



DANIELLE REZENDE VILELA

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM LINHAGENS DE
MILHO**

**LAVRAS - MG
2023**

DANIELLE REZENDE VILELA

TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM LINHAGENS DE 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.

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

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

Vilela, Danielle Rezende.

Tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho / Danielle
Rezende Vilela. - 2023.

79 p. : il.

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

Coorientador(a): Renzo Garcia Von Pinho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. Estresse abiótico. 3. Genes candidatos. I. Von
Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Von Pinho, Renzo Garcia. III.
Título.

DANIELLE REZENDE VILELA

TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM LINHAGENS DE MILHO
DROUGHT STRESS TOLERANCE IN MAIZE LINES

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 10 de fevereiro de 2023.

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos	UFLA
Dr. Silvino Guimarães Moreira	UFLA
Dr. Delacyr da Silva Brandão Junior	UFMG
Dra. Renata Silva-Mann	UFS

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Coorientador

LAVRAS – MG
2023

Aos meus pais, Eila e Rogério.

Ao meu irmão Igor.

Aos meus avós.

Com todo o amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me abençoar em toda a minha caminhada, e pela sabedoria para tomar as decisões corretas.

Aos meus pais, Eila e Rogério, pelo amor incondicional, incentivo, apoio e carinho, e por estarem presentes em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão Igor, pela amizade, carinho, amor, e por ser exemplo de força de vontade e determinação.

À minha avó Mércia, por todos os conselhos, orações, e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu avô Custódio, meu grande exemplo, que onde quer que ele esteja está muito orgulhoso de mim.

Aos meus avós Maria Aparecida e Maurício, por serem apoio, e pelos conselhos sábios, amor e orações.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro. Ao CNPq e à Capes pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por ter me acolhido, pelos conhecimentos transmitidos, dedicação, incentivo, paciência e amizade, e por ter confiado em meu trabalho. Agradeço ainda, por ter me acompanhado durante toda a minha trajetória na UFLA, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador, Dr. Renzo Garcia Von Pinho, por toda a ajuda e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dra Heloisa Oliveira dos Santos, Dr Silvino Guimarães Moreira, Dr. Delacyr da Silva Brandão Junior, Dra Renata Silva-Mann, pela disponibilidade, e por terem aceitado o convite.

À Dra. Thaisa Fernanda Oliveira e à Dra. Flaviane de Oliveira Ribeiro, por se colocarem à disposição para contribuírem com este trabalho.

A todos os professores do Setor de Sementes, por toda a contribuição e auxílio.

Aos amigos, Dr. Renato Coelho de C. Vasconcellos, Dra. Elise de Matos Pereira, Dr. Wilson Vicente Souza Pereira e Dra Dayliane Andrade Bernardes, pela ajuda e disposição sempre que precisei.

A todos os amigos, estagiários, bolsistas do Setor de Sementes e colegas da pós-graduação, em especial, à Rafaela, Edlania, Juara, Giovana, Thamires, Ana, Giovani, Ana Maria e Thiago, por toda a ajuda e empenho na realização dos experimentos, por todos os momentos de alegria e, principalmente, pela amizade.

Aos que estão comigo desde o início da graduação, em especial, Cids, Flavinha, Rafa, Inara, Rodolfo, Ewerton, Maiara, Victor, Vinicinho e Reberth, pela paciência, amizade, companheirismo, incentivos e bons momentos.

Aos colaboradores do Setor de Sementes, Jaqueline, Geraldo, Rafaela e Rose e Viviana e Itamar, pela disponibilidade e auxílio.

À Marli, por toda a ajuda, disponibilidade e conselhos durante todo o período da pós-graduação.

Aos colaboradores do Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia-CDTT/DAG/UFLA da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por todo o auxílio durante a condução do experimento de campo.

Aos amigos do NEsem, por todos os conhecimentos compartilhados e momentos que passamos juntos.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Estresses abióticos como o déficit hídrico podem afetar o desenvolvimento das plantas e a produtividade de grãos. A identificação e o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao déficit hídrico são prioridade em programas de melhoramento de milho. Além da avaliação de características agronômicas torna-se importante estudar a expressão de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico para entender os mecanismos envolvidos nesta característica, visando o desenvolvimento de ferramentas que possam ser utilizadas em programas de melhoramento. Assim, objetivou-se avaliar as características agronômicas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho cultivadas em diferentes densidades de plantas. Também foi avaliada a expressão de genes candidatos associados à tolerância ao déficit hídrico pela técnica de qRT-PCR, em diferentes tecidos das plantas dessas linhagens. Para as avaliações das características agronômicas foram utilizadas linhagens, as quais foram avaliadas em experimentos anteriores, contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico. Foram instalados experimentos utilizando-se duas densidades de plantas, 60 e 120 mil plantas nas segundas safras dos anos 2019 e 2020. Nessas condições, foram avaliadas as características: Florescimento Feminino (FF), Florescimento Masculino (FM), Intervalo de Florescimento Masculino e Feminino (IFMF), Altura de Plantas (APL), Altura de Inserção da Primeira Espiga (AIE), Diâmetro do colmo (DC), Prolificidade (PROL), Peso dos grãos de cada subparcela (KG/P), Peso da espiga (PE), Comprimento da Espiga (CE), Número de grãos por espiga (NGE), *Stay Green* (*S.Green*). Nas duas safras, maior IFMF foi observado em linhagens classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico, 24 e 57. Para as características APL e AIE, nas duas safrinhas, maiores valores foram observados em plantas desenvolvidas na maior densidade de plantas, e maior APL foi observada nas plantas das linhagens classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico, linhagens 57 e 24. Maior peso da espiga foi observado na linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico e, menor peso da espiga e menor número de grãos por espiga foram observados na linhagem 24, classificada como não tolerante. Quanto à variável de *S. Green*, as plantas das linhagens tolerantes, 91 e 32, permaneceram verdes por mais tempo. Nas duas safras avaliadas, maior produção de grãos foi observada nas linhagens tolerantes, 91, 63 e 32, e menor na linhagem 24. Sendo assim, considerando as características agronômicas, a linhagem 91 se mostrou mais tolerante ao déficit hídrico. Em relação à expressão dos genes, houve diferença entre os diferentes genótipos, tecidos e densidades populacionais. Maior expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* foi observada em tecidos de plantas da linhagem tolerante, L91, e para o gene *ZmPP2C* maior expressão foi observada em tecidos da linhagem não tolerante, L24-NT. Para estes genes, de maneira geral, maior expressão foi observada em folhas desenvolvidas na maior densidade de plantas. De maneira geral, para os genes relacionados às enzimas antioxidantes, *SOD* e *CAT 3*, maior expressão foi observada em folhas e colmos de plantas da linhagem não tolerante, L24-NT. Assim, os genes *ZmDREB2A/2.1S* e *ZmPP2C* são sugeridos como potenciais marcadores moleculares para assistir programas de melhoramento, visando o desenvolvimento de cultivares para tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: *Zea mays*. Estresse abiótico. Fatores de Transcrição. Antioxidantes.

ABSTRACT

Abiotic stresses such as water deficit can affect plant development and grain productivity. The identification and development of genotypes tolerant to water deficit are priorities in maize breeding programs. In addition to the evaluation of agronomic traits, it is important to study the expression of genes related to tolerance to water deficit in order to understand the mechanisms involved in this trait, aiming at the development of tools that can be used in breeding programs. Thus, the objective was to evaluate the agronomic characteristics related to tolerance to water deficit in maize lines grown at different plant densities. The expression of genes associated with tolerance to water stress was also evaluated, using the qRT-PCR technique, in different plant tissues of maize lines. For the evaluation of the agronomic characteristics, lines were used, which were evaluated in previous experiments, contrasting in terms of tolerance to water deficit. Experiments were installed using two plant densities, 60 and 120 thousand plants in the second crops of the years 2019 and 2020. Under these conditions, the following characteristics were evaluated: Female Flowering (FF), Male Flowering (FM), Male and Female Flowering Interval (IFMF), Plant Height (APL), First Ear Insertion Height (AIE), Stem Diameter (DC) Prolificity (PROL), Grain Weight of each subplot (KG /P), Ear Weight (EP), Ear Length (EC), Number of grains per ear (NGE), Stay Green (S.Green). In the two harvests, higher IFMF was observed in lines classified as non-tolerant to water deficit, 24 and 57. For the APL and AIE characteristics, in the two harvests, higher values were observed in plants developed in the largest plant population, and greater APL was observed in plants from lines classified as non-tolerant to water deficit, lines 57 and 24. Higher ear weight was observed in line 91, classified as tolerant to water deficit, and lower weight of ear and smaller number of grains per ear were observed in line 24, classified as non-tolerant. As for the *S. Green* variable, the plants of the tolerant lines, 91 and 32, remained green for a longer time. In the two seasons evaluated, higher grain production was observed in tolerant lines, 91, 63 and 32, and lower in line 24. Thus, considering the agronomic characteristics, line 91 was more tolerant to water deficit. Regarding gene expression, there was difference between different genotypes, tissues, and population densities. Higher expression of the ZmDREB2A/2.1S gene was observed in tissues of plants from the tolerant lineage, L91-T, and for the ZmPP2C gene, higher expression was observed in tissues of the non-tolerant lineage, L24-NT. For these genes, in general, higher expression was observed in leaves developed at a largest density of plants. In general, for genes related to antioxidant enzymes, SOD and CAT 3, higher expression was observed in leaves and stems of plants of the non-tolerant strain, L24-NT. Thus, the genes ZmDREB2A/2.1S and ZmPP2C are suggested as potential molecular markers to assist breeding programs aimed at developing cultivars for tolerance to water deficit.

Keywords: Zea mays. Abiotic stress. Transcription Factors. Antioxidants.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1	INTRODUÇÃO	10
	REFERÊNCIAS.....	14
	CAPÍTULO 2 CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS RELACIONADAS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM LINHAGENS DE MILHO DESENVOLVIDAS SOB DIFERENTES DENSIDADES POPULACIONAIS ...	17
1	INTRODUÇÃO	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1	Local de realização dos experimentos.....	24
2.2	Seleção dos genótipos	24
2.3	Instalação dos campos experimentais	24
2.4	Avaliação de caracteres indiretos relacionados à tolerância ao déficit hídrico	25
2.5	Dados climáticos durante a condução dos experimentos	27
2.6	Análises estatísticas.....	28
3	RESULTADOS	29
4	DISCUSSÃO	40
5	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	CAPÍTULO 3 GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM DIFERENTES TECIDOS DE PLANTAS DE LINHAGENS DE MILHO.....	52
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1	Local de realização dos experimentos.....	58
2.2	Seleção dos genótipos	58
2.3	Instalação dos experimentos de campo.....	58
2.4	Análise da expressão de transcritos por meio da técnica de qRT-PCR	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A produção de milho no Brasil tem sido realizada principalmente em duas épocas de semeaduras, a primeira safra ou safra verão, e a segunda safra, também conhecida como safrinha. A partir da safra 2019/2020 passou-se a considerar mais uma época de semeadura, chamada de terceira safra de milho. Na safra verão a semeadura é realizada entre os meses de setembro a novembro (período chuvoso). Normalmente a semeadura da safrinha ocorre após a soja precoce, entre os meses de janeiro e março, no período da seca (AGRIANUAL, 2016; COELHO, 2013).

No Brasil, o maior percentual de produção de milho acontece na segunda safra, e a área cultivada nesta tem aumentado, chegando a superar a primeira safra, representando 77% da produção total do grão no país (CONAB, 2023).

Mesmo com a representatividade desta cultura na segunda safra, as condições de disponibilidade hídrica não são ideais e, com isso, o crescimento de plantas de milho é afetado negativamente devido à escassez de água. Além disso, a segunda safra também é influenciada pela temperatura e radiação decrescentes. Assim, esses fatores isolados ou em combinação deles levam a reduções significativas na produtividade da cultura do milho (SHAFIQ; AKRAM; ASHRAF, 2019; CLOVIS *et al.*, 2015). No entanto, é importante ressaltar também, que condições de déficit hídrico e redução na produção têm sido observadas na primeira safra ou safra verão.

A produção de milho em todo o mundo é influenciada sobremaneira pelas condições climáticas. Os estresses abióticos como seca, salinidade, altas temperaturas, estão entre as principais restrições edafoclimáticas as quais afetam o crescimento das plantas e a produtividade agrícola e causam mais de 50% da perda de produtividade de grãos anualmente (VERMA; DEEPTI, 2016; EL-SABAGH *et al.*, 2018; FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico é considerado um dos principais responsáveis pela perda de produtividade das culturas (SANTOS *et al.*, 2020), uma vez que ocorre em várias regiões. A seca pode ser definida, meteorologicamente, como período prolongado com precipitações abaixo da média. Outra definição relacionada à agricultura, é quando não há água suficiente para o crescimento das plantas, isto é, um intervalo entre a

necessidade da cultura por água e seu fornecimento, causando déficit hídrico e, conseqüentemente, reduções na produtividade (BLUM, 2011).

Os veranicos intensos e as secas recorrentes têm comprometido a produtividade do milho em todo o mundo (KONDWAKWENDA *et al.*, 2021). Projeta-se que a ocorrência de chuvas torrenciais e mal distribuídas e altas temperaturas, se tornarão mais frequentes e severas, afetando o desenvolvimento e produtividade das lavouras. Vale ressaltar, que áreas sem irrigação suplementar são responsáveis por mais da metade da produção agrícola em países em desenvolvimento, aproximadamente 60%, e estão sujeitas a períodos prolongados de déficit hídrico (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

A redução da produtividade em função de déficit hídrico varia com a espécie. Na cultura do trigo, a redução varia de 21 a 50%, e na cultura do milho de 39% a 50% (CHA-UM; YOOYONGWECH; SUPAIBULWATANA, 2010; DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2016). Outros autores relataram ainda, que a redução na produtividade de grãos na cultura do milho pode variar de 40 a 90% quando o déficit hídrico ocorre nos estádios de florescimento e enchimento de grãos (MENKIR; AKINTUNDE, 2001; BADU-APRAKU *et al.*, 2011; BADU-APRAKU; OYEKUNLE, 2012).

A perda de produtividade do milho devido ao déficit hídrico é um problema comum, que ocorre em todo o mundo, porém, na maioria das vezes é imprevisível. Nesse sentido, para mitigar os problemas causados pela deficiência hídrica e reduzir a perda de produtividade, a identificação e o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao déficit hídrico e com bom desempenho nessas situações devem ser prioridade em programas de melhoramento de milho (AO *et al.*, 2020, FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

O genótipo tolerante deve garantir alta produtividade de grãos tanto em condição de déficit hídrico quanto em condições normais. Portanto, em programas de melhoramento para a tolerância ao déficit hídrico objetiva-se obter o máximo potencial para produtividade de grãos e garantir que a produtividade sob estresse seja próxima do potencial produtivo (MESSMER; STAMP, 2010).

A utilização de cultivares tolerantes ao déficit hídrico é uma estratégia eficiente para aumentar a produtividade das culturas em áreas expostas ao déficit hídrico (BERNINI *et al.*, 2020). A compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação das plantas ao déficit hídrico é importante para a identificação dos genótipos tolerantes. No entanto, o melhoramento para a tolerância ao déficit hídrico é um desafio em programas de melhoramento genético, já que a tolerância ao déficit hídrico é controlada por muitos genes distribuídos em diferentes regiões do genoma (KONDWAKWENDA *et al.*, 2021). Além disso, é uma característica fortemente

influenciada pela interação genótipos *versus* ambiente, além de envolver diferentes processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

O déficit hídrico compromete o crescimento e desenvolvimento das plantas e desencadeia uma série de respostas nelas, envolvendo alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Vale ressaltar, que a duração, severidade, órgãos e tecidos afetados, e estágio de desenvolvimento, também influenciam nas respostas das plantas ao estresse (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

As respostas das plantas ao déficit hídrico tem sido alvo de várias pesquisas que envolvem o melhoramento genético, com o objetivo de desenvolver cultivares tolerantes. Por meio de pesquisas tem sido observado que há grande variabilidade para tolerância ao déficit hídrico em várias espécies cultivadas, como trigo, milho, sorgo e milheto (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022). Por isso, a compreensão dos mecanismos de resposta das culturas diante do déficit hídrico é parte essencial desse processo.

Assim, devido à complexidade e os desafios da seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, alguns caracteres secundários da planta têm sido utilizados para a seleção, como caracteres agronômicos e marcadores moleculares (MIKIĆ *et al.*, 2016). O florescimento masculino, altura de plantas e *stay-green*, podem ser utilizados como caracteres de seleção fenotípica para discriminação de genótipos de milho em programas de melhoramento, visando a tolerância ao déficit hídrico (BERNINI *et al.*, 2020).

Características secundárias englobam aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das plantas em resposta ao estresse hídrico. Alguns caracteres agronômicos têm sido associados à tolerância ao déficit hídrico e são frequentemente utilizados nas pesquisas, dentre eles pode-se citar: intervalo entre o florescimento masculino e feminino, *stay green*, altura de plantas, número de espigas por plantas e diâmetro do caule (BERNINI *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020).

Em grande parte dos programas de melhoramento objetiva-se aumentar a produtividade de grãos. No entanto, a produtividade de grãos possui baixa herdabilidade, alta interação com o ambiente, sendo um entrave para a seleção. Assim, a fenotipagem por meio de características secundárias é um dos pilares do melhoramento de tolerância ao déficit hídrico, já que características possuem alta correlação com a produtividade de grãos (KONDWAKWENDA *et al.*, 2021).

Além dos caracteres agronômicos, marcadores moleculares relacionados à tolerância ao déficit hídrico têm sido desenvolvidos e aplicados para a seleção de genótipos com tolerância ao déficit hídrico (BÄNZIGER *et al.*, 2004; MAKANZA *et al.*, 2018). As avaliações

moleculares incluem o uso de genes candidatos e análise de locos de caracteres quantitativos (*Quantitative Traits Loci* -QTL's) (NIKOLIĆ *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2014).

Nos últimos anos tem sido observado o progresso em pesquisas envolvendo a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados às respostas das plantas ao déficit hídrico (ZHANG *et al.*, 2022). Devido à complexidade das repostas moleculares, técnicas biotecnológicas como identificação de QTL's (ZHAO *et al.*, 2018), identificação de genes candidatos por meio da expressão de transcritos (VON PINHO, 2021), dentre outras, têm sido estudadas. Dentre os genes candidatos relacionados à tolerância ao déficit hídrico destaca-se os antioxidantes e os fatores de transcrição como os DREBS (MARQUES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021; VON PINHO, 2021).

A identificação de genes envolvidos nas respostas ao déficit hídrico possibilita a identificação e compreensão das rotas envolvidas nesse processo, o que torna viável o uso desses genes como marcadores moleculares (BIAZUZO, 2013). Sendo assim, a associação entre marcadores moleculares e características agronômicas fornece informações da base genética para esta característica e das interações genótipos por ambientes, permitindo que possam ser utilizados como ferramenta para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

Neste contexto, objetivou-se avaliar as características agronômicas e expressão de genes associados à tolerância ao estresse hídrico em linhagens de milho contrastantes, cultivadas em diferentes densidades de plantas.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar as características agronômicas e expressão de genes associados à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho contrastantes, cultivadas em diferentes densidades de plantas.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. **Agriannual 2016**. São Paulo: FNP – Consultoria & Agroinformativos, 2016. p. 409-444.
- AO, S. *et al.* Drought tolerance in maize is influenced by timing of drought stress initiation. **Crop Science**, [S.l.], v. 60, n. 3, p. 1591-1606, 2020.
- BADU-APRAKU, B. *et al.* Combining ability and heterotic groups of early-maturing tropical white maize inbred lines under stress and nonstress environments. **Agronomy Journal**, [S.l.], v. 103, n. 2, p. 544-557, 2011.
- BADU-APRAKU, B.; OYEKUNLE, M. Genetic analysis of grain yield and other traits of extra-early yellow maize inbreds and hybrid performance under contrasting environments. **Field Crops Research**, [S.l.], v. 129, n. 11, p. 99-110, 2012.
- BÄNZIGER, M. *et al.* Breeding for improved drought tolerance in maize adapted to southern Africa. Resilient crops for water-limited environments: Proceedings of a Workshop. Paper presented at the resilient crops for water-limited environments: proceedings of a workshop in Mexico. **Cimmyt**, 2004.
- BERNINI, C.S. *et al.* Seleção fenotípica de híbridos de milho para ambientes de baixa altitude e déficit hídrico. **Nativa**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 172-177, 2020.
- BIAZUZO, M.M.A. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum**. 2013. 177 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2013.
- BLUM, A. **Plant breeding for water-limited environments**. Tel Aviv: Springer, 2011. 270 p.
- CHA-UM, S.; YOOYONGWECH, S.; SUPAIBULWATANA, K. Water deficit stress in the reproductive stage of four indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, [S.l.], v. 42, n. 5, p. 3387-3398, 2010.
- CLOVIS, L.R. *et al.* Avaliação de linhagens S3 de milho por meio de testadores adaptados à safrinha. **Revista Caatinga**, [S.l.], v. 28, n.1, p. 109-120, 2015.
- COELHO, H.A. **Diferentes condições de estresse hídrico no desenvolvimento de milhos transgênico e convencional**. 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Irrigação e Drenagem) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP, 2013.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, 2022/23 – Quarto levantamento v. 10 - SAFRA 2022/23- n. 2, janeiro de 2023**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra>. Acesso em: 26 jan. 2023.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P.A. Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production. **Plos One**, [S.l.], v. 11, n. 5, p. 1-15, 2016.

EL-SABAGH, A. *et al.* Response of maize hybrids to drought tolerance in relation to grain weight. **Fresenius Environmental Bulletin**, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 2476-2482, 2018.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para estresses abióticos**. Viçosa: UFV, 2022. 312 p.

KONDWAKWENDA A. *et al.* Aspects in breeding maize for drought tolerance: Progress and modern breeding approaches. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 510-517, 2021.

MAKANZA, R. *et al.* High-Throughput phenotyping of canopy cover and senescence in maize field trials using aerial digital canopy imaging. **Remote Sensing**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 1-13, 2018.

MARQUES, T.L. *et al.* Physiological analysis and gene expression analysis of ZmDBP3, ZmALDH9, ZmAN13, and ZmDREB2A in maize lines. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2019.

MENKIR, A.; AKINTUNDE, A.O. Evaluation of the performance of maize hybrids, improved open-pollinated and farmers' local varieties under well-watered and drought stress conditions. **Maydica**, [S.l.], v. 46, n. 4, p. 227-238, 2001.

MESSMER, R.; STAMP, P. Trends in drought research. **Kasetsart J. Natural Science**, [S.l.], v. 44, p. 507-516, 2010.

MIKIĆ, S. *et al.* Agronomic and molecular evaluation of maize inbred lines for drought tolerance. **Spanish Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 1-13, 2016.

NIKOLIĆ, A. *et al.* Identification of QTLs for yield and drought-related traits in maize: Assessment of their causal Relationships. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [S.l.], v. 26, n.3, p. 2952-2960.

SANTOS, A.O. *et al.* Grain yield, anthesis-silking interval and drought tolerance indices of tropical maize hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

SANTOS, M.C. *et al.* Enzymatic activity and gene expression related to drought stress tolerance in maize seeds and seedlings. **Bioscience Journal**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 1-13, 2021.

SHAFIQ, S.; AKRAM, N.A.; ASHRAF, M. Assessment of physio-biochemical indicators for drought tolerance in different cultivars of maize (*Zea mays* L.). **Pakistan Journal of Botany**, [S.l.], v. 51, n. 4, p. 1241-1247, 2019.

VERMA, A.K.; DEEPTI, S. Abiotic stress and crop improvement: current scenario. **Advances in Plants & Agriculture Research**, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 345-346, 2016.

VON PINHO, I.V. **Fenotipagem e expressão gênica para tolerância ao déficit hídrico em milho**. 2021. 114 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

XU, J. *et al.* Identification of candidate genes for drought tolerance by whole-genome resequencing in maize. **BMC Plant Biology**, [S.l.], v. 14, n. 83, p. 1-15, 2014.

ZHANG, H., *et al.* Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**, [S.l.], v. 23, n.1, p. 104-119, 2022.

ZHAO, X.Q. *et al.* Identification of QTLs and meta-QTLs for seven agronomic traits in multiple maize populations under well-watered and water-stressed conditions. **Crop Science**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 507-520, 2018.

CAPÍTULO 2 CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS RELACIONADAS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM LINHAGENS DE MILHO DESENVOLVIDAS SOB DIFERENTES DENSIDADES POPULACIONAIS

RESUMO

O déficit hídrico leva a uma série de alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que interferem no desenvolvimento e causam redução da produtividade. Para mitigar os efeitos causados pelo déficit hídrico é importante investir em programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao déficit hídrico. Nesse sentido, a avaliação de características agronômicas é importante para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, pois estas características possuem alta herdabilidade sob estresse e também alta correlação genética com a produtividade. Assim, objetivou-se avaliar as características agronômicas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho contrastantes, cultivadas em diferentes densidades de plantas. Para as avaliações das características agronômicas foram utilizadas linhagens contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico. Foram instalados experimentos utilizando-se duas densidades de plantas, 60 e 120 mil plantas por hectare na segunda safra dos anos de 2019 e 2020. Nestas condições, foram avaliadas as seguintes características: Florescimento Feminino (FF), Florescimento Masculino (FM), Intervalo entre o Florescimento Masculino e Feminino (IFMF), Altura de Plantas (APL), Altura de Inserção da Primeira Espiga (AIE), Diâmetro do colmo (DC), Prolificidade (PROL), Peso dos grãos de cada subparcela (KG/P), Peso da espiga (PE), Comprimento da Espiga (CE), Número de grãos por espiga (NGE) e *Stay Green* (*S.Green*). Nas duas safras, 2019 e 2020, maior intervalo entre o florescimento masculino e feminino foi observado nas linhagens classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico, 24 e 57. Para as características APL e AIE, nas duas safras, maiores valores foram observados em plantas desenvolvidas na maior densidade de plantas, e maior APL foi observada nas plantas das linhagens classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico, linhagens 57 e 24. Maior peso da espiga foi observado na linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico e menor peso da espiga e menor número de grãos por espiga foi observado na linhagem 24, classificada como não tolerante. Quanto a variável *Stay Green* (*SG*), as plantas das linhagens tolerantes, 91 e 32, permaneceram verdes por mais tempo. Nas duas safrinhas avaliadas, maior produção de grãos foi observada nas linhagens tolerantes (91, 63 e 32) e menor produção de grãos foi observada na linhagem 24. Sendo assim, considerando as características agronômicas, a linhagem 91 se mostrou a mais tolerante ao déficit hídrico, e a linhagem 24 a menos tolerante.

Palavras-chave: *Zea mays*. Densidade de plantio. Seleção indireta. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Water deficit leads to a series of morphological, physiological, biochemical, and molecular changes that interfere with development and cause reduced productivity. To mitigate the effects caused by water deficit, it is important to invest in genetic improvement programs for the development of cultivars tolerant to water deficit. In this sense, the evaluation of agronomic traits is important for the selection of genotypes tolerant to water deficit, as these traits have high heritability under stress and also a high genetic correlation with productivity. Thus, the objective was to evaluate the agronomic characteristics related to tolerance to water deficit in contrasting maize lines, grown at different plant densities. For the evaluation of the agronomic traits, contrasting strains were used in terms of tolerance to water deficit. Experiments were installed using two plant densities, 60 and 120 thousand plants per hectare in the second harvest of the years 2019 and 2020. Under these conditions, the following characteristics were evaluated: Female Flowering (FF), Male Flowering (FM), Interval between Male and Female Flowering (IFMF), Plant Height (APL), First Ear Insertion Height (AIE), Stem Diameter (DC), Prolificity (PROL), Grain Weight of each subplot (KG/P), Ear Weight (EP), Ear Length (EC), Number of grains per ear (NGE), *Stay Green* (*S.Green*). In both seasons, 2019 and 2020, a greater interval between male and female flowering was observed in lines classified as non-tolerant to water deficit, 24 and 57. For APL and AIE characteristics, in both seasons, higher values were observed in developed plants at the highest plant density, and the highest APL was observed in plants from lines classified as non-tolerant to water deficit, lines 57 and 24. Higher ear weight was observed in lineage 91, classified as tolerant to water deficit and lower weight of the ear and a smaller number of grains per spike was observed in lineage 24, classified as non-tolerant. As for the variable Stay Green (SG), the plants of the tolerant lines, 91 and 32, remained green for a longer time. In the two off-seasons evaluated, higher grain production was observed in the tolerant lines (91, 63 and 32) and lower grain production was observed in line 24. Thus, considering the agronomic characteristics, line 91 proved to be the most tolerant to the deficit water stress, and strain 24 the least tolerant.

Keywords: *Zea mays*. Planting density. Indirect selection. Abiotic stress.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no Brasil e no mundo, assumindo importante papel no agronegócio, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, perdendo a liderança para os Estados Unidos e China, e é o segundo maior exportador da cultura (KIST *et al.*, 2019).

No Brasil, tem sido observado aumento significativo da área plantada com milho na segunda safra e redução da área na primeira safra. A área plantada com milho segunda safra corresponde a mais de 77% de toda a produção de milho (CONAB, 2023).

O cultivo de milho em segunda safra é geralmente mais exposto ao déficit hídrico, pois abrange o final do período chuvoso, o que pode provocar reduções significativas na produtividade de grãos. Na segunda safra 2021/2022 o baixo volume de chuvas restringiu a semeadura e o desenvolvimento das plantas regiões do país. Mesmo no cultivo de verão, foram observadas, em algumas regiões do país, a exemplo da região Sul, reduções na produtividade de grãos devido às condições de déficit hídrico (CONAB, 2023).

Sabe-se que estresses abióticos causam prejuízos diversos sobre a agricultura. A cultura do milho, está sujeita a diferentes tipos de estresses abióticos ao longo do seu ciclo, no entanto, o déficit hídrico é o fator abiótico que mais tem causado impacto na produtividade da cultura.

O déficit hídrico ocorre em grande parte dos cultivos agrícolas e pode ocorrer em conjunto com outros estresses abióticos, como altas temperaturas e salinidade. É definido como período de precipitação insuficiente, ou ausência de chuvas e é conhecido como seca. Nessas condições, a quantidade de água disponível é inferior à necessária pela cultura, o que conseqüentemente influencia na produtividade. O déficit hídrico pode ocorrer nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas e, assim, dependendo do estádio, pode influenciar com maior ou menor intensidade (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

Na cultura do milho, as plantas são mais suscetíveis ao déficit hídrico nos estádios iniciais de desenvolvimento e nas fases reprodutivas. Quando o estresse ocorre nos estádios iniciais, afetam o estabelecimento e o estande das plantas, enquanto na fase reprodutiva reduz a fertilização e o enchimento de grãos (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022). No entanto, quando o déficit hídrico ocorre no período reprodutivo ocorre maior perda de produtividade do que na fase vegetativa (EL-SABAGH *et al.*, 2018). Vale ressaltar, que na segunda safra, a deficiência hídrica normalmente coincide com os estádios mais avançados da cultura, florescimento e enchimento de grãos, o que pode limitar substancialmente o seu potencial produtivo (SIMÃO *et al.*, 2017).

Sabe-se que o déficit hídrico leva a uma série de alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Na cultura do milho causa redução da produtividade e da altura e diâmetro do colmo, aumento do intervalo entre o florescimento masculino e feminino, dentre outros (GUIMARÃES; ROCHA; PATERNIANI, 2019; SANTOS *et al.*, 2020).

Nesse sentido, para mitigar os efeitos causados pelo déficit hídrico, é muito importante o investimento em programas de melhoramento genético de milho voltados para a tolerância ao déficit hídrico, com o objetivo de desenvolver cultivares que sejam adaptadas e tolerantes ao déficit hídrico, e ao mesmo tempo, produtivas.

Segundo Fritsche-Neto e Borém (2022), devido ao impacto que o déficit hídrico pode ter sobre a agricultura, desenvolver genótipos adaptados a essas condições, que sejam mais produtivos e eficientes, deve ser prioridade dos programas de melhoramento genético.

A seleção dos genótipos superiores não é tarefa fácil, pois a tolerância ao déficit hídrico é uma característica quantitativa, complexa e controlada por muitos genes, além de ser influenciada pelo ambiente. É conhecida por afetar muitas características agrônômicas (ZHAO *et al.*, 2018). Portanto, são necessárias novas estratégias para entender os mecanismos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico o que exige conhecimentos multidisciplinares para o estabelecimento de metodologias adequadas e confiáveis no processo de melhoramento (PATERNIANI *et al.*, 2019).

A produtividade de grãos é um caráter quantitativo, complexo, com baixa herdabilidade e altamente influenciada pelo ambiente, o que dificulta a seleção. Assim, a utilização de caracteres indiretos é fundamental para seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento. A utilização desses caracteres, a exemplo de características agrônômicas, permite a seleção com boa precisão. Para a seleção das características ideais a serem avaliadas é preciso que estas sejam correlacionadas com a produtividade, tenham alta variabilidade genética, alta herdabilidade e sejam de fácil mensuração (FRITSCHE-NETO; BORÉM, 2022).

Nesse sentido, a fenotipagem tem papel essencial na seleção de genótipos tolerantes, principalmente utilizando as características secundárias, que podem ser definidas como características morfofisiológicas, fisiológicas e os componentes de produção (TUBEROSA, 2012). Segundo Tobar-Tosse *et al.* (2015), para obter genótipos superiores, é necessário avaliar um conjunto de características que combinam várias informações contidas nos genótipos a serem avaliados.

Dentre os caracteres secundários mais utilizados e com eficiência na seleção dos genótipos para a tolerância ao déficit hídrico, estão: prolificidade, intervalo entre o florescimento masculino e feminino, *stay green*, altura de plantas, altura da primeira espiga,

número de grãos por espiga, peso da espiga, tamanho ou comprimento da espiga, enrolamento foliar, dentre outros (LUCHE, 2015; ZHAO *et al.*, 2018; BERNINI *et al.*, 2020). Todos esses caracteres, de maneira contrária à produtividade, têm alta herdabilidade sob estresse e também alta correlação genética com a produtividade (BOLAÑOS; EDMEADES, 1997).

O déficit hídrico quando ocorre durante o período de florescimento afeta o desenvolvimento da planta e aumenta o intervalo entre o florescimento feminino e masculino (IFMF), que é um aspecto crítico para o desenvolvimento de grãos e sementes, pois afeta o sincronismo do florescimento masculino e feminino. Neste caso o desenvolvimento da espigueta é retardado, o que leva à não coincidência com o período de antese, que nessas condições, tem o processo de senescência acelerado. Isso resulta em falhas no processo de fertilização, e como consequência, grande número de espigas sem grãos ou com poucos grãos o que reduz a produtividade da cultura (BAZINGER *et al.*, 2000, DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2016). Assim, genótipos com menor intervalo entre o florescimento masculino e feminino devem ser selecionados em condição de déficit hídrico para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico em programas de melhoramento. Dessa maneira, na maioria dos casos, a ocorrência ou indução do estresse nesse estágio gera resultados promissores para seleção de plantas com tolerância ao déficit hídrico.

Além de causar falta de sincronismo entre os florescimentos masculino e feminino, o déficit hídrico pode levar ao aborto do óvulo, e esterilidade do pólen em algumas espécies de cereais como arroz e milho (FISCHER *et al.*, 2011, ARAUS; SÁNCHEZ; EDMEADES, 2012). Portanto, de maneira semelhante ao IFMF, o número de espigas por planta também é afetado pelo déficit hídrico, pois contribui para o aborto das espiguetas, e redução do número de espigas por planta.

Ribaut *et al.* (2009) e Edmeades (2000), classificaram o número de espigas e o IFMF como caracteres úteis para a seleção para a tolerância ao déficit hídrico, com alta herdabilidade e valores de correlação com a produtividade de grãos.

Outro caráter importante para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico e de fácil visualização é o *stay green* ou senescência retardada das folhas (KONDWAKWENDA *et al.*, 2021). Esta característica se refere ao atraso da morte das folhas, mantendo-as com maior área verde, principalmente nos estádios mais avançados, como o enchimento de grãos, e deve ser avaliado visualmente após o florescimento, no período de enchimento de grãos.

O *stay green* é considerado importante característica para promover a tolerância ao déficit hídrico e garantir a produtividade de grãos, além disso, é um dos principais responsáveis por aumentar o peso médio dos grãos (PEIGAO *et al.*, 2006; LUCHE *et al.*, 2015). É uma

importante adaptação ao ambiente e está associada com o aumento de produtividade nessas condições, pois permite o enchimento e a mobilização de reserva para os grãos, devido à manutenção da eficiência fotossintética (DARYANTO *et al.*, 2016). A capacidade de manter as folhas e os caules verdes nos estádios mais avançados da cultura, é um mecanismo de resistência e está relacionada com a maior capacidade de tolerar estresses, devido a proteção das estruturas fotossintéticas e maior capacidade de combater espécies reativas de oxigênio devido à presença de enzimas antioxidantes, fazendo com que as plantas sejam capazes de se recuperarem após enfrentarem período de déficit hídrico (TIAN *et al.*, 2012; KANTE, 2016).

Assim, devido à alta herdabilidade e variância genética para o intervalo entre florescimento masculino e feminino, e para o *stay green* sob condições de déficit hídrico, a utilização desses caracteres secundários em ambientes sujeitos ao déficit hídrico visando a seleção de genótipos tolerantes é importante. Vale ressaltar ainda, que as correlações destes caracteres com a produtividade média de grãos são altas (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

A habilidade da planta reagir às condições de estresse, como o déficit hídrico, envolve modificações morfológicas em diversos tecidos da planta. Assim, a avaliação das modificações morfoanatômicas das plantas, como altura de plantas, altura de inserção da espiga e diâmetro do colmo, sob condições de déficit hídrico, também contribuem para o entendimento dos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico.

Períodos de déficit hídrico nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta de milho, período vegetativo, levam a redução do crescimento da planta como consequência da menor área foliar da planta. Em condições de déficit hídrico tem sido observado menores alturas médias das plantas de milho, retardo do crescimento e também menor acúmulo de fotoassimilados (MELO *et al.*, 2018).

Além disso, a altura de plantas pode ser alterada tanto pela densidade de plantas como pelo déficit hídrico. Um maior número de plantas por hectare proporciona maior crescimento de plantas em altura, o que leva também ao aumento da altura de inserção da espiga. Isso ocorre porque o adensamento estimula a dominância apical, favorecendo o crescimento vertical (ALMEIDA *et al.*, 2000; PENARIOL *et al.*, 2003; CALONEGO *et al.*, 2011). Ressalta-se ainda, que plantas mais altas tendem a ter menores valores de diâmetros do colmo, maior suscetibilidade ao acamamento, menor produtividade dos grãos, além de prejudicar a colheita (CORRÊA, 2018).

Conforme já descrito, muitas são as características secundárias que podem ser utilizadas nos programas de melhoramento genético para a seleção de genótipos para a tolerância ao déficit hídrico. No entanto, segundo Blum (2011), duas considerações devem ser observadas

no momento da instalação dos campos experimentais, para melhorar a eficiência da seleção para produtividade sob déficit hídrico ou ainda compensar a baixa herdabilidade da produção sob estresse: o campo experimental deve apresentar homogeneidade das condições edafoclimáticas para a redução do erro experimental e; deve-se utilizar populações que contenham variabilidade genética para produtividade de grãos, tolerância ao déficit hídrico e ideotipo de plantas que contenham caracteres secundários.

Nos programas de melhoramento genético, para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, existe preocupação em relação a instalação e condução dos experimentos, uma vez que as condições climáticas de chuva e umidade são incertas e incontroláveis (ZAFAR *et al.*, 2017). No entanto, algumas estratégias podem ser utilizadas para se obter sucesso na seleção de genótipos tolerantes em condições de campo não controladas, como a utilização de altas densidades populacionais e a realização da semeadura na segunda safra, ou safrinha, período coincidente com baixos índices pluviométricos durante o desenvolvimento das plantas. Além disso, a realização de mais de uma safra agrícola se faz necessária para maior eficiência na seleção, devido à interação genótipo *versus* ambiente.

Em algumas pesquisas tem sido demonstrado a viabilidade do melhoramento para tolerância ao déficit hídrico em condições favoráveis de umidade, quando se utiliza altas densidades populacionais de plantas (BECK *et al.*, 1996; SANGOI; SALVADOR, 1996; MONNEVEUX; RIBAUT, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014; ABREU *et al.*, 2017; VILELA, 2019).

Neste contexto, pesquisas visando a identificação de características que sejam associadas à tolerância ao déficit hídrico na cultura do milho são importantes para aumentar a eficiência de seleção. Assim, diante do exposto, o objetivo no presente trabalho foi avaliar as características agronômicas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho com variabilidade genética para esta característica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de campo foram desenvolvidos em duas áreas experimentais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em duas safras agrícolas (2019 e 2020). Em 2019 foi instalado na área experimental situada no município de Lavras – MG, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80 m. Já em 2020, o experimento foi instalado no Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia- CDTT/DAG/UFLA da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Ijaci/MG, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°09'S, longitude 44°54'W e altitude de 920 m. Todas as avaliações foram realizadas no Laboratório Central de Sementes, localizado no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da ESAL/UFLA.

2.2 Seleção dos genótipos

A seleção das linhagens utilizadas na pesquisa foi realizada de acordo com os resultados obtidos por Abreu *et al.* (2018), a qual foi baseada em dados de germinação e crescimento de plântulas sob condições de restrição hídrica. Assim, foram selecionadas cinco linhagens contrastantes em relação à tolerância ao déficit hídrico, sendo três linhagens tolerantes (T), L91-T, L63-T e L32-T, e duas linhagens não tolerantes (NT), L57-NT e L24-NT.

2.3 Instalação dos campos experimentais

Após a seleção das linhagens, os experimentos foram instalados na segunda safra dos anos de 2019 e 2020.

Em ambos os anos, o solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química destes. Anteriormente à semeadura, as sementes foram tratadas com fungicida Vitavax/Thiram[®] 200SC na dosagem de 250ml.100Kg⁻¹ de sementes.

Na segunda safra de 2019, o experimento foi instalado utilizando-se as linhagens L91-T, L63-T (tolerantes) e as linhagens L57-NT e L24-NT (não tolerantes). A semeadura foi realizada em 08/02/19, quando foram utilizadas as densidades de plantas de 60 e 120 mil plantas ha⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições,

no esquema de parcelas subdividas no espaço, sendo as diferentes densidades de plantas dispostas na parcela. Cada parcela foi composta por 4 linhas com 16 metros, no espaçamento de 0,6 m entre linhas. Nas subparcelas, compostas por 4 linhas com 4 metros de comprimento cada, foram dispostas as linhagens. Foi considerada como parcela útil, as duas linhas de semeadura centrais de cada subparcela. A semeadura foi realizada de forma manual e após 30 dias foi realizado desbaste para o ajuste da população de plantas desejada (60 e 120 mil plantas ha^{-1}).

No segundo experimento, implantado na segunda safra de 2020, foram utilizadas as linhagens L91-T, L32-T (tolerantes) e as linhagens L57-NT e L24-NT (não tolerantes). A semeadura foi realizada em 20/03/20, também foram utilizadas duas densidades de plantas, 60 e 120 mil plantas ha^{-1} . O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com seis repetições, no esquema de parcelas subdividas no espaço, sendo as diferentes densidades de plantas dispostas na parcela. Cada parcela foi composta por 6 linhas com 16 metros, no espaçamento de 0,6 m entre linhas. Nas subparcelas, compostas por 2 linhas com 4 metros de comprimento cada, foram dispostas as linhagens. Foi considerada como parcela útil, as duas linhas centrais de semeadura de cada subparcela. A semeadura foi realizada de forma manual e após 30 dias foi realizado desbaste para o ajuste da população de plantas desejada.

A adubação de cobertura, assim como os demais tratos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura.

A colheita dos grãos, em ambas, foi realizada em espigas. As espigas foram colhidas e despalhadas manualmente, quando os grãos atingiram teor de água de 20%. A secagem das espigas foi realizada em secadores experimentais de pequena escala, descrito por Navratil e Burris (1982).

2.4 Avaliação de caracteres indiretos relacionados à tolerância ao déficit hídrico

Foram avaliadas 10 plantas na safra de 2019 e 5 plantas na safra de 2020 de cada subparcela. Nas duas safras, 2019 e 2020, foram avaliados os seguintes caracteres:

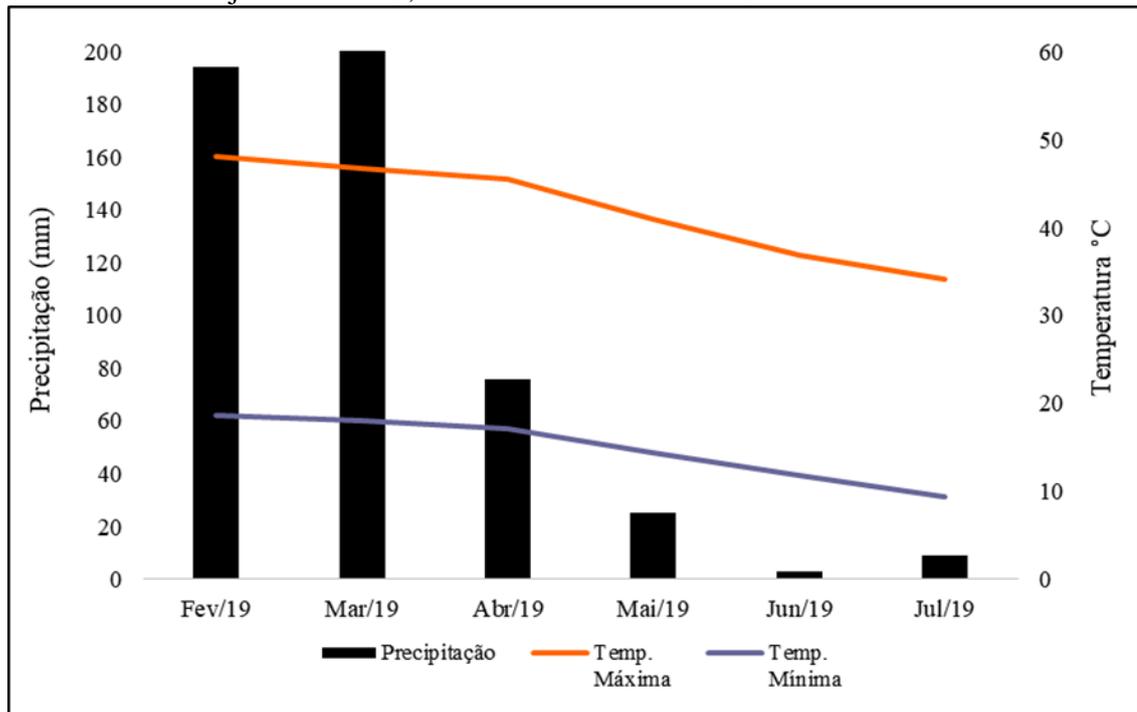
- a) Florescimento masculino e feminino: foi determinado pelo número de dias ocorrido da semeadura até que 50% das plantas de cada parcela apresentassem antese e estilo-estigmas visíveis. O florescimento masculino foi definido quando houve liberação do pólen, e o florescimento feminino quando os estilo-estigmas atingiram pelo menos 1 cm de comprimento;

- b) Intervalo entre os florescimentos feminino e masculino em dias (IFMF): o IFMF foi determinado considerando o período, em dias, entre a semeadura e os florescimentos feminino e masculino. Apenas nos dados da safra de 2019, para eliminar os valores negativos, que dificultariam a análise de variância, foi adicionado a todos os valores de IFMF, uma constante de valor 100;
- c) Prolificidade: ao final da fase de florescimento feminino foi avaliado o número de espigas por planta escolhidas aleatoriamente;
- d) Altura de plantas: ao final da fase de florescimento feminino foram medidas, em plantas escolhidas aleatoriamente, e com auxílio de régua graduada, a altura do nível do solo até a última folha completamente expandida (cm);
- e) Altura da inserção da primeira espiga: ao final da fase de florescimento foram avaliadas plantas escolhidas aleatoriamente, e com auxílio de régua graduada foi medida a altura do solo até o nó de inserção da primeira espiga (cm);
- f) kg/subparcela: foi obtido por meio do peso de grãos obtido em plantas da área útil de cada subparcela, expresso em kg;
- g) Comprimento da espiga: após a colheita e despalha, com auxílio de régua graduada foi medido o comprimento da espiga despalhada (cm);
- h) Número de grãos por espiga: após a debulha, foram contados o número de grãos por espigas selecionadas de modo aleatório;
- i) Diâmetro do colmo: ao final da fase de florescimento foram avaliados, em plantas escolhidas aleatoriamente, e com auxílio de régua graduada os diâmetros do colmo no primeiro internódio acima do nível do solo (cm);
- j) Peso da espiga: foi obtido por meio do peso das espigas em cada subparcela, expresso em gramas, foi avaliado apenas na safra de 2020;
- k) *Stay Green*: foi avaliado a partir da maturidade fisiológica dos grãos, aos 125 dias após a semeadura, por uma escala de notas de 1 a 5, conforme metodologia sugerida por Costa *et al.* (2008): nota 1 para plantas com todas as folhas verdes acima da espiga e pelo menos duas folhas verdes abaixo da espiga; nota 2 para plantas em que todas as folhas acima da espiga estiverem verdes; nota 3 para plantas com duas folhas acima da espiga estiverem secas e as demais verdes; nota 4 quando duas folhas no ápice da planta estiverem verdes e; nota 5 para plantas com todas as folhas secas. As notas foram atribuídas a todas as plantas da parcela, de 7 em 7 dias, até atingirem a nota máxima. Para análise dos dados, foi utilizada a média das notas corrigidas pela data do

florescimento feminino de cada linhagem. Avaliação realizada apenas na safra 2020/2021.

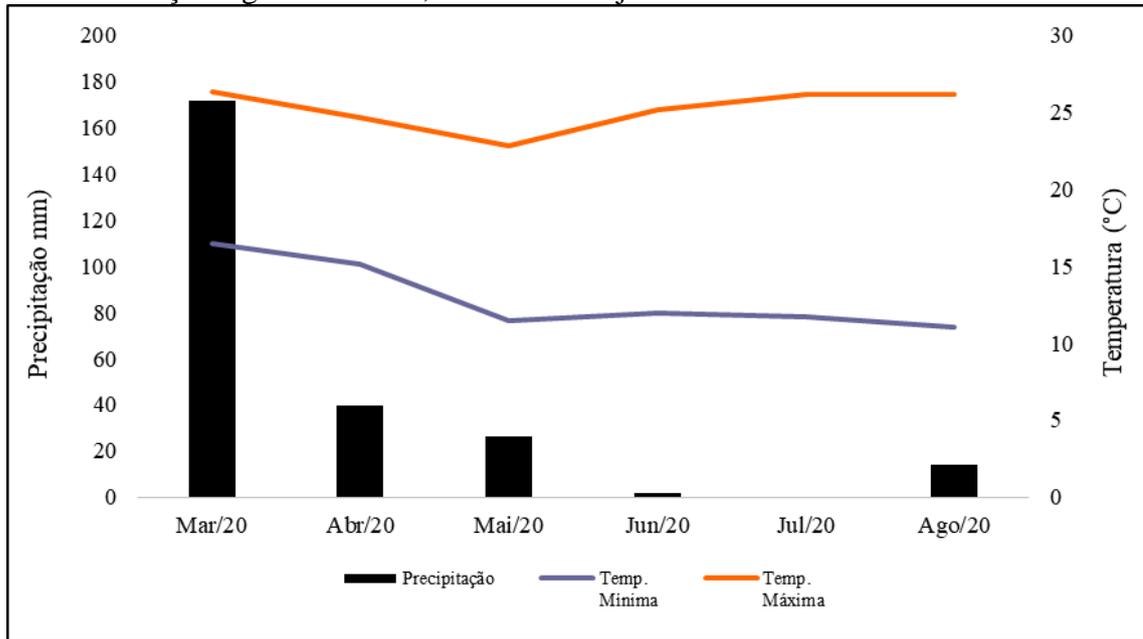
2.5 Dados climáticos durante a condução dos experimentos

Figura 1 - Valores de precipitação (mm) e temperaturas mínima e máxima (°C) no período de fevereiro a julho de 2019, na cidade de Lavras- MG.



Fonte: INMET (2019).

Figura 2 - Valores de precipitação (mm) e temperaturas mínima e máxima (°C) no período de março a agosto de 2020, na cidade de Ijaci – MG.



Fonte: INMET (2020).

2.6 Análises estatísticas

As análises dos resultados dos caracteres indiretos foram feitas utilizando-se o modelo de parcelas subdivididas no espaço, e a comparação das médias foi feita pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no *software R* usando o pacote ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014).

3 RESULTADOS

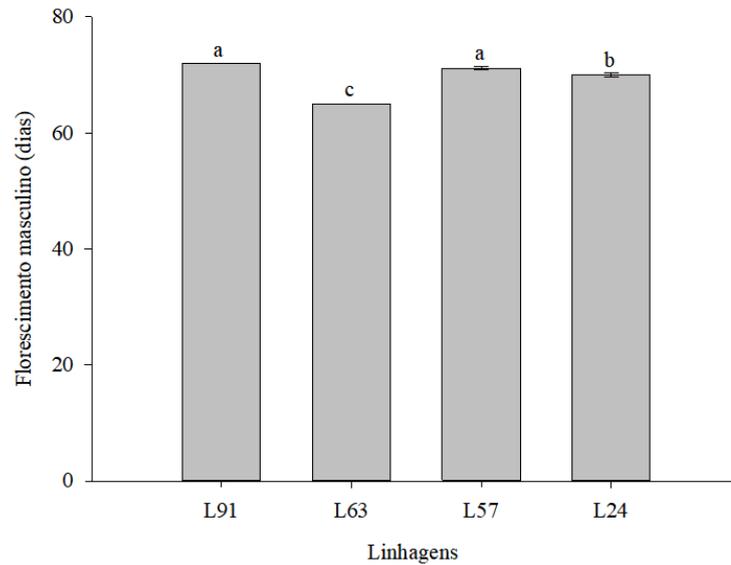
Inicialmente, serão apresentados os dados das características agronômicas avaliadas na segunda safra de 2019. Em seguida, serão apresentados os dados referentes à segunda safra realizada em 2020, e no final, serão discutidos os resultados obtidos nas duas safras e os possíveis efeitos do ambiente e das condições climáticas nas características agronômicas das linhagens avaliadas.

Os dados de temperatura média e precipitação, durante a condução do experimento em campo, foram apresentados na Figura 1. Por meio da análise dos dados, na segunda safra de 2019, observa-se que a precipitação após a semeadura foi alta, nos meses de fevereiro e março, contribuindo para um bom desenvolvimento inicial das plantas. No período de florescimento, no mês de abril, houve chuvas constantes e bem distribuídas, o que influenciou positivamente no desenvolvimento do sistema reprodutivo das plantas, uma vez que é uma das fases de maior demanda de água. Na fase de enchimento de grãos as plantas foram expostas por período de veranico, o que pode ter influenciado a produção de grãos. A temperatura média ao longo do ciclo da cultura foi de 21 °C e a precipitação total foi de 529 mm.

Em relação aos dados das características agronômicas avaliadas na segunda safra de 2019, foram observadas diferenças significativas para a variável linhagem em todas as características avaliadas. Para as diferentes densidades populacionais de plantas, observou-se diferenças significativas para altura de plantas, altura de inserção da primeira espiga, diâmetro do colmo, peso dos grãos por subparcela. Houve interação significativa entre as linhagens e as densidades populacionais para as características: intervalo de florescimento feminino e masculino, florescimento feminino. Para as características prolificidade e número de grãos por espiga não houve diferença significativa.

Houve diferenças significativas entre as diferentes linhagens para florescimento masculino e interação linhagem *versus* densidade populacional para o florescimento feminino (FF), e ainda para o intervalo de florescimento masculino e feminino (IFMF). Para o florescimento masculino, foi observado maior período para antese nas linhagens 91 e 57 (FIGURA 3).

Figura 3 - Resultados médios do florescimento masculino (dias) (FM) em diferentes linhagens, safra de 2019.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: Da autora (2023).

Em relação ao florescimento feminino, não houve diferença significativa em plantas desenvolvidas sob diferentes densidades de plantas para as linhagens 91 e 63 (tolerantes). Já para as linhagens 57 e 24, classificadas como intolerantes, maiores períodos para emissão do estilo estigma foram observados quando se utilizou a maior população de plantas da linhagem 57 e na menor população de plantas da linhagem 24. Menor período para emissão do estilo estigma foi observado na linhagem 63 nas duas densidades populacionais (TABELA 1).

Tabela 1 - Florescimento feminino (FF) (dias), das linhagens nas densidades de 60.000 e 120.000 plantas/ha, safra 2019.

Densidade de Populacional	L91	L63	L57	L24
60.000 pl/ha	73,00Aa	66,5Ab	72Ba	72,75Aa
120.000 pl/ha	73,00Aa	67,0Ac	73,67Aa	70,33Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Para o intervalo entre os florescimentos masculino e feminino (IFMF), não houve diferença significativa em plantas desenvolvidas sob diferentes populações de plantas para as linhagens 91 e 63 (tolerantes). No entanto, para a linhagem 57, maior intervalo foi observado quando se utilizou a maior população de plantas e para a linhagem 24 quando foi utilizada a

menor população nas plantas. Maior intervalo entre os florescimentos masculino e feminino foi observado na linhagem 24 quando se utilizou a densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹ e menor intervalo na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹ (TABELA 2).

Tabela 2 - Médias do Intervalo entre o Florescimento masculino e feminino (IFMF) das linhagens nas densidades de 60.000 e 120.000 plantas/há, safra 2019.

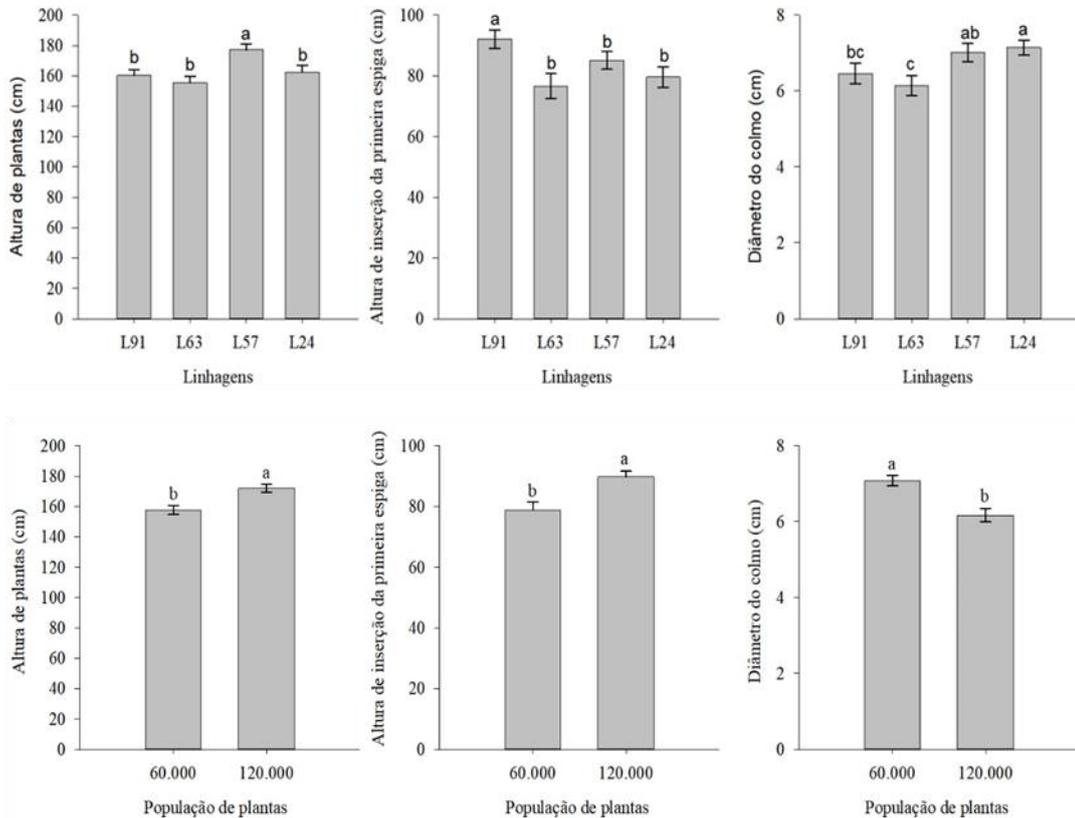
Densidade	L91	L63	L57	L24
Populacional				
60.000 pl/ha	1,00Ab	1,50 Ab	1,00Bb	3,00Aa
120.000 pl/ha	1,00Aab	2,00Aa	2,33Aa	0,00Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Em relação aos dados de altura de plantas (APL), altura de inserção da primeira espiga (AIE) e diâmetro do colmo (DC), houve diferença significativa quando foram utilizadas diferentes populações de plantas e também entre as diferentes linhagens. Para as avaliações de alturas, APL e AIE, maiores valores foram observados quando se utilizou a maior densidade populacional. O contrário foi observado para a característica diâmetro do colmo, na qual foram observados os maiores valores quando se utilizou a menor população de plantas. Para a característica altura de plantas, maior altura foi observada na linhagem 57, classificada como não tolerante ao déficit hídrico. Maior altura de inserção da primeira espiga foi observada na linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico. Em relação ao diâmetro do colmo, maior diâmetro foi observado na linhagem 24 e menor na linhagem 63 (FIGURA 4).

Figura 4 - Resultados médios de altura de plantas em cm (API), altura de inserção da primeira espiga em cm (AIE), diâmetro do colmo em cm (DC), em diferentes linhagens e em diferentes densidades de plantas, safra de 2019.

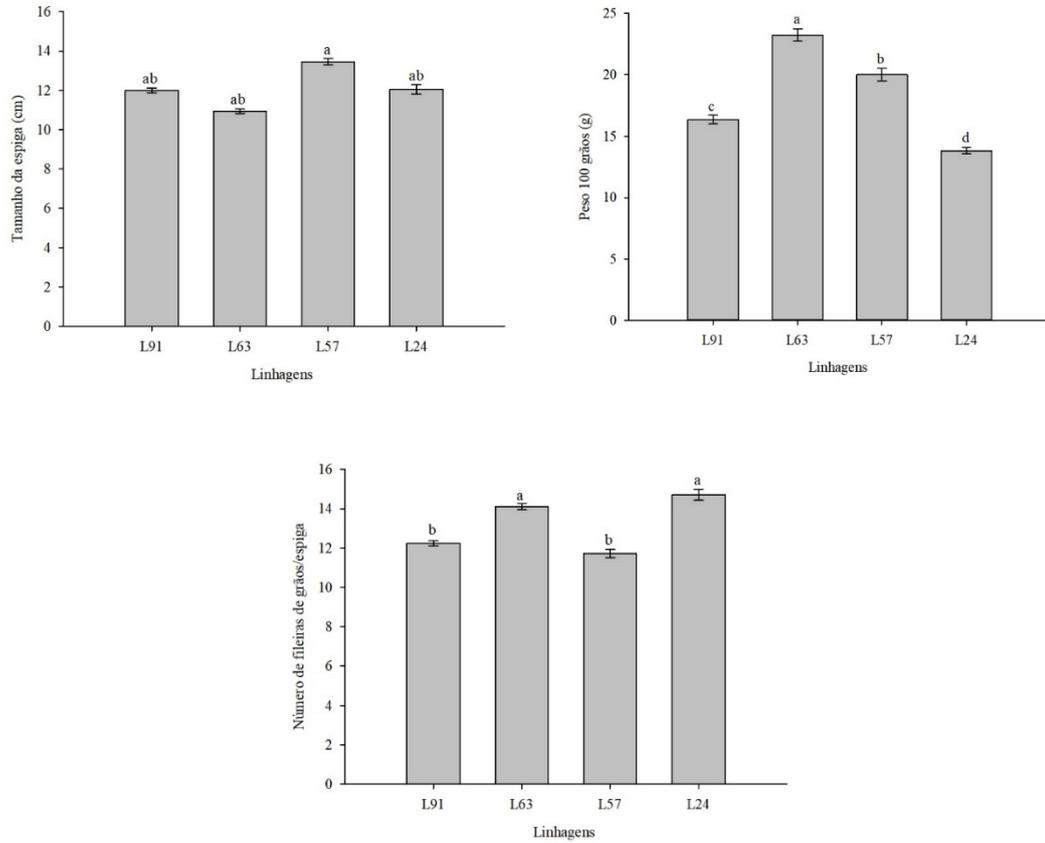


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Para as características número de fileiras de grãos por espiga (NF) e peso de 100 grãos (P100), peso dos grãos por subparcela (Kg/P) e comprimento da espiga (CE) houve diferenças significativas entre as diferentes linhagens. Maior número de fileiras foi observado nas espigas das linhagens 63 e 24 (FIGURA 5). Maior peso de 100 grãos foi observado para as linhagens 63, 57, 91 e 24, nessa ordem (FIGURA 5). No que se refere ao comprimento da espiga, maior valor foi verificado nas espigas da linhagem 57 (FIGURA 5). Para o peso dos grãos por subparcela (KG/P), observa-se a superioridade das linhagens classificadas como tolerantes ao déficit hídrico, 91 e 63 (FIGURA 6).

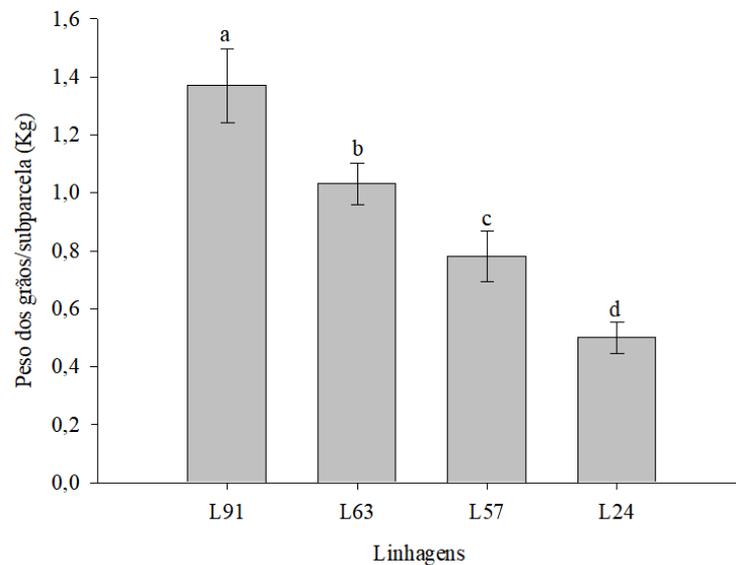
Figura 5 - Resultados médios de comprimento (tamanho) da Espiga em cm (CE), peso de 100 grãos em g (P100) e número de fileiras por espiga (NF) em diferentes linhagens, safra de 2019.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Figura 6 - Resultados médios do Peso dos grãos por subparcela (Kg) (Kg/subparcela) em diferentes linhagens, safra de 2019.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

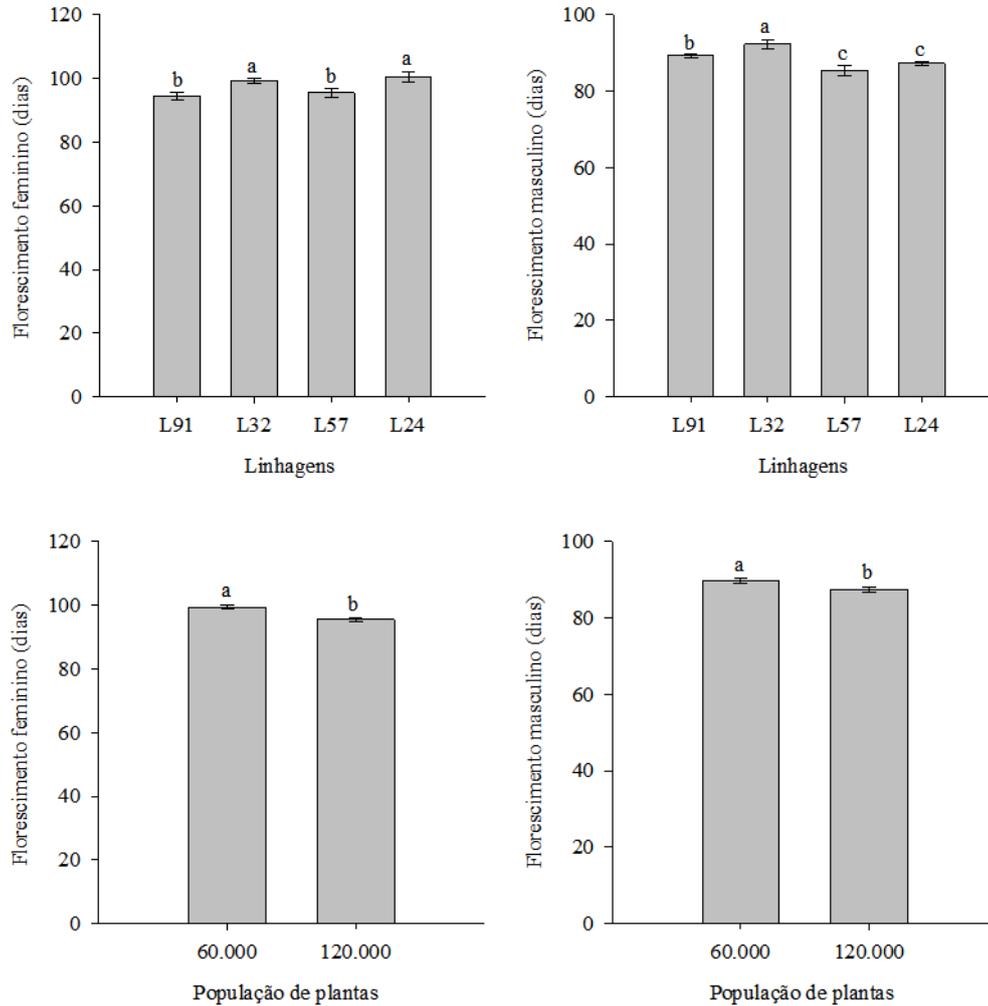
Fonte: Da autora (2023).

Os dados de temperatura média e precipitação durante a condução do experimento em campo, na segunda safra de 2020, estão apresentados na Figura 2. Observa-se que a precipitação no mês da semeadura, mês de março, foi considerável e importante para o bom desenvolvimento inicial das plantas. Nos meses seguintes, a precipitação foi considerada baixa nos meses de abril e maio, e nos meses de junho, julho e agosto foi considerada incipiente para o desenvolvimento da cultura. O período de veranico foi coincidente com o florescimento das plantas, meses de junho e julho, com o volume de chuva baixo, o que influenciou negativamente o desenvolvimento do sistema reprodutivo das plantas, uma vez que é uma das fases de maior demanda de água. O mesmo ocorreu na fase de enchimento de grãos, uma vez que as plantas foram expostas ao déficit hídrico, o que influenciou na produção de grãos. A temperatura média ao longo do ciclo da cultura foi de 20 °C e a precipitação total foi de 253 mm.

Na segunda safra de 2020, também foram observadas diferenças significativas entre as linhagens em todas as características avaliadas. Para a variável densidade populacional de plantas, houve diferenças significativas para florescimento feminino, florescimento masculino, altura de plantas, altura de inserção da primeira espiga, peso da espiga, peso dos grãos por subparcela, número de grãos por espiga. Houve interação significativa entre as linhagens e as densidades populacionais para as características: intervalo de florescimento feminino e masculino, altura de plantas.

Para o florescimento feminino, maior período para emissão do estilo estigma foi observado nas linhagens 32 e 24 e menor período nas linhagens 91 e 57. Já para o florescimento masculino, o maior período para a antese foi observado na linhagem 32, seguido da linhagem 91, 57 e 24. Tanto para o florescimento masculino quanto para o feminino, maior período para a antese e emissão dos estilo-estigmas, foi observado na menor densidade populacional, de 60 mil plantas.ha⁻¹.

Figura 7 - Resultados médios de florescimento feminino (dias) (FF) e florescimento masculino (dias) (FM) em diferentes linhagens, safra 2020.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Em relação ao intervalo entre o florescimento masculino e feminino (IFMF) (TABELA 3), houve interação significativa entre linhagens e densidades populacionais. Houve diferença significativa para o IFMF em plantas desenvolvidas sob diferentes densidades de plantas apenas para a linhagem 24, na qual, maior IFMF foi observado quando se utilizou a menor população de plantas. Foram observados maiores intervalos de florescimento masculino e feminino em plantas de linhagens classificadas como intolerantes (L57 e L24) e menores intervalos em linhagens classificadas como tolerantes (L91 e L32), quando cultivadas em uma população de 60 mil plantas ha^{-1} . Por sua vez, na população de 120 mil plantas ha^{-1} menor intervalo entre o florescimento masculino e feminino foi observado na linhagem 91, evidenciando maior sincronismo entre os florescimentos nessa linhagem que é classificada como tolerante ao déficit hídrico.

Tabela 3 - Médias do Intervalo entre o florescimento masculino e feminino em dias (IFMF) das linhagens nas densidades de 60.000 e 120.000 plantas/ha, safra 2020.

Densidade de Populacional	L91	L32	L57	L24
60.000 pl/ha	6,5Ab	5,83Ab	11,5Aa	15,33Aa
120.000 pl/ha	4,5Ab	8,17Aab	8,5Aab	11,33Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Houve diferença significativa para APL (TABELA 4) em plantas desenvolvidas sob diferentes densidades de plantas em todas as linhagens, sendo que a maior altura de plantas foi observada quando se utilizou a maior densidade populacional, em todas as linhagens avaliadas. Nas duas densidades populacionais, maior altura de plantas foi observada nas linhagens classificadas como intolerantes (L57 e L24).

Tabela 4 - Médias da Altura de Plantas em cm (APL) das linhagens nas densidades de 60.000 e 120.000 plantas/ha, safra 2020.

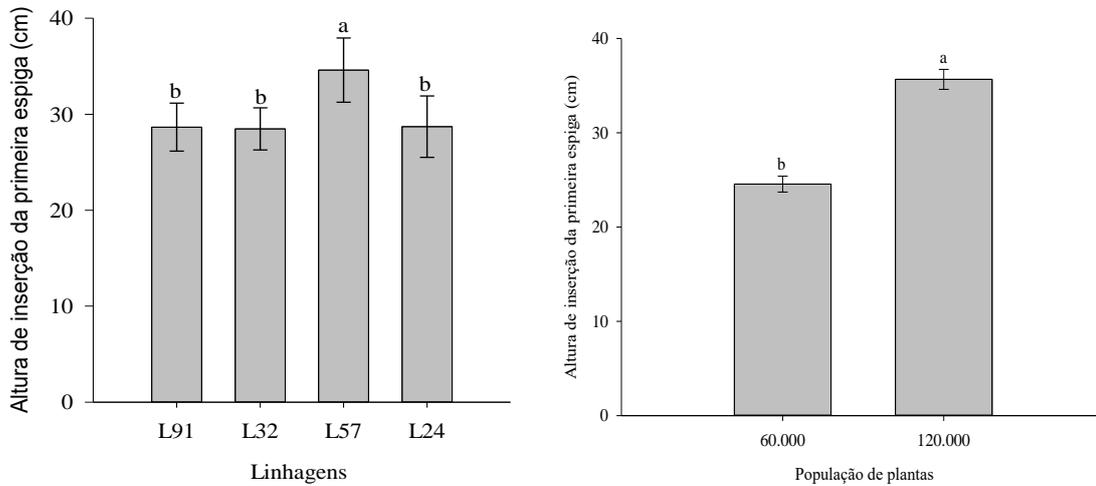
Densidade Populacional	L91	L32	L57	L24
60.000 pl/ha	50,23Bb	48,77Bb	64,45Ba	58,3Bab
120.000 pl/ha	59,41Ab	65,65Ab	87,23Aa	85,77Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

Para a característica altura de inserção da primeira espiga (AIE) (FIGURA 8), houve diferença significativas quando foram utilizadas diferentes densidades de plantas e também entre as diferentes linhagens. De maneira semelhante à APL, maior altura de inserção da primeira espiga foi observada quando se utilizou a maior densidade populacional, 120 mil plantas.ha⁻¹. Sendo que a maior altura de plantas foi observada na linhagem 57, classificada como intolerante ao déficit hídrico.

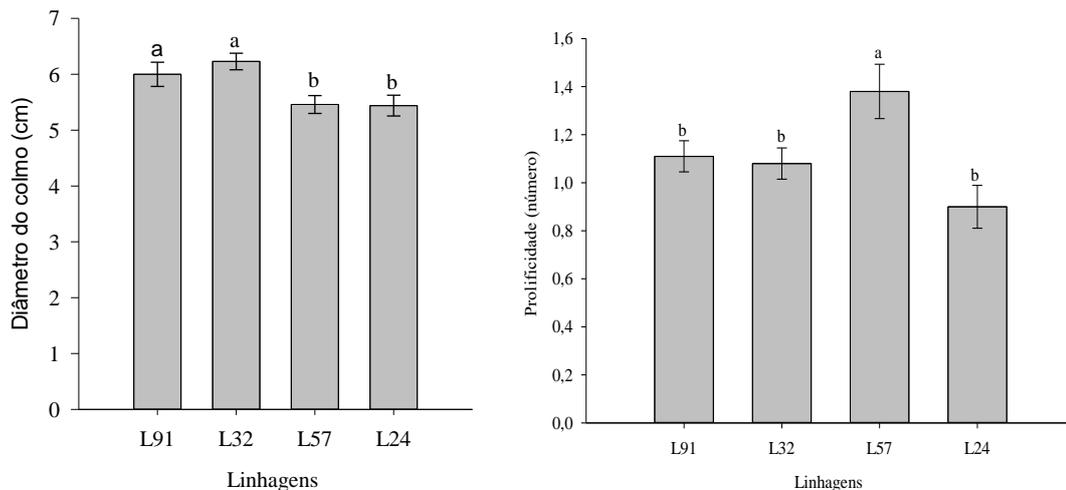
Figura 8 - Resultado médio para a característica Altura de inserção da primeira espiga em cm (AIE), observadas em diferentes linhagens e densidades de plantas, safra 2020.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: Da autora (2023).

Para as características diâmetro do colmo (DC) e prolificidade (PROL) (FIGURA 9), observou-se diferenças significativas entre as linhagens. Maiores valores de DC foram observados em plantas das linhagens classificadas como tolerantes ao déficit hídrico, 91 e 32. Já um maior número de espigas por planta, prolificidade, foi observado em plantas da linhagem 57, classificada como não tolerante ao déficit hídrico.

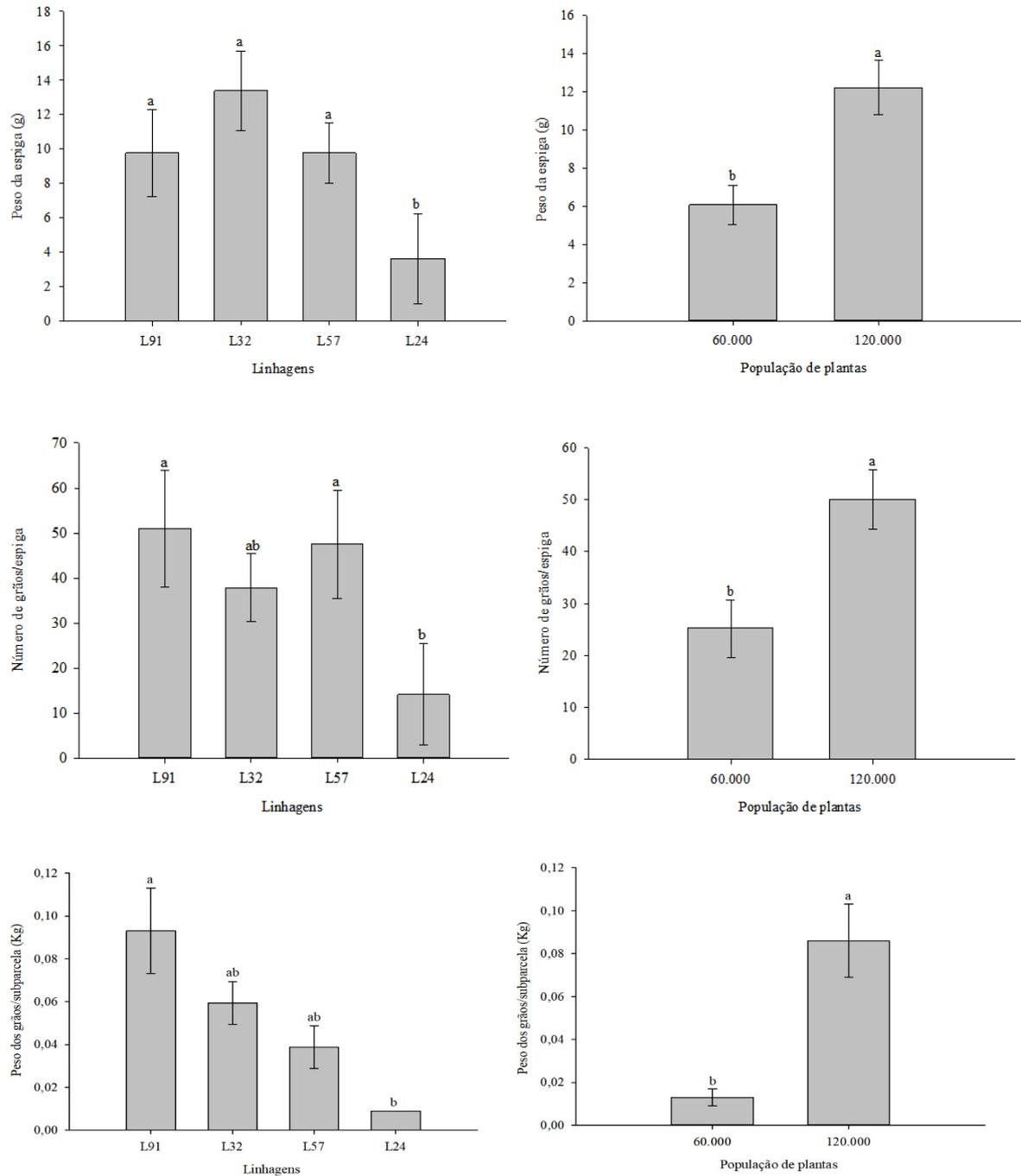
Figura 9 - Resultado médio para as características Diâmetro do colmo em cm (DC) e Prolificidade (PROL), em diferentes linhagens e densidades de plantas, safra 2020.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: Da autora (2023).

Para as características, PE, NGE E KG/P, maiores valores foram observados quando se utilizou a maior população de plantas (FIGURA 10). Em relação ao peso da espiga, menor peso foi na linhagem 24, classificada como intolerante ao déficit hídrico, sendo que nesta mesma linhagem também foi observado menor número de grãos por espiga e menor produção de grãos por subparcela. Ressalta-se que a maior produção de grãos por subparcela foi observada na linhagem 91, classificada tolerante ao déficit hídrico. Nesta linhagem também foram observados valores superiores de peso da espiga e número de grãos por espiga quando comparado à linhagem 24, classificada como não tolerante ao déficit hídrico.

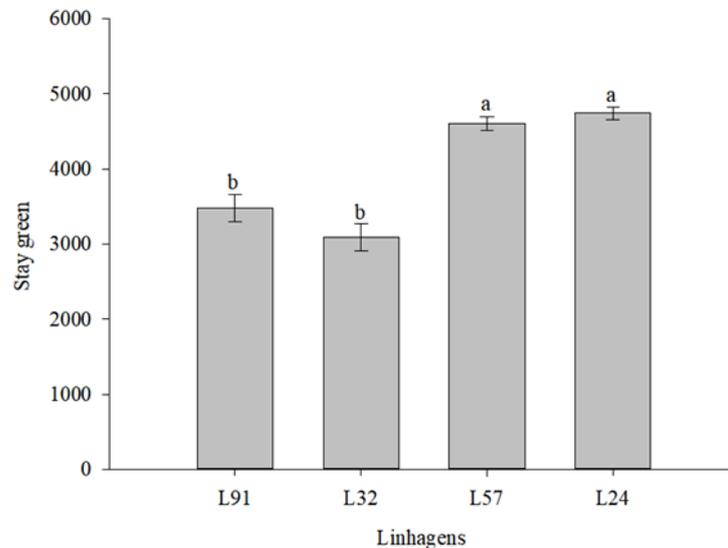
Figura 10 - Resultado médio para as características peso da espiga em gramas (PE) e número de grãos por espiga (NGE) e peso dos grãos por subparcela em kg (KG/P) em diferentes linhagens e densidades de plantas, safra 2020.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: Da autora (2023).

Com relação à característica *Stay Green* (FIGURA 11), ou senescência retardada das folhas, foi possível observar que as linhagens classificadas como tolerantes ao déficit hídrico, 91 e 32 mantiveram maior área verde em suas folhas por mais tempo fator importante para garantir a produtividade de grãos.

Figura 11 - Resultado médio para o caractere *Stay Green* (*S. Green*) em diferentes linhagens, safra 2020.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2023).

4 DISCUSSÃO

Ao comparar os valores de precipitação durante o ciclo da cultura na safra 2019 e safra 2020, observou-se que em 2020 a flutuação da precipitação foi maior (FIGURAS 1 e 2). Nesse ano, ocorreu um curto período com alta precipitação no início do ciclo da cultura, seguido de períodos longos com precipitação mínima ou sem precipitação. Esse fato influenciou consideravelmente os resultados das características agrônômicas e, conseqüentemente, na produção de grãos.

Ao analisar os resultados referentes aos florescimentos masculino e feminino, foi observado que na safra de 2019, maior número de dias para o florescimento feminino foi observado em plantas das linhagens 57 e 24, na maior população de plantas 120 mil plantas por ha⁻¹. Essa população foi utilizada para simular a deficiência hídrica, conforme proposto por Abreu *et al.* (2017) e Pereira *et al.* (2014). Nestas linhagens classificadas como não tolerantes, e nesta população de plantas, houve retardamento da emissão do estilo estigma. Na safra de 2020 nas linhagens 32 e 24, maior número de dias para emissão do estilo estigma foi observado quando cultivadas na menor população de plantas 60 mil plantas por ha⁻¹. No que se refere ao florescimento masculino, maior número de dias para antese foi observado em plantas das linhagens 91 e 57, na safra de 2019 e na linhagem 32 na safrinha de 2020. O período de florescimento está relacionado com o ciclo dos materiais genéticos que podem ser

superprecoces, precoces e normais. Dentre as linhagens avaliadas, as linhagens 91 e 32 são classificadas como normais, as linhagens 63 e 57 como precoces, e a linhagem 24 como superprecoce, o que justifica os resultados obtidos para os florescimentos feminino e masculino (ABREU, 2016).

No entanto, embora o período de florescimento esteja ligado ao ciclo da linhagem, o desenvolvimento das plantas de milho é prejudicado quando as plantas passam por períodos de déficit hídrico. Assim, em condições de déficit hídrico, o florescimento feminino pode ser atrasado, causando dessincronismo, e ainda o ciclo da cultura ser alterado, muitas vezes ocorre a redução do ciclo. Além disso, a falta de água pode causar alterações em relação ao sincronismo e entraves na etapa de fertilização dos óvulos (GUIMARÃES; GUIMARÃES; GUIMARÃES, 2018). Nas duas safras, para a linhagem 24 classificada como não tolerante ao déficit hídrico, foi observado maior período para emissão do estilo estigma. Vilela (2019), também observou maior número de dias para emissão do estilo e estigma e para a antese na linhagem 24. Sob condições de deficiência hídrica tem sido observado o retardamento da emissão de estilo-estigma (SAH *et al.*, 2020).

Em relação ao intervalo entre o florescimento masculino e feminino, nas duas safras, 2019 e 2020, maior intervalo foi observado nas linhagens classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico, 24 e 57, evidenciando falta de sincronismo entre os florescimentos uma vez que em condições de déficit hídrico pode ocorrer um atraso na emissão do estilo estigma, o que leva ao dessincronismo. Quanto maior o intervalo entre o florescimento masculino e feminino, maior a probabilidade de os grãos de pólen serem liberados antes da emissão do estilo estigma, o que inviabiliza a fertilização dos óvulos e, conseqüentemente, a formação dos grãos. Maior tempo entre a antese e a emissão do estilo estigma tem sido observado em genótipos não tolerantes ao déficit hídrico (ABREU, 2013, VILELA, 2019; SAH *et al.*, 2020). Sob condições de déficit hídrico, observa-se aumento significativo do intervalo entre o florescimento masculino e feminino (ZHAO *et al.*, 2018) e correlação negativa do IFMF com a produtividade de grãos (SOUSA *et al.*, 2018). O aumento do IFMF, resulta na maior parte dos casos, em plantas estéreis e com poucos grãos na espiga (ARAUS *et al.*, 2012). É desejável menor intervalo entre o florescimento feminino e o masculino em condições de déficit hídrico, o que pode indicar maior adaptação ao estresse, ou seja, genótipos tolerantes que garantem a produtividade de grãos em condições adversas (ZAIDI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2018).

Ressalta-se que, na safra de 2020, na qual a semeadura foi realizada em março, o número de dias para o florescimento feminino aumentou quando comparado ao observado na safra de 2019. Isto pode ser explicado pelo fato de as condições edafoclimáticas nas quais as plantas

foram desenvolvidas na safra de 2020, terem sido diferentes das da safra de 2019. Ressalta-se que, em 2020, a semeadura foi realizada em março e que o desenvolvimento das plantas coincidiu com maior déficit hídrico e menores temperaturas, o que contribuiu para o aumento do ciclo das linhagens.

Nas linhagens classificadas como tolerantes ao déficit hídrico, 91, 63, 32, não se observou diferenças entre os florescimentos masculino, antese, e feminino, emissão do estilos-estigma. O que pode ser explicado pelos mecanismos de resistência, já que em resposta à condição de déficit hídrico, as plantas possuem mecanismos de resistência, que são conhecidos como escape, prevenção e tolerância. Na categoria escape, a planta reduz o ciclo de vida, completando-o antes que o déficit hídrico cause danos fisiológicos. Na prevenção, a planta retarda a desidratação, por meio do fechamento estomático. Já na categoria tolerância, a planta consegue manter seu metabolismo mesmo em condições de baixo potencial hídrico, e ainda consegue recuperar-se após o estresse (BARNABÁS; JÄGER; FEHÉR, 2008).

Ressalta-se que o IFMF pode ser uma boa característica para ser utilizada no melhoramento para tolerância ao déficit hídrico. Santos *et al.* (2020), classificaram o intervalo entre o florescimento masculino e feminino como útil para a seleção precoce em situações de déficit hídrico.

As maiores alturas de plantas (APL) e alturas de inserção da primeira espiga (AIE), nas duas safras, foram observados em plantas desenvolvidas na maior população de plantas, 120 mil plantas ha⁻¹. Maior APL foi observada nas plantas das linhagens 57 e 24, classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico. Maior AIE foi observada nas plantas da linhagem 91, na safrinha de 2019 e na linhagem 57 na safrinha de 2020. Ferreira *et al.* (2015); Vilela (2019), também verificaram aumento na altura de plantas quando essas foram desenvolvidas em altas densidades de plantas.

Ressalta-se que, algumas modificações morfofisiológicas são feitas pelas plantas, o que permite que consigam produzir mesmo em condições de déficit hídrico, dentre elas ressalta-se o menor crescimento das plantas. A característica de porte de planta baixo está entre as características consideradas nos programas de melhoramento de plantas como ideais para um ideótipo de milho tolerante (XOCONOSTLE-CAZARES *et al.*, 2010; RIBAUT *et al.*, 2009). Nesse trabalho, nas duas safras, foi possível observar menor crescimento das plantas das linhagens consideradas tolerantes ao déficit hídrico, linhagens 91, 32 e 63.

Em relação ao diâmetro do colmo, na safra 2019, menor diâmetro dos colmos foi observado em plantas desenvolvidas sob maior densidade de plantas. Já na safra 2020, o maior diâmetro do colmo foi observado em plantas das linhagens 91 e 32, classificadas como

tolerantes ao déficit hídrico. Em condições de seca, Hussain *et al.* (2019), observaram redução significativa do diâmetro do colmo das plantas, o que pode facilitar a quebra do colmo.

A maior população de plantas por hectare, ou seja, maior número de plantas por hectare estimula modificações no desenvolvimento da planta, causando a alongação dos entrenós, a produção de caules mais longos e de menor diâmetro, elevando a dominância apical e altura de inserção de espigas (ALMEIDA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2017). Essas modificações foram observadas na linhagem 57 e 24, classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico. Nessas linhagens foi possível observar maior desenvolvimento em altura e no caso da linhagem 24 um menor diâmetro do colmo. Maior altura de plantas e de inserção da espiga e menor diâmetro do colmo não é desejável devido à maior possibilidade de quebra do colmo. Nesse sentido, as linhagens tolerantes, 91, 63 e 32 possuem vantagem adaptativa a essas condições.

A avaliação das características número de fileiras de grãos por espiga (NF) e peso de 100 grãos foi realizada apenas na safra 2019. Maiores NF e P100 foram observados na linhagem 63, classificada como tolerante ao déficit hídrico. Esses resultados são importantes e explicam a manutenção da alta produção de grãos mesmo em condições de déficit hídrico, característica desejável para genótipos tolerantes a essas condições. Sah *et al.* (2020), observaram redução do número de fileiras por espigas em condições de déficit hídrico em linhagens não tolerantes ao déficit hídrico. O menor número de fileiras por espiga reflete o desenvolvimento das plantas, podendo contribuir para uma menor produção em condição de estresse. Essas avaliações não foram realizadas na safrinha de 2020 devido ao baixo número de grãos presente nas espigas, resultado do não sincronismo do florescimento e também da ausência de chuvas em grande parte do ciclo da cultura nesse ano.

Para a característica de prolificidade (PROL), ou seja, número de espigas por planta, houve resultados significativos na safra de 2020, na qual foi observado maior número de espigas em plantas da linhagem 57. Sah *et al.* (2020) observaram redução do número de espigas por planta tanto em linhagens tolerantes como em linhagens não tolerantes, quando desenvolvidas em condições de déficit hídrico.

Houve variação no comprimento da espiga (CE) somente na safra 2019, na qual maior CE foi observado nas espigas das plantas da linhagem 57. As plantas da linhagem 57 são maiores em altura e, em consequência disso, também apresentaram maior desenvolvimento das espigas em tamanho. Da mesma maneira que na característica prolificidade, Sah *et al.* (2020), observaram redução do comprimento da espiga tanto em linhagens tolerantes como em não tolerantes, quando desenvolvidas em condições de déficit hídrico. Menores tamanhos da espiga

foram observados por Silva *et al.* (2021), quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico na fase de polinização.

Com relação às avaliações de número de grãos por espiga (NGE), os resultados só foram significativos na safra 2020, na qual maior número de grãos por espiga foi observado quando as plantas foram desenvolvidas na maior população de plantas, 120 mil plantas ha⁻¹. Menores valores de NGE foram observados em espigas da linhagem 24, classificadas como não tolerantes ao déficit hídrico. Silva *et al.* (2021), observaram variações do número de grãos por espiga quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico nas fases de pendoamento e floração, o que interfere na formação das espigas.

A característica peso da espiga (PE) só foi avaliada na safra 2020. Foram observados maiores pesos da espiga quando estas foram desenvolvidas na maior densidade de plantas, 120 mil plantas.ha⁻¹. O menor peso da espiga foi observado na linhagem 24, classificada como não tolerante, e o maior peso foi observado na linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico. Esse resultado, juntamente com o número de grãos por espiga explica a menor produção de grãos da linhagem 24. Zhao *et al.* (2018), observaram que, sob condições de estresse hídrico, houve redução significativa do peso das espigas.

As características número de grãos por espiga e peso da espiga têm correlação positiva com a produtividade de grãos, que é muito importante para a seleção de genótipos tolerantes. No entanto, a produtividade de grãos é menos instável e tem menor herdabilidade que essas características. Sendo assim, o NGE e o PE influenciam na seleção de genótipos tolerantes e devem ser utilizados em conjunto com outras características na seleção, pois são mais estáveis que a produtividade de grãos e podem melhorar a resposta de seleção de genótipos de milho em condições de déficit hídrico (SOUSA *et al.*, 2018).

Com relação ao peso dos grãos por subparcela (KG/SP), maior produção de grãos foi observada nas linhagens tolerantes nos dois anos agrícolas avaliados. Na safrinha de 2019, maior produção foi observada nas linhagens 91 e 63, classificadas como tolerantes. E na safrinha de 2020 maior produção de grãos foi observada quando se utilizou a maior densidade de plantas. Ao comparar as linhagens, maior produção de grãos foi observada na linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico e menor produção foi observada na linhagem 24, classificada como não tolerante. Neste trabalho e também no de Abreu (2013), avaliando linhagens quanto a tolerância ao déficit hídrico, também se observou que a linhagem 91 foi tolerante ao déficit hídrico e apresentou maior produtividade.

Foi observado na linhagem 24, menores valores de número de grãos por espiga e também peso da espiga, além de maior intervalo entre o florescimento masculino e feminino, o

que refletiu diretamente na menor produtividade dessa linhagem, uma vez que há correlação positiva entre o número de grãos por espiga e o peso da espiga com a produtividade de grãos (SOUSA *et al.*, 2018), e o maior intervalo entre os florescimentos masculinos e feminino que podem levar a esterilidade das plantas ou a plantas com poucos grãos por espiga (ARAUS *et al.*, 2012). Além disso, déficit hídrico na fase de florescimento tem como consequência redução na produtividade (SILVA *et al.*, 2021).

A produtividade de grãos é a característica de maior interesse para os agricultores, já que é o que garante retorno financeiro. Sendo assim, genótipos tolerantes ao déficit hídrico, devem possuir maior produtividade que o genótipo não tolerante em diferentes ambientes com déficit hídrico. Para a linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico, foi observada maior produção de grãos nas duas safras, que foram realizadas em diferentes anos agrícolas, 2019 e 2020, e que tiveram durante o ciclo de condições edafoclimáticas diferentes, sendo que no ano de 2020 houve condições de déficit hídrico mais severas. Sendo assim, a linhagem 91 se mostra promissora quanto à tolerância ao déficit hídrico, uma vez que o genótipo ideal deve apresentar alta produtividade de grãos sob diferentes condições e níveis de estresse (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2022).

Para a avaliação de *Stay Green (SG)*, ou seja, senescência retardada das folhas, que foi avaliada somente na safrinha de 2020, as plantas das linhagens tolerantes, 91 e 32, permaneceram verdes por mais tempo e, em contrapartida, as linhagens não tolerantes começaram o processo de senescência das folhas mais rápido. Sah *et al.* (2020), também observaram que as plantas dos genótipos tolerantes permanecem verdes por mais tempo. Em híbridos com *stay green* acentuado, houve alta produtividade de grãos, sendo assim, o SG pode ser considerado um bom indicador agrônômico encontrado em cultivares tolerantes ao déficit hídrico. Assim, genótipos que possuem senescência retardada das folhas possuem maior tolerância ao déficit hídrico, já que plantas verdes nas fases finais de desenvolvimento, fase de enchimento de grãos, permite que a planta consiga continuar fornecendo fotoassimilados nesse período (BERNINI *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÕES

As características agronômicas, altura de plantas, altura de inserção da primeira espiga e intervalo entre os florescimentos masculino e feminino, avaliadas em maior densidade de plantas, são eficientes para a seleção quanto à tolerância ao déficit hídrico.

As características de *stay green*, produtividade de grãos são importantes para a seleção de genótipos de milho quanto à tolerância ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V.M. *et al.* Combining ability and heterosis of maize genotypes under water stress during seed germination and seedling emergence. **Crop Science**, [S.l.], v. 59, n. 1, p. 33-43, 2018.
- ABREU, V.M. *et al.* 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. **Análise dialélica e estratégias para a seleção de genótipos de milho submetidos ao estresse hídrico nas fases de germinação e emergência de plântulas**. 2016. 138 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- _____. **Seleção indireta para tolerância à seca em milho por meio de características agronômicas e de sementes**. 2013. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013
- ALMEIDA, M.L. *et al.* Incremento na densidade de plantas: uma alternativa para aumentar o rendimento de grãos de milho em regiões de curta estação estival de crescimento. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 23-29, 2000.
- ARAUS, J.L.; SANCHEZ, C.; EDMÉADES G.O. **Phenotyping maize for adaptation to drought**. In: MONNEVEUX, P.; RIBAUT, J.M. (Eds.). **Drought phenotyping in crops: from theory to practice** CGIAR Generation Challenge Program, 2011. p. 263–83.
- _____. Phenotyping maize for adaptation to drought. **Frontiers in Physiology**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 1-20, 2012.
- BÄNZIGER, M. *et al.* **Breeding for Drought and Nitrogen Stress Tolerance in Maize: From Theory to Practice**. Mexico, D.F.: CIMMYT, 2000.
- BARNABÁS, B.; JÄGER, K.; FEHÉR, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, England, v. 31, n. 1, p. 11–38, 2008.
- BECK, D. *et al.* Progresso no desenvolvimento de tolerância à seca e nitrogênio baixo do solo na cultura do milho. In: CONFERÊNCIA ANUAL DE MILHO E SORGO PESQUISA, 51., 1996. Chicago. **Anais** [...]. Chicago: Semente Americana da Associação Comercial, 1996. p. 85-111.
- BERNINI, C.S. *et al.* Seleção fenotípica de híbridos de milho para ambientes de baixa altitude e déficit hídrico. **Nativa**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 172-177, 2020.
- BLUM, A. **Plant breeding for water-limited environments**. Tel Aviv: Springer, 2011. 270 p.

BOLAÑOS, J.; EDMÉADES, G.O. The importance of anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *In: Proceeding of A Symposium, 1996, El Batán. Developing Drought and Low N-Tolerant Maize: Proceedings [...]. Mexico: CIMMYT, 1997. p. 355- 368.*

CALONEGO, J.C. *et al.* Produtividade e crescimento de milho em diferentes arranjos de plantas. **Agrarian**, [S.l.], v. 4, n. 12, p. 84-90, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, 2022/23 – Quarto levantamento v. 10 - SAFRA 2022/23- n. 2, janeiro de 2023.** Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em: 26 jan. 2023.

CORRÊA, R.G. **Direções de semeadura, densidade de plantas e variações na dosagem de sementes na produtividade do milho.** 2018. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2018.

COSTA, E.F.N. *et al.* Herança da senescência retardada em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 207-213, 2008.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **Plos One**, [S.l.], v. 11, n. 5, p. 1-15, 2016.

EDMEADES, G.O. *et al.* The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. **Physiology and modeling kernel set in maize**, [S.l.], v. 29, p. 43-73, 2000.

EL-SABAGH, A. *et al.* Response of maize hybrids to drought tolerance in relation to grain weight. **Fresenius Environmental Bulletin**, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 2476-2482, 2018.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, [S.l.], v. 5, n. 19, p. 1-6, 2014.

FERREIRA, J.P. *et al.* Características agronômicas do milho sob arranjos espaciais e densidades de plantas em região de cerrado. Cultura Agronômica. **Revista de Ciências Agrônomicas**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 27-44, 2015.

FISCHER, K.S.; *et al.* Phenotyping rice for adaptation to drought. *In: MONNEVEUX, P. RIBAUT, J.M. (Eds). Drought phenotyping in crops: from theory to practice: CGIAR Generation Challenge Programme, 2011. p. 213-244.*

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para estresses abióticos.** Viçosa: UFV, 2022. 312p.

GUIMARÃES, F.F.M.; GUIMARÃES, C.T.; GUIMARÃES, L.J.M. Caracterização agronômica de linhagens tropicais de milho cultivadas sob baixa disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, [S.l.], v. 6, n. especial, p. 1-5, 2018.

GUIMARÃES, P.S.; ROCHA, D.S.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Conteúdo de carboidrato foliar em híbridos de milho submetidos à restrição hídrica. **Evidencia**, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 93-112, 2019.

HUSSAIN, H.A. *et al.* Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **BDMEP- Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. 2019.

BDMEP- Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. 2020.

KANTE, M. *et al.* Stay-green QTLs in temperate elite maize. **Euphytica**, [S.l.], v. 207, n. 2, p. 463-473, 2016.

KIST, B.B. *et al.* **Anuário brasileiro do milho 2019**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2019. 72 p.

KONDWAKWENDA, A. *et al.* Aspects in breeding maize for drought tolerance: Progress and modern breeding approaches. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 510-517, 2021.

LUCHE, H.D.S. *et al.* Stay-green: a potentiality in plant breeding. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 45, n. 10, p. 1755-1760, 2015.

MELO, A.V. *et al.* Desempenho agrônômico de genótipos de milho submetidos ao estresse hídrico no sul do estado do Tocantins. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [S.l.], v. 17, n. 2, p. 177-189, 2018.

MONNEVEUX, P.; RIBAUT, J.M. Secondary traits for drought tolerance improvement in cereals. *In: Drought Tolerance in Cereals*. RIBAUT, J.M. (Ed). Binghamtown, NY, USA: The Haworth Press Inc, 2006. p. 97-143.

NAVRATIL, R.J.; BURRIS, J.S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, [S.l.], v. 74, n. 1, p. 159-161, 1982.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z. *et al.* Estratégias de melhoramento para tolerância à seca em germoplasma de milho tropical. **Singular Meio Ambiente e Agrárias**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 19-24, 2019.

PEIGAO, L. *et al.* Structural and biochemical mechanism responsible for the stay-green phenotype in common wheat. **Chinese Science Bulletin**, [S.l.], v. 51, n. 21, p. 2595-2603, 2006.

PENARIOL, F.G. *et al.* Comportamento de cultivares de milho semeadas em diferentes espaçamentos entre linhas e densidades populacionais, na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 52-60, 2003.

PEREIRA, L.B. *et al.* Características agronômicas da planta e produtividade da silagem e grãos de milho submetido a diferentes arranjos populacionais **Magistra**, [S.l.], Cruz das Almas, BA, v. 29, n. 1 p. 18-27, 2017.

PEREIRA, L.P.L. **Aspectos morfofisiológicos e agronômicos de plantas de milho em diferentes populações de plantas e direcionamentos de plantio**. 2014, 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

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

SAH, R.P. *et al.* Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

SANGOI, L.; SALVADOR, R.J. Performance agronômica de genótipos de milho macho-estéril e fértil em duas populações de plantas. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 26, n. 3, p. 377-388, 1996.

SANTOS, A.O. *et al.* Grain yield, anthesis-silking interval and drought tolerance indices of tropical maize hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

SILVA, S. *et al.* Parâmetros produtivos do milho sob déficit hídrico em diferentes fases fenológicas no semiárido brasileiro. **IRRIGA**, v. 1, n. 1, p. 30-41, 2021.

SIMÃO, E.P. *et al.* Demanda de nutrientes pelo milho safrinha em função da época de semeadura e adubação. **Embrapa Milho e Sorgo**. Artigo em periódico indexado (ALICE), 2017.

SOUSA, R.S. *et al.* Identification of drought-tolerant corn genotypes by multivariate analysis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S.l.], v. 48, n. 3, p. 204-211, 2018.

TIAN, F.X. *et al.* Improved drought resistance in a wheat *stay green* mutant *tasg1* under field conditions. **Biologia Plantarum**, [S.l.], v. 56, n. 3, p. 509-515, 2012.

TOBAR-TOSSE, D.E. *et al.* Caracterização de genótipos de soja-hortaliça por análise de componentes principais. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 45, n. 7, p. 1214-1219, 2015.

TUBEROSA, R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. **Frontiers in Physiology**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 1-26, 2012.

VILELA, D.R. **Características agronômicas e expressão de enzimas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho**. 2019. 51 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

XOCONOSTLE-CAZARES, B. *et al.* Drought tolerance in crop plants. **American Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 241-256, 2010.

ZAFAR, S.A. *et al.* Heat shock induced morpho-physiological response in indica rice (*Oryza sativa* L.) at early seedling stage. **Pakistan Journal of Botany**, [S.l.], v. 49, n. 2, p. 453-463, 2017.

ZAIDI, P.H. *et al.* Relationship between drought and excess moisture tolerance in tropical corn (*Zea mays* L.). **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 78-96, 2008.

ZHAO, X.Q. *et al.* Identification of QTLs and meta-QTLs for seven agronomic traits in multiple maize populations under well-watered and water-stressed conditions. **Crop Science**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 507-520, 2018.

CAPÍTULO 3 GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM DIFERENTES TECIDOS DE PLANTAS DE LINHAGENS DE MILHO

RESUMO

A tolerância ao déficit hídrico envolve mecanismos complexos de respostas das plantas, que englobam um grande número de genes, além de serem influenciados por interações genéticas e ambientais. Assim, o entendimento da base molecular da tolerância ao déficit hídrico pode auxiliar os melhoristas nos processos de seleção, visando o desenvolvimento de plantas tolerantes. A avaliação da expressão de genes associados a respostas das plantas ao déficit hídrico, torna-se uma ferramenta importante em programas de melhoramento de plantas. Objetivou-se avaliar a expressão de genes candidatos associados à tolerância ao déficit hídrico em diferentes tecidos de plantas de linhagens de milho, pela técnica de qRT-PCR, em diferentes tecidos de plantas das linhagens de milho. A partir dos resultados obtidos em avaliações agronômicas para esta característica, foram selecionadas duas linhagens contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, L91-T (tolerante) e L24-NT (não tolerante), cujas plantas foram desenvolvidas em duas densidades populacionais, 60 e 120 mil plantas por hectare. Aos 101 dias após a semeadura, no estágio R1, foram coletadas folhas, colmos e raízes adventícias. Esses tecidos foram utilizados para avaliar a expressão de quatro genes associados à tolerância ao déficit hídrico: *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmPP2C*, *CAT3* e *SOD*, pela técnica de qRT-PCR. Foi possível observar expressão diferencial dos genes nos diferentes genótipos, tecidos e densidades populacionais. Maior expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* foi observada na linhagem tolerante, L91-T. Já para o gene *ZmPP2C*, maior expressão foi observada na linhagem não tolerante, L24-NT. Para estes genes, de maneira geral, maior expressão foi observada em folhas e na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹. De maneira geral, para os genes relacionados ao sistema antioxidante, a exemplos de *SOD* e *CAT3*, maior expressão foi observada na linhagem não tolerante, L24-NT. Em folhas e colmos de plantas desenvolvidas nas duas densidades populacionais maior expressão foi observada para *SOD*, em folhas de plantas desenvolvidas na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹ maior expressão foi observada para o gene *CAT3*. Assim, os genes *ZmDREB2A/2.1S* e *ZmPP2C* são potenciais candidatos para a seleção de plantas de milho com tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: qRT-PCR. Fatores de Transcrição. Antioxidantes.

ABSTRACT

Tolerance to water deficit involves complex plant response mechanisms, which encompass a large number of genes, in addition to being influenced by genetic and environmental interactions. Thus, understanding the molecular basis of water deficit tolerance can help breeders in selection processes aimed at developing tolerant plants. The evaluation of the expression of genes associated with plant responses to water deficit becomes an important tool in plant breeding programs. The objective was to evaluate the expression of genes associated with tolerance to water stress, using the qRT-PCR technique, in different plant tissues of maize lines. Based on the results obtained in agronomic evaluations for this characteristic, two contrasting lines were selected regarding tolerance to water deficit, L91-T (tolerant) and L24-NT (non-tolerant), whose plants were developed in two population densities, 60 and 120 thousand plants per hectare. At 101 days after sowing, at the R1 stage, leaves, stems and adventitious roots were collected. These tissues were used to evaluate the expression of four genes associated with water deficit tolerance: ZmDREB2A/2.1S, ZmPP2C, CAT3 and SOD, using the qRT-PCR technique. It was possible to observe differential gene expression in different genotypes, tissues, and population densities. Higher expression of the ZmDREB2A/2.1S gene was observed in the tolerant strain, L91-T. As for the ZmPP2C gene, higher expression was observed in the non-tolerant strain, L24-NT. For these genes, in general, higher expression was observed in leaves and in the density of 120 thousand plants.ha-1. In general, for genes related to the antioxidant system, such as SOD and CAT3, higher expression was observed in the non-tolerant strain, L24-NT. In leaves and stems of plants developed at the two population densities, higher expression was observed for SOD, in leaves of plants developed at the density of 120,000 plants.ha-1, higher expression was observed for the CAT3 gene. Thus, the genes ZmDREB2A/2.1S and ZmPP2C are potential candidates for the selection of maize plants with tolerance to water deficit.

Keywords: qRT-PCR. Transcription Factors. Antioxidants

1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de respostas das plantas ao déficit hídrico são complexos, envolvem um grande número de genes e são influenciados por diversas interações genéticas e ambientais (VERMA; DEEPTI, 2016). Assim, a utilização de ferramentas como a expressão de genes é muito importante na seleção de genótipos com tolerância ao déficit hídrico (ROY; TUCKER; TESTER, 2011). Nesse sentido, o entendimento da base molecular da tolerância ao déficit hídrico, a identificação dos mecanismos de respostas e dos genes, podem ser utilizados para auxiliar os melhoristas para o desenvolvimento de plantas com maior tolerância a esse estresse abiótico.

A expressão de genes, a qual está relacionada à resposta das plantas sob déficit hídrico varia com a duração, severidade e constância do estresse, órgão ou tecido afetado, estágio fenológico e com o genótipo (FRITSCHÉ-NETO; DOVALE; CAVATTE, 2011). Assim, o entendimento dos mecanismos de resposta das plantas é importante para a avaliação de transcritos relacionados à tolerância ao déficit hídrico. A expressão destes genes influencia em modificações estruturais e funcionais em tecidos e órgãos de plantas, envolvendo modificações fenotípicas e alterações em níveis moleculares e celulares (PEREZ-ALFOCEA *et al.*, 2011).

Alguns estudos têm sido realizados e um grande número de genes associados a resposta ao déficit hídrico já foram identificados, porém, o mecanismo de tolerância ainda não é totalmente compreendido (TEJEDA, 2019). Apesar dos desafios enfrentados, em trabalhos relacionados à tolerância ao déficit hídrico têm sido avaliados os caracteres agrônômicos para essa característica (SANTOS *et al.*, 2021), modificações fisiológicas e do sistema antioxidante das plantas (MORAIS *et al.*, 2020; TEJEDA, 2019) e ainda a expressão de genes por meio da análise transcriptômica (VON PINHO, 2021).

Esses genes podem ser divididos em dois grupos. O primeiro se refere aos genes que codificam proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais, e como exemplo podem ser citados os fatores de transcrição das famílias bZIP, a exemplo do gene ZmBZIP72 e da família AP2/ERF que incluem os genes ZmDREB1e ZmDREB 2 (LENG; ZHAO, 2020). O segundo grupo está relacionado à codificação de proteínas que atuam como receptoras de moléculas oxidantes, como Superóxido dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase (WEI *et al.*, 2022).

Em condições de déficit hídrico, ocorre uma sequência de alterações nos tecidos vegetais, a primeira é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), seguida do aumento da expressão de genes com funções antioxidantes, que leva ao aumento nos níveis

dos sistemas antioxidantes e também ao aumento da capacidade de eliminação de EROS, o que confere a capacidade de tolerância (MANO, 2002).

As EROS são formas reduzidas ou ativadas de oxigênio atmosférico (O_2), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH) (CHOUDHURY *et al.*, 2017), que são produzidas em condição de estresse e podem causar danos oxidativos nos componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, quando os níveis de EROS são maiores que a capacidade de defesa dos mecanismos antioxidantes. São consideradas também moléculas sinalizadoras e responsáveis por controlar respostas aos estresses como o déficit hídrico.

Para combater as EROS, as plantas desenvolveram um sistema antioxidante que inclui um sistema enzimático, a exemplo das enzimas superóxido dismutase, catalase e as peroxidases e um sistema não enzimático que envolve por exemplo as flavononas, antocianinas, carotenóides e ácido ascórbico (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; AHMAD *et al.*, 2017). Assim, a avaliação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes tem sido utilizada em programas de melhoramento de plantas em condições de déficit hídrico, já que na maioria dos casos, plantas com sistema antioxidante mais eficiente tendem a ser mais tolerantes ao déficit hídrico.

Dentre as enzimas envolvidas na proteção oxidativa contra as EROs destacam-se a Superóxido dismutase (SOD) e a Catalase (CAT). A primeira é considerada a primeira linha de defesa contra a EROs, e desempenha um papel essencial na dissociação das moléculas de O_2^- , superóxido, formando H_2O_2 e O_2 . A segunda participa da neutralização de oxidantes, convertendo H_2O_2 em H_2O e O_2 (DALL'ASTA, 2013).

Outra categoria de genes que também têm sido estudadas são as que codificam proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais, a exemplo do gene *DREB*, que codifica para uma proteína regulatória, a proteína DREB, proteínas de ligação de elementos responsivos à desidratação, que é um fator de transcrição. Os genes *DREBs* têm sido utilizados para o desenvolvimento de plantas transgênicas devido a sua importância quanto à tolerância à deficiência hídrica (ZHANG *et al.*, 2022).

Esses genes que codificam fatores de transcrição, estão envolvidos na transdução de sinal em resposta às condições de estresse e são ativados nos estágios iniciais de regulação gênica, correspondem ao início dos eventos moleculares contra a desidratação celular. Codificam proteínas reguladoras que induzem sinais em cascata que envolvem proteínas funcionais e estruturais ativando genes relacionados ao déficit hídrico (NEPOMUCENO *et al.*, 2000; BENKO-ISEPPON *et al.* 2011).

Os genes responsivos quanto à tolerância ao déficit hídrico e que são ativados em condições de déficit hídrico, possuem o *cis*-elemento responsivo à desidratação (DRE) na região promotora. Os fatores de transcrição, como o *DREB1A* e *DREB2A*, interagem e se ligam com a região DRE e ativam a expressão desses genes (LIU *et al.*, 1998, MARUYAMA *et al.*, 2009).

O gene *DREB* é muito estudado em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Nesta espécie é comum superexpressão do gene em plantas que sobrevivem em ambientes com déficit hídrico. Em plantas de arroz (CHEN *et al.*, 2008), trigo (MARUYAMA *et al.*, 2009) e milho (VON PINHO, 2021) a expressão de DREBs também foi associada com a tolerância ao déficit hídrico.

Ainda na transdução de sinais celulares nas plantas, as proteínas de fosforilação e desfosforilação estão envolvidas nos processos de mudanças fisiológicas e metabólicas das plantas quando essas estão em condição de estresse. Como exemplo, pode-se citar as proteínas fosfatases que desempenham função na modulação e reversibilidade dos mecanismos regulatórios. A proteína do tipo 2C fosfatase (PP2C) tem sido estudada como sinalizadora de estresses abióticos em plantas (MARQUES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021; VON PINHO, 2021).

Em milho, em plantas expostas ao déficit hídrico, verifica-se que superexpressão do gene *ZmPP2C* aumenta a sensibilidade das plantas e, conseqüentemente, reduz a tolerância ao estresse hídrico (LIU *et al.*, 2013). Da mesma maneira, He *et al.* (2019) indicaram, após avaliar as funções da fosfatase PP2C em plântulas de milho, que *ZmPP2CA2* e *ZmPP2C_A6* desempenham papéis negativos nas respostas de estresse ao déficit hídrico.

Vale ressaltar, que a expressão de genes ocorre de maneira diferencial nos diferentes órgãos e tecidos das plantas, sendo também influenciada pelo estágio fenológico da planta, e é induzida por fatores ambientais, a exemplo do déficit hídrico. Genes do tipo *DREB* são altamente expressos em raízes, folhas e caules de plantas de *A. thaliana* (AGARWAL *et al.*, 2006) e em milho os genes do tipo *DREB1* são altamente expressos em raízes (LIU *et al.*, 2013). Alta expressão em raízes de plantas de milho também foram identificadas para o gene *ZmPP2C*. Para os genes que envolvem a enzima catalase, os genes da classe I são altamente expressos em folhas e quase ausente em estádios avançados de desenvolvimento, os da classe II, a exemplo da *CAT 2*, se expressam em tecidos vasculares e os da classe III, em sementes e plântulas (DALL'ASTA, 2013).

Assim, levando-se em consideração os estudos já realizados, a principal estratégia para o sucesso da seleção de plantas de milho para a tolerância ao déficit hídrico é a associação do melhoramento convencional com técnicas moleculares e de engenharia genética. Estudos que

envolvem a expressão de genes são essenciais para aumentar a eficiência e auxiliar em programas de melhoramento, já que os diferentes genótipos possuem diferentes graus de tolerância e, como consequência, apresentam expressão diferencial destes genes. A identificação desses genes possibilita a utilização em programas de melhoramento convencional por meio de cruzamentos direcionados ou ainda em técnicas mais avançadas de biotecnologia, possibilitando a obtenção de genótipos tolerantes a condições de déficit hídrico.

Portanto, estudos envolvendo identificação de genes candidatos e a expressão de transcritos relacionados à tolerância ao déficit hídrico são importantes para o entendimento dos mecanismos desta tolerância e para a seleção de genótipos tolerantes. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar a expressão de genes candidatos, em raízes adventícias, caules e folhas de duas linhagens de milho, contrastantes, para a característica de tolerância ao déficit hídrico e desenvolvidas sob diferentes densidades populacionais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de campo foram desenvolvidos em duas áreas experimentais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras em duas safras agrícolas (2019 e 2020). Em 2019 foi instalado na área experimental, situada no município de Lavras – MG, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80 m. Já em 2020 o experimento foi instalado no Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia- CDTT/DAG/UFLA da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Ijaci – MG, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°09'S, longitude 44°54'W e altitude de 920 m. Todas as avaliações foram realizadas no Laboratório Central de Sementes, localizado no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da ESAL/UFLA.

2.2 Seleção dos genótipos

A seleção das linhagens utilizadas na pesquisa foi realizada de acordo com os resultados obtidos por Abreu *et al.* (2018), a qual foi baseada em dados de germinação e crescimento de plântulas sob condições de restrição hídrica. Assim, foram selecionadas cinco linhagens contrastantes em relação à tolerância ao déficit hídrico, sendo três linhagens tolerantes (T), L91-T, L63-T e L32-T, e duas linhagens não tolerantes (NT), L57-NT e L24-NT.

2.3 Instalação dos experimentos de campo

Após a seleção das linhagens, os experimentos foram instalados na segunda safra dos anos agrícolas 2019/20 e 2020/21.

Em ambos os anos, o solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química destes, anteriormente à sementeira. As sementes foram tratadas com fungicida Vitavax/Thiram[®] 200SC na dosagem de 250 ml.100kg⁻¹ de sementes.

Na segunda safra de 2019/20, o experimento foi instalado utilizando-se as linhagens L91-T, L63-T (tolerantes) e as linhagens L57-NT e L24-NT (não tolerantes). A sementeira foi realizada em 08/02/19, quando foram utilizadas as densidades de plantas de 60 e 120 mil plantas ha⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com quatro repetições, no esquema de parcelas subdividas no espaço, sendo as diferentes densidades de plantas

dispostas na parcela. Cada parcela foi composta por 4 linhas com 16 metros, no espaçamento de 0,6 m entre linhas. Nas subparcelas, compostas por 4 linhas com 4 metros de comprimento cada, foram dispostas as linhagens. Foi considerada como parcela útil as duas linhas de semeadura centrais de cada subparcela. A semeadura foi realizada de forma manual e após 30 dias foi realizado desbaste para o ajuste da população de plantas desejada (60 e 120 mil plantas ha^{-1}).

No segundo experimento, implantado na segunda safra de 2020/21, foram utilizadas as linhagens L91-T, L32-T (tolerantes) e as linhagens L57-NT e L24-NT (não tolerantes). A semeadura foi realizada em 20/03/20, também foram utilizadas duas densidades de plantas, 60 e 120 mil plantas ha^{-1} . O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com seis repetições, no esquema de parcelas subdividas no espaço, sendo as diferentes densidades de plantas dispostas na parcela. Cada parcela foi composta por 6 linhas com 16 metros, no espaçamento de 0,6 m entre linhas. Nas subparcelas, compostas por 2 linhas com 4 metros de comprimento cada, foram dispostas as linhagens. Foi considerada como parcela útil as duas linhas centrais de semeadura de cada subparcela. A semeadura foi realizada de forma manual e após 30 dias foi realizado desbaste para o ajuste da população de plantas desejada.

As adubações de cobertura, assim como os demais tratos culturais e fitossanitários, foram realizadas de acordo com o recomendado para a cultura.

A colheita dos grãos em ambas as safras foi realizada em espigas. As espigas foram colhidas e despalhadas manualmente, quando os grãos atingiram teor de água de 20%. A secagem das espigas foi realizada em secadores experimentais de pequena escala, descrito por Navratil e Burris (1982).

2.4 Análise da expressão de transcritos por meio da técnica de qRT-PCR

A partir dos resultados obtidos nas avaliações agrônômicas, foram selecionadas duas linhagens contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico, L91-T (tolerante) e L24-NT (não tolerante), para as análises de expressão de transcritos, realizada por meio da técnica de qRT-PCR.

Para as análises de expressão de transcritos, foram coletados tecidos de plantas das duas linhagens, contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico, desenvolvidas sob diferentes densidades. Aos 101 dias após a semeadura, no estágio R1, foram coletadas folhas, colmos e raízes adventícias. Foram coletadas as folhas mais novas e saudáveis, os colmos foram coletados do penúltimo internódio das plantas, e as raízes adventícias foram coletadas em plantas que

possuíam raízes visíveis acima do solo. Os tecidos foram coletados em campo e imediatamente acondicionados em gelo, em seguida, as amostras foram armazenadas em *deep-freezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o início das análises moleculares.

A expressão dos transcritos envolvidos no processo de tolerância déficit hídrico por meio da técnica de RTq-PCR foi dividida em quatro etapas: extração e purificação do RNA, transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e análise dos resultados.

Para a extração do RNA as folhas, colmos e raízes adventícias das plantas das linhagens de milho foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente Purification Reagent® (Invitrogen), usado como agente extrator.

As amostras foram maceradas em cadinho de porcelana com auxílio de pistilo, sendo adicionado nitrogênio líquido para evitar o descongelamento e oxidação do material. Após isso, 150 mg do material foram separados em microtubos de 2 ml aos quais foram adicionados 750 μL do agente extrator. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e mantida em repouso por 10 minutos, quando foram centrifugadas ($14.000\text{ rpm}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sendo o sobrenadante coletado (aprox. 600 μL) e submetido à lavagem. Esta etapa consistiu na adição de 100 μL de NaCl 5M e agitação por 10 segundos, seguidos pela adição de 300 μL de clorofórmio e agitados novamente por 1 minuto. Os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos ($14.000\text{ rpm}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo 600 μL do sobrenadante coletados e novamente submetidos à etapa de lavagem. Após isso, 600 μL do sobrenadante foram coletados e misturados a isopropanol, sendo as amostras mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, quando foram centrifugadas por 25 minutos ($14.000\text{ rpm}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$). O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado a partir da adição de 600 μL de etanol 75% seguido de centrifugação por 5 minutos ($14.000\text{ rpm}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os péletes foram secados em capela de fluxo laminar até o etanol residual ser eliminado e, então, foram ressuspendidos em 20 μL de água ultrapura.

A integridade e pureza do RNA foi avaliada em todas as etapas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e espectrofotômetro (BioTek™ Eon™ *Microplate Spectrophotometer*). A corrida foi realizada por 40 minutos a 80 v e 100 mA, sendo o gel visualizado em transiluminador para confirmar a integridade do RNA extraído.

Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com DNaseFree para evitar qualquer contaminação com DNA genômico. Para isso, foi utilizado o KitDNase PROMEGA® de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA foi adicionado a 2,5 μL do tampão, 0,5 μL da enzima e o volume de cada amostra completado para 25 μL . O material foi incubado por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ quando foi então adicionado o reagente para

interromper a reação e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo posteriormente centrifugados (10.000 rpm/4 °C) por 5 minutos.

Após o processo de extração e purificação, os mRNAs foram usados como molde para a síntese de cDNA. O kit *High Capacity DNA Reverse to Transcription cDNA®* (Applied Biosystems) foi utilizado seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Foi coletado de cada amostra o volume contendo 1,5 µg de RNA, aos quais foram adicionados 2 µL do tampão, 0,8 µL de nucleotídeos, 2 µL de *primers* aleatórios e 1 µL da enzima, sendo o volume completado para 25 µL com água ultrapura. O material foi incubado em termocilcador *Labnet MultiGene™*, seguindo as condições que seguem: anelamento a 25 °C por 10 minutos; extensão a 37 °C por 120 minutos; desnaturação final a 85 °C por 5 minutos.

Para a análise da expressão gênica pela técnica de qRT-PCR, a seleção dos genes-alvo foi feita com base na revisão bibliográfica, considerando os estudos sobre a tolerância ao déficit hídrico na cultura do milho e em plantas cultivadas. As sequências dos *primers* selecionados foram encontradas no *Maize Genetics and Genomics Database, GenBank*. Com base nestas sequências, os *primers* foram desenhados utilizando o software *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems).

As sequências dos *primers* utilizados são apresentadas na Tabela 1. Os genes *Ubiquitina (UBI)* e *18S (18S)* foram usados como controles endógenos (CUI *et al.*, 2011; MANOLI *et al.*, 2012).

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

Gene	Função	Sequência 5'-----3'
<i>Ubiquitina (UBI)</i>	Controle Endógeno	FAAGGCCAAGATCCAGGACAA RTTGCTTTCCAGCGAAGATGA
<i>18S</i>	Controle Endógeno	FTGTCCATCACTTGTGAAGCCTCCT RACGACCTTAGCCAATATCGCACCA
<i>CAT3</i>	Remoção de H ₂ O ₂ produzido durante a degradação de ácidos graxos	FCTGCTGGAAACTATCCTGAGTGR RATTGACCTCTTCATCCCTGTG
<i>DREB 2A/2.1S</i>	Proteínas de elemento de ligação que respondem a desidratação	FGCAGCCCCGGAAGGAAGAA RGATGACAGCTGCCACTGACGTA
<i>ZmPP2C</i>	Regulador na resistência a estresses abióticos	FGGAAGCTCCGATAACATCACAGT RTCTTTGTCGTCGCCTGATTTTC
<i>SOD</i>	Antioxidante	FHTGGAGCACCAGAAGATGA RCTCGTGTCCACCCTTTCC

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

Fonte: Da autora (2023).

Para a análise da eficiência dos *primers*, foi feito um mix de cDNA de todas as amostras dos quais foram retirados 1 µL e em seguida foram adicionados 3 µL do reagente SYBRGreen (*Applied Biosystems*), 0,2 µL de cada *primer (reverse e forward)* e o volume completado para 7 µL com água ultrapura. A reação foi feita em aparelho ABI Prism 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*), consistindo nas etapas:

- Iniciação: 2 minutos a 50 °C seguido de 10 a 95 °C;
- Reação (50 ciclos): 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 15 minutos a 95 °C.
- Especificidade da reação pela curva de desnaturação (*Melting*) de 60-95 °C.

A eficiência dos *primers* estudados foi realizada usando-se o software LingReg PCR (DEKKERS *et al.*, 2012; RAMAKERS *et al.*, 2003; RUIJTER *et al.*, 2009), seguindo as recomendações dos autores. A eficiência foi calculada para cada uma dos 4 *primers*, sendo usados apenas *primers* com eficiência igual ou maior que 1,8 (equivalente a 90%).

Para a análise de expressão dos genes selecionados foi utilizado o aparelho ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*), com método de detecção via SYBR Green. Foram

utilizadas amostras de cDNA obtidas das folhas, colmo e raízes adventícias de duas linhagens de milho, L91-T e L24-NT desenvolvidas sob diferentes densidades.

Para cada reação, foi utilizado 1,0 µl de cDNA (diluído 1:5), 0,4 µl de *primer forward* e 0,4 µl de *primer reverse*, 3 µl de *Master Mix SYBR green* (Applied Biosystems) e 2,6 µl de água ultrapura, para um volume final de 7,0 µl/amostra. As amostras foram pipetadas em triplicatas técnicas, e um controle sem cDNA (branco) foi incluído para cada par de *primers*.

As condições térmicas da reação foram: 2 minutos a 50 °C e 10 minutos a 95 °C para início, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizo com 15 minutos a 95 °C. Ao final da ciclagem, foi avaliada a especificidade da reação de PCR usando a curva de desnaturação de 60-95 °C. Os dados de Ct (*Cycle threshold*) foram coletados, exportados pelo programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1) e analisados em planilha Excel (Microsoft).

A expressão gênica foi analisada pelo método $\Delta\Delta Ct$ seguindo-se a equação usada por Hellemans *et al.*, (2007) utilizando-se valores individuais de eficiência de cada *primer* de acordo com o proposto por Rao *et al.* (2013). As fórmulas usadas para o cálculo da expressão relativa normalizada dos genes estudados constam na Equação 1.

Foram usadas como controle as amostras de folha com 60 dias. Desta maneira, os valores de expressão gênica foram expressos em Expressão Relativa Normalizada, sendo considerada a expressão do controle igual a 1, e os demais tratamentos com valores relativos a este.

$$\text{Expressão Relativa normalizada} = \frac{Ex_{Interesse}}{Ex_{Referência}} \quad (1)$$

Onde:

$$Ex = Ef^{-\Delta Ct} \quad (2)$$

E:

$$\Delta Ct = Ct_{Controle} - Ct_{Amostra} \quad (3)$$

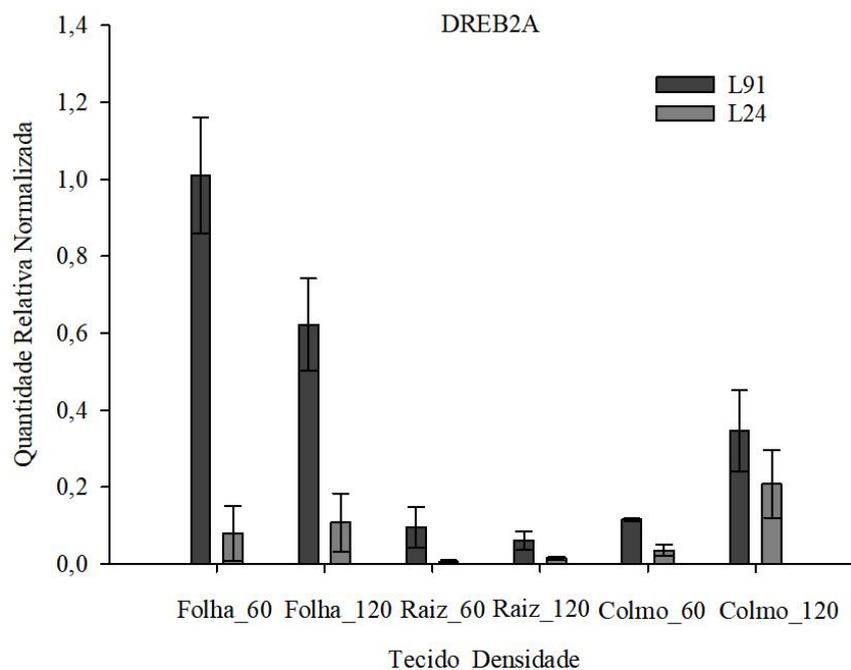
Onde: $Ex_{Interesse}$ = expressão gênica do gene de interesse; $Ex_{Referência}$ = expressão gênica do gene de referência; Ef = Eficiência do *primer*; Ct = *Cycle threshold*. A expressão do gene de referência ($Ex_{referência}$) consistiu na média dos valores de eficiência para os dois genes usados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise de eficiência dos *primers*, foi utilizado o *software* LingReg PC que foi proposto por Ramakers *et al.* (2003) e provado confiável por Ruijter *et al.* (2009) e Dekkers *et al.* (2012), sendo um método eficiente e de menor custo para as análises de eficiência dos *primers*. Apesar do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ser o mais popular entre os pesquisadores para mensuração da expressão gênica, Hellemans *et al.* (2007) e Rao *et al.* (2013) concluíram que para a expressão gênica relativa deve-se considerar a eficiência de cada *primer* individualmente a qual pode variar desde 60 a 100% (1,2 a 2,0). Assim, no presente estudo, os valores de eficiência individuais de cada *primer* foram usados, sendo aplicada então a Equação 1, apresentada no material e métodos, e os valores de resultado da análise de eficiência dos *primers* testados que foram 2,0 para o *primer Ubiquitina*, 1,8 para *18s*, 2,0 para *CAT3*, 2,0 para *DREB2A/2.1S*, 1,8 para *ZmPP2C* e 2,0 para *SOD*.

Na Figura 1, observa-se maior expressão do gene *DREB2A/2.1S* em todos os tecidos das plantas da linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico, nas duas densidades populacionais, quando comparado com a linhagem 24, não tolerante.

Figura 1- Expressão do gene *DREB 2A/2.1S* em tecidos de plantas de duas linhagens de milho (L91-T e L24-NT) desenvolvidas em diferentes densidades de plantas (60 e 120 mil plantas.ha⁻¹). UFLA, Lavras 2023.



Fonte: Da autora (2023).

Em pesquisa desenvolvida por Von Pinho (2021), na qual foi avaliada a expressão de genes em plântulas de milho que foram desenvolvidas sob restrição hídrica utilizando solução de PEG 6000 (-0,6MPa), maiores valores de expressão do gene *DREB2A/2.1S* também foram observados em plântulas da linhagem L91 e das progêneses F_{2:3} tolerantes, e menores valores na linhagem e progêneses classificadas como não tolerantes.

A associação da superexpressão dos genes que codificam a proteína DREB com a maior tolerância ao déficit hídrico tem sido relatada por diversos autores e em diferentes culturas (QIN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; MARUYAMA *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2011; BIAZUZO, 2013; VON PINHO, 2021). Esses genes que codificam a proteína DREB, estão associados com a tolerância a estresses abióticos em plantas. Eles atuam nos eventos moleculares e, assim, induzem a respostas das plantas contra a desidratação celular (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011).

Também foi possível diferenciar a expressão do gene nos diferentes tecidos de plantas e densidades populacionais. Foi observada a expressão do gene em folhas, raízes e colmos de plantas desenvolvidas nas duas densidades populacionais. Agarwal *et al.* (2006) e Biazuzo (2013), ao estudarem a expressão do gene *AtDREB2A* em *A. thaliana* e do *DREB2C* no feijoeiro, também observaram a expressão destes em raízes, folhas e colmos em condições de déficit hídrico.

Nas plantas da linhagem 91, desenvolvidas nas duas densidades, maior expressão do gene *DREB2A/2.1S* foi observada em folhas (FIGURA 1). Maior expressão deste gene em folhas e raízes foi observada em plantas desenvolvidas na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹, já no tecido colmo, maior expressão foi observada na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹. Santos *et al.* (2021) ao estudar a expressão relativa do gene *DREB2A/2.1S* em parte aérea e raízes de plântulas de milho desenvolvidas em substratos com 70% e 10% da capacidade de retenção de água no solo, com e sem déficit hídrico, observaram maior expressão do gene na parte aérea de plântulas desenvolvidas em condições normais e maior expressão em raízes quando essas foram desenvolvidas na condição de déficit hídrico.

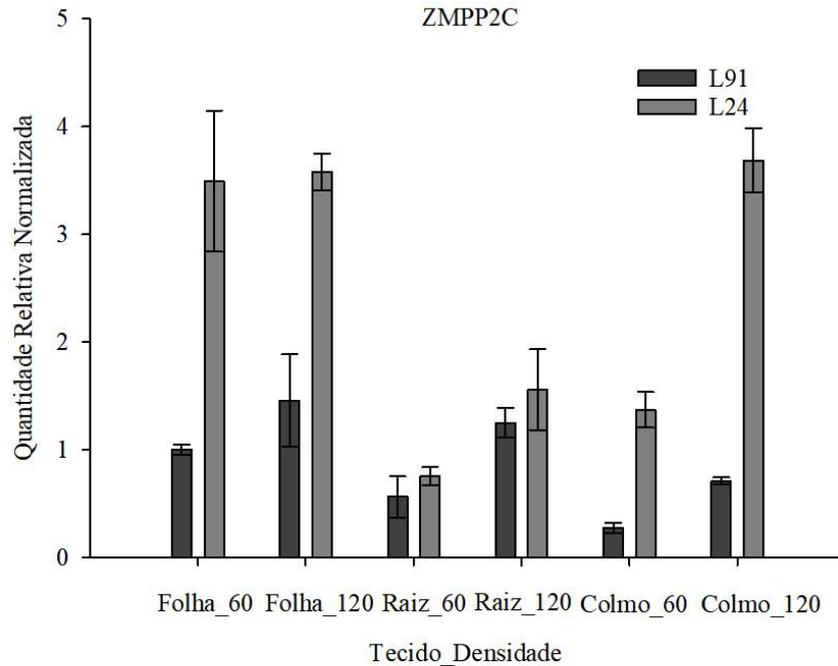
Em todos os tecidos das plantas da linhagem 24, classificada como não tolerante, maior expressão do gene *DREB 2A/2.1S* foi observada na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹. Nas duas linhagens, 91 e 24, menor expressão do gene foi observada em raízes, nas duas densidades populacionais. Diferente do observado no presente trabalho, Liu *et al.* (2013) ao avaliar a expressão de todos os genes *ZmDREB* em folhas e raízes com três semanas sob estresse, observaram maior expressão em raízes. No entanto, em folhas, também foi possível observar aumento da expressão quando comparada com condições sem estresse. Maior expressão em

raízes, sob condição de déficit hídrico, também foram observadas em linhagens de soja (ENGELS *et al.*, 2013).

Os genes, podem ser induzidos ou reprimidos em diferentes tempos durante o desenvolvimento da planta. Biazuzo (2013), ao avaliar a expressão diferencial de genes relacionados ao déficit hídrico no feijoeiro observou que a indução da expressão do gene *DREB2C* ocorreu mais rapidamente em caules e folhas do genótipo tolerante. Já no genótipo não tolerante, a expressão ocorreu mais rapidamente em raízes e caules, nesse mesmo genótipo, a repressão, ocorre tardiamente em caules e folhas. Essa repressão tardia do gene em caules e folhas pode explicar a maior expressão do gene *DREB 2A/2.1S* observada na presente pesquisa, nesses mesmos tecidos, desenvolvidos sob duas densidades populacionais, coletados em estádios de desenvolvimento mais avançados.

Na Figura 2 está representada a expressão relativa do gene *ZmPP2C*. Em todos os tecidos da linhagem 24, classificada como não tolerante ao déficit hídrico, desenvolvidas sob duas densidades populacionais, foi observada maior expressão do gene, quando comparado às observadas na linhagem 91, classificada como tolerante. Tem sido observado em algumas pesquisas que a superexpressão desse gene reduz a tolerância ao estresse hídrico, já que aumenta a sensibilidade das plantas (LIU *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2019). Marques *et al.* (2019) também observaram maior expressão do gene em pontas da espiga de plantas das linhagens não tolerantes e menor nas pontas das espigas das linhagens tolerantes. Também Von Pinho (2021), observou maior expressão do gene em plântulas da linhagem classificada como não tolerante ao déficit hídrico.

Figura 2 - Expressão do gene *ZmPP2C* em tecidos de plantas de duas linhagens de milho (L91-T e L24-NT) desenvolvidas em diferentes densidades de plantas (60 e 120 mil plantas.ha⁻¹). UFLA, Lavras 2023.



Fonte: Da autora (2023).

Também foi possível observar expressão diferencial do gene *ZmPP2C* em plantas desenvolvidas nas duas densidades populacionais. Tanto na linhagem 91 quanto na linhagem 24, maior expressão do gene *ZmPP2C* foi observada na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹, em todos os tecidos avaliados. A densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹ foi utilizada para simular a deficiência hídrica, sendo assim, a maior expressão das plantas nesta densidade acontece devido à resposta das plantas como defesa à condição de déficit hídrico.

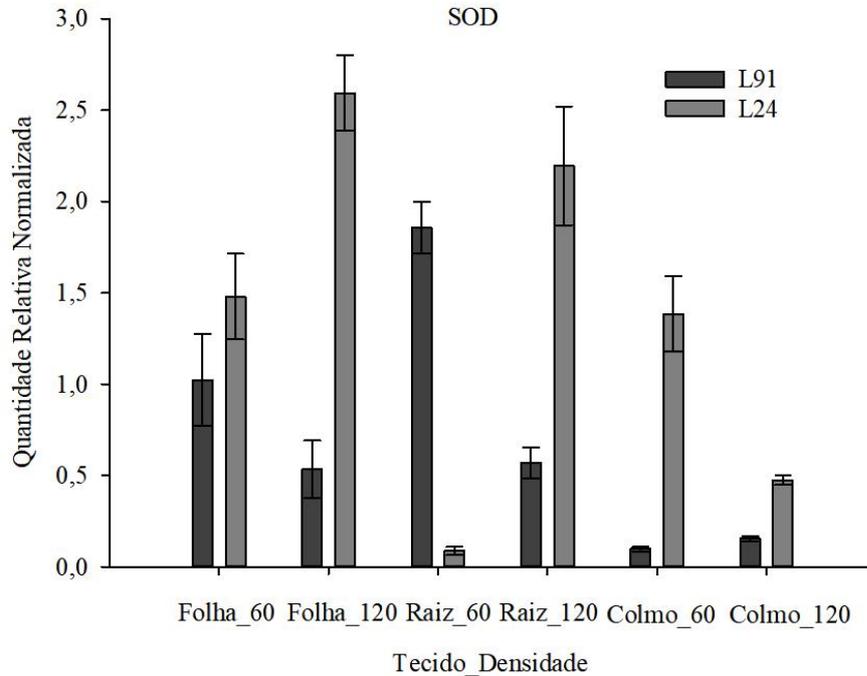
Na linhagem 91, maior expressão foi observada em folhas, seguida de raiz, e a menor expressão foi no colmo, nas duas densidades populacionais. Para a linhagem 24, na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹, foi observado comportamento igual ao da linhagem 91. Na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹, maior expressão foi observada em colmo, seguida de folha e raiz. He *et al.* (2019) também observaram expressão diferencial dos genes *ZmPP2C* nos diferentes tecidos. Ao analisar a expressão de genes *ZmPP2C-A* sob tratamento com ABA em plantas de milho, os autores também observaram que os genes *ZmPP2C-A* foram induzidos na parte aérea ou na raiz, ou em ambos. Para este gene, *ZmPP2C*, em trabalho realizado por Santos *et al.* (2021) houve menor expressão na parte aérea de plântulas desenvolvidas em substrato com 10% da capacidade de retenção de água, condição considerada como déficit hídrico.

Os genes *ZmPP2C* atuam como regulares negativos nas respostas à seca de plantas. Maiores expressões do gene *ZmPP2C* estão associadas à menor tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico (VON PINHO, 2021). He *et al.* (2019) observaram que superexpressão dos genes *ZmPP2C-A2* e do gene *ZmPP2C-A6* propiciaram efeitos negativos em respostas das plantas ao déficit hídrico, com aumento da sensibilidade das plantas e perda de água mais rápida. Esses resultados explicam os resultados encontrados nesse trabalho, já que a maior expressão do gene foi verificada na linhagem classificada como não tolerante ao déficit hídrico. Sendo assim, os genes *ZmPP2C* podem ser promissores para serem utilizados como marcadores moleculares no processo de seleção para tolerância ao déficit hídrico.

É importante ressaltar a complementariedade dos genes *ZmDREB2A/2.1S* e do gene *ZmPP2C* no que se refere à avaliação da tolerância ao déficit hídrico, já que a superexpressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* está associada à maior tolerância ao déficit hídrico e a do gene *ZmPP2C* à maior sensibilidade das plantas ao déficit hídrico. No presente trabalho, foi possível observar maior expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* na linhagem classificada como tolerante, linhagem 91, e maior expressão do gene *ZmPP2C* na linhagem classificada como não tolerante, linhagem 24.

Em relação à expressão do gene *SOD* (FIGURA 3), maior expressão foi observada na linhagem 24, classificada como não tolerante ao déficit hídrico, em todos os tecidos avaliados e desenvolvidos sob densidades populacionais, exceto no tecido raiz na densidade populacional de 60 mil plantas.ha⁻¹.

Figura 3 - Expressão do gene *SOD* em tecidos de plantas de duas linhagens de milho (L91-T e L24-NT) desenvolvidas em diferentes densidades de plantas (60 e 120 mil plantas.ha⁻¹). UFLA, Lavras 2023.



Fonte: Da autora (2023).

Em condições de estresse, ocorre aumento da produção de EROS. Para combater as EROS, as plantas utilizam de complexos enzimáticos para a detoxificação celular. Dentre essas enzimas, as *SODs*, superóxido dismutase, constituem a primeira linha de defesa contra as EROs e catalisam a dismutação dos radicais livres superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Os genes das *SODs* são expressos em diferentes níveis e diferentes tecidos das plantas fazendo parte do complexo de defesa antioxidante das plantas (DALL'ASTA, 2013).

Também foi possível observar expressão diferencial em tecidos desenvolvidos nas duas densidades populacionais. Na linhagem 91, maior expressão do gene *SOD* foi observada nos em folhas e raízes das plantas desenvolvidas na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹. Já no colmo, maior expressão do gene foi observada na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹. De maneira contrária, na linhagem 24, maior expressão do gene *SOD* foi observada em folhas e raízes na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹ e no tecido colmo, maior expressão foi observada na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹.

Hussain *et al.* (2019), ao avaliarem os efeitos da seca e altas temperaturas em híbridos de milho observaram aumento dos níveis de superóxidos dismutase em condições de estresse quando comparados com a condições controle. Em algumas pesquisas, maior expressão das

enzimas antioxidantes como superóxido dismutase foram observadas em genótipos tolerantes ao déficit hídrico (LI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020).

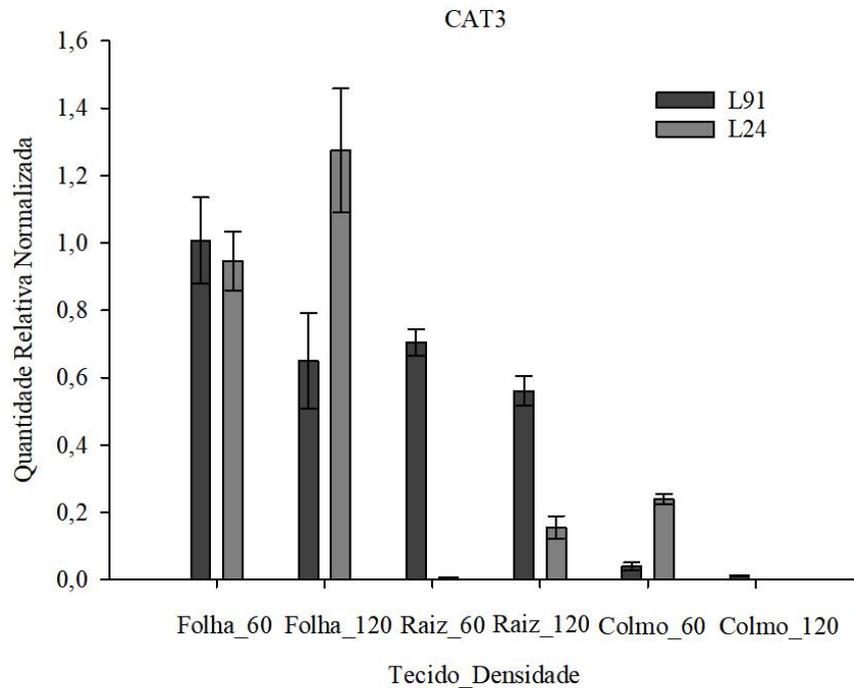
Nas plantas da linhagem 91, desenvolvidas nas duas densidades populacionais, a maior expressão do gene *SOD* foi observada em raízes, seguida de folha e colmo. De maneira semelhante, Fraiz (2015) observou em raízes de cultivares de soja, maior expressão de superóxido dismutase em raízes da cultivar tolerante.

Já nas plantas da linhagem 24, maior expressão foi observada em folhas, nas duas densidades populacionais. Santos *et al.* (2021), ao avaliar a expressão da enzima superoxóxido dismutase, por meio da técnica de eletroforese, também observaram expressão variável desta em sementes, raízes e parte aérea, em função do genótipo utilizado. Vilela (2019) observou maior expressão da enzima SOD em folhas quando comparada com a ponta da espiga. A expressão de proteínas também pode variar de acordo com a idade da planta, podendo ser maior em tecidos verdes, e apresentar decréscimo na fase reprodutiva (RAO, 2005 citado por FAVARETO, 2017).

Sob condições de déficit hídrico, enzimas antioxidantes podem ser ativadas para o controle de radicais livres, sendo assim, a eliminação de EROS pode ser uma resposta adaptativa para sobreviver em condições estressantes (LI *et al.*, 2021).

Na Figura 4 está representada a expressão relativa do gene *CAT3*. De maneira geral, maior expressão do gene *CAT3* foi observada na linhagem 24, em folhas das plantas desenvolvidas na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹. No entanto, maior expressão do gene quando comparadas às linhagens foi observada na linhagem 91, classificada como tolerante, em folhas e raízes desenvolvidas na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹ e em raízes e colmo das plantas desenvolvidas na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹. Nos colmos desenvolvidos na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹ maior expressão foi observada na linhagem 24, classificada como não tolerante ao déficit hídrico.

Figura 4 - Expressão do gene *CAT 3* em tecidos de plantas de duas linhagens de milho (L91-T e L24-NT) desenvolvidas em diferentes densidades de plantas (60 e 120 mil plantas.ha⁻¹). UFLA, Lavras 2023.



Fonte: Da autora (2023).

O aumento da expressão de genes e da atividade das enzimas antioxidantes, como a *CAT*, em situações de déficit hídrico, nos genótipos tolerantes tem sido relatadas em algumas pesquisas na cultura do milho (ZHANG *et al.*, 2020; VON PINHO, 2021) e na cultura do feijoeiro (BIAZUZO, 2013). Dall'asta (2013), avaliando a expressão de genes do sistema antioxidante em folhas de milho com aplicação de ABA, encontraram variações nas respostas para os genes *CAT1*, mas não encontraram diferenças significativas entre os transcritos do gene *CAT3*. O tratamento com ABA induz a expressão do sistema antioxidante e, conseqüentemente, aumento da expressão do gene *CAT1* em folhas de milho (ZHANG *et al.*, 2006).

Também foi possível diferenciar a expressão do gene nos diferentes tecidos de plantas desenvolvidas nas duas densidades populacionais. Nas plantas da linhagem 91, maior expressão do gene *CAT3* foi observada em todos os tecidos analisados de plantas desenvolvidas na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹. Maior expressão foi observada em folhas, seguida de raízes e colmos. Já nas plantas da linhagem 24, maior expressão foi observada em folhas e raízes desenvolvidas na densidade de 120 mil plantas.ha⁻¹ e em colmos desenvolvidos na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹. Na linhagem 24, a maior expressão foi observada em folhas desenvolvidas nas duas densidades populacionais.

O gene *CAT3*, que codifica a proteína *cat3* em milho, pertence à classe II na classificação das catalases, sendo mais expressas em tecidos vasculares. No entanto, no presente trabalho, maior expressão da enzima foi observada em folhas. Esse fato pode ser explicado, pois a proteína *cat3* apresenta pico de expressão na transição entre os períodos de dia/noite (REDINBAUGH; SABRE; SCANDALIOS, 1990). Assim, o momento da coleta do tecido pode ter influenciado na maior ou menor expressão desse gene nos diferentes tecidos. Sob condições de déficit hídrico, genes são reprimidos ou ativados e a expressão desses genes depende da intensidade e duração do estresse, do genótipo e do estágio de desenvolvimento das plantas (VON PINHO, 2021).

Foi observada maior expressão dos genes *SOD* e *CAT3* em raízes das plantas da linhagem 91, classificada como tolerante ao déficit hídrico, desenvolvidas na densidade populacional de 60 mil plantas.ha⁻¹. Nesta linhagem, nos trabalhos de Marques *et al.* (2019) e Santos *et al.* (2021), foram verificados maiores comprimentos de raízes em plântulas desenvolvidas na condição sem estresse hídrico, ou seja, em condições com 70% da capacidade de retenção de água. Este resultado explica a maior expressão desses genes em raízes na condição sem estresse, que está relacionado ao maior desenvolvimento radicular da linhagem 91.

Na linhagem 24, o padrão de expressão dos genes *SOD* e *CAT 3*, foi o mesmo. Maior expressão ocorreu em folhas desenvolvidas nas duas densidades populacionais, e maior expressão em folhas e raízes desenvolvidas na densidade populacional de 120 mil plantas.ha⁻¹ e em colmos na densidade de 60 mil plantas.ha⁻¹. Esse fato pode ser explicado pela associação dos genes do sistema antioxidantes no processo de defesa contra os radicais livres já que a *SOD* catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir do superóxido e o peróxido de hidrogênio produzido pela *SOD* é convertido em água e oxigênio pela *CAT*.

Sendo assim, pode-se inferir que houve resposta da linhagem 24 sob déficit hídrico, em função da maior sensibilidade, principalmente em raízes e folhas sob maior densidade populacional, com o conseqüente aumento da expressão dos genes *SOD* e *CAT* nessas condições.

Ressalta-se que na linhagem 24, classificada como não tolerante ao déficit hídrico, para todos os quatro genes analisados, a maior expressão foi observada na maioria dos tecidos das plantas desenvolvidas na densidade populacional de 120 mil plantas.ha⁻¹. Essa população foi utilizada para simular a deficiência hídrica, conforme proposto por Abreu *et al.* (2017) e Pereira *et al.* (2014). Sendo assim, a maior expressão nos tecidos das plantas da linhagem 24, nesta população, acontece devido a resposta das plantas como defesa à condição de déficit hídrico.

Por meio dos resultados da expressão de transcritos foi possível observar que em tecidos de plantas do genótipo tolerante, linhagem 91, houve maior expressão do gene *ZmDREB2A/2.1*, importante marcador para a tolerância ao déficit hídrico. E em contrapartida, no genótipo não tolerante, linhagem 24, houve maior expressão do gene *ZmPP2C*, que está associado à intolerância, por aumentar a sensibilidade das plantas às condições de déficit hídrico. Esses resultados confirmam a classificação desses genótipos quanto à tolerância ao déficit hídrico. Sendo assim, estes genes são potenciais marcadores moleculares e genes candidatos à seleção de genótipos de milho para a característica de tolerância ao déficit hídrico.

Vale ressaltar ainda, que para os genes *ZmDREB2A/2.1* e *ZmPP2C*, a maior e menor expressão em genótipos tolerantes tem sido observada em diferentes pesquisas, independentemente das metodologias adotadas para simular condições de deficiência hídrica.

No entanto, ao observar os resultados de expressão daqueles genes do sistema antioxidante, observa-se maior variação dos resultados. Isto pode ser explicado pela complexidade de respostas das plantas ao déficit hídrico, envolvendo os vários genes que codificam enzimas de defesa às EROS. Para a SOD, por exemplo, são vários os genes envolvidos os quais se expressam diferentemente em tecidos, estádios de desenvolvimento, genótipos e condições edafoclimáticas. Assim, o uso de marcadores mais estáveis como *ZmDREB2A/2.1* e *ZmPP2C*, parece ser mais seguro para a seleção de genótipos com tolerância ao déficit hídrico.

Ressalta-se ainda, em relação a expressão diferencial dos genes nos tecidos, que para a maioria dos genes, a maior expressão foi observada em folhas. Dentre os tecidos avaliados a folha é o de mais fácil coleta, armazenamento e maceração. Assim, recomenda-se a utilização das folhas para a avaliação da expressão dos genes associados à tolerância ao déficit hídrico.

4 CONCLUSÕES

A maior expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* está associada à maior tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico.

A maior expressão do gene *ZmPP2C* está associada à menor tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico.

Os genes *ZmDREB2A/2.1S* e *ZmPP2C* são genes candidatos para a seleção de genótipos visando a tolerância ao déficit hídrico.

A maior expressão de genes, para a característica de tolerância ao déficit hídrico, é observada em folhas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. *et al.* Combining ability and heterosis of maize genotypes under water stress during seed germination and seedling emergence. **Crop Science**, [S.l.], v. 59, n. 1, p. 33-43, 2018.
- ABREU, V. M. *et al.* 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.
- AGARWAL, P.K. *et al.* Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, [S.l.], v. 25, n. 12, p. 1263-1274, 2006.
- AHMAD, I.Z. Effects of different metal stresses on the antioxidant defense systems of medicinal plants. *In: Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Springer: Singapore, 2017. 215-256 p.
- BENKO-ISEPPON, A.M. *et al.* Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 1112-1134, 2011.
- BIAZUZO, M.M.A. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum**. 2013. 177 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2013.
- CHEN, J.Q. *et al.* Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 30, n. 12, p. 2191-2198, 2008.
- CHOUDHURY, F.K. *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, 2022/13 – Segundo levantamento v. 10 - SAFRA 2022/23- n. 2, dezembro de 2022**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra>. Acesso em: 06 dez. 2022.
- CUI, M. *et al.* Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 49, n. 12, p. 1384-1391, 2011.
- DALL'ASTA, P. **Expressão de genes do sistema antioxidante mediada por ácido abscísico em folhas de milho (*Zea mays* L.)**. 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos e Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 1-13, 2014.
- DEKKERS, B.J. *et al.* Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in Arabidopsis and tomato seeds. **Plant and Cell Physiology**, [S.l.], v. 53, n. 1, p. 28-37, 2012.

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

FAVARETO, A. L. **Expressão de proteínas em híbridos de milho geneticamente modificado sob ação de estresse hídrico e infestação de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2017. 65 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, SP, 2017.

FRAIZ, A.C.R. **Importância da respiração radicular na tolerância ao déficit hídrico em soja**. 2015. 63 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para estresses abióticos**. Viçosa: UFV, 2022. 312p.

FRITSCHÉ-NETO, R.; DOVALE, J. C.; CAVATTE, P. C. Melhoramento para tolerância a estresses ou para eficiência no uso de recursos. *In*: FRITSCHÉ-NETO R, BORÉM. A **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 39-79.

HE, Z. *et al.* The maize clade A PP2C phosphatases play critical roles in multiple abiotic stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 20, n. 14, p. 1-14, 2019.

HELLEMANS, J. *et al.* qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**. [S.l.], v. 8, n. 2, p. 1-14, 2007.

HUSSAIN, H.A. *et al.* Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

LENG, P.; ZHAO, J. Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.l.], v. 133, p. 1455-1465, 2020.

LI, H. *et al.* Physiological and proteomic analyses revealed the response mechanisms of two different drought-resistant maize varieties. **BMC Plant Biology**, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.

LIU, Q. *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, [S.l.], v. 10, n. 8, p. 1391-1406, 1998.

LIU, S. *et al.* Genome-Wide Analysis of ZmDREB Genes and Their Association with Natural Variation in Drought Tolerance at Seedling Stage of *Zea mays* L. **Plos Genetics**, [S.l.], v. 9, n. 9, p. 1-17, 2013.

- MANO, J. Early events in environmental stresses in plants – induction mechanisms of oxidative stress. In: INZE, D.; MONTAGO, M.V. (Eds.). **Oxidative stress in plants**. New York: Taylor and Francis, 2002. 217-245 p.
- MANOLI, A. *et al.* Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. **Journal of Plant Physiology**, Jena, Netherlands, v. 169, p. 807–815, 2012.
- MARQUES, T.L. *et al.* Physiological analysis and gene expression analysis of ZmDBP3, ZmALDH9, ZmAN13, and ZmDREB2A in maize lines. **Acta Scientiarum Agronomy**, [S.l.], v. 42, n. 1, p. 1-7, 2019.
- MARUYAMA, K. *et al.* Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 150, n. 4, p. 1972-1980, 2009.
- MIKIĆ, S. *et al.* Agronomic and molecular evaluation of maize inbred lines for drought tolerance. **Spanish Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 1-13, 2016.
- MORAIS, T.D.C. *et al.* Physiological and antioxidant changes in sunflower seeds under water restriction. **Journal of Seed Science**, [S.l.], v. 42, n. 1, p. 1-12, 2020.
- NAVRATIL, R.J.; BURRIS, J.S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, [S.l.], v. 74, n. 1, p. 159-161, 1982.
- NEPOMUCENO, A.L. *et al.* Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.l.], v. 35, n. 7, p. 1407-1416, 2000.
- PEREIRA, L. P. L. **Aspectos morfofisiológicos e agrônômicos de plantas de milho em diferentes populações de plantas e direcionamentos de plantio**. 2014. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.
- PEREZ-ALFOCEA, F. *et al.* Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. **Omics**, [S.l.], v. 15, n. 12, p. 893-901, 2011.
- QIN, F. *et al.* Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 50, n. 1, p. 54-69, 2007.
- RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, [S.l.], v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.
- RAO, X. *et al.* An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostat Bioinforma Biomath**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 71-85, 2013.
- REDINBAUGH, M.G.; SABRE, M.; SCANDALIOS, J.G. Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 87, n. 17, p. 6853-6857, 1990.
- ROY, S.J.; TUCKER, E.T.; TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 232-239, 2011.

RUIJTER, J.M. *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 37, n. 6, p. 1-12, 2009.

SANTOS, M.C. *et al.* Enzymatic activity and gene expression related to drought stress tolerance in maize seeds and seedlings. **Bioscience Journal**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 1-13, 2021.

TEJEDA, L.H.C. **Déficit hídrico em plântulas de milho: aspectos morfológicos e moleculares**. 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

VERMA, A.K.; DEEPTI, S. Abiotic stress and crop improvement: current scenario. **Advances in Plants & Agriculture Research**, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 345-346, 2016.

VILELA, D. R. **Características agronômicas e expressão de enzimas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho**. 2019. 51 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

VON PINHO, I.V. **Fenotipagem e expressão gênica para tolerância ao déficit hídrico em milho**. 2021. 114 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

WEI, X. *et al.* Overexpression of ZmSRG7 Improves Drought and Salt Tolerance in Maize (*Zea mays* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 23, n. 21, p. 13349, 2022.

ZHANG, A. *et al.* Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 141, n. 2, p. 475-87, 2006.

ZHANG, H., *et al.* Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**, [S.l.], v. 23., n.1, p. 104-119, 2022.

ZHANG, Q. *et al.* Identification of drought tolerant mechanisms in a drought-tolerant maize mutant based on physiological, biochemical and transcriptomic analyses. **BMC Plant Biology**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 1-14, 2020.