



GUSTAVO EVANGELISTA OLIVEIRA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO
DAS ENZIMAS AMILASES EM SEMENTES DE
LINHAGENS DE MILHO**

LAVRAS - MG

2012

GUSTAVO EVANGELISTA OLIVEIRA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
AMILASES EM SEMENTES DE LINHAGENS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Renzo Garcia Von Pinho

Coorientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Oliveira, Gustavo Evangelista.

Qualidade fisiológica e expressão das enzimas amilases em
sementes de linhagens de milho / Gustavo Evangelista Oliveira. –
Lavras : UFLA, 2012.

55p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Renzo Garcia Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Qualidade de sementes. 3. qRT-PCR. 4. α -
amilase. 5. β -amilase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

GUSTAVO EVANGELISTA OLIVEIRA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
AMILASES EM SEMENTES DE LINHAGENS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2012.

Dr. João Bosco dos Santos UFLA

Dra. Édila Vilela Resende Von Pinho UFLA

Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Orientador

LAVRAS - MG

2012

Aos meus pais João Almir e Roseane, pelo exemplo de vida, educação, torcida e amor; a meu irmão Felipe pelo apoio e amizade e a Thaís pelo amor, companheirismo, apoio e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela conquista de mais esta vitória.

Aos meus pais, João Almir e Roseane, pelo amor incondicional, incentivo, apoio e carinho.

Ao meu irmão Felipe pelo carinho, amizade e alegria.

A minha namorada Thaís pelo amor, dedicação, alegria, incentivo e compreensão.

Aos meus avós pelos conselhos sábios, amor e orações.

Aos meus Padrinhos, Tios e primos pelo apoio, incentivo e torcida.

A Cida, Vinicius, Vanessa e Afonso pela torcida, apoio e orações.

Aos Professores Renzo e Édila pela orientação, ensinamentos, profissionalismo, amizade e paciência.

Ao Max (*in memoriam*) pelo exemplo de força, esperança e amizade.

Ao Professor João Bosco pela disponibilidade e ensinamentos.

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

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de recursos para execução do projeto.

Aos professores pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Laboratório de Sementes, pelo auxílio na execução dos experimentos e amizade.

Ao grupo do milho e estagiários do Laboratório de Sementes, por todo o auxílio e dedicação na execução do experimento, além da amizade e do companheirismo.

Aos colegas do Grupo de Estudo em Genética e Melhoramento de plantas pela convivência e aprendizado.

Aos amigos Paulo, Jaime, Karina, Ricardo, José Maria, Kaio e Danuzapela amizade sincera, companheirismo, honestidade, incentivos e bons momentos.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização de mais essa etapa.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo. Assim, o estudo da expressão de genes associados a essa característica é importante no processo de seleção de genótipos em programas de melhoramento. Neste trabalho objetivou-se estudar a expressão gênica das enzimas amilases, importantes no processo de germinação de sementes de milho, de diferentes genótipos e tamanhos. O experimento foi conduzido em área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas sementes de quatro linhagens de milho discrepantes quanto a qualidade fisiológica, classificadas em dois tamanhos. Para avaliar a qualidade fisiológica utilizou-se os testes de germinação, emergência, índice de velocidade de emergência e envelhecimento artificial. Para a quantificação da atividade das enzimas α -amilase e β -amilase utilizou-se a técnica de espectrofotometria em sementes secas e sementes embebidas das linhagens. A expressão da enzima α -amilase foi avaliada ainda pela técnica de eletroforese e a expressão dos genes *Alpha amylase B73*, *Alpha amylase (LOC542522)*, *Isoamylase mRNA clone 353244*, *Beta amylase 5 (amyb5)* e *Ubiquitina Desidrogenase Alcoólica ADH* (controle endógeno) foi estudada pela técnica de *qRT-PCR* em sementes secas e embebidas das linhagens. Foi observado que há expressão diferenciada das enzimas amilases em sementes de linhagens com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Maior expressão das enzimas amilases é observada em sementes de milho embebidas. Há maior expressão de transcritos em sementes de menor tamanho quando embebidas.

Palavras-chave: Qualidade de sementes. *qRT-PCR*. α -amilase e β -amilase.

ABSTRACT

The physiological quality of maize seeds is influenced by genotype. Thus, study of gene expression associated with this feature is important in genotypes selection process in breeding programs. This work aimed to study the gene expression of amylase enzymes, important in the process of maize seed germination, in different genotypes and sizes. The experiment was conducted in the experimental area and the Central Laboratory of Seed of the Department of Agriculture, at the Federal University of Lavras. Seeds of four maize inbred lines differing on physiological quality, as classified in circular sieves in two sizes. To evaluate the physiological quality we used the germination test, emergence of plants, emergence speed index and accelerating aging test. To quantify the activity of the amylase enzymes was used spectrophotometry in dry and soaked inbred lines seeds. The expression of α -amylase enzyme was also examined by electrophoresis and the expression of genes Alpha amylase B73, Alpha amylase (LOC542522), Isoamylase mRNA clone 353244, Beta amylase 5 (amyb5), Ubiquitin and Alcohol Dehydrogenase ADH (endogenous control) was studied by qRT-PCR technique in different inbred lines seeds, dry and soaked. There is different amylases expression in inbred lines seeds with different levels of physiological quality. Higher amylases expression is observed in corn soaked seeds. There is higher expression of transcripts in seeds of small size, when soaked.

Keywords: Seed quality. qRT-PCR. α -amylase and β -amylase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Padrões isoenzimáticos da α -amilase de sementes de milho embebidas (E) de diferentes linhagens e tamanhos, pequeno (P) e grande (G), reveladas para α -amilase.....	42
Figura 2	Atividade de amilases em sementes de milho de diferentes linhagens, e de dois tamanhos, pequeno (P) e grande (G), secas e embebidas.....	43
Figura 3	Perfil da expressão quantitativa relativa do gene Isoamyla sem RNA clone 353244 (IsoAmy), em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes, secas e embebidas	44
Figura 4	Perfil da expressão quantitativa relativa do gene <i>Alpha amylase</i> B73 (<i>AmyB73</i>), em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes, secas e embebidas	45
Figura 5	Perfil da expressão quantitativa relativa do gene <i>Alpha amylase</i> (LOC542522), em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes,secas e embebidas	46
Gráfico 1	Curva de dissociação ou de <i>Melting</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das linhagens utilizadas.....	26
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados na análise de <i>qRT-PCR</i> em sementes de diferentes linhagens de milho.....	34
Tabela 3	Resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação, envelhecimento artificial (EA), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência de plântulas das sementes de milho de diferentes linhagens e de dois tamanhos (pequena e grande).....	37
Tabela 4	Resultados médios (%) do teste de germinação de sementes de milho de diferentes linhagens e de dois tamanhos pequeno (P) e grande (G), avaliados em diferentes dias	38
Tabela 5	Resultados médios (%) de vigor obtidos pelo teste de envelhecimento artificial (EA), emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de milho de diferentes linhagens e tamanhos pequeno (P) e grande (G)	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Mercado de sementes.....	14
2.2	Qualidade de sementes.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Local.....	26
3.2	Material Genético.....	26
3.3	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes.....	28
3.3.1	Teste de Germinação.....	28
3.3.2	Emergência de plântulas e Índice de Velocidade de Emergência (IVE).....	28
3.3.3	Envelhecimento artificial.....	29
3.4	Análise da expressão da enzima α -amilase por meio da técnica de eletroforese.....	29
3.5	Expressão de amilases totais por meio da técnica de espectrofotometria.....	30
3.6	Análise da expressão das enzimas β -amilase e α -amilase por meio da técnica de <i>qRT-PCR</i>	31
3.6.1	Extração de <i>RNA</i> e Purificação.....	31
3.6.2	Síntese de <i>cDNA</i>	32
3.6.3	Desenho de <i>primers</i>	33
3.6.4	<i>PCR</i> em tempo real.....	34
3.6.5	Análise dos resultados.....	35
3.7	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Qualidade Fisiológica.....	37
4.2	Expressão gênica das enzimas α e β -amilase por meio da técnica de eletroforese, espectrofotometria e <i>qRT-PCR</i>	41
5	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho assume importante papel na agricultura, sendo que no Brasil 27,5% da área cultivada com grãos correspondem ao milho (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012). Neste contexto, tem sido observado aumento da demanda de sementes híbridas de milho com alta qualidade principalmente com a comercialização de transgênicos, o que exige das empresas produtoras, investimento em programas de qualidade.

De uma maneira geral não tem sido observado nos programas de melhoramento de milho um direcionamento durante os processos de seleção até os ensaios para o registro de novas cultivares, para a característica de qualidade fisiológica. No entanto, após os ensaios de valor de cultivo e uso para o registro de cultivares, ou seja, quando as cultivares já foram desenvolvidas após vários anos de seleção, tem-se deparado com cultivares produtivas, mas, com baixa qualidade fisiológica, o que inviabiliza a oferta dessa nova cultivar no mercado.

Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes é influenciada pelo genótipo e assim a seleção para essa característica deve ser considerada nos programas de melhoramento. Além disso, tem sido observada, em alguns trabalhos, a influência do tamanho das sementes sobre a qualidade fisiológica. A expressão dos genes associados à qualidade fisiológica pode ser avaliada por meio de análises de germinação e vigor, e ainda pelas análises de transcritos de proteínas em sementes.

Durante o processo de germinação de sementes de milho, o embrião produz e secreta giberelinas naturais para o endosperma. Esses hormônios induzem o desenvolvimento de enzimas hidrolíticas na camada de aleurona, tais como as enzimas α -amilase e β -amilase, que são responsáveis pela degradação

das reservas que se encontram no endosperma e essas são sintetizadas na camada de aleurona.

A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho. As α -amilases constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos (FRANCO et al., 2002). Essa enzima juntamente com a enzima β -amilase estão altamente relacionadas à qualidade de sementes. Por isso, o estudo da expressão gênica dessas enzimas é importante para o conhecimento do comportamento genético, podendo assim auxiliar em programas de melhoramento genético de milho, voltado para qualidade fisiológica de sementes.

Desta forma, o objetivo neste trabalho foi estudar a expressão das enzimas amilases associadas à qualidade fisiológica de sementes de milho, de diferentes genótipos e tamanhos de sementes. Objetivou-se ainda avaliar a expressão dessas enzimas em sementes secas e embebidas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mercado de sementes

A cultura do milho ocupa a terceira posição em área plantada em todo mundo e a segunda posição no Brasil, perdendo apenas para a soja. A produção brasileira de milho estimada na safra 2010/2011 é de 57,5 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2011). Considerando uma área colhida de 13,8 milhões de hectares, estima-se uma demanda por sementes de mais de 260 mil toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2010).

A taxa de utilização de sementes de milho é de aproximadamente 84% (ABRASEM, 2010), valor considerado alto quando comparado ao observado em outras espécies. Essa quantidade utilizada se deve ao uso de sementes híbridas, que apresentam alto valor agregado, resultando em maiores produtividades. Sabe-se que o aumento na produção, em plantas da geração F1, está diretamente relacionado com o efeito da heterose, fenômeno no qual o cruzamento entre linhagens produz um indivíduo superior quanto ao rendimento e vigor (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004).

Também tem sido observado nos últimos anos aumento na utilização de sementes de híbridos simples de milho, correspondendo a 60% do mercado dessa cultura no Brasil. Essa tendência dos agricultores utilizarem mais sementes de híbridos simples mostra o investimento cada vez maior em alta tecnologia (ABRASEM, 2009). E também, a necessidade de programas eficientes de controle de qualidade na produção de sementes, haja vista que na produção de híbrido simples as sementes são produzidas a partir de linhagens, que naturalmente, possuem menor qualidade fisiológica de sementes.

Outro fator a ser considerado é o aumento da comercialização de sementes transgênicas de milho no Brasil, o que exige das empresas produtoras, altos padrões de qualidade, devendo ser associados a sistemas produtivos rentáveis. Ressalta-se que em 2010 foram cultivados no Brasil sete milhões de hectares de milho transgênicos, o que corresponde aproximadamente a 50% da área total plantada com essa cultura, com aumento considerável da área cultivada em relação à safra de 2009, que foi de aproximadamente cinco milhões de hectares (ABRASEM, 2010).

O preço de sementes transgênicas é mais alto em relação às convencionais, mesmo assim, segundo o International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - ISAAA (2009) observa-se uma rápida adesão dos agricultores a essa tecnologia.

Nesse novo cenário, investimentos em tecnologias de produção de sementes são prioritários nas empresas, para a garantia de comercialização de sementes com alta qualidade fisiológica. Além de investimentos em técnicas de produção e processamento de sementes, a seleção de genótipos que apresenta sementes com alta qualidade é importante para garantir o registro e a comercialização de cultivares com sementes de alta qualidade fisiológica. Assim, torna-se cada vez mais importante que as empresas produtoras de sementes invistam em programas de controle de qualidade interno, por meio dos quais são controladas todas as etapas do processo de produção.

2.2 Qualidade de sementes

O uso de sementes de boa qualidade é requisito essencial para o sucesso no estabelecimento dos cultivos e na obtenção de elevados rendimentos. A qualidade das sementes é determinada pela interação entre atributos fisiológicos,

sanitários, genéticos e físicos, os quais interferem diretamente no potencial de desempenho em campo e durante o armazenamento (MARCOS FILHO, 2005).

A qualidade fisiológica de sementes depende de vários fatores: genéticos, de formação (microsporogênese, macrosporogênese e polinização), de maturação, os relacionados aos danos mecânicos, microrganismos e insetos, os decorrentes das condições ambientais durante o armazenamento e os relativos à densidade, ao tamanho e à idade das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Em algumas pesquisas têm sido observado a influência do tamanho da semente sobre a qualidade fisiológica. As sementes de maior tamanho normalmente são as que possuem embriões bem formados e com mais quantidades de reservas. Pode-se supor, então, que essas produzam plântulas mais vigorosas, principalmente sob condições diferentes daquelas consideradas ideais. Entretanto, nem sempre têm sido observadas relações entre o tamanho e a massa média da semente e o seu vigor, pelo fato de que os fatores ambientais podem interferir nos resultados (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Trabalhos realizados com o intuito de estudar a diferença na qualidade fisiológica de sementes de diferentes tamanhos são recorrentes na literatura. Entre esses, Faiguenbaum e Romero (1991) reportaram o melhor desempenho das sementes de milho de maior tamanho e formato achatado, quando comparadas com aquelas pequenas e arredondadas durante a germinação e a sobrevivência de plantas no campo, inclusive na produção de grãos. Martinez et al. (1998) também verificaram que as sementes grandes e achatadas de milho híbrido apresentam maior potencial de armazenabilidade comparado as de menor tamanho e arredondadas, em condições controladas de temperatura e umidade relativa. Já, Scotti e Silveira (1977), Silva e Marcos Filho (1982) e Von Pinho et al. (1995) encontraram diferenças significativas no tamanho e no formato das sementes durante o estágio de plântulas e no estabelecimento da

cultura, e esses atributos não interferiram nas fases subsequentes da lavoura. Esses resultados foram também reportados por Andrade et al. (1997) e Nafziger (1992), os quais concluíram que o tamanho e o formato das sementes de milho não apresentaram nenhum efeito significativo na produção de grãos. Embora haja uma literatura extensa, os resultados são ainda contraditórios e parece não haver uma opinião consensual sobre o assunto.

Por meio de algumas pesquisas têm sido observado que a qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo (GOMES et al., 2000; HOECHER et al., 2006; JOSÉ et al., 2004).

A maior parte de estudos dessa natureza está relacionada à influência da heterose ou vigor híbrido na germinação (CAUSSE et al., 1995; GOMES et al., 2000; HOECHER et al., 2006; JOSÉ et al., 2004; ROOD et al., 1990; ROOD; LARSEN, 1988). Em vários desses trabalhos, foi constatado que as plantas híbridas apresentam maior eficiência nos sistemas enzimáticos do que as linhagens, o que explica o maior vigor das sementes.

Por meio de estudos bioquímicos, foi observado que o controle da síntese de α -amilase e subsequente hidrólise das reservas de sementes, apresenta uma ligação entre as giberelinas e a heterose em milho (PALEG, 1965). Rood e Larsen (1988), investigando o envolvimento da α -amilase na heterose em plântulas de milho, verificaram que, após 48 horas de embebição da semente, a atividade dessa enzima nas plântulas híbridas foi maior do que a de seus parentais, bem como a concentração do ácido giberélico (GA3), resultando numa hidrólise mais rápida do amido do milho. Segundo Rood et al. (1990), linhagens de milho são menos vigorosas que seus híbridos descendentes, em parte por causa da deficiência de giberelinas. Houve correlação positiva entre o teor de giberelinas encontrado nas plântulas e os aumentos da taxa de crescimento, área foliar e altura de plantas de milho. Os autores relataram que uma das causas da depressão por endogamia é a deficiência de giberelinas.

Estimativas de heterose associadas aos caracteres que se expressam logo após a emergência foram obtidas por Hoecker et al. (2006). Para isso, avaliaram quatro linhagens de milho duro e dentado e os híbridos oriundos das linhagens, bem como os recíprocos. Eles observaram alta heterose para os caracteres avaliados, em torno de 51%, demonstrando que a heterose é manifestada durante os estágios iniciais após a emergência.

Ainda procurando explicar a origem da heterose na germinação e vigor das sementes, alguns trabalhos foram realizados, como os de Mino e Inoue (1994), em que a maior velocidade de germinação e o crescimento vigoroso das plântulas estavam associados com a maior atividade metabólica de RNA, proteínas e *DNA* nos embriões. Os autores verificaram também que, no embrião híbrido, o metabolismo de proteínas e lipídeos é superior aos das linhagens, favorecendo o crescimento do eixo embrionário e uma maior germinação das sementes. Li et al. (2009) estudando os perfis de expressão gênica entre híbridos altamente heteróticos e seus pais, assim como híbridos de baixa heterose, verificaram que ambos apresentaram maior expressão gênica que seus pais, em relação aos caracteres avaliados.

Causse et al. (1995) observaram relação entre a atividade da sacarose fosfato sintetase (SPS) e crescimento vegetativo inicial nas plântulas de milho. A maior atividade da SPS, que ocorreu nas plântulas híbridas, foi correlacionada com a maior produção de matéria seca. O autor não verificou diferença significativa para a atividade da ADP glucose pirofosforilase entre os híbridos e as linhagens estudadas.

A estimativa da heterose ou vigor híbrido para caracteres associados à qualidade fisiológica foi obtida por Gomes et al. (2000). Foram avaliadas seis linhagens de milho e os seus respectivos híbridos simples e híbridos simples recíprocos, constatando que as sementes híbridas de milho apresentaram qualidade fisiológica superior quando comparadas às linhagens, evidenciando a

expressão da heterose na qualidade fisiológica de sementes. Também foi verificada a maior importância da capacidade específica de combinação, ou seja, dos efeitos não aditivos no controle genético da qualidade fisiológica.

Souza et al. (2008) estudaram os parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de progênies intra e interpopulacional de milho. Neste trabalho foi observado que as populações de meios irmãos intra e interpopulacional diferem em relação à qualidade das sementes; as estimativas da heterose foram de pequena magnitude, 4,5% no teste padrão de germinação, 10,1% no envelhecimento acelerado e 5,7% na velocidade de germinação. A maior parte da variância genética aditiva interpopulacional (σ^2_{A12} ou σ^2_{A21}) foi explicada pela variância aditiva intrapopulacional (σ^2_{A11} ou σ^2_{A22}). Esse fato evidencia menor importância da dominância e indica que a seleção recorrente recíproca deve ser menos eficiente que a intrapopulacional para esses caracteres.

Além do efeito de heterose, a qualidade fisiológica de sementes também sofre efeito materno, uma vez que na fertilização uma das células espermáticas do grão de pólen funde-se à oosfera para formar o zigoto e a outra célula espermática funde-se a um tecido formado a partir da diferenciação dos dois núcleos polares, dando origem a uma estrutura triploide, que formará o endosperma. Portanto, o zigoto que dará origem a planta possui 50% da informação dos cromossomos de origem paterna e 50% de origem materna. Já o endosperma e a camada de aleurona apresentam 66,66% dos cromossomos maternos e apenas 33,33% dos cromossomos paternos (VEIT et al., 1993). O efeito materno sobre a expressão de genes são muito mais forte no endosperma e na camada de aleurona do que em tecidos vegetativos (STUPAR; HERMANSON; SPRINGER, 2007).

Rood e Larsen (1988) estudaram a relação de giberelinas (GAs) e amilases com a heterose. Foram utilizadas duas linhagens e seu respectivo híbrido. Os autores relataram que a maior concentração endógena de GAs nas

sementes híbridas aumentou a atividade da α -amilase nas plântulas híbridas e, conseqüentemente, uma hidrólise mais rápida do amido, que é combustível para o crescimento inicial das plântulas. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que as GAs controlam a biossíntese da α -amilase, que estão envolvidas na regulação da heterose em sementes de milho. Apesar de ter sido demonstrado o efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes em várias pesquisas, pode-se considerar ainda o efeito de genes aditivos, ou seja, o comportamento “*per se*” da linhagem sobre a qualidade fisiológica de sementes (GOMES et al., 2000; JOSÉ et al., 2004 ; SOUZA et al., 2008).

Gomes et al. (2000), observaram que sementes de linhagens com baixa qualidade fisiológica influenciam na qualidade fisiológica das sementes híbridas, quando essas linhagens são utilizadas, principalmente, como parental feminino. Também José et al. (2004), observaram influência do genótipo e efeito materno na tolerância de sementes às altas temperaturas de secagem, com efeitos diretos na germinação e no vigor de sementes. Assim, a seleção de linhagens que apresentam sementes com alta qualidade fisiológica é importante para o desenvolvimento de híbridos nos programas de melhoramento.

Durante a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho podem ser utilizados a expressão de genes associados a esta característica, pelos testes de germinação, vigor, análises proteicas e ainda por meio de transcritos.

Nos programas de controle de qualidade interno a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho tem sido realizada, principalmente, por meio de testes de germinação, teste de frio e teste de envelhecimento artificial (CATÃO et al., 2010; COIMBRA et al., 2009; FARIA et al., 2002) . Além dos testes fisiológicos, em algumas pesquisas, têm sido associada à expressão de enzimas, por meio da técnica de eletroforese, com a qualidade fisiológica de sementes de milho (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2004; FARIA et al., 2002; GOMES et al., 2000; JOSÉ et al., 2005; ROSA et al., 2000, 2004). Em

algumas destas pesquisas foi associada à expressão das enzimas α -amilase e β -amilase com a qualidade fisiológica de sementes de milho.

Essas enzimas são importantes nessa espécie, uma vez que a semente de milho é rica em amido, sendo essa principal substância de reserva, representando 70% do peso total do grão (WU et al., 2009). O amido de milho comum é uma mistura de aproximadamente 28% de amilose e 72% amilopectina. Durante a germinação das sementes, as reservas insolúveis de alto peso molecular são degradadas e convertidas a formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou de produção de energia. Segundo Bewley e Black (1985), as modificações metabólicas que ocorrem na germinação são resultados da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência, a exemplo das enzimas α -amilase e β -amilase.

A β -amilase é uma α -1,4-D-glucano maltohidrolase (EC 3.2.1.2.) que catalisa a liberação de maltose e dextrinas a partir das extremidades não redutoras do amido. A β -amilase é sintetizada durante o processo de desenvolvimento da semente. Nas sementes secas são encontradas duas formas: uma livre, forma ativa, e uma limite, forma pouca ativa, que representa aproximadamente 75% do total de β -amilase. A liberação e ativação de β -amilase durante a germinação é acompanhada pelo acúmulo adicional de suas isoformas (SOPANEN; LAURIÈRE, 1989).

A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho. As α -amilases constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos (FRANCO et al., 2002). Usualmente ela não está presente nas sementes secas, sendo sintetizada “de novo” e secretada pela camada de aleurona (KIGEL; GALILI, 1995).

A síntese e a secreção da α -amilase iniciam-se no escutelo de forma rápida e por um breve período, no máximo até o quarto dia. Já a camada de aleurona necessita de um tempo maior para realizar a síntese e secreção da α -amilase. No entanto, a camada de aleurona tem a capacidade de secretar maior quantidade de α -amilase e por um período de tempo maior. Estima-se que o pico da síntese de α -amilase é entre cinco e sete dias e vai gradualmente diminuindo até o fim da germinação (SUBBARAO; DATTA; SHARMA, 1998).

As giberelinas estão envolvidas na regulação da mobilização das reservas, no entanto, para que a germinação e o crescimento de plântulas de milho possam ocorrer após a embebição das sementes, a secagem das sementes é necessária para sensibilizar a camada de aleurona ao ácido giberélico e ativar a síntese de α -amilase (ROSA et al., 2000).

Durante a germinação das sementes, a giberelina é sintetizada no embrião e secretada na camada de aleurona (LOVEGROVE; HOOLEY, 2000). Nas células da aleurona, a giberelina é detectada através de receptores como GID1, resultando na degradação de reguladores negativos, aumentando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e cGMP que causa a indução dostrans-ativadores, promovendo assim a expressão das α -amilases (NAKAJIMA et al., 2006; XIE et al., 2007).

Segundo Carvalho e Nakagawa (2000) várias pesquisas têm sido desenvolvidas para detectar as diversas reações metabólicas que envolvem a síntese e a degradação de moléculas durante o desenvolvimento, a germinação e a deterioração de sementes. Esses mesmos autores afirmam que durante a fase de maturação das sementes, a análise do acúmulo de materiais de reserva por meio de marcadores moleculares pode fornecer indícios da qualidade das sementes e que a atividade da enzima α -amilase tem sido utilizada como marcador relacionado com a tolerância à secagem de sementes de milho.

Além do estudo de expressão gênica de enzimas associadas à qualidade fisiológica de sementes por meio da técnica de eletroforese, a determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN, 2001). Uma das técnicas utilizadas para a avaliação dos níveis de transcritos é a PCR em tempo real. Essa técnica tem sido amplamente utilizada na área médica, por apresentar alta sensibilidade e reprodutibilidade em um tempo de análise relativamente curto. Uma vantagem dessa técnica de *PCR* é que a amplificação da seqüência de *DNA* alvo pode ser acompanhada durante toda a reação, pelo monitoramento indireto da acumulação de produtos. Usando esse método, um gene alvo pode ser quantificado através de uma curva padrão, a partir de quantidades conhecidas de um gene de referência (BONFINI et al., 2002; DING et al., 2004).

A quantificação é a característica mais importante do *qRT-PCR*. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser deduzida considerando diferenças de *Ct* entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000). Comparada com o PCR clássico, uma das principais vantagens do qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis. É altamente sensível na detecção de *DNA* ou *RNA* devido à combinação de amplificação realizada pelo passo de *PCR* e o sistema de detecção. Em qualquer caso a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de *PCR*, por gel de eletroforese, curva de dissociação e dados de sequenciamento.

Em estudos com plantas, uma das utilizações dessa técnica é a quantificação do nível de transcritos em órgãos vegetais (HERNANDEZ et al., 2001; SONG et al., 2011; WANG et al., 2012) além de, detecção de organismos geneticamente modificados (AGALETA et al., 2011; BAKO; GALL; BALAZS,

2011; HERNANDEZ et al., 2001), estudar famílias de genes (BARROS et al., 2012), determinar o número de inserções de *T-DNA* em plantas transgênicas (YANG et al., 2005) e muitas outras aplicações.

A quantificação via *qRT-PCR* envolve a medição do número de cópias de genes de controle endógeno, ou gene de referência, expostos as mesmas condições de manipulação dos genes alvos para amplificação (HERNANDEZ, 2004). Para realizar uma análise de *PCR* em tempo real é necessário pelo menos um controle endógeno, pois esse irá fornecer um valor estimado da quantidade total do *DNA* na amostra. A amplificação de sequências específicas e sua quantificação relativa são baseadas nesses genes que devem obedecer três requisitos: ser específico para a espécie, exibir baixo número de cópias, e baixa heterogeneidade entre cultivares (DING et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2001).

Muitas pesquisas têm sido realizadas para identificar genes de referência para as diferentes culturas. Para milho tem-se utilizado principalmente *ADH*, invertase-1, zeína, amido-sintaseIIb, *GAPDH*, 18s rRNA e ubiquitina (HERNANDEZ et al., 2004; LI; HE; JIN, 2009; LUO et al., 2008; SCHOLDBERG et al., 2009; SONG et al., 2011; SPOLLEN et al., 2008; UZAROWSKA et al., 2009; ZHANG et al., 2007). Outros exemplos são: a lectinae β -actina para soja, cruciferina e BnACCg8 gene para colza (DELANO et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2001) e gene *SPS* para arroz (DING et al., 2004) entre muitos outros.

A expressão gênica utilizando *qRT-PCR* em tempo real, foi utilizada por Song et al. (2011) em sementes de milho, no intuito de elucidar o metabolismo da geberelina. Análises dos perfís de expressão mostraram que 15 transcritos, de genes relacionados ao metabolismo de GA, podem ser detectados durante a germinação das sementes de milho.

Este estudo fornece uma evidência adicional de que o aumento na síntese de GA ativa no embrião é necessário para fatores geradores de germinação. Além disso, muitas variedades de genes metabólicos de GA foram detectados, o que revela a complexidade do mecanismo subjacente da regulação da GA na germinação de sementes.

Na ciência básica, o *qPCR* tem sido amplamente empregado na quantificação de transcritos específicos (*qRT-PCR*) e na análise de famílias multigênicas. Assim, a técnica de *qRT-PCR* pode ser utilizada em estudos de expressão gênica das enzimas amilases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, município de Lavras, MG, a 910 m de altitude, latitude de 21°14'S e longitude de 45°00 W. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, fase Cerrado. Esta região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Koppen. A temperatura média anual é de 19,4°C e a pluviosidade se distribui, principalmente de outubro a abril, com valores anuais de 1529,7 mm.

3.2 Material Genético

Foram utilizadas sementes de quatro linhagens cedidas pela empresa Geneseeeds Recursos Genéticos Ltda, discrepantes quanto à qualidade de sementes segundo Gomes et al. (2000), sendo duas com alta qualidade (63 e 64) e duas com baixa qualidade (43 e 54) (Tabela 1).

Tabela 1 Características das linhagens utilizadas

Linhagem	Ciclo	Grão	Porte
43	Normal	Semiduro	Alto
54	Precoce	Duro	Baixo
63	Precoce	Duro	Médio
64	Precoce	Duro	Médio

Inicialmente foi instalado um campo para a multiplicação das sementes das linhagens. Esse campo foi composto de seis linhas de dez metros para cada linhagem, instaladas no espaçamento de 0,8m. A adubação, manejo e tratamentos culturais foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura.

Para evitar cruzamentos indesejados, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilos-estigmas. Quando os estilos-estigmas estavam receptivos foram realizadas manualmente as autofecundações.

As espigas foram colhidas manualmente quando o teor de água das sementes atingiu aproximadamente 25%. A despalha foi realizada manualmente e a secagem foi realizada em secador de espigas à temperatura de 35° C, até as sementes atingirem teor de água de 13%. Após a secagem e trilha manual as sementes foram classificadas quanto ao tamanho, em peneiras de crivos circulares, e foram agrupadas naquelas retidas nas peneiras 20 e 22, denominadas de sementes grandes e naquelas retidas nas peneiras 18 e 16, denominadas de sementes pequenas.

Após a classificação das sementes, foi realizado o teste de germinação para verificar a qualidade inicial do lote. Pelos resultados verificou-se que as sementes de todos os genótipos apresentavam alta qualidade fisiológica, pois as condições experimentais durante a fase de produção dessas foram favoráveis. Assim para a seleção de genótipos discrepantes quanto à qualidade fisiológica das sementes, foi necessário submeter às mesmas ao envelhecimento por meio do teste de envelhecimento artificial. Sendo assim, as sementes foram tratadas com o fungicida Vitavax®-Thiram 200 SC, na dosagem 250 ml para cada 100 Kg de sementes. O método utilizado para o envelhecimento foi o de minicâmaras do tipo "gerbox", onde as sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água, onde permaneceram incubadas durante 96 horas, numa temperatura de 41°C (VIEIRA; CARVALHO,

1994). As sementes envelhecidas foram homogeneizadas e secadas a sombra à temperatura ambiente até que atingissem o teor de água inicial de 13%.

3.3 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes das quatro linhagens foi feita inicialmente, por meio de testes de germinação e vigor.

3.3.1 Teste de Germinação

A semeadura foi realizada entre papel toalha tipo *Germitest* umedecido com água destilada na proporção de $2,5 \text{ ml.g}^{-1}$ de papel. As sementes permaneceram no germinador regulado para 25°C , seguindo as descrições das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As avaliações das plântulas normais foram efetuadas aos três, cinco e sete dias após a instalação do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais e o teste foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes.

3.3.2 Emergência de plântulas e Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

Foram avaliadas 200 sementes, distribuídas em bandejas contendo o substrato solo mais areia na proporção 1:2. As bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento vegetal regulada a 25°C e as avaliações foram realizadas diariamente a partir do início da emergência das plântulas até o estabelecimento do estande. O índice de velocidade de emergência foi determinado segundo a fórmula proposta por Edmond e Drapala (1958), e o estande final aos 14 dias após a semeadura.

$$M = \frac{(N1 \times G1) + (N2 \times G2) + \dots + (Nn \times Gn)}{G1 + G2 + \dots + Gn}$$

Onde: M - número médio de dias para germinação; N1 - número de dias para a primeira avaliação; G1 - número de sementes germinadas na primeira avaliação; Nn - número de dias para a última avaliação; Gn - número de sementes germinadas na última avaliação.

3.3.3 Envelhecimento artificial

O método utilizado foi o de minicâmaras do tipo "*gerbox*" onde as sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas à temperatura de 41°C, e em seguida foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente (VIEIRA; CARVALHO, 1994). As avaliações foram realizadas aos cinco dias após a sementeira, computando-se o percentual de plântulas normais.

3.4 Análise da expressão da enzima α -amilase por meio da técnica de eletroforese

Sementes pequenas e grandes das quatro linhagens foram semeadas como descrito no teste de germinação. Após 70 horas, os eixos embrionários foram retirados e os endospermas triturados a frio em nitrogênio líquido (ROOD; LARSEN, 1988) e armazenados em freezer a -81°C. Outra amostra de sementes secas foi triturada a frio em nitrogênio e armazenada em freezer a -81°C, até o momento das análises. Para a extração da enzima α -amilase foram adicionados 200 μ L de tampão de extração Tris-HCl, 0,2M, pH 8,0 a 0,1g do pó obtido. O homogeneizado foi mantido por 12 horas em geladeira a 5°C, sendo

que, após este período, as amostras foram centrifugadas a 16.000g a 4°C, por 60 minutos. Volumes de 40µL do extrato proteico foram aplicados aos géis de poliacrilamida 7,5% (gel separador-contendo amido) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-Glicina pH 8,9 e as corridas eletroforéticas foram efetuadas a 12mA no gel concentrador e 24mA no gel separador. Os géis foram revelados para o sistema α -amilase, em solução tampão de acetato de sódio 50mM, pH 5,6 e solução de iodo 10mM, contendo iodeto de potássio, 14mM.L⁻¹, segundo Alfenas (1998).

3.5 Expressão de amilases totais por meio da técnica de espectrofotometria

Amostras de sementes pequenas e grandes de cada linhagem foram semeadas como descrito no teste de germinação. Após 70 horas, os eixos embrionários foram retirados e os endospermas triturados a frio em solução de nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -81°C. Outra amostra de sementes secas foi triturada a frio em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -81°C, até o momento das análises. A extração da enzima ocorreu pela adição de 10ml de tampão de acetato de sódio 50mMol, pH 5,6 em 1g do pó obtido. As amostras foram mantidas por 12 horas em geladeira a 5°C. Após esse período foram centrifugadas a 16.000g a 4°C, por 60 minutos e o sobrenadante foi separado para a realização do teste.

Para a quantificação das amilases foram utilizados 0,1 ml do sobrenadante e 0,1 ml de substrato (amido 1% em tampão de acetato de sódio 50mM, pH 5,6). As amostras foram incubadas por diferentes tempos (0, 20, 40, 60 e 80 minutos) e adicionou-se 0,2 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS) para inibir a reação. Após o período de incubação as amostras foram aquecidas por 5 minutos em banho-maria (100 °C) e em seguida resfriadas em água corrente e em seguida adicionaram-se 1,6 ml de água. As leituras foram realizadas em

espectrofotômetro a 550 nanômetros e a atividade da amilase foi calculada a partir de uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade (U) equivale a um microMol de produto formado por minuto nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em unidades por grama de sementes.

3.6 Análise da expressão das enzimas β -amilase e α -amilase por meio da técnica de *qRT-PCR*

3.6.1 Extração de RNA e Purificação

A extração do RNA foi realizada a partir das sementes das linhagens com alta e baixa qualidade fisiológica e dois tamanhos as quais foram maceradas, em nitrogênio líquido e com a adição do reagente *Pure Link RNA Plant*[®] (*Invitrogen*), seguindo as especificações do fabricante.

Foram maceradas cinco sementes em nitrogênio líquido e transferidos 100mg para o microtubo, juntamente com 500 μ L do reagente *Concert* gelado (4°C) e homogeneizados em vórtex. Em seguida, os tubos foram expostos à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por dois minutos, à temperatura ambiente, com velocidade de 14.000g, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de NaCl 5 M e as amostras homogeneizadas em vórtex, por cinco segundos. Na sequência, foram adicionados 300 μ L de clorofórmio e os tubos foram submetidos à inversão por 5 X. Para separar as fases, as amostras foram submetidas à centrifugação de 14.000g, durante dez minutos, a temperatura de 4° C, e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado um volume equivalente à fase aquosa de isopropanol gelado e homogeneizado em vórtex, durante cinco segundos. As

amostras foram mantidas à temperatura ambiente por dez minutos e posteriormente foram submetidas à centrifugação também por dez minutos a 4° C e 14.000g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 75% gelado e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto, a temperatura ambiente (14.000g). O líquido residual foi removido do tubo com a pipeta e o RNA foi ressuscitado em 20 µL de água Milli-Q autoclavada. Contudo as amostras foram armazenadas a -20° C.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e visualizada após coloração com brometo de etídio. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

Após as extrações dos ácidos nucleicos as amostras foram tratadas com *DNase Free* para evitar qualquer contaminação com *DNA*. Para isso foi utilizado o *DNase DNA Free* (Ambion) e protocolo realizado conforme recomendações do fabricante.

Para comprovar a eficiência da descontaminação foi feito uma reação de PCR convencional com todas as amostras, onde não se esperava a amplificação das mesmas. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de *DNA* de sementes de milho e os *primers* dos controles endógenos Ubiquitina e Desidrogenase Alcoólica (*ADH*). As amplificações foram avaliadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.6.2 Síntese de *cDNA*

Após o processo de extração e purificação de *RNA*, foi realizada a síntese de *cDNA*. Para isso foi utilizado *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA®* da *Applied Biosystems*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Primeiramente, o *RNA* foi preparado a uma concentração de 1µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi

preparado um *mix* contendo 2 μL do tampão da enzima, 2 μL do *primer RT Random Primers*, 0,8 μL do *mix dNTP* (100 mM), 1 μL *Multi ScribeTM Reverse Transcriptase*, e água para um volume final de 10 μL /amostra. Para cada solução preparada de 10 μL de RNA a 1 μg , foram acrescentados 10 μL desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador *Multigene Gradient Labnet*, programado com três etapas: 10 min a 25°C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 min a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

A eficiência da síntese de *cDNA* foi comprovada por meio de *PCR* convencional com todas as amostras, onde se esperava a amplificação das mesmas. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de *DNA* genômico de milho e os *primers* dos genes endógenos Ubiquitina e *ADH*. As amplificações foram avaliadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.6.3 Desenho de *primers*

Para análise da expressão gênica pela técnica de *qRT-PCR*, os *primers* utilizados foram desenhados com o auxílio do *software Primer Express 3.0* (*Applied Biosystems*), após a busca das sequências dos genes no *site* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Tabela2). Como controles endógenos foram utilizados os genes da Ubiquitina e *ADH* (LIVAK; SCMITTGEN, 2001; SCHOLDBERG et al., 2009).

Tabela 2 *Primers* utilizados na análise de *qRT-PCR* em sementes de diferentes linhagens de milho

Gene		Sequência 5'-----3'
<i>Alpha amylase B73</i>	F	CCGGCTCCACGCAGAAC
	R	TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
<i>Alpha amylase (LOC542522)</i>	F	TGCAGCCTCCTAGTGCTTGAC
	R	TGGAAGAGGACCTGGGATTG
<i>Isoamylase mRNA clone 353244</i>	F	CATGAAGGACGAAACCAAAGG
	R	TCTGGAAGCCCAACAACCA
<i>Beta amylase5 (amyb5)</i>	F	GAACGCGCTAGCCAAGTATGT
	R	CGAACGTGTTGTGACAGTGA
Ubiquitina	F	AAGGCCAAGATCCAGGACAA
	R	TTGCTTTCCAGCGAAGATGA
Desidrogenase Alcoólica (ADH)	F	AGGACGCTGAGTTAAGACC
	R	CACATTTGGCAGATCAGTGC

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

3.6.4 PCR em tempo real

Para a análise da expressão gênica quantitativa por *qRT-PCR* foi utilizado o equipamento *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*, utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* e o *cDNA* obtido a partir de *RNA* extraído das sementes. As condições térmicas da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Software (Versão 2.0.1)*. Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de *cDNA* diluído 1:5, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen)* para um volume final 10,0 µL/amostra. Controles negativos e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises.

Foram utilizadas três replicatas técnicas, para cada gene em estudo, sendo os resultados normalizados usando CTs (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão dos genes de referência Ubiquitina e *ADH*.

O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold*). Foi utilizado o método do CT comparativo. Para isso, previamente foi realizado um experimento de validação para mostrar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referências são similares e bem próximas de 100% (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). As curvas padrões para os genes em estudo foram geradas a partir das seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento também permitiu a definição da melhor diluição *cDNA* utilizada em cada reação, a qual foi de 1:5.

3.6.5 Análise dos resultados

As amostras de menor expressão, para cada gene, foram utilizadas como amostras calibradoras e o método utilizado para medir a expressão relativa foi o Método da Curva Padrão Relativa, descrito no manual do aparelho (*AppliedBiosystems*). Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de *PCR* em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de *mRNA*'s das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de *mRNA*'s de controle. Após a obtenção dos dados brutos, estes foram analisados por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de *PCR*) do gene alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct$ (amostra) – Ct (controle endógeno) e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.7 Análise estatística

A análise dos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica seguiu o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2, sendo quatro linhagens e dois tamanhos de sementes, com quatro repetições. A comparação das médias dos tratamentos para os testes foi feita pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa estatístico R 2.14.1 (2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade Fisiológica

Pelos resultados da análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação, envelhecimento artificial, emergência e índice de velocidade de emergência (Tabela 3), verifica-se que houve efeito altamente significativo, com $p=0$, para a interação entre os fatores tamanho x linhagem e para cada fator isolado com exceção para o índice de velocidade de emergência onde o fator tamanho não foi significativo.

As médias dos dados obtidos estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5, juntamente com seus agrupamentos pelo teste de Scott e Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 Resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação, envelhecimento artificial (EA), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência de plântulas das sementes de milho de diferentes linhagens e de dois tamanhos (pequena e grande)

Fatores	GL	QM					
		(% Germinação)			EA	IVE	(% Emergência
		3 dias	5 dias	7 dias			
Linhagem	3	9319*	17225*	16,45*	156,83*	0,14924*	18,833*
Tamanho	1	496,1*	136,1*	28,12*	98*	0,000008	84,5*
Linhagem*Tamanho	3	132,8*	46,1*	43,45*	48,33*	0,06144*	19,5*
Resíduo	24	17,4	12,6	3,125	6,083	0,0010835	4,667
CV(%)		13,21	6,66	1,85	2,75	2,87	2,23

*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Durante o período do teste de germinação foram realizadas avaliações aos três, cinco e sete dias para um melhor entendimento do comportamento dos

genótipos ao longo do processo de germinação. Foram observados nas sementes das linhagens (43 e 54) definidas por Gomes et al. (2000) como de baixa qualidade, menores valores de germinação aos 3 e 5 dias, independente do tamanho da semente (Tabela 4). Aos sete dias, considerando as sementes pequenas, menor valor de germinação foi observado naquelas da linhagem 54 e maior valor de germinação foi observado em sementes da linhagem 64. Neste período para as sementes grandes, menor valor de germinação foi observado em sementes da linhagem 43. Uma semente com alto vigor possui um sistema de membranas bem estruturado e todo o aparato pronto para a germinação. Assim a qualidade das sementes está diretamente relacionada com a velocidade de germinação (MARCOS FILHO, 2005).

De maneira geral, nas sementes da linhagem 64 foram observadas médias superiores de germinação em todas as épocas de avaliação, independentemente do tamanho. Observa-se também nas sementes pequenas médias inferiores de germinação aos 7 e 5 dias para as linhagens 54 e 63.

Tabela 4 Resultados médios (%) do teste de germinação de sementes de milho de diferentes linhagens e de dois tamanhos pequeno (P) e grande (G), avaliados em diferentes dias

Linhagem	3 dias		5 dias		7 dias	
	P	G	P	G	P	G
43	2 C a	3 C a	9 C a	10 C a	96 B a	94 B a
54	2 C a	3 C a	14 C b	20 B a	91 C b	99 A a
63	47 B b	64 B a	86 B b	96 A a	95 B b	98 A a
64	60 A b	73 A a	96 A a	96 A a	99 A a	97 A a

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada época de avaliação, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Pelos resultados do teste de envelhecimento artificial (Tabela 5), menor vigor foi observado em sementes pequenas das linhagens 43 e 54 e sementes grandes da linhagem 43. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Gomes et al. (2000), os quais trabalharam com essas mesmas linhagens e verificaram que as linhagens 43 e 54 foram menos vigorosas que as demais. Também foi observado menor vigor em sementes pequenas das linhagens 54 e 64.

Tabela 5 Resultados médios (%) de vigor obtidos pelo teste de envelhecimento artificial (EA), emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de milho de diferentes linhagens e tamanhos pequeno (P) e grande (G)

Linhagem	EA		Emergência (%)		IVE	
	P	G	P	G	P	G
43	86 B a	83 B a	93 B b	98 A a	3,882 C b	3,712 B a
54	83 B b	93 A a	97 A a	99 A a	3,458A a	3,469A a
63	92 A a	95 A a	93 B b	100 A a	3,657 B a	3,575A a
64	91 A b	95 A a	99 A a	98 A a	3,491A a	3,729B b

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada época de avaliação, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Quanto à emergência de plântulas (Tabela 5), foi observado que as sementes grandes das quatro linhagens não diferem entre si. Para as sementes pequenas, valores inferiores foram observados em sementes das linhagens 43 e 63.

Os resultados do índice de velocidade de emergência obtidos pela utilização da fórmula proposta por Edmond e Drapala (1958), fornece o número médio de dias para emergência. Observa-se pelos resultados da Tabela 5 que para as sementes grandes os melhores índices foram para as linhagens 54 e 63,

enquanto que para sementes pequenas as melhores foram observados nas sementes das linhagens 54 e 64.

De uma maneira geral, nos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica observa-se menores valores de germinação e vigor em sementes da linhagem 43 e melhor qualidade fisiológica nas sementes da linhagem 64. Ressalta-se que dependendo do teste utilizado há algumas inversões de comportamento. Segundo Gomes et al. (2000), José et al. (2004) e Souza et al. (2008), a qualidade fisiológica de sementes de milho é controlada por vários genes e desta forma, as condições durante o processo de produção da semente podem interferir no comportamento da linhagem, o que demanda a avaliação da qualidade de sementes produzidas em diferentes condições climáticas.

As condições climáticas durante o processo de produção de sementes foram favoráveis à qualidade fisiológica das sementes. Por esse motivo, houve a necessidade de submeter às sementes ao teste de envelhecimento, antes da avaliação da qualidade fisiológica pelos testes de germinação e vigor. Ressalta-se ainda as diferenças estatísticas significativas observadas entre valores próximos de germinação e vigor decorrente dos baixos valores de coeficiente de variação (Tabela 3).

Houve tendência de as sementes grandes apresentarem médias superiores às sementes pequenas, assim como reportado por Carvalho e Nakagawa (2000) que observaram que sementes grandes apresentam maior germinação que as pequenas. No entanto, não se tem uma consistência de resultados nos diferentes genótipos, o que corrobora com os resultados de Andrade et al. (1997) e Nafziger (1992). Esses autores concluíram ainda, que o tamanho e o formato das sementes de milho não apresentaram nenhum efeito significativo na produção de grãos.

4.2 Expressão gênica das enzimas α e β -amilase por meio da técnica de eletroforese, espectrofotometria e *qRT-PCR*

Em sementes secas não foi observada a expressão de α -amilase, pela técnica de eletroforese. Isso se deve a baixa atividade dessa enzima nas sementes secas, sendo necessária sua síntese “de novo” pela camada de aleurona (KIGEL; GALILI, 1995).

Na Figura 1 estão apresentados os padrões isoenzimáticos da α -amilase em sementes grandes e pequenas de linhagens de milho submetidas à embebição. Foi observada maior expressão da enzima em sementes da linhagem 63, e a menor expressão nas da linhagem 43. A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho (FRANCO et al., 2002). Assim, genótipos com maior expressão dessas enzimas, tem mais facilidade em disponibilizar carboidratos para o embrião, resultando em maior velocidade de germinação e vigor.

A degradação do amido, principal fonte de reserva na maioria das sementes de plantas cultivadas, é essencial na germinação dessas sementes (YAMASAKI, 2003). Pelos resultados (Figuras 1 e 2), observa-se que a atividade das amilases aumenta consideravelmente durante o processo de embebição. O mesmo foi observado por Sana et al. (2009) trabalhando com sementes de nabo e trigo.

Em relação ao tamanho de sementes, a maior expressão desta enzima foi observada em sementes grandes da linhagem 54 (Figura 1). Nessas sementes foram observados maiores valores de germinação aos 5 e 7 dias e vigor pelo teste de envelhecimento artificial (Tabelas 4 e 5).

A expressão das enzimas amilases totais em sementes secas e embebidas, avaliadas por meio de espectrofotometria, está apresentada na Figura 2. Maior expressão de amilases foi observada na linhagem 63 e menor na

linhagem 64, independente do tamanho da semente. Para a linhagem 63 não houve diferenças na expressão de amilases em sementes de diferentes tamanhos. Maior expressão dessa enzima foi observada em sementes grandes para as linhagens 43 e 64 e em pequenas da linhagem 54.

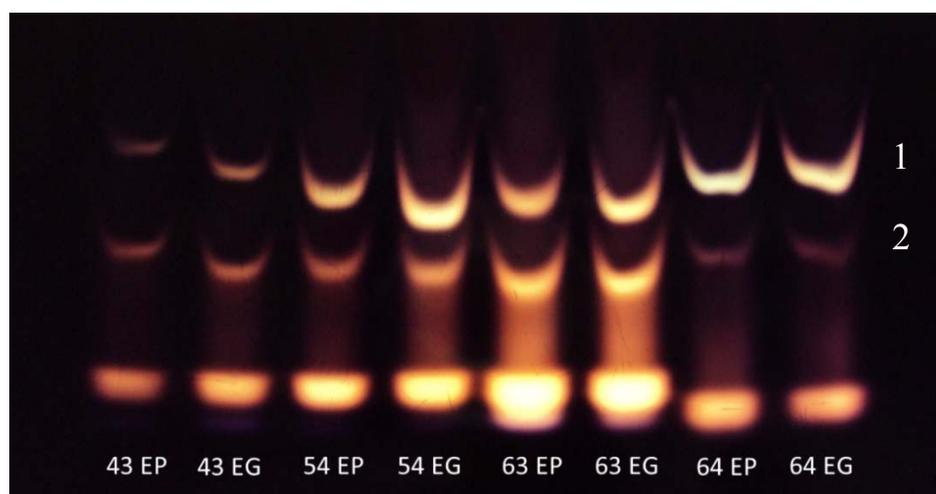
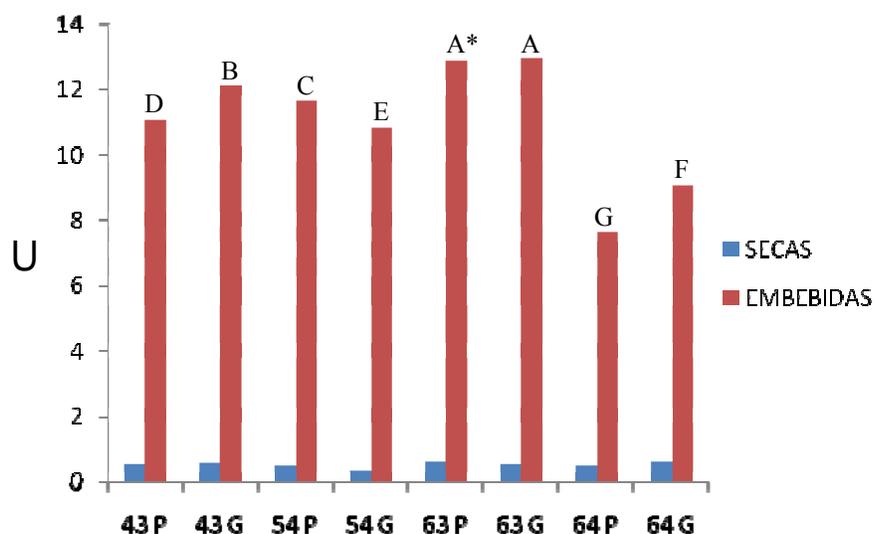


Figura 1 Padrões isoenzimáticos da α -amilase de sementes de milho embebidas (E) de diferentes linhagens e tamanhos, pequeno (P) e grande (G), reveladas para α -amilase

Por meio dos padrões isoenzimáticos obtidos por meio da técnica de eletroforese, também, foi observada maior expressão da enzima α -amilase em sementes da linhagem 63, independentemente do tamanho (Figura 1).

Pela técnica de espectrofotometria foi possível quantificar as amilases, em sementes secas. Segundo Sopenan e Laurière (1989) a enzima β -amilase se expressa em sementes secas, pois esta enzima é sintetizada durante o processo de desenvolvimento da semente e sua liberação e ativação, durante a germinação, é acompanhada pelo acúmulo adicional de suas isoformas. Maior expressão das amilases foi observada em sementes embebidas por 70 horas. Segundo Rood e Larsen (1988) a expressão das enzimas α -amilases aumenta

com o tempo de embebição e a maior expressão observada foi no tempo de 72 horas. Não se observou consistência nos resultados, quanto a comparação, entre sementes pequenas e grandes.



*Médias seguidas pela mesma letra, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade

Figura 2 Atividade de amilases em sementes de milho de diferentes linhagens, e de dois tamanhos, pequeno (P) e grande (G), secas e embebidas

Nas Figuras 3, 4, 5 e 6 são apresentados os resultados da expressão dos genes *Isoamylase mRNA* clone 353244 (*IsoAmy*), *Alpha amylase B73* (*AmyB73*), *Alpha amylase (LOC542522)* e *Beta amylase 5 (AmyBeta5)* avaliada por meio da técnica *qRT-PCR*.

Maior expressão do gene *IsoAmy* foi observado em sementes pequenas embebidas da linhagem 63 (Figura 3). Considerando os valores absolutos, a expressão deste gene, também foi maior em sementes pequenas e embebidas, quando comparadas às sementes grandes e embebidas. Por meio desses

resultados, infere-se que uma vez que as sementes menores requerem menor quantidade de água no processo de embebição, é de se esperar que a síntese de enzimas envolvidas no processo de germinação, seja iniciada antes em sementes pequenas quando comparadas com as sementes maiores.

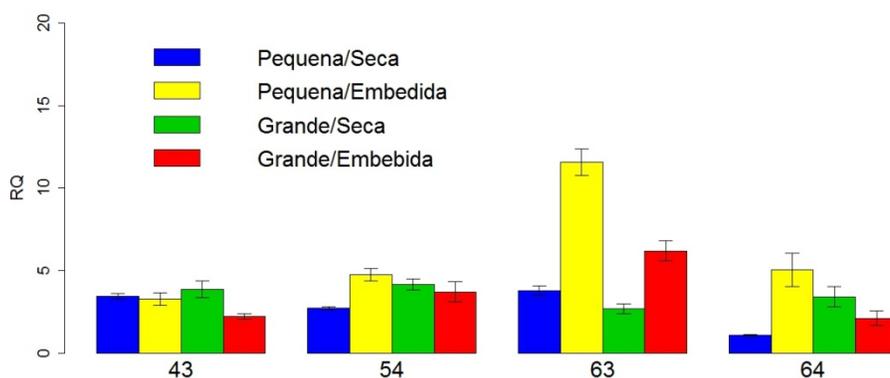


Figura 3 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene *IsoAmy* sem RNA clone 353244 (*IsoAmy*), em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes, secas e embebidas

Quanto à menor expressão do gene em sementes secas, observa-se que a maioria das enzimas amilases envolvidas na germinação de sementes de milho, é sintetizadas “de novo”, havendo a necessidade de embebição. Segundo Lovegrove e Hooley (2000), Nakajima et al. (2006) e Xie et al. (2007) após a embebição, no embrião, ocorre a síntese de giberelina, que é secretada na camada de aleurona, onde ativa a síntese de α -amilase.

Em sementes pequenas das linhagens 54, 63 e 64 menor expressão do gene *IsoAmy* foi observada em sementes secas. Já para linhagem 43 não foi observada diferença na expressão nestas sementes.

Na Figura 4, observa-se maior expressão do gene *AmyB73* nas sementes embebidas da linhagem 64. Não se observou a expressão desse gene em sementes secas em nenhuma das linhagens, e nessa situação ocorre a síntese “de novo” da enzima após a embebição das sementes (KIGEL; GALILI, 1995). Esse comportamento também foi observado para o gene *Alpha amylase* (LOC542522), com maior expressão em sementes embebidas da linhagem 63 (Figura 5).

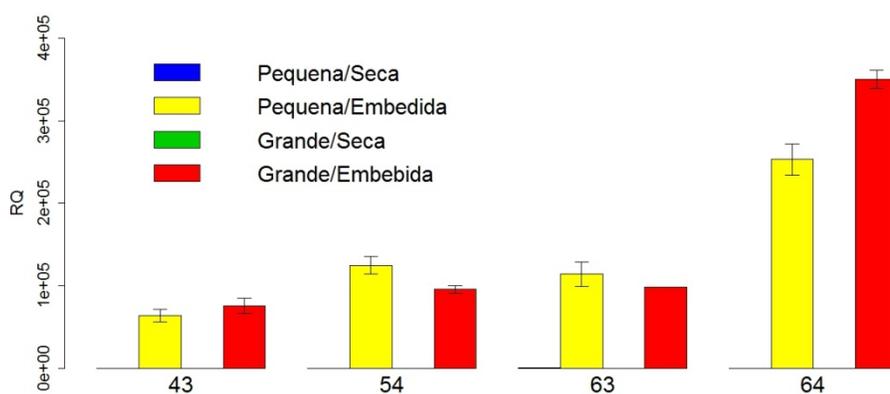


Figura 4 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene *Alpha amylase* B73 (*AmyB73*), em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes, secas e embebidas

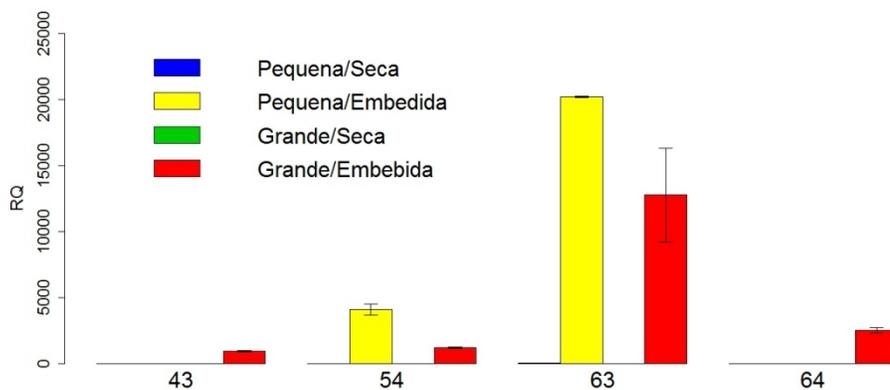


Figura 5 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene *Alpha amylase* (LOC542522), em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes, secas e embebidas

Pode ser observado, pela curva de dissociação (Gráfico 1), que após a amplificação por meio da técnica de *qRT-PCR*, não foi verificado formação de dímero de *primer* em nenhum gene estudado. A curva de dissociação foi realizada para cada tratamento. A curva apresentada no Gráfico 1 refere-se ao gene *AmyB73*.

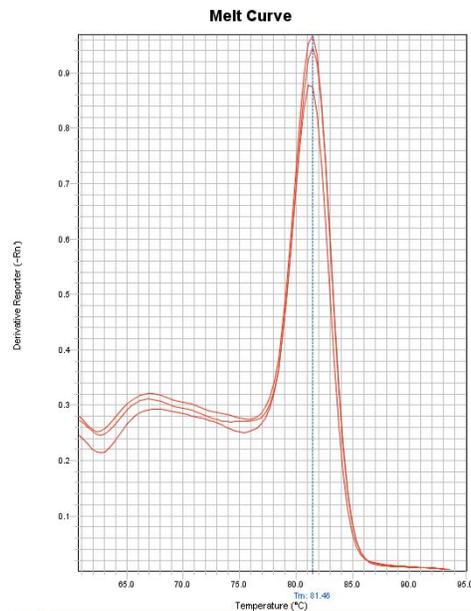


Gráfico 1 Curva de dissociação ou de *Melting*

Infere-se que os genes *AmyB73* e *Alpha amylase (LOC542522)* estão associados à qualidade fisiológica de sementes das linhagens estudadas. Para as linhagens 64 e 63 classificadas como de alta qualidade fisiológica de sementes foram observados os maiores valores de expressão dos genes *AmyB73* e *Alpha amylase (LOC542522)*, respectivamente. Por meio dos testes de germinação e vigor foi observada menor qualidade fisiológica em sementes da linhagem 43. Para esses dois genes, nessa linhagem, foi observada a menor expressão. Ressalta-se que para essa linhagem houve a expressão do gene *Alpha amylase (LOC542522)* apenas nas sementes grandes e embebidas.

Em relação ao gene *AmyBeta5* (Figura 6) a expressão do mesmo foi observada apenas nas sementes embebidas. Foi observada ainda, maior expressão em sementes pequenas embebidas. A enzima β -amilase é sintetizada durante o desenvolvimento das sementes e sua liberação e ativação ocorre durante a germinação, sendo acompanhada pelo acúmulo de suas isoformas

(SOPANEN; LAURIÈRE, 1989). O gene em referência na literatura está relacionado à síntese de β -amilase. No entanto, a expressão do mesmo não foi observada em sementes secas. Por outro lado, o único gene que se expressou em sementes secas foi o *IsoAmy*. Esse fato também pôde ser observado através da avaliação por meio da técnica de espectrofotometria, no qual as sementes embebidas apresentaram valores de atividade das enzimas amilases superiores aos das sementes secas.

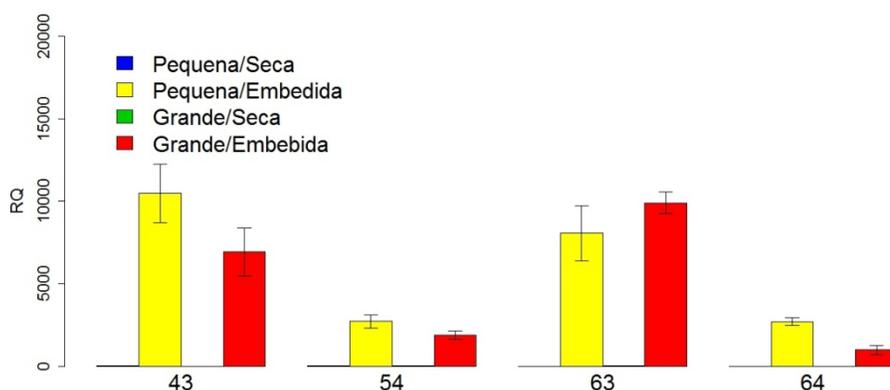


Figura 6 Perfil da expressão quantitativa relativa do geneBeta *amylase5* (*AmyBeta5*) em sementes de linhagens de milho pequenas e grandes, e secas e embebidas

Comparando os resultados da expressão observados pelas técnicas de *qRT-PCR* e eletroforese, verifica-se no zimograma da α -amilase (Figura 1) isoformas específicas as quais podem estar associadas aos genes estudados. Infere-se que o gene *AmyB73* (Figura 4) está associado a isoforma1 da α -amilase o gene *Alpha amylase (LOC542522)* (Figura 5) está associado a isoforma 2 da α -amilase.

Ainda em relação ao zimograma apresentado na (Figura 1), observa-se para a linhagem 63 maior atividade da enzima α -amilase, e ao comparar estes

resultados com a expressão avaliada pela técnica de *qRT-PCR* verifica-se maior expressão dos genes *IsoAmy*, *Alpha amylase (LOC542522)* e *AmyBeta5*.

Assim por meio de uma avaliação geral da expressão das enzimas amilases por meio das técnicas de eletroforese, espectrofotometria, *qRT-PCR* e pelos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica, observa-se que a linhagem 43 apresenta menor qualidade fisiológica, o que pode comprometer a utilização da mesma na composição de híbridos, principalmente como parental feminino. Assim, por meio destas análises houve expressão significativa de genes associados às enzimas amilases e à qualidade fisiológica das sementes.

A análise do perfil de expressão da enzima α -amilase por meio da técnica de eletroforese pode ser utilizada para auxiliar na seleção de genótipos em programas de melhoramento. Dessa forma, é possível eliminar genótipos com baixa qualidade de sementes em fases iniciais do programa.

É importante ressaltar que vários genes, além das amilases, podem estar envolvidos no controle do caráter qualidade fisiológica de sementes, como exemplo, pode-se citar os genes relacionados diretamente com a respiração. Portanto, sugere-se que novos estudos sejam realizados buscando envolver maior número de genes e famílias multigênicas.

5 CONCLUSÃO

Há expressão diferenciada das enzimas amilases em sementes de linhagens com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

Maior expressão das enzimas amilases é observada em sementes de milho embebidas.

Há maior expressão de transcritos em sementes embebidas de menor tamanho.

Dentre as linhagens estudadas, menor qualidade fisiológica de sementes foi observada na linhagem 43.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.
- ANDRADE, R. V. et al. Efeito da forma e do tamanho da semente no desempenho no campo de dois genótipos de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 62-65, jan. 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário 2009**. p. 25-32. Londrina, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário 2010**. p. 34. Londrina, 2010.
- BAKO, A.; GALL, G.; BALAZS, E. Quantification of transgene expression in maize (*Zea mays* L.) throughout the vegetation period. **Plant Breeding**, Berlin, v. 130, p. 41-45, 2011.
- BARROS, B. et al. In silico characterization and expression analysis of the multigene family encoding the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 327-334, 2012.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1985. 367 p.
- BONFINI, L. et al. **Review of GMO detection and quantification techniques**. Ispra: European Commission, 2002. 67 p.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. S. et al. Alterações isoenzimáticas relacionadas a peroxidação de lipídios de sementes de girassol envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of m RNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct. 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CATÃO, H. C. R. M. et al. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de milho crioulo produzidas no norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.10, p. 2060-2066, 2010.

CAUSSE, M. et al. Sucrose phosphate synthase: enzyme with heterotic activity correlated with maize growth. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 4, p. 995-1001, July/Aug. 1995.

COIMBRA, R. A. et al. Teste de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (sh2). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2402-2408, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2011**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_19_09_49_47_boletim_setembro-2011>. Acesso em: 2 fev. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2012**. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2012.

DELANO, J. et al. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5839-5834, 2003.

DING, J. et al. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative pcr detection of transgenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 3372–3377, 2004.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, Alexandria, n. 71, p. 428-434, 1958.

FAIGUENBAUM, M.; ROMERO, A. L. Efecto del tamaño de semilla sobre la germinación, el vigor y el rendimiento de un híbrido de maíz (*Zea mays*). **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 18, n. 3, p. 111-117, Sept. 1991.

FARIA, M. A. V. R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de linha de leite. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2002.

FRANCO, O. L. et al. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 269, p. 397-412, 2002.

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

HERNANDEZ, M. et al. A rapeseed specific gene, Acetyl-CoA Carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3622-3627, 2001.

HERNANDEZ, M. et al. Development and comparison of four real-time Polymerase Chain Reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 4632–4637, 2004.

HOECKER, N. et al. Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 3, p. 421-429, Feb. 2006.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS. **Brief 41-2009**: global status of commercialized biotech/GM crops. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/executiv-eshummary/default.asp>>. Acesso em: 14 abr. 2010.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 3, p. 414-428, set./dez. 2004.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40 n. 2, p. 115-121, 2005.

KIGEL, J.; GALILI, G. Seed development and germination. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

KUHN, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

LI, B. et al. Genome-wide comparisons of gene expression for yield heterosis in maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, p. 162-176, 2009.

LI, W.; HE, P.; JIN, J. Potassium influenced phenylalanine ammonia-lyase, peroxidases and polyphenol oxidases in *Fusariumgraminearum* infected maize (*Zea mays* L.). Davis: University of California, 2009.

LIVAK, K. J.; SCMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOVEGROVE, A.; HOOLEY, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 102-110, 2000.

LUO, M. et al. Characterization of gene expression profiles in developing kernels of maize (*Zea mays*) inbred Tex6. **Plants Breeding**, San Diego, v. 127, p. 569-578, 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARTINEZ, E. M. et al. Effect of seed shape and size on germination of corn (*Zea mays* L.) stored under adverse conditions. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 26, n. 2, p. 439-448, Apr. 1998.

MINO, M.; INOUE, M. Analysis of glucose metabolism in the heterotic viability in seedling grow of maize F1 hybrid. **Japan Journal Crop Science**, Tokyo, v. 63, n. 4, p. 682-688, Dec. 1994.

NAFZIGUER, E. D. Seed size effects on yields of two corn hybrids. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 5, n. 4, p. 538-544, Oct./Dec. 1992.

NAKAJIMA, M. et al. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. **Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 880-889, 2006.

PALEG, L. G. Physiological effects of gibberellins. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.16, p. 291-322, 1965.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 22 out. 2011.

ROOD, S. B. et al. Gibberellins and heterosis in maize: quantitative relationships. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 2, p. 281-286, Mar./Apr. 1990.

ROOD, S. B.; LARSEN, K. M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal Experimental Botany**, London, v. 39, n. 199, p. 223-233, 1988.

ROSA, S. D. V. F. et al. Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento à baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n.2, p. 290-310, 2004.

ROSA, S. D. V. F. et al. Qualidade fisiológica e enzimática em sementes de milho submetidas a secagem artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21. n. 1, p. 177-184, 2000.

SANA, N. K. et al. Enzyme activities and mobilization of nutrients in brassica (*brassicasp.*) and wheat (*triticumaestivuml.*) seeds during germination. **Journal of Biosciences**, Kamataka, v. 17, p. 101-106, 2009.

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

SCOTTI, C. A.; SILVEIRA, J. F. Tamanho da semente em relação ao comportamento do milho (*ZeamaysL.*), Londrina: IAPAR, 1977. 12 p (Boletim Técnico, 4).

SILVA, W. R.; MARCOS FILHO, J. Influência do peso e do tamanho das sementes de milho sobre o desempenho no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 12, p. 1743-1750, 1982.

SONG, J. et al. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. **Gene**, Amsterdam, v. 482, p. 34-42, 2011.

SOPANEM, T.; LAURIÈRE, C. Release and activity of bound β -amylase in a germinating barley grain. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 89, p. 244-249, 1989.

SOUZA, N. O. S. et al. Genetic control of traits associated with maize seed quality. **Maydica**, Bergamo, v. 53, n. 1, p. 55-62, 2008.

SPOLEN, S. G. et al. Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. **BMC Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 32, 2008.

STUPAR, R. M.; HERMANSON, P. J.; SPRINGER, N. M. Nonadditive expression and parent-of-origin effects identified by microarray and allele-specific expression profiling of maize endosperm. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 145, p. 411-425, 2007.

SUBBARAO, K. V.; DATTA, R.; SHARMA, R. Amylase synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 3, p. 657-666, 1998.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 1, p. 49-53, Jan. 1998.

UZAROWSKA, A. et al. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. **BMC Plant Biology**, California, v. 9, p. 15, Feb. 2009.

VEIT, B. et al. Maize floral development: new genes and old mutants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1205-1215, 1993.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

VON PINHO, E. V. R. et al. Influência do tamanho e do tratamento de semente de milho na preservação da qualidade durante o armazenamento e posterior comportamento no campo. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 30-36, jan./mar. 1995.

WANG, J. et al. Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeriagraminis* f. sp. *tritici* using GeneChip. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 381-387, 2012.

WU, Y. et al. Genetic analysis of high amylose content in maize (*Zea mays* L.) using a triploid endosperm model. **Euphytica**, Wageningen, v. 166, p. 155-164, 2009.

XIE, Z. et al. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 64, p. 293–303, 2007.

YANG, L. T. et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Cambridge, v. 23, p. 759-763, 2005.

ZHANG, X. et al. Laser microdissection of narrow sheath mutant maize uncovers novel gene expression in the shoot apical meristem. **Plos Genetics**, Berkeley, v. 3, n. 6, p. 101, 2007.