela 4). Com exceção do observado para o híbrido 91/31, para os demais genótipos linhagens e híbridos não houve diferenças significativas entre os comprimentos dos pendões das plantas desenvolvidas sob déficit hídrico ou sob condições favoráveis, sem déficit.

Tabela 4 - Resultados médios de comprimento de pendão (CP), em centímetros, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico), em linhagens e híbridos de milho.

	L31	L91	31/91	91/31
Sem déficit hídrico	31Abc	26 Ab	38 Aa	43 Aa
Com déficit hídrico	28 Abc	24 Ac	36 Aab	31 Bab
CV %	40,99			

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

Nan *et al.* (2018) verificaram que os comprimentos dos pendões de plantas desenvolvidas sob condição de estresse por seca foram menores do que aqueles desenvolvidos sob irrigação (controle). Em média, o comprimento do pendão diminuiu de 4,11 para 3,01 cm após o déficit hídrico.

Por meio de experimentos subsequentes foi verificado, ainda, que pequenos pendões são frequentemente associados a melhorias na eficiência da produção de grãos, especialmente em uma alta densidade de plantas (DUNCAN *et al.*, 1967; GROGAN, 1956; HUNTER *et al.*, 1969), que é porque pendões menores podem liberar mais energia para a produção de grãos e reduzir a interceptação de luz (DUNCAN *et al.*, 1967; GROGAN, 1956; HUNTER *et al.*, 1969).

Quanto ao número de sementes por planta, maiores valores foram observados em plantas híbridas desenvolvidas sem déficit hídrico (Tabela 5). Já em relação às linhagens 91 e 31 não houve diferença do número de sementes submetidos ou não ao déficit hídrico. Ressalta-se que a não significância do número de sementes das linhagens, nas duas condições (com e sem déficit hídrico), pode ser atribuída ao número muito pequeno de sementes, que variou de zero a cinco. Para este caractere o coeficiente de variação foi alto o que pode ser explicado pela significativa variação do número de sementes.

Tabela 5 - Resultados médios de número de Sementes (NS), em centímetros, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico), em linhagens e híbridos de milho.

	L31	L91	31/91	91/31
Sem déficit hídrico	3Ab	5Ab	66Aa	77Aa
Com déficit hídrico	5Ab	0Ab	37Ba	10Bb
CV %	110,71			

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

O baixo rendimento de grãos pode ser atribuído ao dessincronismo do florescimento masculino e feminino que é aumentado sob condições de déficit hídrico (SOUSA *et al.*, 2015). Paterniani *et al.* (2015) com o objetivo de distinguir, entre as 150 progênes de irmãos completos interpopulacionais de milho, aquelas contrastantes para tolerância à seca. Identificaram que as progênes selecionadas sob déficit hídrico tiveram produção 10% superior aos materiais não tolerância.

O efeito do déficit hídrico no milho ocorrido a partir da fase de florescimento afeta significativamente o rendimento de grãos, bem como os componentes de produção (CAKIR, 2004). Sob condições de déficit hídrico há atraso da emissão dos estilo-estigmas em detrimento da liberação de grãos de pólen, em ambiente de casa de vegetação. Já sob condições favoráveis não houve diferença entre do florescimento masculino entre os genótipos linhagens e híbridos avaliados.

Segundo Fancelli e Dourado Neto (2000), estresse hídricos, durante o processo de germinação, podem impedir a germinação, alterar a velocidade, o tempo e a uniformidade da germinação, comprometendo o estabelecimento da cultura. Deficiências hídricas posteriores poderão paralisar o crescimento, bem como retardar o desenvolvimento reprodutivo das plantas.

Sabe-se que algumas estratégias são adotadas pelas plantas para tolerar a deficiência hídrica. Em uma delas, o escape, as plantas evitam o estresse por meio da redução no seu ciclo de vida, adotando uma rápida germinação ou florescimento antecipado (VERSLUES; JUENGER, 2011).

Para as variáveis, florescimento masculino e florescimento feminino, foi observado interação significativa para genótipo x nível de retenção de água do solo. Já para o intervalo

entre o florescimento masculino e feminino, em condições de déficit hídrico não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados.

Com exceção da linhagem 91, não foi observada diferença significativa para os genótipos linhagens e híbridos observados do número de dias entre a semeadura e o florescimento feminino em condições de déficit hídrico. Sob condições de déficit hídrico foi observado atraso na emissão do estilo-estigma (Tabela 6). A linhagem 31, teve uma precocidade em relação a linhagem 91 em dois dias.

Tabela 6 - Resultados médios, em dias, de florescimento feminino, em linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico).

	L31	L91	31/91	91/31
Sem déficit hídrico	84Aa	86Ba	80Aa	80Aa
Com déficit hídrico	84Ab	89Aa	82Ac	83Ac
CV %	2,35			

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

Sob condições favoráveis, sem déficit hídrico, houve florescimento feminino mais tardio da linhagem 91, em relação aos demais. Nesta condição, não houve diferença do florescimento feminino entre os genótipos linhagens e híbridos avaliados. Já sob condição de déficit hídrico, os florescimentos femininos mais precoces foram observados para os híbridos 31/91 e 91/31, sendo que não houve diferença estatística entre estes. Ainda sob condição de déficit hídrico, o florescimento feminino foi mais precoce na L31, quando comparado ao observado na L91.

Em relação ao florescimento masculino, sob condições de déficit hídrico, houve o florescimento mais precoce das plantas híbridas, em relação ao observado nas duas linhagens L31 e L91 (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados médios, em dias, de florescimento masculino, em linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem ou com déficit hídrico).

	L31	L91	31/91	91/31
Sem déficit hídrico	84Aa	86Aa	80Aa	80Aa
Com déficit hídrico	84Aa	89Aa	82Ab	83Ab
CV %	5,25			

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2022).

Na presente pesquisa, não houve diferença estatística em relação ao IFMF dos materiais avaliados. Segundo Durães *et al.* (1998), baixos valores de IFMF indicam sincronismo no florescimento, resultante da adaptação a determinado estresse, e está associado ao rendimento de grãos sob condições adversas.

Ao compilar os resultados obtidos, na presente pesquisa, observa-se o efeito da heterose ou vigor híbrido para os genótipos híbridos 31/91 e 91/31, quando comparados as linhagens L31 e L91. Isto pode ser observado por meio das características: altura de plantas, comprimento de pendões e número médio de sementes por planta de milho.

Sob condições de déficit hídrico não foi possível diferenciar as linhagens 31, classificada em trabalhos anteriores, como não tolerante e a L91, classificada como tolerante, pelas características de altura de plantas, comprimento do pendão, número de sementes por planta e florescimento masculino. Na condição de déficit hídrico, o florescimento feminino da linhagem 31, foi mais precoce que o da linhagem 91. Nesta condição, tanto para o florescimento masculino e quanto para o florescimento feminino houve maior precocidade dos genótipos híbridos (31/91 e 91/31), quando comparada à das linhagens.

As diferenças observadas em relação aos florescimentos masculinos e femininos dos híbridos e linhagens parecerem estar mais associados ao ciclo dos genótipos (linhagens e híbridos) utilizados do que à tolerância ao déficit hídrico. Isso pode ser observado quando se compara, para cada genótipo, os florescimentos masculino e feminino, nas duas condições, com e sem deficiência hídrica. Com exceção, foi observado apenas para a linhagem 91, em que houve maior ciclo sob condições de déficit hídrico.

Assim, pode-se inferir que as condições por meio das quais procura-se avaliar características para tolerância ao déficit hídrico não foram eficientes. Manter os valores de retenção de água no solo para simular condição de déficit hídrico ou não, é um desafio, mesmo com todos os cuidados demandados, uma vez que a outros fatores que interferem no desenvolvimento das plantas, mesmo em casa de vegetação. Tem sido um desafio, também, avaliar o déficit hídrico sob condições de campo em função da instabilidade climática, muitas vezes se cultiva as plantas numa determinada época e não ocorre o déficit hídrico esperado. Em função disso, a seleção precoce por meio de características associadas ao desenvolvimento de plântulas parece ser promissora para a seleção de genótipos com tolerância à seca.

4 CONCLUSÕES

Sob as condições de déficit hídrico, impostas nesta pesquisa, não é possível diferenciar a linhagem, classificada como não tolerante e a linhagem, classificada como tolerante, pelas características de altura de plantas, comprimento do pendão, número de sementes por planta e florescimento masculino.

Na condição de déficit hídrico, o florescimento feminino da linhagem, não tolerante, é mais precoce que o da linhagem tolerante.

Pode-se inferir que as metodologias utilizadas para avaliar as características para tolerância ao déficit hídrico não permitem a seleção segura para tolerância a deficiência hídrica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V.M.; VON PINHO, E.V D.R.; DE CARVALHO, M.R.; NAVES, G.M.D.F.; VON PINHO, R.G.; DOS SANTOS, H. O. **Indirect selection for drought tolerance in maize through agronomic and seeds traits**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 287- 296, 2017.
- ABREU, V.M.; VON PINHO, E.V.R.; MENDES-RESENDE, M.P.; BALESTRE, M.; LIMA, A.C.; SANTOS, H.O.; VON PINHO, R.G.; **Combining Ability and Heterosis of Maize Genotypes under Water Stress during Seed Germination and Seedling Emergence**, Crop Science, Volume59, Issue1, Pages 33-43, Jan/Feb 2019.
- ADHIKARI, T. B.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. **Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal**. Phytopathology 89, p. 687-694, 1999.
- AGRAMA, H. A.; MOUSSA, M. E. **Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.)**. Euphytica, Wageningen, v. 91, n. 1, p. 89-97, 1996.
- ARNOLD, C. Y. **The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system**. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v. 74, n.1 p. 430-445, 1959.
- BÄNZINGER, M.; EDMEADES, G.O.; BECK, D.; BELLON, M. **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice**. Mexico: CIMMYT, 68 p. 2000.
- BEEVER D. **Os transgênicos e o futuro da agricultura**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 3: 4-8. 2000.
- BENEŠOVÁ, M.; HOLÁ, D.; FISCHER, L.; JEDELSKÝ, P. L.; HNILIČKA, F.; WILHELMOVÁ, N.; ROTHOVÁ, O.; KOČOVÁ, M.; PROCHÁZKOVÁ, D.; HONNEROVÁ, J.; FRIDRICHOVÁ, L.; HNILIČKOVÁ, H. **The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration?** PLoS ONE, v. 7, n. 6, e38017, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038017>.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. **Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass, and radiation utilization**. Field Crops Research, Amsterdam, v. 31, p. 233-252. 1993.
- BOLAÑOS J.; EDMEADES, G. O. **The importance of the anthesis– silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize**. Field Crops Research, v. 48, n. 1, p. 65–80. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Coordenação de Laboratório Vegetal, 2009.
- BROWN, P.J., UPADYAYULA, N., MAHONE, G.S., TIAN, F., BRADBURY, P.J., MYLES, S., HOLLAND, J.B. *ET AL.* **Distinct genetic architectures for male and female inflorescence traits of maize**. PLoS Genet. 7(11), e1002383. 2011.

- CAKIR, R. **Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn.** Field Crops Research, Amsterdam, v. 89, p. 1-16, 2004.
- CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. **Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective.** BMC Plant Biology, v. 11, article 163, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>.
- DANTAS, A.A.A.; CARVALHO, L.G.; FERREIRA, E. **Climatic classification and tendencies in Lavras region, MG.** Ciência e Agrotecnologia. v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000600039>.
- DASS, S. *et al.* **Morphological traits determining drought tolerance in maize.** Indian Journal of Agricultural Research, Haryana, v. 35, p. 190-193, 2001.
- DUNCAN, W.G.; WILLIAMS, W.A.; LOOMIS, R.S. **Tassels and the productivity maize.** Gop Sei., Madison, 737-9, 1967.
- DURÃES, F.O.M.; MAGALHÃES, P.C.; SANTOS, M.X.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. **Intervalo entre florescimentos masculino e feminino como parâmetro fenotípico útil ao melhoramento de milho tropical para tolerância à seca.** pp. 27. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife, PE. Resumos [...] Recife: IPA, 1998.
- DUVICK, D. N. **The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.).** Advances in Agronomy, v. 86, p. 83-145, 2005.
- ENQUIST, B. J.; NIKLAS, K. J. **Invariant scaling relations across tree-dominated communities.** Nature. V. 410, p. 655-660. Abril de 2001.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho.** 1. ed. Guaíba: Agropecuária, 2000. v. 1. 360 p.
- FISCHER, T.; EDMÉADES, G.O.; **Breeding and Cereal Yield Progress.** Crop Science, Volume 50, Issue 1 Pages 85 - 98, Mar. 2010. DOI:10.2135/cropsci2009.10.0564.
- GERALDI, I.O.; MIRANDA FILHO, J.B.; and VENCOVSKY, R. **Estimates of genetic parameters for tassel characters in maize (*Zea mays* L.) and breeding perspectives.** Maydica, 30(1), 1– 14. 1985.
- GROGAN, C.O. **Detasseling responses in com.** Agron. J., Madison, 48 247-9, 1956.
- GUIMARÃES, P.S.; ROCHA, D.S.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; **Conteúdo de carboidrato foliar em híbridos de milho submetidos à restrição hídrica.** Evidência - Ciência e Biotecnologia. v. 19 n. 2. 2019.
- GUPTA, D.K.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J. (Eds.). **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants.** [S.l.]: Springer International Publishing, 2018.
- HUNTER, R.B.; DAYNARD, T.B.; HUME, D.J.; TANNER, J.W. **Effect of tassel removal on grain yield of cern (*Zea mays* L.).** Crop Sei., Madison, 9405-6, 1969.
- LAMBERT, R.J.; JOHNSON, R.R. **Leaf angle, tassel morphology, and the performance of maize hybrids.** Crop Sci, 18(3), 499-502. 1978.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 20. 27 p. 1995.

MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; ALBUQUERQUE, P.; KARAM, D.; MAGALHÃES, M.M.; CANTÃO, F.R.O.; **Caracterização Ecofisiológica de Linhagens de Milho Submetidas a Baixa Disponibilidade Hídrica Durante o Florescimento**. Dec. 2009. DOI:10.18512/1980-6477/rbms.v8n3p223-232.

NAN, W; LIANG, L; WEN-WEI, G; YONG-BO1, W; YONG, H; WENG, J; MING-SHUN, M; ZHANG D; HAO Z; XIN-HAI1, L; **Transcriptomes of early developing tassels under drought stress reveal differential expression of genes related to drought tolerance in maize**. Journal of Integrative Agriculture. Volume 17, Issue 6, Pages 1276-1288, June 2018. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61777-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61777-5).

NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. **The effect of drying temperature on corn seed quality**. Canadian Journal of Plant Science, v. 64, n. 1, p. 487-496, 1984.

NURMBERG, P. L.; BRITO, A.; ZIMMER, C. M.; SCHWANTES, D. O.; MANTOVANI, E. E.; BOSETTI, F.; ROTUNDO, J.; TRUONG, S. K.; DE LA VEGA, A.; BORRAS, L.; MESSINA, C.; McCORMICK, R. F. **A commercial breeding perspective of maize improvement for drought stress tolerance**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 21, e1277, 2022.

OYEKUNLE, M.; BADU-APRAKU, B.; HEARNE, S.; FRANCO, J. **Genetic diversity of tropical early-maturing maize inbreds and their performance in hybrid combinations under drought and optimum growing conditions**. Field Crops Research, v. 170, p. 55-65, 2015.

PATERNIANI, M. E. A. G.; GUIMARÃES, P. S.; BERNINI, C. S.; GALLO, P.B. **Caracteres secundários relacionados à tolerância à seca em progênies de irmãos germanos interpopulacionais de milho**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 14, n. 1, p. 130-144, 2015.

QIN, X.; TIAN, S.; ZHANG, W.; DONG, X.; MA, C.; WANG, Y.; YAN, J.; YUE, B. QDtbn1, an F-box gene affecting maize tassel branch number by a dominant model. Plant biotechnology journal, Vol.19 (6), p.1183-1194, 2021. org.ez32.periodicos.capes.gov.br/10.1111/pbi.13540.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009. ISBN 3-900051-07-0.

RIBAUT, J.M.; HOISINGTON, D.A.; DEUTSCH, J.A.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE- LEON, D. **Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. Flowering parameters and the anthesis-silking interval**. Theoretical and Applied Genetics, New York, v. 92, n. 7, p. 905-914, 1996.

ROSEGRANT, M. W. **Challenges and policies for global water and food security**. Econ. Rev. p. 5-20, 2016.

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

SILVA, K.M.J. **Desempenho agrônômico, qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de milho submetidas ao tratamento químico.** 2018. 94 p. Orientador(a): Renzo Garcia Von Pinho. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2018.

SOUSA, R.S.; BASTOS, E.A.; CARDOSO, M.J.; RIBEIRO, V.Q; BRITO, R.R. **Desempenho produtivo de genótipos de milho sob déficit hídrico.** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.14, n.1, p. 49-60, 2015.

SPITKÓ, T.; NAGY, Z.; ZSUBORI, Z. T.; HALMOS, G.; BÁNYAI, J.; MARTON, C. L. **Effect of drought on yield components of maize hybrids (*Zea mays* L).** Maydica, Bergamo, v. 59, n. 2, p. 161-169, 2014.

VERSLUES, P.E.; JUENGER, T.E. **Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments.** Current Opinion in Plant Biology, v.14, p.240–245, 2011.

WANG, H.; GU, L.; ZHANG, X.; LIU, M.; JIANG, H.; CAI, R.; ZHAO, Y.; CHENG, B. **Global transcriptome and weighted gene co-expression network analyses reveal hybrid-specific modules and candidate genes related to plant height development in maize,** Plant Molecular Biology, 98:187–203, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0763-4>.

XIAO, Y. N.; ZHANG, S. H.; LI, M. S. **Identification of quantitative trait loci (QTLs) for flowering time using SSR marker in maize under water stress.** Korean Journal of Genetics, Seoul, v. 26, n. 4, p. 405- 413, 2004.

XIE, H.; DING, D.; CUI, Z.; WU, X.; HU, Y.; LIU, Z.; LI, Y.; TANG, J. **Genetic analysis of the related traits of flowering and silk for hybrid seed production in maize.** Genes & Genomics, v. 32, n. 1, p. 55-61, 2010. DOI: 10.1007/s13258-010-0801-3

XU, G.; WANG, X.; HUANG, C.; XU, D.; LI, D.; TIAN, J.; CHEN, Q.; WANG, C.; LIANG, Y.; WU, Y.; YANG, X.; TIAN, F. **Complex genetic architecture underlies maize tassel domestication.** New Phytol. 214(2):852-864. PMID: 28067953; PMCID: PMC5363343. Apr. 2017. doi: 10.1111/nph.14400.

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHU, J-K. **Thriving under stress: How plants balance growth and the stress response.** Dev. Cell, 55, 529–543, 2020. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.10.012.

ZHAO, J. *et al.* **Shoot and root traits in drought tolerant maize (*Zea mays* L.) hybrids.** Journal of Integrative Agriculture, 17: 1093-1105, 2018.

CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADAS A TOLERÂNCIA A SECA EM LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO.

RESUMO

A avaliação da expressão de enzimas pode ser uma ferramenta para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico. Enzimas do sistema antioxidante têm apresentado importante correlação com a tolerância a seca em resposta à formação de espécies reativas ao oxigênio. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar linhagens e híbridos de milho quanto à tolerância à seca, por meio da expressão e quantificação das enzimas Ascorbato peroxidase (APX), Catalase (CAT), Esterase (EST), Peroxidase (POX) e de proteínas totais em folhas, raízes e sementes de plantas de milho submetidas à restrição hídrica, por meio das técnicas de eletroforese e espectrofotometria de microplacas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram selecionadas duas linhagens contrastantes, sendo a linhagem 91, tolerante ao déficit hídrico e uma linhagem 31, não tolerante ao déficit hídrico, seu respectivo híbrido de milho (91/31) e seu recíproco (31/91). O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos Casualizados em esquema fatorial (4x2), sendo 4 materiais genéticos, e 2 regimes hídricos (substrato com 30% e 70% da capacidade de retenção de água pelo solo). As análises das proteínas foram realizadas em folhas bandeiras, raízes das linhagens e híbridos, aos 70 dias após semeadura e em sementes provenientes dos materiais genéticos produzidos em casa de vegetação sob os dois regimes hídricos. Conclui-se que a maior atividade da enzima SOD, CAT, POX, em folhas e raízes é observada na linhagem não tolerante, submetida à deficiência hídrica. Também, na linhagem não tolerante, a maior atividade da enzima esterase é observada em folhas, raízes e sementes, independentemente de o crescimento das raízes ocorrer sob deficiência hídrica ou não. Em relação à expressão destas enzimas em folhas e raízes dos genótipos híbridos, é observada maior atividade destas quando comparada à observada nas linhagens tolerante e não tolerante, independentemente da condição de deficiência hídrica. É possível observar, de uma maneira geral, para as enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase, o aumento da atividade destas em folhas, raízes e sementes quando foram desenvolvidas sob déficit hídrico. Para maioria dos genótipos (linhagens e híbridos) avaliados, a maior expressão das proteínas sob condição de deficiência hídrica.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes. EROs. Estresse abiótico.

CHAPTER 2 - EXPRESSION OF GENES RELATED TO DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE INBRED LINES AND HYBRIDS.

ABSTRACT

The evaluation of enzyme expression can be a tool for the selection of genotypes tolerant to water deficit. Enzymes of the antioxidant system have shown an important correlation with drought tolerance in response to the formation of reactive oxygen species. Therefore, the objective of this work was to evaluate maize lines and hybrids regarding drought tolerance, through the expression and quantification of the enzymes Ascorbate peroxidase (APX), Catalase (CAT), Esterase (EST), Peroxidase (POX) and proteins in leaves, roots and seeds of maize plants subjected to water restriction, using the technique of electrophoresis and microplate spectrophotometry. The experiment was carried out in a greenhouse and in the Laboratory of the Department of Agriculture of the Universidade Federal de Lavras (UFLA). Two contrasting inbred lines were selected, being inbred line 91, tolerant to water deficit and inbred line 31, not tolerant to water deficit, its respective maize hybrid (91/31) and its reciprocal (31/91). The experimental design used was Randomized Blocks in a factorial scheme (4x2), with 4 genetic materials and 2 water regimes (substrate with 30% and 70% of the soil water retention capacity). Protein analyzes were performed on flag leaves, roots of the inbred lines and hybrids, at 70 days after sowing in seeds from genetic materials produced in a greenhouse under the two water regimes. It is concluded that the highest activity of the enzyme SOD, CAT, and POX, in leaves and roots is observed in the non-tolerant inbred, submitted to water deficit. Also, in the non-tolerant inbred line, the highest activity of the esterase enzyme is observed in leaves, roots, and seeds, regardless of whether root growth occurs under water deficit or not. Regarding the expression of these enzymes in leaves and roots of the hybrid genotypes, greater activity is observed when compared to that observed in tolerant and non-tolerant inbred, regardless of the water deficit condition. It is possible to observe, in general, for the enzymes catalase, peroxidase and superoxide dismutase, the increase in their activity in leaves, roots and seeds when they were developed under water deficit. For most genotypes (inbred lines and hybrids) evaluated, the highest expression of proteins was under water deficit condition.

Keywords: Antioxidant enzymes. ROS. abiotic stress.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um cereal de grande importância econômica mundial e é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros. Devido aos programas de melhoramento, as plantas de milho, geralmente, apresentam bom desempenho em diferentes condições climáticas (MARQUES *et al.*, 2019).

Estresses ambientais, como altas temperaturas, salinidade e seca, isoladas ou em combinação, representam os fatores mais limitantes para a produtividade agrícola em todo o mundo. Desses, a seca é o estresse ambiental mais importante na agricultura, uma vez que causa perdas significativas da produtividade das culturas (FRACASSO; TRINDADE; AMADUCCI, 2016). Levando-se em consideração que o milho é muito exigente em água, a alta variação do rendimento dessa cultura tem sido atribuída, principalmente, à deficiência hídrica causada em função de instabilidades no regime de chuvas. (SOUZA *et al.*, 2015).

Eventos de seca aumentaram em frequência e intensidade, em várias regiões do planeta, nas últimas décadas, e a seca está associada a graves perdas econômicas e sociais globais, afetando mais pessoas do que qualquer outro desastre natural (CUNHA *et al.*, 2019). Essa crescente demanda, somada às mudanças climáticas, indica a necessidade de um aumento da oferta de produtos agrícolas com maior eficiência do uso de recursos, principalmente em ambientes onde a água será limitante (GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Sabe-se que um grande número de genes é expresso diferencialmente sob seca em diferentes tecidos da planta, estádios e níveis de deficiência hídrica. A identificação desses genes responsivos ao déficit hídrico se torna fundamental para o desenvolvimento de cultivares tolerantes, importante para minimizar os efeitos da seca (DEYHOLOS, 2010). Por isso, a seleção de genótipos tolerantes à seca, com melhor eficiência no uso da água e a produção nesses ambientes adversos é uma das formas mais eficazes de melhorar a produtividade e estabilidade do milho (PATERNIANI *et al.*, 2015).

Sob condições de estresse as plantas têm o seu metabolismo e crescimento alterados (GUPTA *et al.*, 2018). Os efeitos negativos do déficit hídrico são geralmente a supressão do crescimento e desenvolvimento (ZHANG *et al.*, 2020).

O déficit hídrico pode afetar o desenvolvimento do dossel vegetativo por meio da alteração no número total de folhas da planta, na taxa de expansão (TAIZ; ZEIGER, 2017),

comprometer o desenvolvimento vegetativo do milho, com redução da altura de plantas, massa seca da parte aérea e raiz (CLEMENTE, 2017), reduzir a expansão das folhas, acelerar a senescência, diminuir o índice de área foliar e aumentar a abscisão das folhas (MUNNÉ-BOSCH, 2013), afetar sementes por planta, tamanho e massa de sementes (SABERALI; MORADI, 2019). Nascimento *et al.* (2017) observam, também, que sob condições de déficit hídrico poderá haver perdas nos principais componentes de produção como diâmetro de espiga, comprimento de espiga, número de grãos por espiga, número de grãos por fileira e índice de espiga. Segundo Jalil *et al.* (2017), o déficit hídrico também é um importante promotor de radicais livres, pois através das respostas da planta à sua incidência, é criado um ambiente propício à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na planta.

As EROs são produzidas em quase todas as células e são reconhecidas como importantes sinalizadoras em vários processos biológicos necessários durante o desenvolvimento e crescimento das plantas (MITTLER, 2017). As EROs são produtos naturais de organismos aeróbicos, participam da produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, fagocitose, sistema de defesa e na síntese de substâncias biológicas (OZTETIK, 2011). Em eventos relacionados ao estresse biótico e abiótico, as EROs desempenham sua função sinalizadora e, quando em excesso, tem efeito tóxico nas plantas provocando danos nos ácidos nucleicos, lipídeos, metabólitos e proteínas, que podem levar a morte celular (MITTLER, 2017; VAN RUYSKENSVELDE *et al.*, 2018).

Os níveis das espécies reativas de oxigênio são determinados pelo controle do balanço entre produção e quebra, que é ativado pela sofisticada e complexa via dos sistemas antioxidantes (MITTLER *et al.*, 2011; NOCTOR *et al.*, 2018).

As plantas de milho, quando submetidas ao déficit hídrico, acumulam espécies reativas de oxigênio (EROs), que provocam estresse oxidativo e afetam o sistema de defesa de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica (CHOUDHURY *et al.*, 2017). Plantas tolerantes a esse tipo de estresse, assim que estimuladas através da sinalização das EROs, aumentam a atividade das enzimas antioxidantes que atuam na eliminação dos radicais livres gerados pelos danos oxidativos das EROs (TIRELLI, 2021). Nestas condições estão envolvidas enzimas antioxidantes, conhecidas como *scavengers*, que estão associadas à remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs), que são geradas em diversos compartimentos celulares

(citoplasma, mitocôndria, peroxissomos) como resultado dos estresses abióticos e bióticos aos quais as plantas são submetidas (GUPTA *et al.*, 2018).

As plantas protegem suas células e compartimentos subcelulares dos efeitos tóxicos causados por EROs usando compostos protetores e várias enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, peroxirredoxina e polifenol oxidase (CHOUDHURY *et al.*, 2017) e não enzimático como o ácido ascórbico, glutathione e componentes fenólicos, atuam no controle da oxidação e na proteção contra os danos oxidativos nas células por meio da remoção das EROs (GILL; TUTEJA, 2010).

A avaliação da expressão de enzimas pode ser uma ferramenta para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, assim, objetivou-se com esta pesquisa avaliar linhagens e híbridos de milho quanto à tolerância à seca, por meio da expressão e quantificação das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), esterase (EST), peroxidase (POX) e proteínas totais em folhas, raízes e sementes de plantas de milho submetidas à restrição hídrica.

2 METODOLOGIA

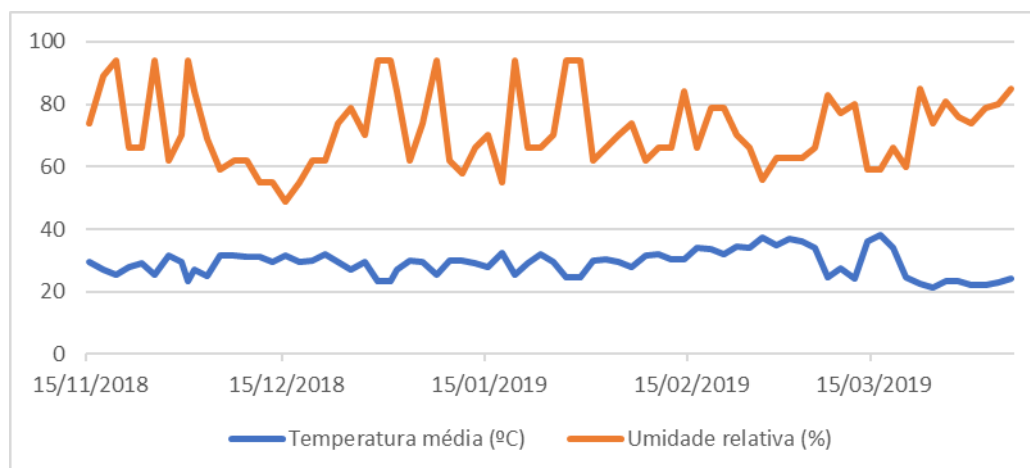
2.1 Localização

A pesquisa foi conduzida em condição de casa de vegetação e no Laboratório Central de Sementes da UFPA, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFPA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Esta região apresenta clima tipo Cwa da classificação de Köppen (DANTAS *et al.*, 2007).

2.2 Dados climáticos durante a condução do experimento

O experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2018 e abril de 2019. Os dados de temperatura média e umidade relativa do ar, durante a condução do experimento em campo, estão apresentados na Gráfico 1. A temperatura máxima, temperatura mínima e a umidade relativa do ar foram monitoradas diariamente (Tabela 1A, APÊNDICE A), no mesmo horário, por meio de termômetro digital e higrômetro digital para medição de umidade do ar, coletados na casa de vegetação, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFPA), em Lavras, MG.

Gráfico 1 - Dados climáticos de Temperatura Média (°C) e Umidade relativa do ar (%), no período de novembro de 2018 a abril de 2019, coletados de casa de vegetação, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.



Fonte: Da Autora (2022).

2.3 Dados de graus-dias e graus-dia acumulado, na cultura do milho.

Para a determinação do cálculo de graus-dia, foi utilizado o método proposto por Arnold (1959). Considerou-se apenas a temperatura basal inferior (T_b) no cálculo dos graus-dia Equação (1).

$$GD = \frac{TM + Tm}{2} - Tb \quad (1)$$

Em que: GD = graus-dia, °C; TM = temperatura máxima do dia, °C; Tm = temperatura mínima do dia, °C; Tb = temperatura basal inferior, °C.

A temperatura basal inferior foi considerada 10°C. Também foi realizada o cálculo dos graus-dia acumulados (GDA). Os dados (Tabelas 1B e 2B, APÊNDICE B) obtidos pelos cálculos de graus-dia e graus-dia acumulado foram utilizados para a elaboração dos dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Graus-dia acumulados e número de dias correspondente a cada subperíodo fenológico da cultura do milho, Lavras, novembro de 2018 a abril de 2019.

Genótipos	Subperíodos fenológicos (Dias)		GDA (Graus-dia acumulados)		
	Semeadura a pendoamento	Pendoamento a colheita	Semeadura a pendoamento	Pendoamento a colheita	Semeadura a colheita
L31	87	54	1520	1003	2523
L91	84	57	1503	1070	2573
91/31	81	60	1486	1137	2623
31/91	82	59	1492	1115	2606

Fonte: Da Autora (2022).

2.4 Seleção de linhagens e híbridos de milho contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico.

A escolha dos materiais utilizados na pesquisa foi realizada de acordo com os resultados obtidos por Abreu *et al.* (2019). Foram utilizadas, nesta pesquisa, duas linhagens contrastantes quanto ao déficit hídrico, a linhagem 91, tolerante e a linhagem 31, não tolerante, e seus respectivos híbridos de milho (91/31 e 31/91) para retirada de folhas e raízes. Para a produção de sementes foram utilizadas também população F₂ (91/31 – F₂ e 31/91 – F₂), derivada destes híbridos (Tabela 2).

Tabela 2 - Genótipos de milho selecionados quanto a tolerância ao déficit hídrico.

Linhagens	Híbridos	População F ₂
L91	91/31	91/31 – F ₂
L31	31/91	31/91 – F ₂

Fonte: Da autora (2022).

2.5 Instalação

Após a seleção das linhagens contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, foi implantado um experimento em casa de vegetação para a produção de sementes das linhagens e híbridos de milho, durante a safra 2018/2019. Foi realizado previamente teste de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009) e verificou-se 99% de germinação nos lotes utilizados.

As sementes foram as sementes foram previamente tratadas com o fungicida VITAVAX®-THIRAM 200, na dosagem de 250 ml por 100 kg-1 de sementes. Em cada vaso,

foram germinadas 6 sementes e após 2 semanas foi realizado o desbaste, restando apenas 1 planta por vaso. As plantas foram desenvolvidas em vasos contendo o substrato de latossolo, com dois grupos de tratamentos diferentes, realizados do plantio a colheita. O primeiro grupo de tratamento, as plantas foram desenvolvidas em vasos com retenção de água de 30%, simulando o déficit hídrico.

O segundo grupo de tratamento, a retenção de água no solo foi ajustada para 70%, ou seja, sem o déficit hídrico. Em ambos os grupos de tratamentos, a reposição da água foi realizada diariamente, com base no peso inicial de cada vaso com os substratos. Após os vasos serem pesados, era repostada a água, conforme o tratamento e os vasos eram pesados novamente para verificação do peso final. A adubação de cobertura, assim como os demais tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com as necessidades da cultura. A coleta de material genético (pendão, folhas e raízes) foi realizada aos 70 dias após a semeadura, em estágio reprodutivo R1.

As espigas oriundas das autofecundações das linhagens, dos híbridos e dos cruzamentos foram colhidas com teor de água de 35%. Após a colheita, as espigas foram despalhadas manualmente e distribuídas em secadores de madeira, de acordo com Navratil e Burris (1984). As espigas despalhadas, inicialmente foram pré-condicionadas durante o processo de secagem à 35 °C até as sementes atingirem 20% do teor de água. Posteriormente, houve o aumento da temperatura para 42 °C até as sementes alcançarem o teor de água de 13%.

2.6 Coleta do material genético

A coleta do material genético para as análises enzimáticas foi realizada em folhas bandeiras e raízes secundárias oriundas das duas linhagens e dois híbridos, aos 70 dias após semeadura e nas sementes adquiridas do processo de autofecundação e cruzamento das linhagens e dos híbridos. Não houve produção de sementes do híbrido 91/31-F₂, submetido ao déficit hídrico.

As amostras das folhas, raízes e sementes foram armazenadas a uma temperatura de -86 °C, em embalagens plásticas, em *deep freezer* até o início das análises. Foram retiradas folhas, raízes e três amostras de 10 sementes, por tratamento, maceradas com auxílio do moedor elétrico e almofariz, na presença de polivinilpirrolidona - PVP e adicionado nitrogênio líquido.

Foram acondicionados 100 mg em microtubos, do material macerado, por tratamento e armazenados a uma temperatura de -86 °C, no *deep freezer*.

2.7 Análises proteômicas pela técnica de eletroforese

Foi realizada a análise das enzimas catalase (EC 1.11.1.6), esterase (EC 3.1.1.1.), peroxidase (EC 1.11.1.7.) e superóxido dismutase (EC 1.15.1.1.), por meio da técnica de eletroforese.

A extração das enzimas catalase, esterase, superóxido dismutase foi realizada com o tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0 + 0,1% de β mercaptoetanol, na proporção de 250 μ L por amostra de 100mg de material macerado. A extração da enzima peroxidase (POX) foi realizada com o tampão de extração (Fosfato de potássio + 0,1% de β mercaptoetanol) na proporção de 250 μ L por amostra de 100mg de material macerado. O material foi homogeneizado em vórtex e mantido por 12 horas, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos, à temperatura de 4 °C.

A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontínuo (7,5% de gel separador e 4,5% de gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados 60 μ L do sobrenadante de cada tratamento, na canaleta do gel, e a corrida eletroforética foi efetuada a 120 V, por 5 horas sob refrigeração (4 °C). Terminada a corrida, as enzimas catalase, esterase e superóxido dismutase foram revelados, conforme Alfenas (2006), com modificações. As expressões das enzimas, foram analisadas quanto á ausência, presença e a intensidade das bandas, por meio de avaliação visual. A quantificação das intensidades das bandas também foi realizada com o auxílio do software ImageJ ®, em pixel e transformadas para unidade de mm².

2.8 Análise da proteína resistente ao calor pela técnica de eletroforese

A extração da proteína resistente ao calor foi realizada com o tampão de extração Tris HCl 50 mM pH 7,5 0 + (0,1% de β mercaptoetanol), na proporção de 1000 μ L por 100 mg do material. O material foi homogeneizado em vortex, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos, à temperatura de 4 °C e removido os sobrenadantes. O sobrenadante foi incubado em banho maria por 15 minutos a 85 °C e novamente centrifugado. O sobrenadante

foi transferido para novos microtubos e o *pellet*, foi descartado. Depois desse procedimento, foram novamente centrifugados a 14.000 rpm durante 30 minutos, à temperatura de 4 °C. Desse extrato, foram coletados 70 µL e adicionados 40 µL de tampão de amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS; 20 mg de azul de Bromofenol e completando o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5), foram imersos em banho maria por 5 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida SDS-Page a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante das amostras e 10 µL de amostra padrão da proteína no gel. Terminada a corrida, os géis foram corados com *Comassie Blue* 0,05%, durante 16 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (Alfnas, 1998).

2.9 Análises proteômicas pelo espectrofotômetro

Para a extração das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foi utilizado um tampão de extração contendo fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e água. Foram adicionados de 1500 µL dessa solução por amostra de 200 mg. O material foi homogeneizado em vortex, e posteriormente centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos, à temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para microtubos.

Para a enzima catalase (CAT) foi utilizada uma solução de incubação, contendo fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e água. Foram colocados em banho maria a 28 °C. Os sobrenadantes foram coletados e aplicados em microplacas de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de 96 poços, em triplicata. A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio (HAVIR; MCHALE, 1990). A reação foi iniciada pela adição do H₂O₂ ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo que, uma unidade de CAT é definida pela quantidade de enzima necessária para decompor 1 µmol min⁻¹ de H₂O₂.

Para a enzima superóxido dismutase (SOD) foi utilizada uma solução de incubação, contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 µM e água. Os sobrenadantes foram coletados e aplicados em microplacas de ELISA de 96 poços, em triplicata. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima inibir a redução fotoquímica do *nitro blue tetrazolium* (NBT), proposta por

Giannopolitis e Ries (1977). Os tubos contendo o tampão juntamente com a amostra e o controle (meio de incubação sem a amostra), foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos e as leituras realizadas a 560 nm. Uma unidade de SOD é definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do NBT. A leitura foi feita a 560 nm em espectrofotômetro.

Para a enzima ascorbato peroxidase (APX) foi utilizada uma solução de incubação, contendo fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 10 mM e água e colocado em banho maria a 28 °C. Os sobrenadantes foram coletados e aplicados em microplacas de ELISA de 96 poços, em triplicata. A atividade da APX foi avaliada pela adição de uma alíquota de 10 µL da amostra, 180 µL da solução de incubação e 10 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM. A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela diminuição da absorbância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm, a cada 15 segundos, durante 3 minutos (NAKANO; ASADA, 1981). Uma unidade de APX é definida pela quantidade de enzima que oxida 1 µmol min^{-1} de ácido ascórbico.

Proteínas totais foram avaliadas pelo método da ligação ao corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA 2,5mg/mL) como padrão e comprimento de onda de 595 nm. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas a 1 mL de reagente de Bradford, agitadas em vórtex para reagir por 15 minutos.

2.10 Análises estatísticas

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o auxílio do Software SISVAR (FERREIRA, 2014).

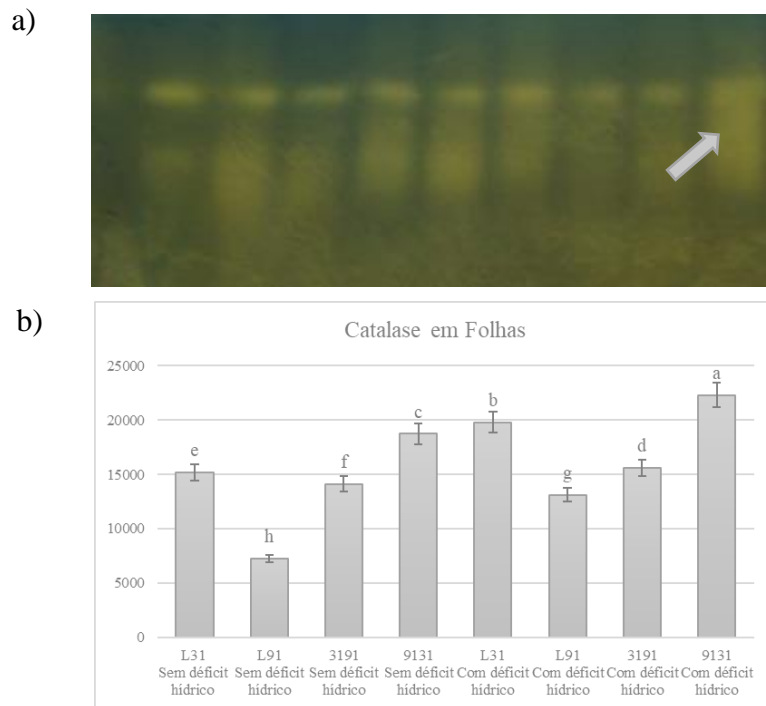
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados das análises proteômicas pela técnica de eletroforese

Em relação à enzima catalase, a maior atividade foi observada em folhas das plantas do híbrido 91/31, desenvolvidas ou não, sob condição de déficit hídrico (Figura 1). Em relação às linhagens, a maior atividade desta enzima foi observada na L31, sob condição de déficit hídrico, quando comparada à observada na linhagem 91, nas mesmas condições. A catalase é

responsável pela dismutação do oxigênio molecular (O_2), formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MEWARD *et al.*, 2018). A enzima catalase, por exemplo, converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e protege as células da oxidação causada pelos radicais livres (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Figura 1 - Atividade da enzima catalase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da CAT e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm^2 , pelo ImageJ.

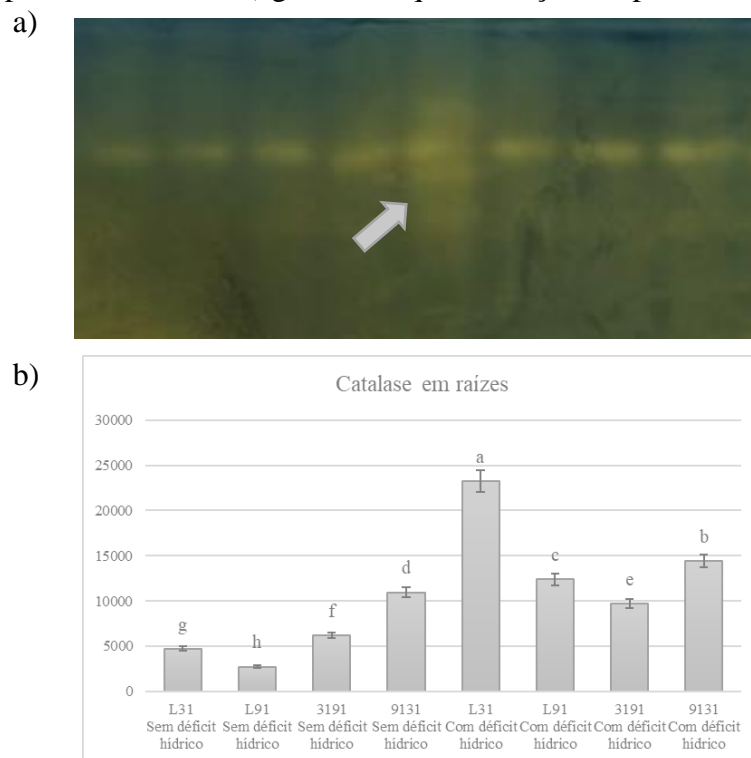


Fonte: Da autora (2022).

Em todos os genótipos, linhagens e híbridos, quando expostos ao déficit hídrico, houve aumento da expressão da enzima catalase quando comparada à observada em plantas desenvolvidas sob condições hídricas favoráveis, mostrando que ocorreu uma maior produção de catalase devido ao estresse causado pela restrição hídrica. Esse resultado também foi encontrado por Pakdel *et al.* (2020), que observaram maior atividade da CAT em folhas frescas de genótipos de milho, contrastantes quanto a tolerância à seca, quando submetidos ao déficit hídrico. Wang *et al.* (2019) também observaram maior expressão desta enzima em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) sob condição de déficit hídrico, seguido de reidratação das plantas. Nesta pesquisa os autores observaram o aumento na atividade dessa enzima com o prolongamento do déficit hídrico.

Em raízes, a expressão da enzima catalase na Linhagem 31, submetidos ao déficit hídrico, foi estatisticamente superior a L31, sem déficit hídrico, e em relação à observada nos demais genótipos (Figura 2). Já Santos *et al.* (2021), ao avaliar a expressão desta enzima em raízes de oito genótipos de milho, tolerantes (T) e não tolerantes (NT), sob duas condições (déficit hídrico e sem déficit hídrico), observaram menor expressão desta em raízes de plântulas desenvolvidas sem deficiência hídrica. Em raízes da linhagem 91, sem déficit hídrico, foi observada menor expressão da enzima catalase, em relação aos outros genótipos (linhagens e híbridos), independentemente. Vale ressaltar que a avaliação da expressão foi realizada em plântulas submetidas por 3 semanas ao déficit hídrico. Nesta presente pesquisa a avaliação foi realizada após 70 dias de semeadura.

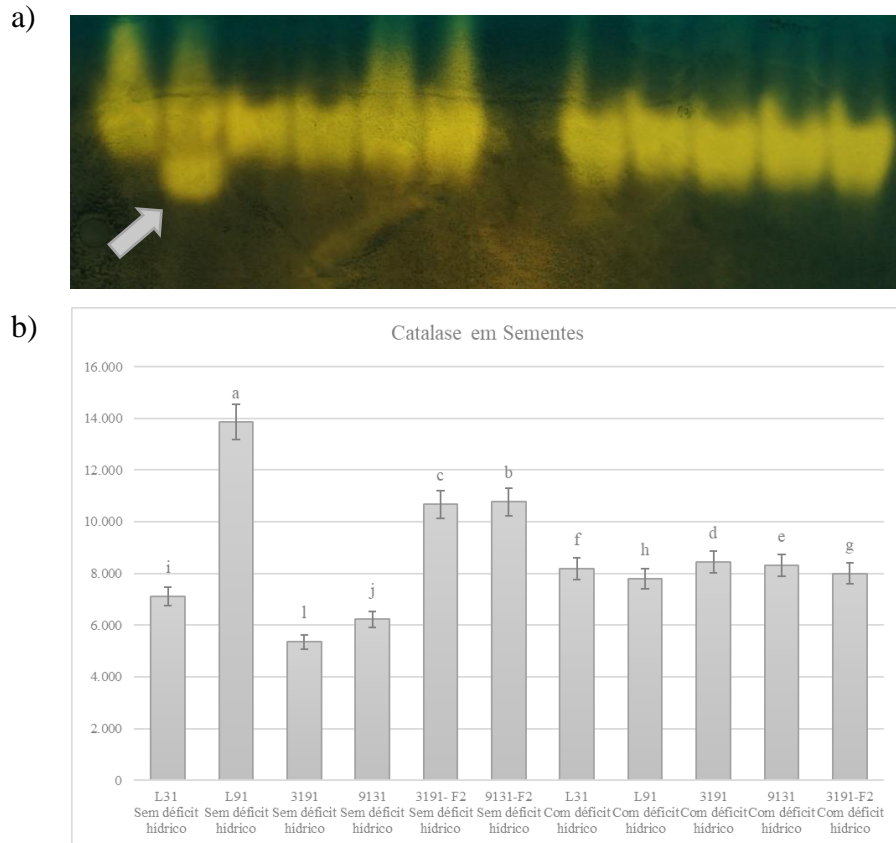
Figura 2 - Atividade da enzima catalase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da CAT e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.



Fonte: Da autora (2022).

Já em sementes da linhagem 91, produzidas sem déficit hídrico, houve maior expressão de CAT em sementes em relação a observada nos demais tratamentos (Figura 3). Abreu *et al.* (2014) também, observaram que em sementes da linhagem 91 (tolerante) houve maior expressão da CAT em relação aos outros genótipos (linhagens e híbridos).

Figura 3 - Atividade da enzima catalase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da CAT e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm^2 pelo ImageJ.



Fonte: Da autora (2022).

Em sementes da linhagem 31, produzidas com déficit hídrico, houve maior expressão da enzima catalase, em relação a mesma linhagem com deficiência hídrica, o que foi observado também em sementes dos híbridos 31/91 e 91/31, já as sementes dos híbridos 31/91F₂ e 91/31F₂, sem déficit hídrico, tiveram uma maior expressão de CAT, do que quando submetidas ao déficit hídrico. Segundo Rosa *et al.* (2005), o SOD e o CAT são enzimas consideradas como mecanismos desintoxicantes eficazes, uma vez que atuam na remoção de EROs das células.

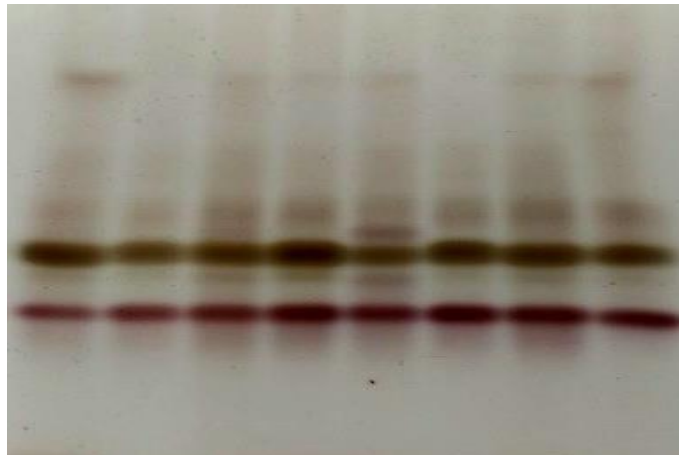
A maior expressão da enzima esterase em folhas foi verificada no híbrido 31/91, sob déficit hídrico (Figura 4). Nas linhagens, a expressão da enzima esterase em folhas também foi maior nos genótipos L91 e L31, submetidos a deficiência hídrica, em relação as mesmas linhagens no tratamento sem déficit hídrico. Santos *et al.* (2021), observaram que em condições

de déficit hídrico, houve mais expressão da enzima esterase na parte aérea de plântulas, tanto para as linhagens quanto para os híbridos.

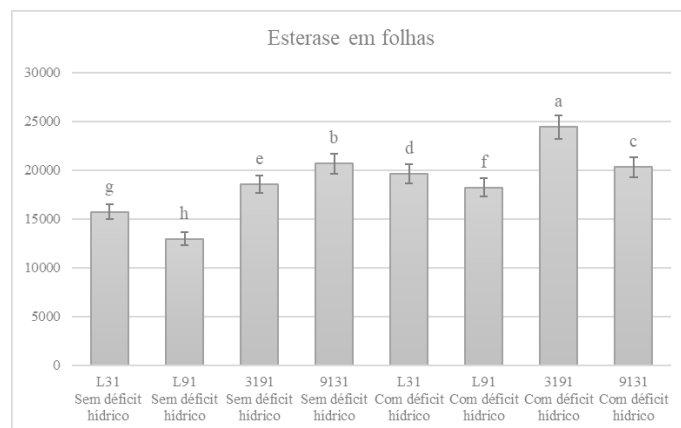
A esterase está associada ao metabolismo de ésteres de membranas celulares e com frequência se correlaciona com o processo deteriorativo de tecidos. Por meio do zimograma a deficiência hídrica parece ter causado danos nas folhas de milho o que poderia explicar a maior expressão de esterase nestas condições. Ao comparar as duas linhagens, em folhas, raízes e sementes da L91, as expressões desta enzima foram menores que na L31, tanto naquelas desenvolvidas sob deficiência hídrica quanto nas desenvolvidas sob condições favoráveis de água no solo (Figura 4, Figura 5 e Figura 6).

Figura 4 - Atividade da enzima esterase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da EST e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm^2 , pelo ImageJ.

a)



b)

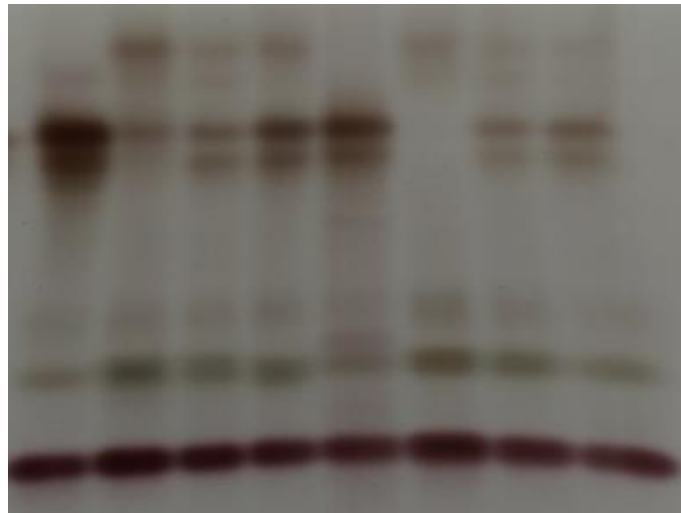


Fonte: Da autora (2022).

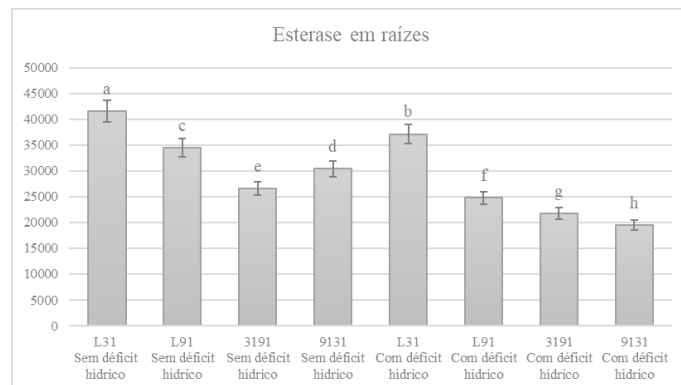
Importante salientar que em raízes, das linhagens e híbridos, submetidas a deficiência hídrica houve menor expressão da enzima esterase, quando comparada à observada em raízes de plantas desenvolvidas em condições favoráveis de retenção de água no solo.

Figura 5 - Atividade da enzima esterase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da EST e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.

a)



b)

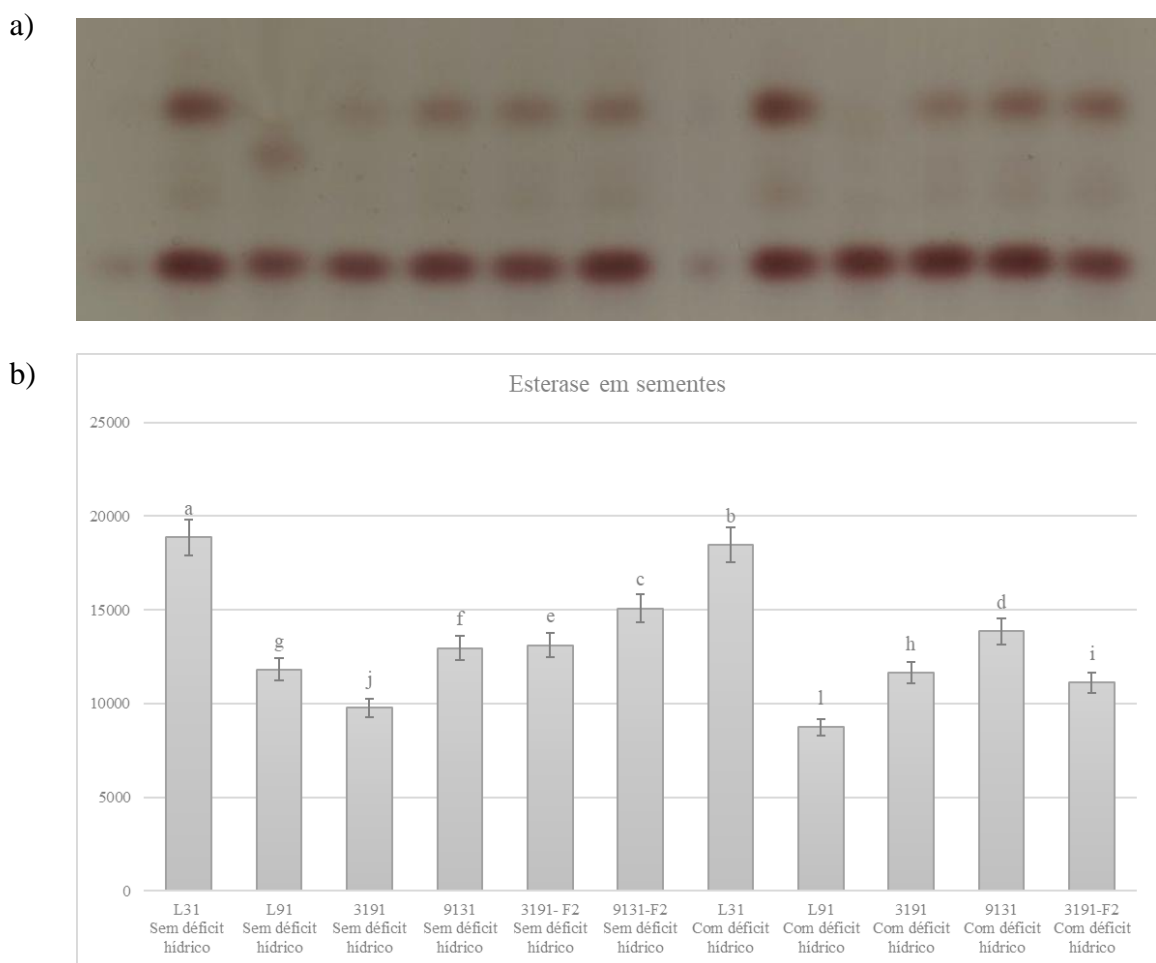


Fonte: Da autora (2022).

Maior atividade da enzima esterase foi observada em sementes da linhagem 31, em ambas as condições de retenção de água no solo. Em ambas as linhagens L31 e L91, menor atividade desta enzima foi observada em sementes desenvolvidas sob deficiência hídrica, o que foi observado também em sementes do genótipo híbrido 31/91-F2 (Figura 6). Marques *et al.*

(2019) também observaram maior expressão da enzima esterase em sementes das linhagens, classificadas como não tolerantes, quando comparadas com as das linhagens 91, classificadas como tolerantes em seu trabalho.

Figura 6 - Atividade da enzima esterase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da EST e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm^2 , pelo ImageJ.

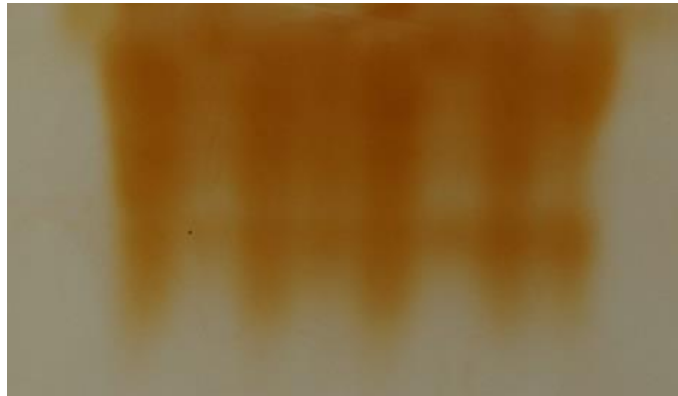


Fonte: Da autora (2022).

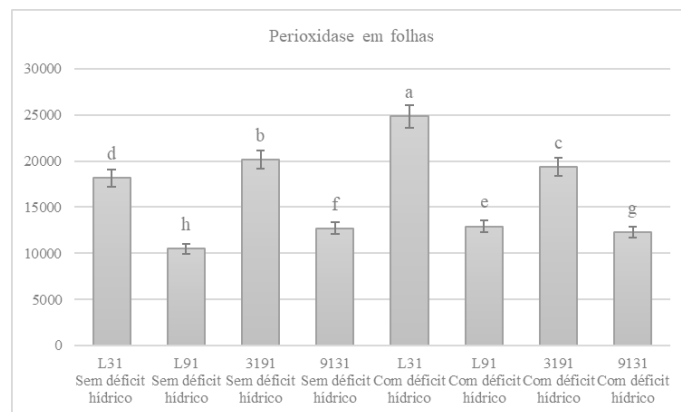
Maior expressão da POX foi observada em folhas e raízes da Linhagem 31, submetida à restrição hídrica (Figura 7 e Figura 8). Em raízes das linhagens 31 e 91 houve aumento da expressão da enzima peroxidase quando as plantas foram desenvolvidas sob deficiência hídrica, o que não foi observado nos genótipos híbridos 31/91 e 91/31.

Figura 7 - Atividade da enzima peroxidase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da POX e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.

a)



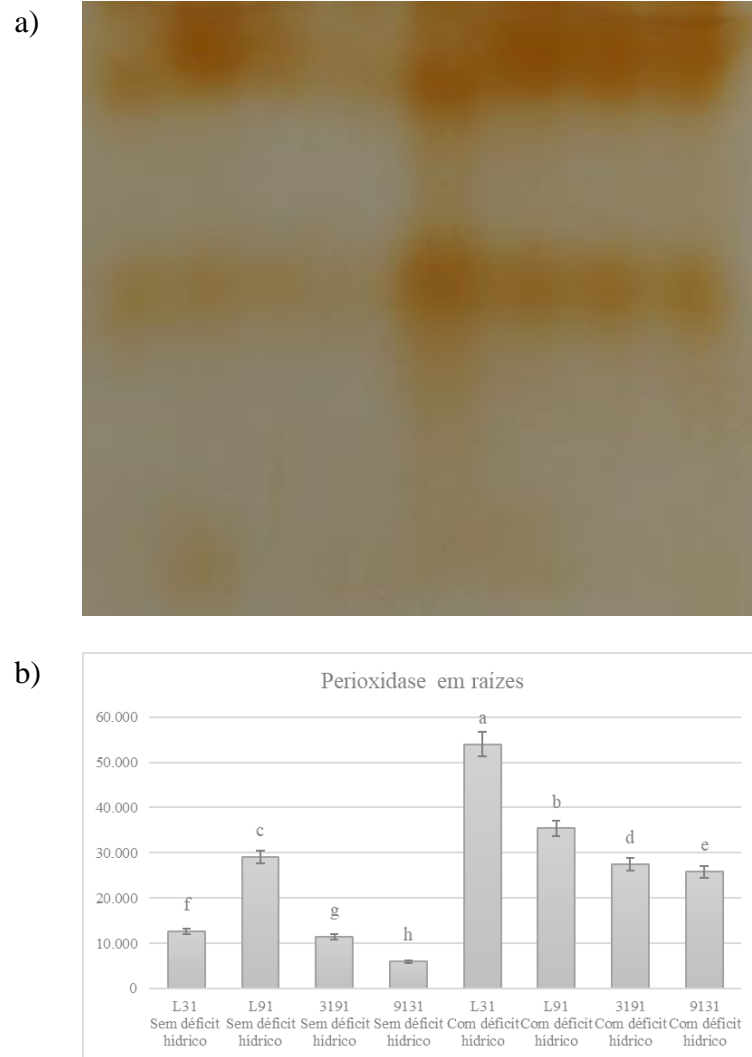
b)



Fonte: Da autora (2022).

Já nas raízes (Figura 8), em todos os genótipos, linhagens e híbridos, submetidos ao déficit hídrico, foram observadas maiores expressões da enzima peroxidase. Em raízes da linhagem 31 houve maior expressão desta, quando comparadas às observadas sem déficit hídrico. Santos *et al.* (2021), também observaram a maior expressão da enzima peroxidase em raízes quando essas estavam sob condições de estresse. A maioria dos genes que se expressam para a peroxidase de milho aparece expressa em tecidos radiculares (HOFMANN, 2020; SEKHON, 2011; WANG, 2015).

Figura 8 - Atividade da enzima peroxidase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da POX e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm^2 , pelo ImageJ.

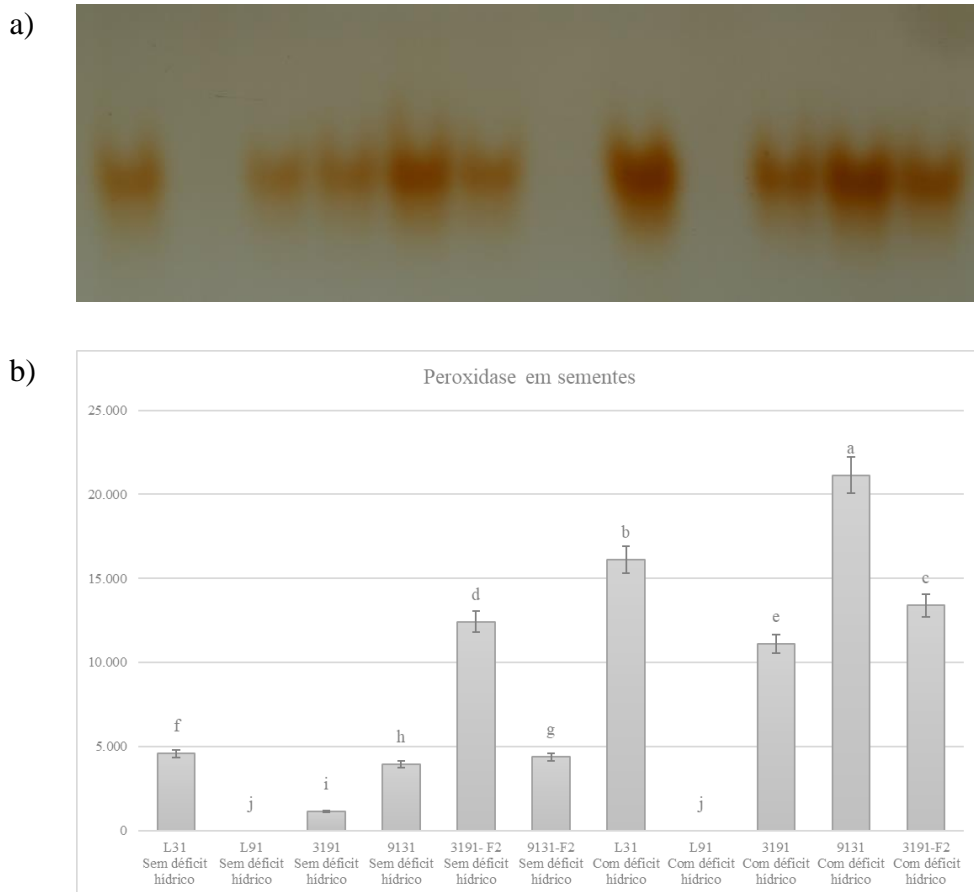


Fonte: Da autora (2022).

Em sementes, pode-se verificar que não houve expressão da peroxidase na linhagem 91, com ou sem deficiência hídrica (Figura 9). Na pesquisa, ao comparar a expressão desta enzima em sementes das linhagens L31, houve maior atividade, quando comparada à L91.

Já nos híbridos avaliados verificou-se maior expressão quando as sementes foram desenvolvidas sob deficiência hídrica. Segundo Vilela (2019), sob estresse hídrico severo, observa-se mais atividade das enzimas POX.

Figura 9 - Atividade da enzima peroxidase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da POX e b) gráfico da quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.



Fonte: Da autora (2022).

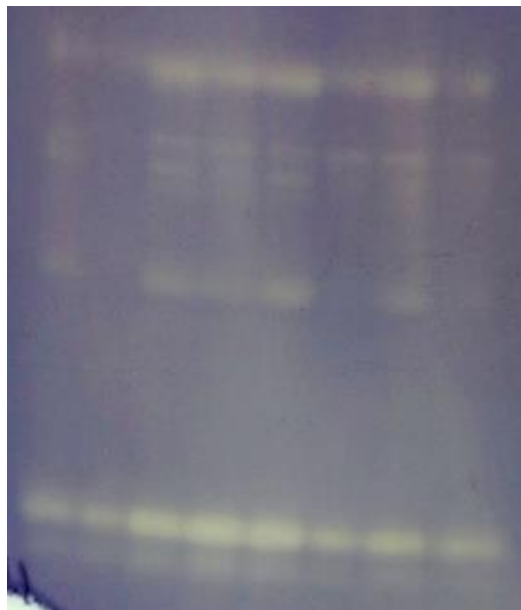
Ressalta-se que em folhas, raízes e sementes, de todos os genótipos, linhagens e híbridos, a maior expressão da enzima peroxidase foi observada sob condições de deficiência hídrica. Assim como a catalase, a peroxidase tem sua atividade relacionada à redução do nível de H₂O₂. O H₂O₂, junto as demais espécies reativas de oxigênio, são responsáveis pela peroxidação de lipídeos e conseqüentemente pela perda da capacidade seletiva e fluidez do sistema de membranas celulares (CHOUDHARY; KUMAR; KAUR, 2019; LIU; SOUNDARARAJAN; MANIVANNAN, 2019; MARQUES *et al.*, 2019; PAUL; ROYCHOUDHURY, 2017).

Quanto à enzima superóxido dismutase (SOD), maior expressão foi observada em folhas das plantas híbridas, 31/91 e 91/31, não submetidas ao déficit hídrico (Figura 10).

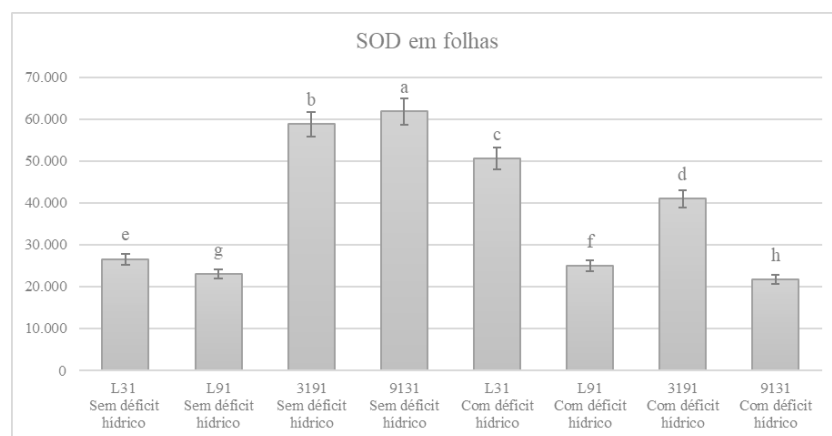
Em linhagens, foi observada maior expressão da enzima SOD em folhas das plantas na L31, submetidas ou não ao déficit hídrico, sendo que a maior expressão ocorreu sob deficiência hídrica. Verifica-se que a expressão de SOD foi maior em plantas submetidas à restrição hídrica, o que pode estar associado à destoxificação celular.

Figura 10 - Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da SOD e b) quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ.

a)



b)



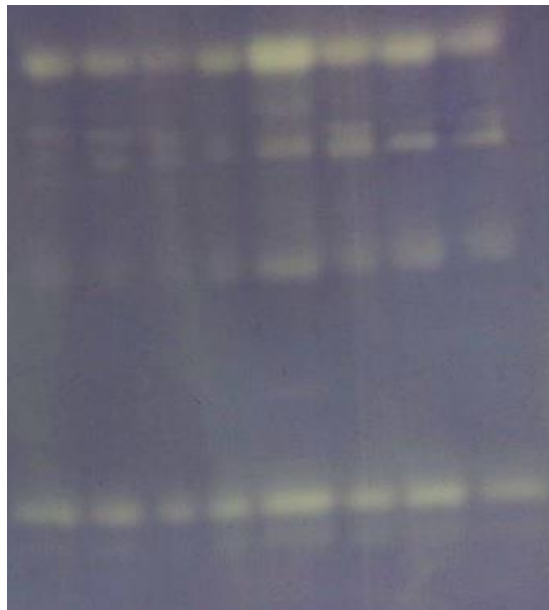
Fonte: Da autora (2022).

Em raízes a maior expressão de SOD foi verificada em plantas submetidas ao déficit hídrico independentemente do genótipo, sendo linhagem ou híbrido. Em ambas as condições, maior atividade desta enzima foi observada na linhagem 31, classificada como não tolerante

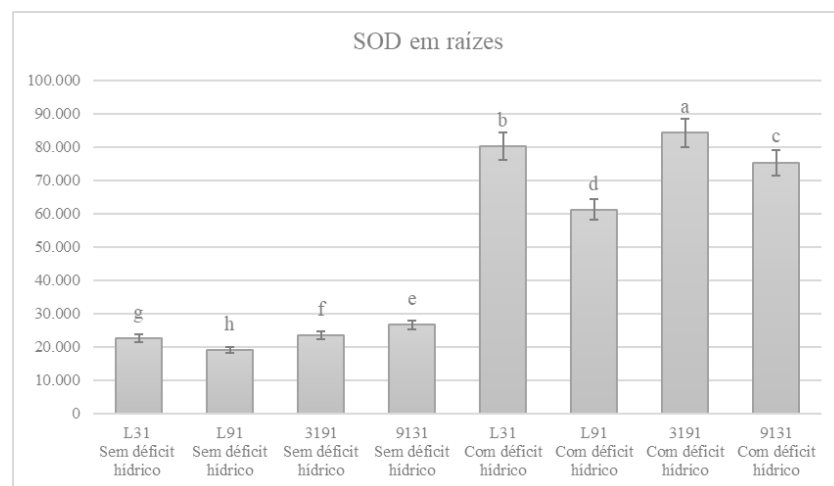
(Figura 11). Os genótipos sensíveis de milho tendem não apresentar esta capacidade de remover as EROs, além de apresentarem baixa taxa fotossintética quando expostas a estresse prolongado (SOUZA *et al.*, 2014).

Figura 11 - Atividade da enzima superóxido dismutase em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da SOD e b) quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ

a)



b)



Fonte: Da autora (2022).

Essa enzima atua como catalizadora no processo de conversão dos radicais superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LIU; SOUNDARARAJAN; MANIVANNAN, 2019; PAUL; ROYCHOUDHURY, 2017). Os radicais O_2^- são produzidos pelo bloqueio da cadeia de transporte de elétrons o que leva à geração de elétrons livres ou, pela reação de transferência de

elétrons da ferredoxina ao oxigênio molecular, e são compostos potencialmente causadores de dano celular por atuarem negativamente sobre a membrana celular (CHOUDHARY; KUMAR; KAUR, 2019; LIU; SOUNDARARAJAN; MANIVANNAN, 2019).

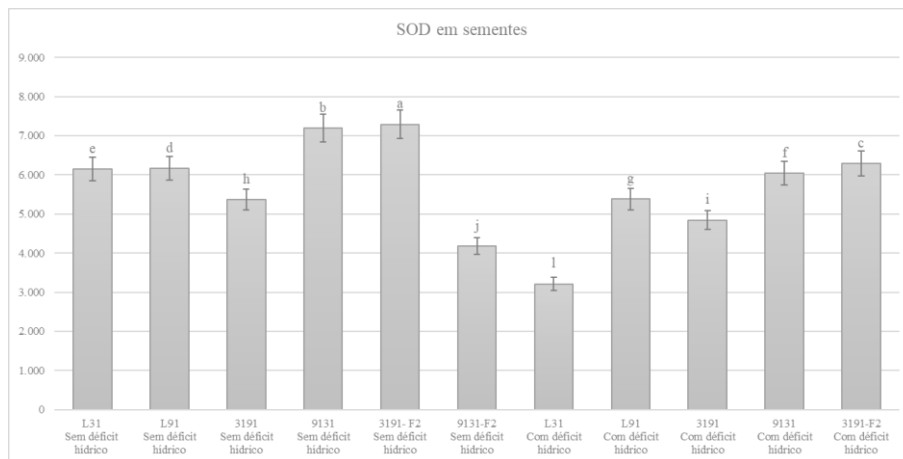
Em sementes houve menor atividades da enzima SOD quando foram desenvolvidas sem déficit hídrico, independentemente do genótipo, linhagens ou híbridos. Em ambas as condições maior atividade em sementes F₂ (Figura 12).

Figura 12 - Atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico): a) padrão de expressão da SOD e b) quantificação em pixel, em mm², pelo ImageJ

a)



b)



Fonte: Da autora (2022).

Ao comparar as linhagens maior expressão foi observada em sementes da linhagem 91, sem deficiência hídrica. A SOD é a primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante, removendo o superóxido, eliminando as possibilidades da formação do radical hidroxila (LUIS *et al.*, 2018). Em plantas de milho tolerantes ao déficit hídrico, uma das respostas fisiológicas

a esta exposição é ativação do sistema antioxidante enzimático para sequestrar as EROs (NOMAN *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2014).

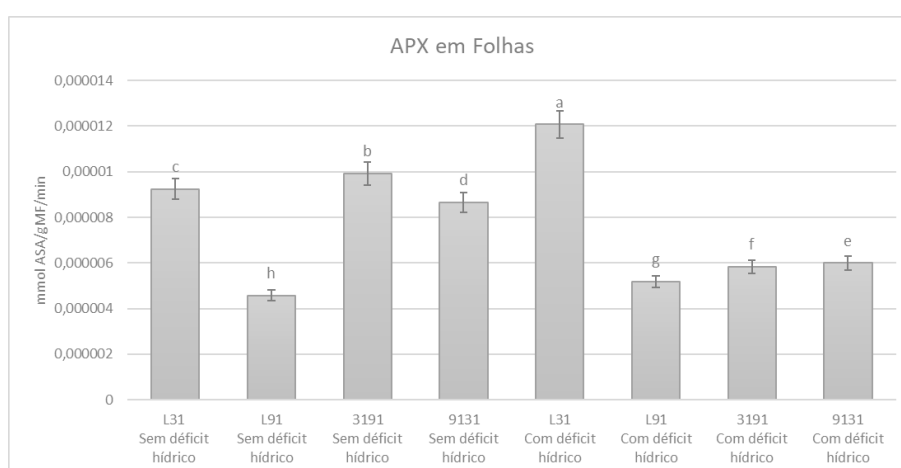
3.2 Resultados das análises proteômicas pela técnica de espectrofotometria de microplacas

A expressão da enzima ascorbato peroxidase (APX) nas folhas foi estatisticamente superior na linhagem 31, submetida ao déficit hídrico, em relação a linhagem 91, e os híbridos Silva Neta *et al.* (2015) observaram aumento da expressão da enzima APX nas folhas de milho, sendo a APX, utilizada como um marcador em folhas, quando há déficit hídrico.

Na presente pesquisa foi observado aumento nos valores de APX em folhas das linhagens 31 e 91, quando submetidas ao déficit hídrico, em relação as essas mesmas linhagens quando não submetidas ao déficit hídrico (Gráfico 2)..

No entanto, em folhas das plantas híbridas 31/91 e 91/31, houve redução dos valores da APX quando submetidas ao déficit hídrico. Sharma e Dubey (2005) observaram que, em condições extremas de seca, a atividade da APX é reduzida.

Gráfico 2 – Quantificação da atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX), por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):

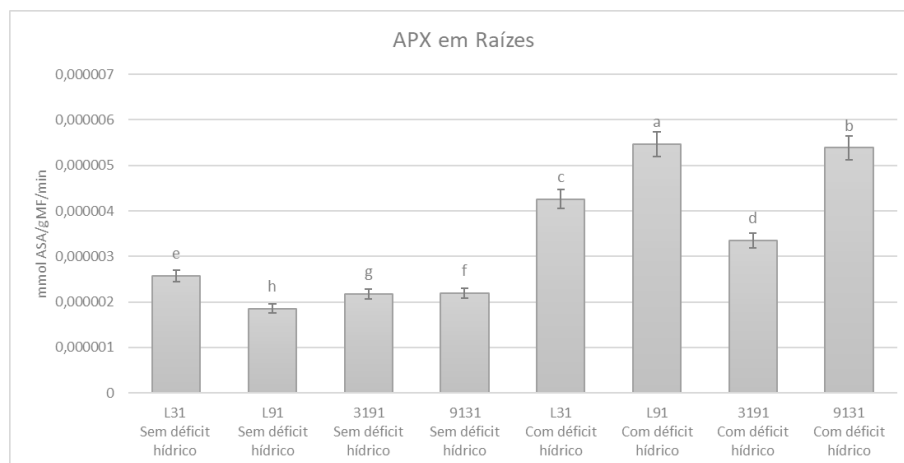


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.
Fonte: Da autora (2022).

Diferentemente do observado em folhas, maiores valores de APX foram observados em raízes e sementes da linhagem 91, desenvolvidas sob déficit hídrico (Gráfico 3 e Gráfico 4). Independentemente do genótipo, linhagem e híbrido, houve aumento da APX, em folhas das plantas desenvolvidas sob déficit hídrico. Xie *et al.* (2018), observaram que as atividades da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR) foram aumentadas sob deficiência hídrica e ainda mais reforçadas pela aplicação de 2-(3,4-Diclorofenoxi) trietilamina (DCPTA) em plântulas de milho.

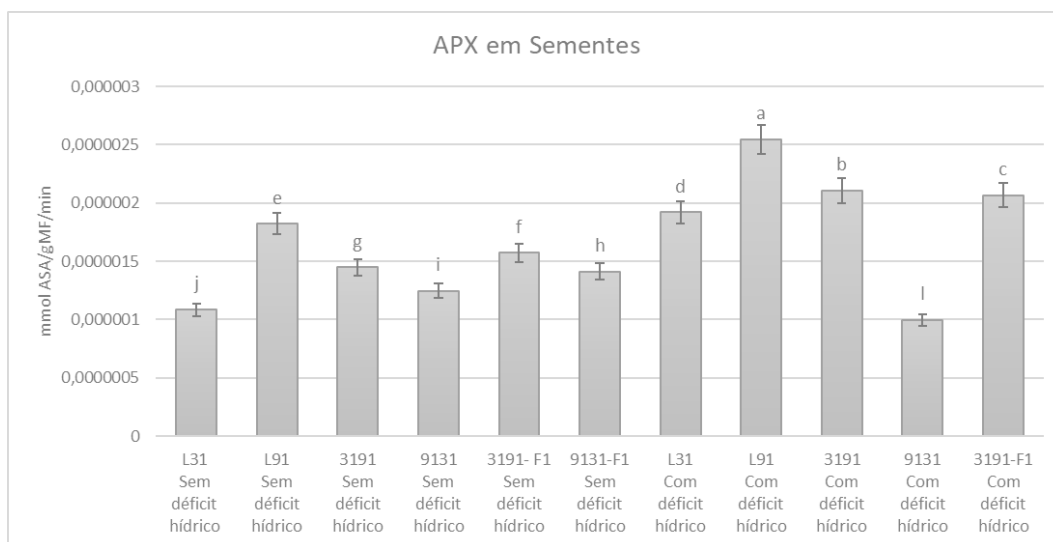
O aumento da atividade da APX nas plântulas, também sugere um sinal de tolerância ao déficit hídrico, pois, além de diminuir o acúmulo de H_2O_2 a sua presença em diferentes compartimentos celulares cria uma barreira de defesa ao estresse oxidativo em organelas fundamentais como o cloroplasto (ZHANG *et al.*, 2013). Em sementes, para a maioria dos genótipos (linhagens e híbridos) houve aumento dos valores da APX sob condições de déficit hídrico.

Gráfico 3 - Quantificação da atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX), por meio da espectrofotometria de microplacas, em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.
Fonte: Da autora (2022).

Gráfico 4 - Quantificação da atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX), por meio da espectrofotometria de microplacas, em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):

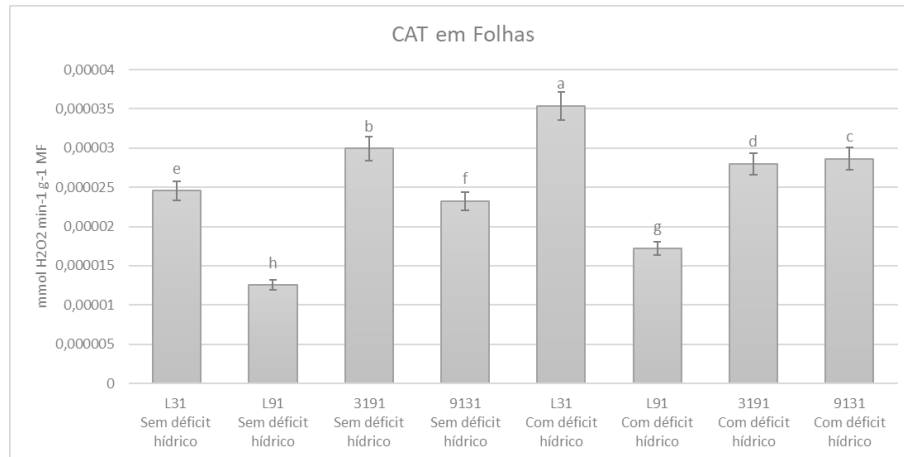


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Em folhas da linhagem 31, submetidas ao déficit hídrico, houve maior expressão da enzima catalase, quando compara com a da linhagem 91, sob deficiência hídrica ou não (Gráfico 5). Hussain *et al.* (2020) também observaram em quatro cultivares de milho sob a influência dos estresses de seca, frio e seca mais frio; maior expressão desta enzima sob condições de estresse. Os autores observaram que, principalmente sob a condição de frio e a condição de seca mais frio, o estresse oxidativo é desencadeado, há maior acúmulo de EROs e taxa de peroxidação lipídica. Variações na resposta de cultivares de milho aos estresses também foram observadas. Sabe-se que o equilíbrio entre as atividades de CAT, SOD e APX é essencial para eliminar os níveis tóxicos de EROs (APEL; HIRT, 2004).

Importante ressaltar que a atividade da enzima catalase, avaliada por meio da técnica de eletroforese, também, foi maior em folhas da linhagem 31 quando comparada à observada em folhas da linhagem 91. Também por meio desta mesma técnica houve aumento da atividade da catalase em folhas sob condições de déficit hídrico, independentemente do genótipo, linhagem ou híbrido.

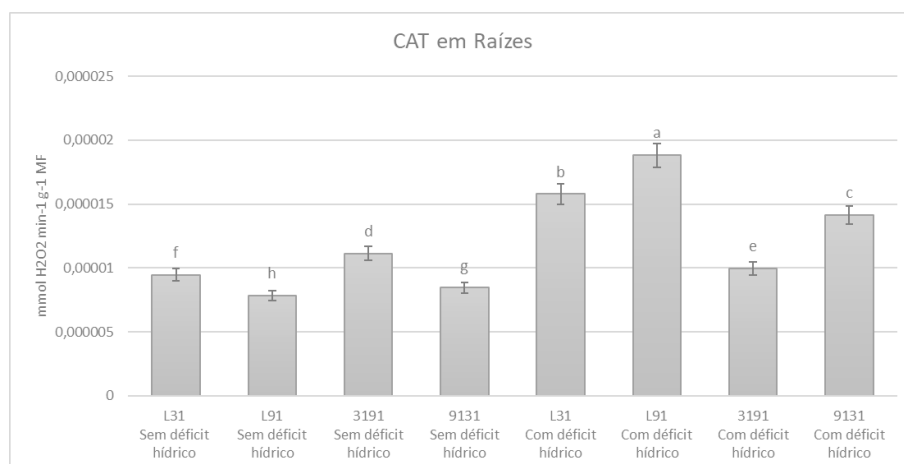
Gráfico 5 - Quantificação da atividade enzimática de catalase (CAT), por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

A expressão da catalase foi maior na linhagem 91, submetida ao déficit hídrico em relação aos outros genótipos (linhagens e híbridos). Com exceção do observado em raízes do híbrido 31/91, sob condições de déficit hídrico, houve aumento desta enzima (Gráfico 6).

Gráfico 6- Quantificação da atividade enzimática de catalase (CAT), por meio da espectrofotometria de microplacas, em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):



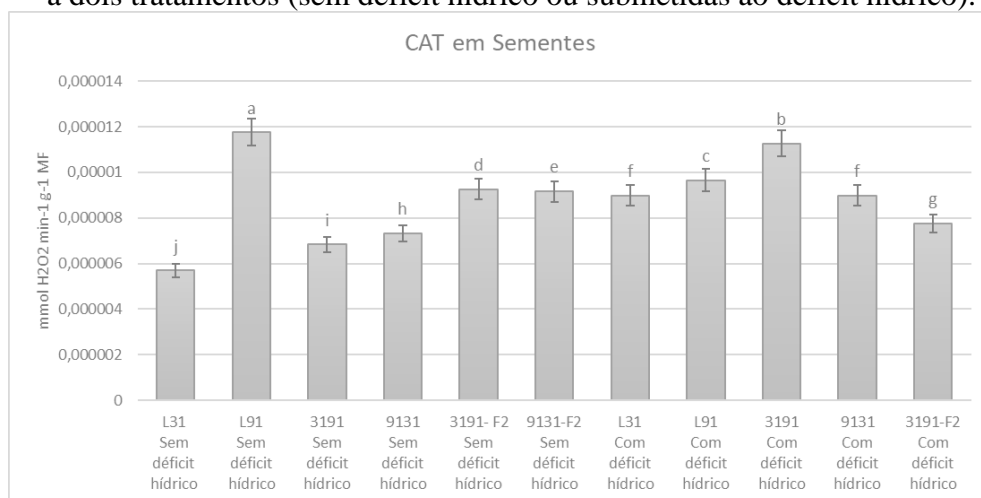
Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Pakdel *et al.* (2020) também observaram aumento da CAT em raízes de genótipos de milho submetidos ao déficit hídrico. Os autores verificaram também aumento das atividades das enzimas SOD e POX em raízes do genótipo classificado como tolerante. Esses resultados corroboram aos de outros autores os quais observaram aumento da atividade de enzimas antioxidantes associadas à resposta à seca em cevada (GHOTBI-RAVANDI *et al.*, 2019), milho (CHUGH *et al.*, 2011), arroz (SHARMA; DUBEY, 2005), gergelim (FAZELI *et al.*, 2007) e colza (ABEDI *et al.*, 2010).

Na presente pesquisa, para a maioria dos genótipos, linhagens e híbridos, houve aumento dos valores de catalase em raízes de plantas desenvolvidas sob condição de déficit hídrico, o que também foi observado quando da avaliação da atividade da catalase pela técnica de eletroforese.

Em relação a expressão em sementes, maiores valores de catalase foram observados nas da linhagem 91, sem déficit hídrico e menor nas da linhagem 31, também não submetida ao déficit hídrico. Houve aumento nos valores desta enzima em sementes da linhagem 31 e os híbridos 31/91 e 91/31, desenvolvidas sob déficit hídrico (Gráfico 7). O aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante é um dos mecanismos de proteção adotados pela planta para eliminar as EROs induzidas pelo estresse (PAKDEL *et al.*, 2020). Segundo estes autores a magnitude da tolerância ao déficit hídrico está relacionada à capacidade de eliminação de ROS das células vegetais.

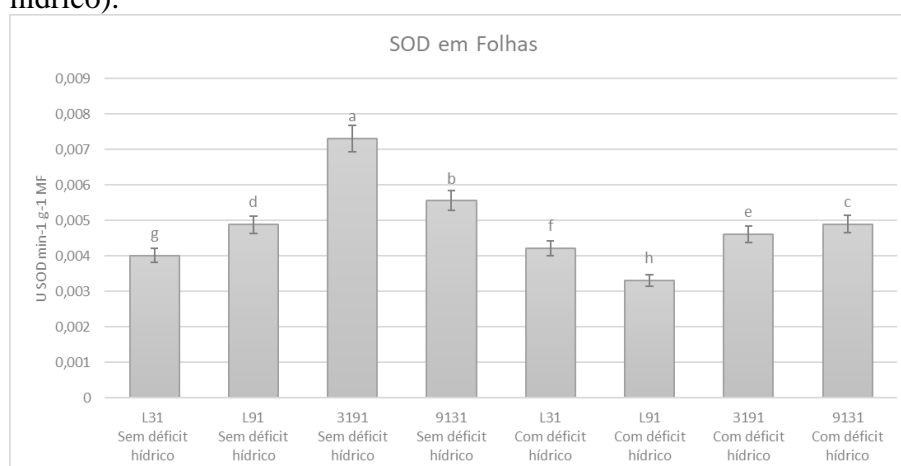
Gráfico 7 - Quantificação da atividade enzimática de catalase (CAT), por meio da espectrofotometria de microplacas, em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Em relação a enzima SOD, a maior atividade, foi observada em folhas das plantas dos híbridos 31/91 e 91/31, sem estresse hídrico (Gráfico 8). Nesta condição menores valores de SOD foram observados em folhas da L31, sem estresse hídrico. Em folhas desta linhagem houve aumento da SOD sob déficit hídrico. No entanto, é importante ressaltar que para os demais genótipos estudados houve redução dos valores de SOD sob condições de déficit hídrico. Por meio da técnica de eletroforese, em folhas de plantas híbridas desenvolvidas sem déficit hídrico houve, também, maior atividade de SOD. A SOD está presente em todos os compartimentos capazes de realizar transporte de elétrons, ou seja, suscetíveis ao estresse oxidativo e encontrada principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias (LUIS *et al.*, 2018).

Gráfico 8 - Quantificação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):

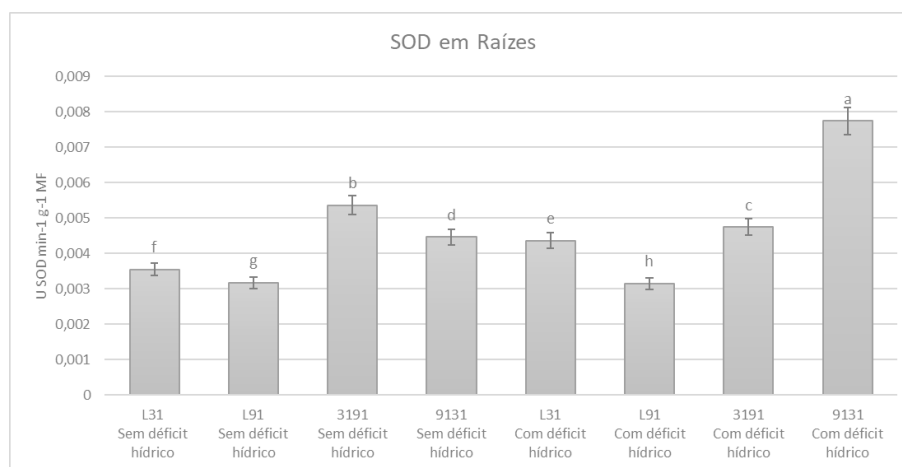


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Em raízes também foi observado a maior expressão de SOD nos híbridos 91/31 e 31/91, submetidas ou não ao déficit hídrico (Gráfico 9). Jabeen *et al.* (2020), em um estudo de tiamina para estimular o crescimento e metabólitos secundários em raízes de nabo, sob déficit hídrico, observaram que as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase aumentaram, enquanto nenhuma alteração foi observada na peroxidase em condições de déficit hídrico. Em raízes, os autores observaram aumento significativo das atividades de SOD e peroxidase, em condições de déficit hídrico, enquanto não houve diferença da atividade de CAT em raízes desenvolvidas a 75% e 50% de retenção de água no solo.

Pela técnica de eletroforese também foi observada maior atividade da SOD em raízes da linhagem 31, quando comparada à observada nas da linhagem 91, desenvolvidas ou não sob déficit hídrico.

Gráfico 9 - Quantificação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), por meio da espectrofotometria de microplacas, em raízes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):



Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Em sementes da linhagem 91, desenvolvidas sem condição de déficit hídrico, houve maior atividade da enzima SOD em relação a outros genótipos, linhagem e híbridos. (Gráfico 10). Para esta mesma linhagem houve redução dos valores de SOD em folhas desenvolvidas sob déficit hídrico. Enzimas como a catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e as peroxirredoxinas atuam, posteriormente a atividade da SOD, uma vez que estão envolvidas na eliminação do peróxido de hidrogênio gerado (FREITAS, 2020).

Segundo Pires *et al.* (2016), a tolerância se dá pelo estímulo à atividade de uma ou mais enzimas do sistema antioxidativo como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX), diminuindo a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Gráfico 10 - Quantificação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), por meio da espectrofotometria de microplacas, em sementes de linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):

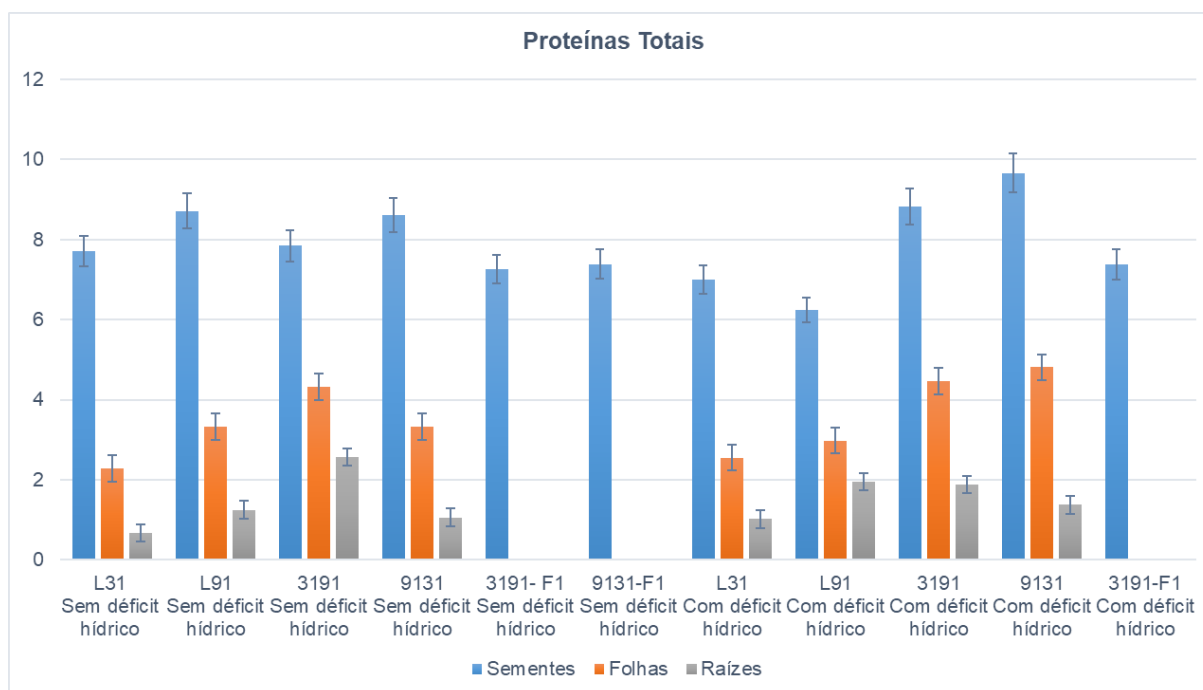


Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Em raízes, houve menores valores de proteínas totais submetidas ou não ao déficit hídrico (Gráfico 11). Yordanov *et al.* (2000), observaram o conteúdo de proteínas solúveis em folhas e a tendência de redução apresentada em raízes sob déficit hídrico podem estar relacionados à ocorrência de degradação e queda na síntese proteica, em consequência da indução de estresse hídrico nas células.

El-Tayeb e Ahmed (2007) ao avaliarem o estresse hídrico em *Vicia faba*, observaram que o conteúdo de proteína no apoplasto de folhas aumentou na cultivar tolerante e reduziu na sensível à seca, o que também foi observado nessa pesquisa. Na L91, houve maior expressão de proteínas do que a L31, submetida ou não ao déficit hídrico.

Gráfico 11 - Quantificação da atividade de proteínas totais, por meio da espectrofotometria de microplacas, em folhas, raízes e sementes linhagens e híbridos de milho, submetidas a dois tratamentos (sem déficit hídrico ou submetidas ao déficit hídrico):



Fonte: Da autora (2022)

Na presente pesquisa observa-se que o déficit hídrico estimulou maior acúmulo de proteínas solúveis em sementes, do que nas folhas e nas raízes, isto ocorre, pois, sementes possuem baixo teor de água em comparação com as folhas e raízes. Esse resultado corrobora com Tirelli (2021), que observou maiores valores de proteínas totais em plântulas produzidas a 10% da capacidade de retenção de água oriundas das sementes provenientes dos campos sem controle da irrigação, isto mostra que estes genótipos sentiram a indução ao estresse fazendo-os aumentar a produção de substâncias a fim de reverter os danos provenientes da falta de água.

Na presente pesquisa, em raízes dos híbridos 91/31-F₂ e 31/91-F₂, sem déficit hídrico e nas folhas e raízes do híbrido 31/91-F₂, com déficit hídrico, não houve expressão de proteínas totais pela técnica de espectrofotometria de microplacas.

Por meio dos resultados das análises proteômicas avaliadas pela técnica de eletroforese foi possível observar mais atividade das enzimas do sistema antioxidante, superóxido dismutase, catalase e peroxidase em folhas e raízes da linhagem 31 quando em relação observada na linhagem 91, independentemente de o crescimento das raízes ocorrer sob

condição de déficit hídrico ou não. Exceção foi observada para a atividade da peroxidase em raízes da linhagem 91, sem déficit hídrico. Em relação à expressão destas enzimas em folhas e raízes dos genótipos híbridos 31/91 e 91/31 foi observada maior atividade destas quando comparado à observada nas linhagens 31 e 91, independentemente da condição de déficit hídrico.

Pela técnica de eletroforese foi possível observar, de uma maneira geral, para as CAT, Peroxidase e SOD, o aumento da atividade destas em folhas, raízes e sementes quando foram desenvolvidas sob déficit hídrico. Isso também foi observado para a catalase em folhas e raízes e para a APX em raízes e sementes, quando quantificadas pela técnica de espectrofotometria de microplacas. Quanto à enzima esterase também foi observada maior atividade em folhas, raízes e sementes da linhagem 31, quando comparada à observada pela linhagem 91. Em folhas houve aumento da atividade desta enzima sob déficit hídrico. Já em raízes e sementes, houve redução da atividade desta enzima sob déficit hídrico.

Como já abordado a característica de tolerância ao déficit hídrico é controlada por muitos genes e a expressão deste é influenciada por diferentes fatores, a exemplo do genótipo, estágio de desenvolvimento no qual ocorre o déficit hídrico, do nível de deficiência hídrica, entre outros. Avaliar a expressão dos genes por meio de análise proteômica é uma importante ferramenta para entender os mecanismos envolvidos na tolerância à seca. Como observado na revisão, sob condições de deficiência hídrica há aumento de EROs que podem causar danos em nível celular. Como defesa, há resposta por meio de enzimas do sistema antioxidante que impedem ou reduzem os danos deletérios causado por EROs. Outras proteínas também podem estar relacionadas à tolerância ao déficit hídrico, a exemplo da esterase, proteínas resistentes ao calor, entre outras.

De maneira geral, a maior expressão das proteínas estudadas nesta pesquisa em folhas, raízes e sementes da linhagem intolerante déficit hídrico L31, comparada à observada na linhagem 91, tolerante, pode estar associada à necessidade de defesa para redução de EROs, formadas na linhagem 31.

No entanto, é importante ressaltar que mesmo o experimento sendo conduzido em casa de vegetação, o controle de todos os fatores que poderiam influenciar na expressão destas enzimas é muito difícil. Manter os valores exatos de retenção de água no solo, por exemplo, é um desafio, o que pode ocasionar a obtenção de resultados nem sempre passíveis de

explicações. Isso pode ser observado em relação à expressão observada nos materiais híbridos. Mesmo assim, marcadores de proteínas podem ser considerados informativos para a seleção de genótipos de milho tolerantes déficit hídrico.

4. CONCLUSÕES

A maior atividade da enzima SOD, CAT, POX, em folhas e raízes é observada na linhagem 31, submetida ao déficit hídrico. Também, na linhagem 91, a maior atividade da enzima esterase é observada em folhas, raízes e sementes, independentemente de o crescimento das raízes ocorrer sob déficit hídrico ou não.

Em relação à expressão destas enzimas em folhas e raízes dos genótipos híbridos, é observada maior atividade destas quando comparada à observada nas linhagens tolerante e não tolerante, independentemente da condição de déficit hídrico.

Para maioria dos genótipos avaliados, há maior expressão das proteínas sob condição de déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABEDI, T.; PAKNIYAT, H. E.; SABERNIA, M. **Alteração da enzima antioxidante em resposta ao estresse hídrico em dez cultivares de colza (*Brassica napus* L.)**. Raça Planta. 46 27–3, 2010.
- ABREU, V. M.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; NAVES, G. M. F.; SILVA NETA, I. C.; GUIMARÃES, R. M.; CARVALHO, M. R. **Desempenho fisiológico e expressão de isoenzimas em sementes de milho submetidas ao estresse hídrico**, Journal of Seed Science. 36 (1) 2014.
- ABREU, V.M.; VON PINHO, E.V.R.; MENDES-RESENDE, M.P.; BALESTRE, M.; LIMA, A.C.; SANTOS, H.O.; VON PINHO, R.G.; **Combining Ability and Heterosis of Maize Genotypes under Water Stress during Seed Germination and Seedling Emergence**, Crop Science - Volume59, Issue 1, Pages 33-43, Jan/Feb 2019. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.03.0161>.
- ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa - MG: UFV, 574 p. 1998.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2.ed. Viçosa: UFV, 627 p. 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction**. Ann Rev Plant Biol.; 55:373-9. 2004.
- ARNOLD, C. Y. **The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system**. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v. 74, n.1 p. 430-445, 1959.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Coordenação de Laboratório Vegetal, 2009.
- CHOUDHURY, F. K.; RIVERO, R. M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. **Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination**. The Plant Journal, 90(5), 856-867, 2017.
- CHOUDHARY, A.; KUMAR, A.; KAUR, N. **ROS and oxidative burst: Roots in plant development**. Plant Diversity, Beijing, 2019.
- CHUGH, V.; KAUR, N.; GUPTA, A. **Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought**. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. 48 47–53, 2011.
- CLEMENTE, D. I. **Estresse hídrico sobre caracteres morfofisiológicos e agronômicos em populações de milho**. Orientador: Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis; coorientador Dr. Antônio Paulino da Costa Netto. 2017. 109 f.: il. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Jataí, 2017.

CUNHA, A. P. M. A.; ZERI, M.; LEAL, K. D.; COSTA, L.; CUARTAS, L. A.; MARENGO, J. A.; TOMASELLA, J.; VIEIRA, R. M.; BARBOSA, A. A.; CUNNINGHAM, C.; CARCIA, J. V. C.; BROEDEL, E.; ALVALÁ, R.; RIBEIRO-NETO, G. **Extreme drought events over Brazil from 2011 to 2019**. *Atmosphere*, v. 10, n. 11, article 642, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/atmos10110642>.

DANTAS, A.A.A.; CARVALHO, L.G.; FERREIRA, E. **Climatic classification and tendencies in Lavras region, MG**. *Ciência e Agrotecnologia*. v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000600039>.

DEYHOLOS, M. K. **Making the most of drought and salinity transcriptomics**. *Plant, Cell & Environment*, 33: 648–654. 2010.

EL-TAYEB, M.A., AHMED, M.K. **Apoplasmic Protein Pattern, Hydrolases and Peroxidase Activity of Vicia faba Cultivars as Influenced by Drought**. *International Journal of Agriculture & Biology*, 1560–8530, 2:226–230, 2007.

FAZELI, F.; GHRBANLI, M. E.; NIKNAM, V. **Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars**. *Biologia Plantarum*. 51 98–103. 2007.

FERREIRA, D.F. **Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons**. *Ciência e Agrotecnologia*, [S.l.], v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRACASSO, A.; TRINDADE, L.; AMADUCCI, S. **Drought tolerance strategies highlighted by two Sorghum bicolor races in a dry-down experiment**. *Journal of Plant Physiology*, v.190, p.1-14, 2016.

FREITAS, A. S. **Antioxidant enzymes expression in seeds and seedlings submitted to stress conditions**. Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho. Coorientador(a): Heloísa Oliveira dos Santos. 2020. 94 p.: il. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. **Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants**. *Plant physiology*, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

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

GHOTBI-RAVANDI, A.A.; SHAHBAZI, M.; PESSARAKLI, M.; SHARIATI, M. **Monitoring the photosystem II behavior of wild and cultivated barley in response to progressive water stress and rehydration using OJIP chlorophyll a fluorescence transient**. *J. Planta. Nutr.* 39 1174–1185. 2016.

GUIMARÃES, P.S.; ROCHA, D.S.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. **Conteúdo de carboidrato foliar em híbridos de milho submetidos à restrição hídrica**. *Evidência - Ciência e Biotecnologia*, v. 19 n. 2, 2019.

GUPTA, D.K.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J. (Eds.). **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants**. [S.l.]: Springer International Publishing, 2018.

- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. **Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana sylvestris***. Archives of Biochemistry and Biophysics, [S.l.], v. 283, n. 2, p. 491-495, 1990.
- HOFMANN, A.; WIENKOOP, S.; HARDER, S.; BARTLOG, F.; LÜTHJE, S. **Hypoxia-Responsive Class III Peroxidases in Maize Roots: Soluble and Membrane-Bound Isoenzymes**. International Journal of Molecular Sciences, 21, 8872, 2020. doi:10.3390/ijms21228872
- HUSSAIN, H.A.; MEN, S.; HUSSAIN, S.; ZHANG, Q.; ASHRAF, U.; ANJUM, S.A.; ALI, I.; WANG, L. **Maize Tolerance against Drought and Chilling Stresses Varied with Root Morphology and Antioxidative Defense System**. Plants (Basel) 6;9(6):720, June 2020. doi: 10.3390/plants9060720.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. **First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid**. Alexandria Journal of Medicine, 54(4):287-293, 2018.
- JABEEN, M.; AISHA, N.; ASHRAF, M.; ALYEMENI, M.; AHMAD, P. **Thiamin stimulates growth and secondary metabolites in turnip (*Brassica rapa* L.) leaf and root under drought stress**. Physiologia plantarum. 172. 2020. doi: 10.1111/ppl.13215.
- JALIL, S. U.; AHMAD, I.; ANSARI, M. I. **Functional loss of GABA transaminase (GABA-T) expressed early leaf senescence under various stress conditions in *Arabidopsis thaliana***. Current Plant Biology, [s.l.], v. 9, p. 11-22, 2017.
- LIU, B.; SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A. **Mechanisms of Silicon-Mediated Amelioration of Salt Stress in Plants**. Plants, Basel, v. 8, p. 307, 2019.
- LUIS, A. *et al.* **Plant Superoxide Dismutases: Function Under Abiotic Stress Conditions**. In: Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Springer, Cham, p. 1-26. 2018.
- MARQUES, T. L. *et al.* **Physiological analysis and gene expression analysis of *ZmDBP3*, *ZmALDH9*, *ZmAN13*, and *ZmDREB2A* in maize lines**. Acta Scientiarum-Agronomy, Maringá, v. 42, p. e43479, 2019.
- MEWARD, A. R. M. A.; DESOKY, E. S. M.; RADY, M. M. **Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application**. Scientia Horticulturae, v. 228, p.132–144, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.008>
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.A.D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; VAN BREUSEGEM, F. **ROS signaling: the new wave?** Trends in Plant Science, [S.l.], v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.
- MITTLER, R. **ROS are good**. Trends in Plant Science, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. **The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance**. Plant Physiology, v. 161, Issue 1, Pages 5–19, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205690>.

- NAKANO, Y.; ASADA, K. **Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts.** *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880, 1981.
- NASCIMENTO, F.N. *et al.* **Desempenho da produtividade de espigas de milho verde sob diferentes regimes hídricos.** *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.16, n.1, p. 94- 108, 2017.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. The effect of drying temperature on corn seed quality. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 64, n. 1, p. 487-496, 1984.
- NOCTOR, G.; REICHHELD, J.P.; FOYER, C.H. **ROS-related redox regulation and signaling in plants.** *In: Seminars in Cell & Developmental Biology Academic Press, [S.l.]*, v. 80, p. 3-12, 2018.
- OZTETIK, E.; CICEK, A. **Effects of urban air pollutants on elemental accumulation and identification of oxidative stress biomarkers in the transplanted lichen *Pseudovernia furfuracea*.** *Environmental Toxicology*. Apr. 2011. <https://doi.org/10.1002/etc.541>.
- PAKDEL, H.; HASSANI, S.B.; GHOTBI-RAVANDI, A.A.; BERNARD, F. **Contrasting the expression pattern change of polyamine oxidase genes and photosynthetic efficiency of maize (*Zea mays L.*) genotypes under drought stress.** *Journal of Biosciences*, v. 45, 73, 2020. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12038-020-00044-3>.
- PATERNIANI, M. E. A. G.; GUIMARÃES, P. S.; BERNINI, C. S.; GALLO, P.B. **Caracteres secundários relacionados à tolerância à seca em progênies de irmãos germanos interpopulacionais de milho.** *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 14, n. 1, p. 130-144, 2015.
- PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. **Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties.** *Plant Gene*, Kidlington v. 11, p. 124-132, 2017.
- PIRES, R. *et al.* **Action of nitric oxide in sesame seeds (*Sesamum indicum L.*) submitted to stress by cadmium.** *Journal of Seed Science*, Londrina, v. 38, n.1, p. 022-029, 2016.
- ROSA, S.D.V.F.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. **Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem.** *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília v. 27, n. 2, p.91-101, 2005.
- SABERALI, S. F.; MORADI, M. **Effect of salinity on germination and seedling growth of *Trigonella foenum-graecum*, *Dracocephalum moldavica*, *Satureja hortensis* and *Anethum graveolens*.** *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Riyadh, v. 18, n. 3, p. 316-323, 2019.
- SANTOS, M. C.; VON PINHO, E. V. R.; SANTOS, H. O.; VILELA, D. R.; SILVA NETA, I. C.; ABREU, V. M.; VASCONCELLOS, R. C. C. **Enzymatic activity and gene expression related to drought stress tolerance in maize seeds and seedlings.** *Bioscience Journal* [online], vol. 37, pp. e37079. 2021. DOI 10.14393/BJ-v37n0a2021-53953.

SEKHON, R.S.; LIN, H.; CHILDS, K.L.; HANSEY, C.N.; BUELL, C.R.; DE LEÓN, N.; KAEPLER, S.M. **Genome-wide atlas of transcription during maize development.** The Plant Journal. 66, 553-563, 2011. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04527.x

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. **Drought Induces Oxidative Stress and Enhances the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings.** Plant Growth Regul 46, 209–221, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0002-2>.

SILVA NETA, I. C. *et al.* **Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination.** Genetics and Molecular Research, 14(1):2674-2690, 2015.

SOUZA, L.C.; MELO, N.C.; SIQUEIRA, J.M.S.; SILVA, V.F.A.; OLIVEIRA NETO, C.F. **Comportamento bioquímico no milho submetido ao déficit hídrico e a diferentes concentrações de silício.** Revista Agrarian, v.8, n.29, p.260-267, Dourados, 2015.

SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; DE CASTRO, E. M.; CARNEIRO, N. P.; PADILHA, F. A.; JÚNIOR, C. C. G. **ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity.** Plant growth regulation, 73(3), 205-217. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2017.

TIRELLI, G. V. **Déficit hídrico na germinação de sementes e crescimento de plântulas de arroz de terras altas** Orientador(a): Heloísa Oliveira dos Santos. Coorientador(a): Flávia Barbosa Silva Botelho. 2021. 69 p.: il. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

VAN RUYSKENSVELDE, V.; VAN BREUSEGEM, F.; VAN DER KELEN, K. **Posttranscriptional regulation of the oxidative stress response in plants.** Free Radical Biology and Medicine, [S.l.], v. 122, p. 181-192, 2018.

VILELA, D.R. **Características agronômicas e expressão de enzimas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho.** Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho. Coorientador(a): Renzo Garcia Von Pinho. 2019. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

WANG, Y.; WANG, Q.; ZHAO, Y.; AGUENTAR.; ZHU, S. **Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response.** Gene, 566, 95-108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.041>.

WANG, X.; LIU, H.; YU, F.; HU, B.; JIA, Y.; SHA, H.; ZHAO, H. **Differential activity of the antioxidant defence system and alterations in the accumulation of osmolyte and reactive oxygen species under drought stress and recovery in rice (*Oryza sativa* L.) tillering.** Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 8543, 2019.

XIE, T.; GU, W.; ZHANG, L.; LI, L. **Modulating the antioxidant system by exogenous 2-(3,4-dichlorophenoxy) triethylamine in maize seedlings exposed to polyethylene glycol-simulated drought stress.** PLoS ONE, 13(9):e0203626, Sep. 2018. DOI:10.1371/journal.pone.0203626.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. **Plant responses to drought, acclimatation, and stress tolerance.** *Photosynthetica*, v.38, p.171-186, 2000. 10.1023/A:1007201411474.

ZHANG, Z. *et al.* **Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses.** *PloS One*, [s.l.], v. 8, n. 2, p. e57472, 2013.

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHU, J-K. **Thriving under stress: How plants balance growth and the stress response.** *Dev. Cell*, 55, 529–543, 2020. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.10.012.

APÊNDICE A– Dados Climatológicos

Tabela 1A - Dados de temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura média e umidade relativa, coletados na casa de vegetação do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, no período de novembro de 2018 a abril de 2019.

Data	Temp. Mínima (°C)	Temp. Máxima (°C)	Temp. Média (°C)	Umidade relativa (%)
15/11/2018	28	31	29,5	74
16/11/2018	26	28	27,0	94
17/11/2018	26	28	27,0	89
18/11/2018	30	33	31,5	59
19/11/2018	25	26	25,5	94
20/11/2018	27	29	28,0	74
21/11/2018	27	29	28,0	66
22/11/2018	28	30	29,0	66
23/11/2018	28	30	29,0	66
24/11/2018	27	29	28,0	70
25/11/2018	25	26	25,5	94
26/11/2018	28	31	29,5	70
27/11/2018	30	33	31,5	62
28/11/2018	29	32	30,5	66
29/11/2018	28	31	29,5	70
30/11/2018	23	24	23,5	94
01/12/2018	26	28	27,0	84
02/12/2018	24	25	24,5	94
03/12/2018	25	25	25,0	69
04/12/2018	27	28	27,5	58
05/12/2018	30	33	31,5	59
06/12/2018	29	31	30,0	62
07/12/2018	30	33	31,5	62
08/12/2018	26	27	26,5	65
09/12/2018	30	32	31,0	62
10/12/2018	28	30	29,0	66
11/12/2018	30	32	31,0	55
12/12/2018	31	34	32,5	55
13/12/2018	29	30	29,5	55
14/12/2018	30	32	31,0	55
15/12/2018	31	32	31,5	49
16/12/2018	30	32	31,0	55
17/12/2018	29	30	29,5	55
18/12/2018	30	31	30,5	52

Tabela 1A, continuação

Data	Temp. Mínima (°C)	Temp. Máxima (°C)	Temp. Média (°C)	Umidade relativa (%)
19/12/2018	29	31	30,0	62
20/12/2018	31	33	32,0	52
21/12/2018	31	33	32,0	62
22/12/2018	30	32	31,0	55
23/12/2018	28	31	29,5	74
24/12/2018	24	25	24,5	89
25/12/2018	26	28	27,0	79
26/12/2018	29	31	30,0	62
27/12/2018	28	31	29,5	70
28/12/2018	24	25	24,5	94
29/12/2018	23	24	23,5	94
30/12/2018	27	29	28,0	70
31/12/2018	23	24	23,5	94
01/01/2019	26	28	27,0	84
02/01/2019	27	30	28,5	75
03/01/2019	29	31	30,0	62
04/01/2019	31	35	33,0	59
05/01/2019	28	31	29,5	74
06/01/2019	28	31	29,5	70
07/01/2019	25	26	25,5	94
08/01/2019	28	30	29,0	66
09/01/2019	29	31	30,0	62
10/01/2019	30	33	31,5	62
11/01/2019	29	31	30,0	58
12/01/2019	27	29	28,0	66
13/01/2019	28	30	29,0	66
14/01/2019	29	31	30,0	62
15/01/2019	27	29	28,0	70
16/01/2019	31	34	32,5	55
17/01/2019	31	34	32,5	55
18/01/2019	30	34	32,0	66
19/01/2019	25	26	25,5	94
20/01/2019	25	26	25,5	94
21/01/2019	28	30	29,0	66
22/01/2019	30	33	31,5	62
23/01/2019	30	34	32,0	66
24/01/2019	28	34	31,0	89
25/01/2019	28	31	29,5	70
26/01/2019	31	35	33,0	62

Tabela 1A, continuação

Data	Temp. Mínima (°C)	Temp. Máxima (°C)	Temp. Média (°C)	Umidade relativa (%)
27/01/2019	24	25	24,5	94
28/01/2019	26	27	26,5	70
29/01/2019	24	25	24,5	94
30/01/2019	28	30	29,0	62
31/01/2019	29	31	30,0	62
01/02/2019	29	32	30,5	66
02/02/2019	29	32	30,5	66
03/02/2019	27	29	28,0	74
04/02/2019	28	31	29,5	70
05/02/2019	27	29	28,0	74
06/02/2019	27	29	28,0	74
07/02/2019	30	33	31,5	62
08/02/2019	30	33	31,5	62
09/02/2019	30	34	32,0	66
10/02/2019	30	34	32,0	66
11/02/2019	29	32	30,5	66
12/02/2019	29	32	30,5	66
13/02/2019	28	33	30,5	84
14/02/2019	28	33	30,5	84
15/02/2019	31	37	34,0	66
16/02/2019	31	37	34,0	66
17/02/2019	30	37	33,5	79
18/02/2019	30	37	33,5	79
19/02/2019	29	35	32,0	79
20/02/2019	29	35	32,0	79
21/02/2019	31	38	34,5	70
22/02/2019	31	38	34,5	70
23/02/2019	31	37	34,0	66
24/02/2019	31	37	34,0	66
25/02/2019	34	41	37,5	56
26/02/2019	34	41	37,5	56
27/02/2019	32	38	35,0	63
28/02/2019	32	38	35,0	63
01/03/2019	33	38	35,5	56
02/03/2019	33	41	37,0	63
03/03/2019	27	31	29,0	85
04/03/2019	31	41	36,0	63
05/03/2019	19	30	24,5	77
06/03/2019	31	37	34,0	66

Tabela 1A, continuação

Data	Temp. Mínima (°C)	Temp. Máxima (°C)	Temp. Média (°C)	Umidade relativa (%)
07/03/2019	19	31	25,0	73
08/03/2019	21	28	24,5	83
09/03/2019	20	32	26,0	62
10/03/2019	24	31	27,5	77
11/03/2019	28	33	30,5	84
12/03/2019	22	26	24,0	80
13/03/2019	33	39	36,0	67
14/03/2019	33	39	36,0	59
15/03/2019	34	42	38,0	59
16/03/2019	34	42	38,0	59
17/03/2019	31	37	34,0	59
18/03/2019	31	37	34,0	66
19/03/2019	19	30	24,5	83
20/03/2019	19	30	24,5	60
21/03/2019	19	26	22,5	83
22/03/2019	19	26	22,5	85
23/03/2019	16	27	21,5	71
24/03/2019	16	27	21,5	74
25/03/2019	17	30	23,5	70
26/03/2019	17	30	23,5	81
27/03/2019	17	30	23,5	60
28/03/2019	17	30	23,5	76
29/03/2019	17	27	22,0	68
30/03/2019	17	27	22,0	74
31/03/2019	17	28	22,5	65
01/04/2019	16	28	22,0	79
02/04/2019	17	29	23,0	74
03/04/2019	17	29	23,0	80
04/04/2019	19	31	25,0	74
05/04/2019	18	30	24,0	85

Fonte: Da Autora (2022)

APÊNDICE B – Graus-dia correspondentes aos subperíodos fenológicos

Tabela 1B - Graus-dia e número de dias correspondente entre a semeadura e pendoamento da cultura do milho, Lavras, novembro de 2018 a abril de 2019.

Mês	Graus-dia (GD)	Semeadura a pendoamento (dias)			
		L31	L91	91/31	31/91
Novembro	18,3	16	16	16	16
Dezembro	18,9	31	31	31	31
Janeiro	19,1	31	31	31	31
Fevereiro	22,3	6	9	3	4

*Graus-dia calculado considerando $T_b = 10^{\circ}\text{C}$

Fonte: Da Autora (2022).

Tabela 2B - Graus-dia e número de dias correspondente entre o pendoamento e a colheita da cultura do milho, Lavras, novembro de 2018 a abril de 2019.

Mês	Graus-dia (GD)	Pendoamento a colheita			
		L31	L91	91/31	31/91
Fevereiro	22,3	22	19	25	24
Março	18,0	31	31	31	31
Abril	13,4	5	5	5	5

*Graus-dias calculado considerando $T_b = 10^{\circ}\text{C}$

Fonte: Da Autora (2022).