



IZABEL COSTA SILVA NETA

**GENES EXPRESSION AND GENETIC CONTROL TO COLD
TOLERANCE DURING CORN SEEDS GERMINATION**

LAVRAS – MG

2017

IZABEL COSTA SILVA NETA

**GENES EXPRESSION AND GENETIC CONTROL TO COLD TOLERANCE
DURING CORN SEEDS GERMINATION**

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.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS - MG

2017

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

Silva Neta, Izabel Costa.

Genes expression and genetic control to cold tolerance during
com seeds germination / Izabel Costa Silva Neta. - 2017.

56 p. : il.

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

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. Vigor. 3. Heterose. I. Von Pinho, Édila Vilela
de Resende. II. Título.

IZABEL COSTA SILVA NETA

**GENES EXPRESSION AND GENETIC CONTROL TO COLD TOLERANCE
DURING CORN SEEDS GERMINATION**

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

Aprovada em 19 de junho de 2017

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva	UNESP-Botucatu
Dr. João Candido de Souza	UFLA
Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

LAVRAS - MG

2017

RESUMO

Aumentar a tolerância das plantas a estresses ambientais é um dos mais relevantes objetivos dos programas de melhoramento genético e a seleção de genótipos superiores deve levar em consideração a fase de germinação e emergência de plântulas. Em condições de temperatura adequada sementes de milho germinam em aproximadamente quatro dias, no entanto a medida que se reduz a temperatura aumenta-se o tempo necessário para que o processo germinativo ocorra. O estudo da tolerância ao frio em sementes e plântulas de milho por meio de avaliações da qualidade fisiológica de sementes, bem como, o estudo dos caracteres genéticos associados à esta característica, permite uma caracterização precoce dos genótipos com tolerância a essa condição adversa de temperatura. Assim o objetivo neste trabalho foi estudar o controle genético para a tolerância ao frio durante o processo germinativo em sementes de milho. Foram utilizadas seis linhagens de milho, três classificadas como tolerantes a baixa temperatura de germinação (91, 64 e 63) e, três suscetíveis a essa condição de estresse (44, 54 e 57). Foi instalado um campo para multiplicação das seis linhagens e concomitante produção de sementes híbridas, em um esquema de dialelo parcial incluindo os recíprocos. Sendo assim, foram produzidas sementes de 24 genótipos de milho. Para a avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes de milho determinou-se o teor de água e realizou-se testes de germinação nas temperaturas de 10 e 25 °C. Após obtidos os dados de avaliação da qualidade fisiológica das sementes para todas as linhagens e híbridos considerados, estes foram utilizados para estimar valores para heterose e as estimativas das capacidades geral e específica de combinação e dos efeitos recíprocos, materno e não-materno. Observou-se que existe expressão da heterose para a característica de tolerância a baixa temperatura de germinação em sementes de milho. Para o controle genético da tolerância a baixa temperatura de germinação em sementes de milho, os genes de efeito não aditivo são mais importantes. Existe efeito recíproco para a característica de tolerância a baixa temperatura de germinação em sementes de milho. Existe efeito de origem materna para os parentais nos cruzamentos testados, o que mostra a importância da escolha dos genitores femininos para compor os cruzamentos.

Palavras-chave: *Zea mays*. Vigor. Heterose. Efeito materno.

ABSTRACT

Increasing plant tolerance to environmental stresses is one of the most important objectives of breeding programs and selection of superior genotypes should take into account the germination and emergence phase of seedlings. Under suitable temperature conditions corn seeds germinate in approximately four days, however as the temperature is reduced, the time required for the germination process increase. The cold tolerance study in corn seeds and seedlings through physiological seed quality assessments, as well as the genetic feature study is associated with this characteristic. It allows an early genotypes characterization with tolerance to this adverse temperature condition. Thus, the objective in this work was to study the genetic control for cold tolerance during the germination process in corn seeds. Six corn lines were used, three classified as tolerant to low germination temperature (91, 64 and 63) and three susceptible to this stress condition (44, 54 and 57). A field was developed to multiply the six lines and concomitant production of hybrid seeds, in a partial diallel scheme including the reciprocal ones. Thus, seeds of 24 corn genotypes were produced. In order to evaluate the physical and physiological quality of corn seeds, the water content was determined and germination tests were carried out at temperatures of 10 and 25 °C. After obtaining physiological seed quality data for all lines and hybrids considered, they were used to estimate values for heterosis and the estimates of the general and specific combination and reciprocal maternal and non-maternal effects. It was observed that there is heterosis expression for the germination low temperature tolerance characteristic in corn seeds. For the genetic control of germination low temperature tolerance in corn seeds, non-additive effect genes are more important. There is a reciprocal effect for the germination low temperature tolerance characteristic of corn seeds. There is an effect of maternal origin for the parents in the crosses tested, which shows the importance of the choice of the female parents to compose the crosses.

Keywords: *Zea mays*. Vigor. Heterosis. Maternal effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10 °c por 4 (4d) e 7 (7d) dias. ufla, lavras, 2017.....	40
Figura 2	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10°c por 4 (4d) e 7 (7d) dias. ufla, lavras, 2017..	41
Figura 3	Atividade da enzima esterase (EST) em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10°c por 4 (4d) e 7 (7d) dias. ufla, lavras, 2017.....	42
Figura 4	Atividade de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10°c por 4 (4d) e 7 dias (7d). ufla, lavras, 2017.....	43
Figura 5	Expressão do gene SAD em sementes de milho secas e embebidas a 10°c por 4 e 7 dias. ufla, lavras, 2017.....	44
Figura 6	Expressão do gene APX em sementes de milho seca e embebidas a 10°c por 4 e 7 dias. ufla, lavras,2017.....	46
Figura 7	Expressão do gene SOD em sementes de milho secas e embebidas a 10°c por 4 e 7 dias. ufla, lavras, 2017.....	47
Figura 8	Expressão do gene ZmPK em sementes de milho seca e embebidas a 10°c por 4 e 7 dias. ufla, lavras, 2017.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Primers utilizados na análise de qRT-PCR.....	27
Tabela 2	Análise de variância para os resultados dos testes de germinação realizados a 25°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.....	29
Tabela 3	Valores médios em porcentagem para os resultados obtidos nos testes de germinação (GER) e protrusão (PROT), realizados a 25°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.....	29
Tabela 4	Resumo da análise de variância para os resultados obtidos nos testes de germinação (GER) e protrusão (PROT), realizados a 10°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.....	30
Tabela 5	Valores médios em porcentagem para os resultados obtidos nos testes de germinação (GER) e protrusão (PROT), realizados a 10°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.....	31
Tabela 6	Quadrados médios das capacidades geral (CGC) e específica de combinação (CEC) e dos efeitos recíprocos (ER), maternos (EM) e não-maternos (NM), para os testes de porcentagem de protrusão (PROT) e porcentagem de germinação (TG)	35
Tabela 7	Estimativas dos efeitos de capacidade geral de combinação (G), capacidade específica de combinação (S), efeito recíproco materno (M) e não-materno (N) para os testes de porcentagem de protrusão (PROT) e porcentagem de germinação (GER) quando germinadas a 10°C.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	THEORETICAL REFERENCE.....	11
2.1	The corn crop in Brazil.....	11
2.2	Stress caused by low temperatures during the seed germination process	12
2.3	Mechanisms of cold tolerance.....	15
2.4	Genetic control to cold tolerance.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Produção de sementes	22
3.2	Heterose.....	23
3.3	Estimativas das capacidades geral e específica de combinação e dos efeitos recíprocos, materno e não-materno.....	24
3.4	Análise Proteômica	25
3.5	Análise da expressão de transcritos por meio da técnica de qRT-PCR.....	25
3.5.1	Extração e Purificação do RNA	26
3.5.2	Transcrição reversa para síntese do cDNA	26
3.5.3	Desenho dos primers	27
3.5.4	Análise dos resultados	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

A seleção de cultivares de milho com tolerância ao frio é fundamental para garantir a germinação, o estabelecimento de plântulas e a produtividade de grãos sob baixas temperaturas. De maneira geral, não tem sido observado nos programas de melhoramento de milho no Brasil, durante os processos de seleção até os ensaios para o registro de novas cultivares, avaliações para a característica de tolerância ao frio no período de germinação.

Em algumas regiões brasileiras, como o sul do país e regiões com elevadas altitudes, muitas vezes a semeadura é atrasada, devido à ocorrência de baixas temperaturas durante a germinação e à falta de cultivares tolerantes a essa condição de estresse. Outro fator a ser considerado é o fato de que produtores que possuem sistema de irrigação, poderiam produzir até três safras de milho caso fossem disponibilizados no mercado cultivares com tolerância a baixas temperaturas durante o processo germinativo.

Em condições de temperatura adequada, sementes de milho tendem a germinar entre três e quatro dias. Quando se reduz a temperatura para 15°C, o período de germinação pode ser de até 14 dias, sendo que à medida que se reduz a temperatura, aumenta-se o tempo necessário para que o processo germinativo ocorra (SILVA NETA et al., 2015). Além da demora e da desuniformidade do processo germinativo, outro problema associado à ocorrência de baixas temperaturas é o fato de que as sementes vão ficar mais tempo no solo, expostas ao ataque de pragas.

Aumentar a tolerância das plantas aos estresses ambientais é um dos mais relevantes objetivos dos programas de melhoramento genético e, na seleção de genótipos superiores, deve-se levar em consideração a fase de germinação das sementes e emergência de plântulas. Em algumas pesquisas tem sido observado efeito de heterose para a característica de tolerância ao frio (ALLAM et al., 2016).

O melhor desempenho dos híbridos comparado ao das linhagens parentais vai de encontro aos resultados de pesquisa em que a regulação da tolerância ao frio envolvem efeitos aditivos e de dominância (DJEMEL et al., 2016; REVILLA et al., 2000). Assim, ressalta-se a importância de se avaliar a tolerância ao frio em sementes, nos processos de seleção, quando ainda são testadas as melhores combinações híbridas.

A adaptação a estresses abióticos requer aumento de características que são quantitativamente herdadas e altamente influenciadas pelo ambiente. Essas características são frequentemente controladas por centenas de genes e, suas interações, frequentemente, são difíceis de mensurar (CARENA, M. J, 2013).

Muitos genes têm sido reportados como de potencial importância para aumentar a tolerância ao frio durante o processo germinativo, no entanto, apenas uma quantidade limitada de QTLs tem se mostrado com real efeito sobre essa característica (FUJINO et al., 2008; IWATA; FUJINO, 2010; LI et al., 2013; MIURA et al., 2001).

A melhor forma de se obter genótipos de milho tolerantes ao frio durante o processo germinativo é conhecer os genes relacionados a essa característica e verificar se existe ou não efeito de heterose e efeito recíproco. Sabe-se que nos programas de melhoramento de milho, o uso final das linhagens é para produção de híbridos; assim, é importante identificar os melhores genótipos e as melhores combinações.

O estudo da tolerância ao frio em sementes e plântulas de milho, por meio de avaliações da qualidade fisiológica de sementes, bem como o estudo dos caracteres genéticos associados a esta característica, permite uma caracterização precoce dos genótipos com tolerância a essa condição adversa de temperatura.

Diante do exposto, objetivou-se, nesta pesquisa, estudar o controle genético para a tolerância ao frio na germinação e avaliar a expressão de genes associados à essa característica em sementes de milho.

2 THEORETICAL REFERENCE

2.1 The corn crop in Brazil

Corn is one of the world's major cereals, ranking as the third most important, behind only wheat and rice (LASHKARI et al., 2011). In Brazil, according to CONAB's latest survey, the estimated production of the 15/16 crop was 66.9 million tons.

The high production of corn crop in Brazil is due, among other factors, to the combination of the continuous progress of agronomic practices and development of stress tolerant hybrids, together with an adequate establishment of the plant stand, achieved mainly by use high quality seeds. According to the latest data from ABRASEM, the seeds utilization rate is about 90%, a value considered high when compared to that observed in other species.

The high rate of corn seeds utilization is due to the value added in hybrid seeds that result in higher yields. It is known that production increase in plants F1 generation is directly related to heterosis effect, a phenomenon in which cross-breeding produces a superior individual in terms of yield and vigor in relation to those observed in their parents.

Another factor to be considered is the increase commercialization of transgenic corn seeds, which demands from the producing companies, high quality standards, and should be associated with profitable production systems.

For the 2015/2016 harvest, 477 corn cultivars were available, 284 transgenic cultivars and 193 conventional cultivars. Among transgenic cultivars, there is a predominance of simple hybrids (82.39%) (CRUZ et al., 2015). The greater supply of transgenic materials coupled with the high number of simple hybrids reflects the high technological level of Brazilian agriculture in relation to the production of corn grains.

In this new scenario, investments in seed production technologies are a priority in companies, since the seed is the vehicle of all technology generated either in conventional breeding programs or using recombinant DNA technology.

In order to supply corn seeds with high germinative potential and vigor, the producing companies have invested in internal quality control programs, which in most cases have more stringent standards than those required by law. Seed quality is determined by the physical, sanitary, physiological and genetic attributes and most of the time these attributes are only evaluated when the hybrid has already been developed. However, in some studies have been verified heterosis and reciprocal effect for attributes related to seed quality (ALLAM et al., 2016; DJEMEL et al., 2016; FRASCAROLI; LANDI, 2013; REVILLA et al., 2000).

Thus, stands out the importance of evaluating seed quality during the selection process of the breeding programs, when the best hybrid combinations are still being tested, since the use of quality corn seeds allows the establishment of a plant stand uniform which can lead to reduction costs with fertilizers, herbicides, pesticides and hence labor.

In the last years, several works have been carried out in order to develop cultivars tolerant to biotic stresses. Currently, on the market the transgenic cultivars are the result of events that confer insect resistance and tolerance to herbicides, glyphosate and ammonium glufosinate, applied in a post-emergence (CRUZ et al., 2015). However, abiotic stresses such as water deficit, salinity and stress caused by high or low temperatures have limited corn production in several Brazilian regions, and there are few studies for the genes that characterize tolerance to these stresses.

Germination and vigor are the first determinants for the success of multiplied crops by means of seeds (DRAGICEVIC et al., 2013; KIM et al., 2014), as the corn case, and for this species the occurrence of adverse conditions effects such as low temperatures during the germination process can compromise the entire crop performance.

Just after winter, planting corn is a strategy to prevent the crop is exposed to the intense heat and drought that normally negatively affect grain production (WIJEWARDANA et al., 2015) in addition, it allows farmers that have irrigation systems and increase of planting period. Nonetheless, corn is a cold-sensitive species, so corn adaptation to an early planting situation requires the development of cultivars with cold tolerance for guarantee the emergence and growth of vigorous seedlings under low temperature conditions (WIJEWARDANA et al., 2015).

For the development of tolerant hybrids to low temperatures, it is important to identify and characterize genotypes that are related to this tolerance in the seed germination phase, as well as to know the mechanisms that confer this tolerance. The elucidation of these mechanisms will certainly facilitate the process of new hybrids generation besides contributing to the selection techniques development that can reduce time and work for the genotypes evaluation for tolerance characteristic to low temperature.

2.2 Stress caused by low temperatures during the seed germination process

Plants are submitted to several abiotic factors, such as cold, drought, saline stress and others that contribute significantly to the spatial distribution and crop productivity (AGARWAL et al., 2006). In addition to geographic distribution, climatic conditions also

greatly influence the season when crops will be sown and often limits the favorable period for the crops development.

Plants, such as all sessile organisms have developed response mechanisms that confer to these tolerance characteristics to stress that facilitate survival in different environmental conditions and over a wide range of thermal amplitude. Environmental stresses can affect almost every aspect of growth and development, resulting in important changes in plant morphology and physiology. Consequently, specific signaling pathways are triggered and cause variations in gene expression and plant metabolism. The plants response to stress is a highly dynamic process, dependent on many factors (JHONOVÁ et al., 2016).

Low temperatures affect negatively the plants development. This adverse condition is one of the main factors that restrict the geographical distribution of cultivated species and periodically causes significant losses in agricultural productivity (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007).

Normally, low temperatures cause plant stress in two ways: by means of direct effects and by the dehydration of cells and tissues when cellular water content becomes unavailable (BECK; HEIM; HANSEN, 2004; JANMOHAMMADI; ZOLLA; RINALDUCCI, 2015).

Stress caused by cold affects seed germination, seedling development, foliar development and consequently agricultural productivity (SHAN et al., 2013).

In order to identify markers associated with the emergence process of sorghum seedlings under 9 temperature regimes (9.4 (8.3/10.2); 10.3 (9.2/11.0); 10.7 (9.8/11.4); 10.8 (9.6/11.6); 11.6 (10.4/12.2); 12.3 (11.7/12.8); 16.7 (11.2/24.0), 17.2 (10.0/26.0), 19.9 (15.4/25.7)), Fiedler et al. (2012), verified that the final seedling emergence percentage was higher at higher temperatures, when the average temperature was 19.9°C, the emergence was 95.7%. However, at temperatures below 10.8 ° C the emergency percentage did not reach 80%. Other aspect verified was as the temperature increased the time for seedlings emergence was reduced, and this emergence was more uniform.

As in most crops, for corn the germination stages and seedling development are extremely important for the establishment and development of the plant stand, which is directly related to production.

Germination is a process composed of three phases, which consist of the imbibition stage, the activation phase of the metabolic processes required for the embryo growth and the embryo growth initiation phase. The duration of each phase depends on inherent properties to the seed, such as the tegument permeability and the seed size, as well as the conditions during imbibition, such as temperature and substrate composition (CARVALHO; NAKAGAWA,

2000), and temperature influences the water absorption speed, germinability, speed and germination uniformity, and in biochemical reactions that determine the whole process (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

The supply of corn hybrids tolerant to low temperature would allow early sowing, resulting in agronomic advantages such as higher productivity. In this situation, it is possible to use longer and more productive cycle hybrids, with better productive stability, due to anticipation of flowering, avoiding extremely hot and dry periods and the possibility of an early harvest or with better grain quality (FRASCAROLI; LANDI 2013). However, for early sowing, corn genotypes should present tolerant to cold, these seeds have the ability to germinate and the seedlings develop even under adverse thermal conditions.

Many times the hybrid that develops very well under suitable temperatures in the range of 25 °C does not have the same behavior under low temperature conditions. In an experiment with three temperature conditions and thirty corn hybrids, a genotype significant effect was observed at different temperature conditions. In general, it was found that under low temperature conditions the root system and seedling shoot are less developed because stress caused by cold significantly reduces cell division and stretching (WIJEWARDANA et al., 2015).

In suitable conditions of temperature and humidity, the corn seedlings emerge in the period of 4 to 5 days, but in conditions of low temperature and low humidity, the germination can take up to two weeks or more (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Cold tolerance, as well as tolerance to other abiotic stresses, may vary depending on a number of factors, such as exposure temperature, duration of exposure to stress condition, and also the plant development stage.

Another important factor to be considered is the variability among genotypes for the tolerance characteristic. In rice, when comparing two cultivars, it was observed, after 28 days of sowing, in a low temperature condition, for the Maratteli cultivar, 82% germination, whereas for the Akitomachi 42%. It is worth mentioning, the seeds that did not germinate at 13°C for both cultivars were viable, because when they were placed at 25°C for 24 hours they showed root protrusion, which shows the negative effect of the low temperature on the seeds germination process (SATO et al., 2016).

In the sorghum crop, conditions of low temperature during the germination process, it has significant effect on the emergence period, seedling length and shoot dry matter. As the temperature is reduced, there is an increase in the emergence period and reduction of seedling length and shoot dry matter. In addition, the authors observed significant correlations among

the data obtained in the laboratory and in field trials. Thus, laboratory tests can be used as an alternative or preliminary screening method for the evaluation of cold tolerant materials (YU et al., 2004).

In sweet corn, cold has a negative effect on the seedlings emergence characteristic. In low temperature conditions the period for seedling emergence is prolonged, there is biomass reduction resulting in a lower weight of the dry matter (ALLAM et al., 2016).

It is worth mentioning, the ideal for a crop is the fast and uniform establishment, and it is important to evaluate in breeding programs that aim at cold tolerance, not only the emergence percentage, but also the speed and uniformity of seedling emergence. In this sense, studies should be conducted to better understand the mechanisms to cold response in corn crop, since low temperatures activate a genes cascade that lead to the accumulation of metabolites and structural proteins that prevent cell damage (KURBIDAEVA; NOVOKRESHCHENOVA, 2011). The genes identification related to these responses may be one of the most effective ways to develop tolerant cultivars for this type of stress. Because, it is the genetic constitution that will delimit the maximum and minimum temperatures, that the plant is potentially able to withstand (HOWARTH; OUGHAM, 1993).

2.3 Mechanisms of cold tolerance

Tolerance to low temperatures is a multigenic and quantitative characteristic, however, it is not known how many locus determine this characteristic (KORN et al., 2008).

Genes that express themselves in tolerant genotypes to low temperature are involved in a variety of cellular functions, including metabolism, transcription, protein targeting, molecule transport, biogenesis, transduction and communication signals, rescue and defense cells, aging and cell death. The identification of these genes not only provides an understanding of cold tolerance, but also allows the strategies development to make plants more tolerant at low temperatures (ŞAHIN-ÇEVIK, 2013).

Because it is a complex quantitative trait, plants tolerance of low temperature is a difficult mechanism to be elucidate by the study of a single gene (WANG; YANG; WANG, 2011). In this way, it is important to evaluate the genes that expressed during the different development stages of the plant under stress conditions caused by the cold.

Membranes are the organelles most susceptible to damage resulting from exposure of plants to low temperatures. Increasing membrane permeability and changing in its viscosity and fluidity results in decreased cell turgor (GUY, 1990). Maintaining the cell membranes

integrity is extremely important for cold tolerance, and the lipid composition of these membranes directly influences this integrity (UEMURA; STEPONKUS, 1999).

According to Funnekotter et al. (2013), the fatty acid unsaturation effect is substantially greater than the chains length effect of these fatty acids when referring to the transition in temperature.

Probably, the change in membrane fluidity in sensitive species at low temperature initiates a chain reaction that leads to acclimatization to this type of stress as a result of increased expression of certain genes, such as the genes encoding the desaturases (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2006).

In *Arabidopsis thaliana*, desaturases expression (FAD8) was strongly induced by low temperature (GIBSON, 1994). Liu et al. (2006) studying the temperature effect on tomato crop, they verified desaturases expression (LeFAD7) was induced by stress caused by low temperature (4°C), but inhibited by the high temperature (45°C) in the leaves. In rice the OsFAD2 gene suggests conferring stress resistance on plants grown under unfavorable temperature conditions (SHI et al., 2012). Kodama et al. (1995) observed unsaturation of fatty acids is one of the factors involved in tolerance to low temperatures in young leaves of tobacco.

Putative stearyl - ACP desaturase (SAD) is a key enzyme in the fatty acids synthesis in plants and catalyzes saturated fatty acids in unsaturated fatty acids (BYFIELD; UPCHURCH, 2007).

In higher plants, such as corn, the SAD enzyme is responsible for the saturated and unsaturated fatty acids rate and this rate is closely related to many functions in plants (LOS; MURATA, 1998;), particularly in acclimated plants to cold (KODAMA et al., 1995; LINDQVIST et al., 1996).

Another mechanism related to seed quality is the enzymes activity related to lipid peroxidation. The esterases are isoenzymes that exhibit multifunctional hydrolytic activity, and in common, catalyze the hydrolysis of a large esters number. The enzyme esterase (EST) is involved in both ester hydrolysis and lipid metabolism. According to Basavarajappa, Shekar Shetty e Prakash (1991), lipid peroxidation is an event associated with seed membrane damage and these changes may lead to the occurrence of deteriorating events that contribute to the seed germination reduction.

Low temperature conditions result in the reduction of biomass and the production of grains in corn crop. This factor of environmental stress can cause a disturbance in the redox

homeostasis of cells and then increase the production of reactive oxygen species (ROS) (MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008; SUZUKI; MITTLER, 2006).

In higher plants, reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (HO), are generated during normal aerobic metabolism, such as photosynthesis and respiration (PATADE; BHARGAVA; SUPRASANNA, 2012). However, under stress conditions, such as low temperatures, ROS are produced at high levels and may result in damage to DNA, proteins and lipids (MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008). To adapt to biotic and abiotic stresses, plants have developed efficient enzymatic and non-enzymatic systems to protect cellular components from oxidative stress.

The enzymatic antioxidant defense system in plants mainly comprises superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX). The enzyme superoxide dismutase is a family of metalloenzymes that catalyze the dismutation of superoxide radicals toxic to O_2 and H_2O_2 , and therefore play a fundamental role in the antioxidant defense system in plants (KAYIHAN et al., 2012). The scavenger mechanism has been widely considered to be of particular importance for germination (JIANG et al., 2013).

Farooq et al. (2008) in an experiment with cold tolerance in hybrid corn verified the seeds physiological conditioning with salicylic acid increased their tolerance at low temperatures, mainly due to the antioxidants activation (including catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase). Hodges et al. (1997) reported the antioxidant enzymes activity level cited previously is a useful tool for selection of corn hybrids resistant to refrigeration. Xi et al. (2010) reported that plants with higher expression of SOD and other scavenging enzymes were designed with the objective to increase stress tolerance, and according to Baek and Skinner (2003) increasing cold tolerance may be accompanied by increased expression of specific genes encoding antioxidant enzymes.

In addition to the antioxidant enzymes LEA (Late embryogenesis abundant) proteins are among the groups of proteins regulated in response to stress caused by low temperatures (JOHNOVÁ et al., 2016).

LEA proteins are a family of super hydrophilic proteins that accumulate in cells as response to dehydration conditions. These proteins were originally associated with seed desiccation tolerance, however, have also been associated with plant tolerance to cooling (SASAKI et al., 2013).

Many genes have been reported as potential to increase cold tolerance during the germination process. However, only a limited amount of QTLs have been shown to have a

real effect on this characteristic (FUJINO et al., 2008; IWATA; FUJINO, 2010; LI et al., 2013; MIURA et al., 2001).

In sweet corn seeds some QTLs were related with cold tolerance, such as QTL in the region 5.03 (ALLAM et al., 2016). Four QTLs responsible for germination at low temperature were identified for the rice Maratteli cultivar from Eastern Europe. The alleles qLTG31 and qLTG3-2 on chromosome 3 and the allele qLTG11-1 on chromosome 11 are associated with the germination rate under low temperature conditions. In contrast, the qLTG11 allele on chromosome 1 is associated to germination rate reduction (SATOH et al., 2016).

This differentiated influence of the alleles for the germination characteristic on low temperature allows concluding that the cultures can be improved by means of assisted selection by molecular markers, without modifying other characteristics of interest, besides allowing the understanding of the mechanisms involved in the cold tolerance during the germinative process (SATOH et al., 2016).

2.4 Genetic control to cold tolerance

In some studies, it has been observed the causes of responses to cold are complex and depend on physiological and molecular changes and, nevertheless, mechanisms studies of response to cold in corn have not been very enlightening (YANG et al., 2011). According to Yang et al. (2011), corn undergoes a complex adaptive process in response to low temperatures. To adapt to stress by cold, this culture evolved a considerable plasticity degree, including the adaptation by means of molecular networks cascades.

Fracheboud et al. (2004) reported that better knowledge of the genetic basis related to cold tolerance in different corn germplasms would allow identification of the complexity degree for this characteristic, thus providing appropriate information for corn breeding by marker-assisted selection, especially if the identified QTLs are stable for materials from different sources.

However, crosses among lineages will not always produce hybrids with good performance, this is because it is necessary to determine the best combinations and identify the parental potentials. There are different methods to determine the best combinations among lineages, however, diallel crossing is the most used genetic method to study genetic inheritance, select the best parental and hybrid combinations (YAN; HUNT, 2002). The main objective of breeding programs is to obtain improved lineages for the hybrids development

with characteristics superior to those already existing and the study of genetic control is an important tool in the hybrids production.

The genetic control allows to evaluate the genetic variability existing in the reference population or in the group of selected parents, as well as to infer about the types and the relative importance of the genetic interactions that act in the determination of the characters, favoring the choice of the selective process that maximizes the expected gains with selection.

In general, diallel crosses correspond to all cases where n parents are crossed 2 to 2. These studies have been used to obtain information about the genetic control of characters in the choice of parents by estimates of combining ability and in the compounds prediction (RAMALHO et al., 2012).

The basic model, also known as balanced diallel, complete or half table, includes all the possible combinations among the n parents and also provides information obtained from the parents, reciprocals and backcrosses (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). However, their use may be made unfeasible by the number of parents, because as the number of parents involved increases, the number of crosses to be performed is also increased.

To reduce the number of crosses, the use of partial diallels was proposed. This diallel is composed for two groups with distinct parents that are crossed. It has the advantage of being able to include a larger number of parents (RAMALHO et al., 2012). Cruz, Regazzi and Carneiro (2012) and Morello, Miranda Filho and Gorgulho (2001) affirm that adjustments to the models of Griffing (1956) and Gardner and Eberhart (1966) for this scheme have made it possible to maximize the information about the studied groups with a smaller number of crosses than those required in the balanced diallel, as well as to allow the evaluation of the heterosis effects resulting from hybridization between the two distinct groups.

The general combining ability (GCA) refers to the average behavior of a parent in a series of hybrid combinations and generates information about the concentration of predominantly additive genes in their effects (G_i), helping to choose the parents in intrapopulation breeding programs (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). According to these authors, when the estimate of G_i is low, be it positive or negative, it indicates that the value GCA of the parent does not differ much from the general average of the diallel population. If the values of G_i are high, be they positive or negative, there is evidence that the parent in question is much superior or inferior to the other diallel parents, in relation to the average progeny performance.

The specific combining ability (SCA) is used to designate cases wherein certain hybrid combinations have relatively better or worse performances than expected based on the

average performance of the parents of that hybrid, i.e, it is an estimate of deviations from a hybrid behavior in relation to expected based on the GCA. The SCA is associated with basically non-additive effects, such as dominance and epistasis (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO 2012; CRUZ; VENCOVSKY, 1989).

The SCA effects estimates (S_{ij}) are useful for determining the best hybrid combinations, but SCA does not specify which of the parents should be used as a female or male parent at the crosses.

For most characteristics the lineage use as a female or male parental does not interfere in the hybrid performance, but for some characteristics the orientation of the crossing may be the factor responsible for the success. The use of crosses with their respective reciprocal in diallel studies allows to estimate the reciprocal effect and consequently to define better how crossings should be oriented (BORDALLO, 2005).

The success of corn hybrids performance is a result of the heterotic effect by crossbreeding with good combinatorial capacity. In general, the main expected effect is related to the increase yield. In the case of corn crop, some studies were found, mainly aiming to prove the occurrence of heterosis or hybrid vigor in germination (CAUSSE et al., 1995; GOMES et al., 2000; HOECHER et al., 2006; JOSÉ et al., 2004; ROOD et al., 1990; ROOD; LARSEN, 1988). In several of these studies, it was verified that the hybrid plants present greater efficiency in the enzymatic systems than in the lineages.

In cold conditions, in sweet corn hybrid seedlings, better performance than the parent lineages was observed (ALLAM et al., 2016), suggesting that there is heterosis effect for the vigor characteristic. Already for the characteristics of emergency days and dry weight, the results were similar to those observed in parental lineages.

The best hybrids performance compared to the parental lineage corroborates with previous reports that the regulation of cold tolerance involves additive and dominance effects (DJEMEL et al., 2015; REVILLA et al., 2000).

For the cold tolerance characteristic during the germination process in corn cultivars, the reciprocal effect was significant, showing the superiority of the tolerant crosses x susceptible in relation to the susceptible x tolerant. An important contribution of this reciprocal effect is due to the maternal effect. It is interesting to note, the maternal effect for the low temperature tolerance characteristic is related to the capacity per se of the parental lineage, indicating that as higher effect per se as greater the maternal effect. Another observation in this work was that the lineages with characteristic Flint grain were the most tolerant to cold (FRASCAROLI; LANDI 2013).

Other authors also rectified that the cross between tolerant x susceptible lineages was more tolerant to cold than reciprocal involving susceptible x tolerant lineages (PESEV, 1970; PINNEL, 1949). Thus, in order to obtain materials with high cold tolerance during the germination process, both parents should be tolerant, but if a lineage susceptible is used, it should be used as a male parent instead of as a female parent, due to the maternal effect of the characteristic.

In the corn crop, when a lineage susceptible to low temperatures was used as a female parental, the F1 and F2 generations were also susceptible to low temperatures. However, when it was used a tolerant lineage at low temperatures as a female parental, its descendants (F1 and F2) were also tolerant to cold, or less susceptible (KOCOVARÁ et al., 2009). These data are important in the choice of female parental in breeding programs aiming at tolerance to low temperatures.

Thus, so that there is production of tolerant hybrids at low temperatures, it is of great importance to identify and characterize genotypes that are related to this tolerance in the germination phase, as well as the mechanisms that confer this tolerance. The elucidation of these mechanisms will certainly facilitate the generating process of new genetic materials, as well as contribute to the development of selection techniques that can reduce the time and work for the materials evaluation with tolerance to low temperatures.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção de sementes

A pesquisa foi conduzida na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Esta região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Köppen. 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.

Para a realização do trabalho, foram utilizadas seis linhagens de milho, sendo três classificadas como tolerantes a baixa temperatura de germinação (91, 64 e 63) e, três não tolerantes a essa condição de estresse (44, 54 e 57). A escolha dos materiais foi realizada de acordo com os resultados obtidos na pesquisa desenvolvida por Silva Neta et al. (2015). Foi instalado um campo para a multiplicação das seis linhagens e concomitantemente para a produção de sementes híbridas, em um esquema de dialelo parcial incluindo os recíprocos. Sendo assim, foram produzidas sementes de 24 genótipos de milho.

O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química do mesmo. Foi utilizado o espaçamento de 0,8 m entre linhas e sete plantas por metro linear. A adubação de cobertura, assim como os demais tratamentos culturais, foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura. Para prevenir cruzamentos indesejados, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando os estilo-estigmas se apresentaram receptivos, foram realizados, manualmente, os cruzamentos e as autofecundações. As sementes foram amostradas para a determinação do teor de água e a colheita foi realizada quando estas apresentavam 25% de teor de água. As espigas foram despalhadas manualmente e, em seguida, submetidas à secagem artificial a 35°C até que as sementes atingissem o teor de água de aproximadamente 13%.

Para a avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes de milho, determinou-se o teor de água e foram realizados testes de germinação nas temperaturas de 10 e 25 °C.

O teor de água foi determinado pelo método de estufa a 105 °C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras de cada material, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida).

Para cada temperatura o teste foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, com a semeadura entre papel tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de

2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo B.O.D., regulada nas temperaturas de 10 e 25 °C (+ou – 3 °C).

Comparar o processo germinativo das sementes em temperatura ideal e baixa temperatura, requer que se adote período de avaliação diferente entre os tratamentos; no caso do milho em condições de temperatura ideal, o processo germinativo ocorre em até 7 dias, mas à medida que se reduz a temperatura, o período para que ocorra a germinação se prolonga. Em condição de 10°C são necessários até 21 dias para que se observe protrusão radicular em alguns materiais; sendo assim, as avaliações foram realizadas aos 4, 7, 14 e 21 dias após a sementeira. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais das quatro repetições. Foram computadas as plântulas que apresentavam pelo menos 1 cm de raiz principal, com duas raízes adventícias com, pelo menos, 1 cm e 1cm de parte aérea. Avaliou-se também a porcentagem de protrusão, adotando-se como padrão as plântulas com pelo menos 0,5cm de radícula.

Para os testes de germinação a 10°C e 25°C, realizados para avaliação da qualidade fisiológica das sementes, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste agrupamento Scott Knott ao nível de 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico R.

3.2 Heterose

Depois de obtidos os resultados das avaliações da qualidade fisiológica das sementes para todas as linhagens e híbridos considerados, estes foram utilizados para estimar valores para heterose (h), utilizando-se a seguinte expressão (RAMALHO et al., 2012):

$$h = F1 - ((L1 + L2) / 2)$$

em que: F1 – média da geração F1 do híbrido simples

L1 – média da linhagem utilizada como parental masculino do híbrido simples

L2 – média da linhagem utilizada como parental feminino do híbrido simples

3.3 Estimativas das capacidades geral e específica de combinação e dos efeitos recíprocos, materno e não materno

Com base nos resultados da análise de variância, as somas de quadrados dos tratamentos foram decompostas em capacidade geral e específica de combinação e efeitos recíprocos, este último foi desdobrado em materno e não materno. Adaptando o modelo proposto por Griffing (1956) para descrever as observações experimentais, tem-se a caracterização apresentada a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + g_j + S_{ij} + R_{ij} + e_{ij}.$$

Em que: $i = 1, 2, \dots, p$, sendo que $p=2$, que corresponde ao grupo 1, linhagens de baixa qualidade fisiológica de sementes;

$j = 1, 2, \dots, p$, sendo que $p=3$, que corresponde ao grupo 2, linhagens de alta qualidade fisiológica de sementes;

Y_{ij} : valor médio da combinação híbrida entre o i -ésimo genitor do grupo 1 e j -ésimo genitor do grupo 2;

μ : média geral;

g_i : efeito da capacidade geral de combinação do i -ésimo genitor do grupo 1;

g_j : efeito da capacidade geral de combinação do j -ésimo genitor do grupo 2;

S_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação entre genitores de ordem i e j , dos grupos 1 e 2, respectivamente;

R_{ij} : efeito recíproco do cruzamento ij : $R_{ij} = R_{ji}$, $E(R_{ij}) = R_{ij}$; e

E_{ij} : erro experimental médio.

Todos os efeitos foram assumidos como fixos nesta análise, a fim de estimar os efeitos dos pais isoladamente, portanto, algumas restrições foram impostas para estimar os efeitos de CGC, CEC e recíproco, materno e não materno. Tais como: $\sum g_i = 0$; $\sum S_{ij} = 0$ para cada j com $S_{ij} = S_{ji}$; $R_{ji} = R_{ij}$; $\sum m_i = 0$; $\sum n_{mi} = \sum n_{m,j} = 0$ com $n_{mij} = -n_{mji}$.

As fórmulas dos quadrados médios estimados (CGC, CEC e efeito recíproco, materno e não materno) estão disponíveis em Cockerham e Weir (1977) e Griffing (1956). As análises estatísticas foram realizadas com os programas estatísticos R e GENES.

3.4 Análise Proteômica

Para a análise proteômica, foram utilizadas sementes das linhagens 54 e 64, bem como as sementes da combinação híbrida entre essas linhagens e do seu recíproco. As análises foram realizadas com sementes secas e sementes embebidas a 10°C por 4 e 7 dias.

Para a extração das proteínas tolerantes ao calor, as sementes foram moídas em mortár sobre gelo, na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, acrescentou-se solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e o sobrenadante foi transferido para microtubos de capacidade de 1500µL. Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 70µL de extrato + 40µL de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (BLACKMAN et al., 1991). Foram aplicados 50µL do extrato com proteínas + tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 120 v e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006).

Para a extração das enzimas catalase, esterase e superóxido dismutase, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi efetuada a 120 V por 5 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados conforme Alfenas (2006).

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

Para análise de transcritos, foram utilizadas sementes das linhagens 54 e 64, bem como sementes da combinação híbrida entre essas linhagens e do seu recíproco. As análises foram realizadas secas e embebidas a 10°C por 4 e 7 dias.

A expressão dos transcritos envolvidos no processo de tolerância à baixa temperatura durante o processo de germinação foi determinada por meio da técnica de qRT-PCR, a qual foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do RNA, Transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e Análise dos resultados.

3.5.1 Extração e Purificação do RNA

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

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

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

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

3.5.2 Transcrição reversa para síntese do cDNA

Após o processo de extração e purificação, os RNAm foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Foi utilizado kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA® da Applied Biosystems, segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio de PCR convencional. Nessa análise, foi utilizado como controle positivo, a amostra de DNA genômico de milho e o primer correspondente ao gene constitutivo Ubiquitina. Foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização das ampliações.

3.5.3 Desenho dos primers

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

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

Gene	Identificação	Sequência 5'-----3'
<i>Ubiquitina</i>	Controle endógeno	F AAGGCCAAGATCCAGGACAA
		R TTGCTTCCAGCGAAGATGA
<i>SAD</i>	Putative stearyl- ACP desaturase	F GGA TTT CCT CCC TGA CCC A
		R GTC CAT GCC CTC GTC CAA A
<i>ZmMPK5</i>	Mitogeno ativado por proteina kinase	F ACTGATGGACCGCAAACC
		R GGGTGACG AGGAAGTTGG
<i>SOD4</i>	Superóxido Dismutase/Antioxidante	F TGGAGCACCAGAAGATGA
		R CTCGTGTCC ACCCTTTC
<i>cAPX</i>	Ascorbato Peroxidase/Antioxidante	F TGAGCGACCAGGACATTG
		R GAGGGCTTTGTCA CTTGGT

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

Fonte: Do autor (2017).

3.5.4 Análise dos resultados

Para a análise de expressão dos genes selecionados, foi utilizado o aparelho ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), com método de detecção via SYBR Green. Foram utilizadas amostras de cDNA obtidas de sementes secas e embebidas por 4 e 7 dias a 10°C, em triplicatas biológicas. A eficiência dos *primers* desenhados foi determinada por meio de curva de diluições por quantificação absoluta.

No ensaio de expressão, em cada reação utilizou-se 1 µL de cDNA (diluído 1:5), 0,4 µL de primer forward/reverse (10µM) e 5 µL de Master MixSYBR green (Applied Biosystems) totalizando um volume final de 10 µL. As amostras foram pipetadas em triplicatas técnicas, e um controle sem cDNA (NTC) foi incluído para cada par de *primers*. Os

resultados foram normalizados usando CTs (Ciclo de threshold) obtidos pela expressão do gene de referência Ubiquitina (UBI). O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (threshold cycle, CT). A expressão relativa foi analisada pelo método Pfaffl (2001).

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água médio das sementes no momento da realização dos testes foi de 12,8 com variação máxima de 1%.

Em relação à qualidade fisiológica, quando a germinação foi realizada a 25°C, não houve diferença significativa entre os materiais avaliados (Tabela 2). Assim, pode-se afirmar que todos os materiais analisados, ou seja, parentais e híbridos, apresentam resultados semelhantes à 25°C, temperatura essa favorável para germinação de sementes de milho.

Tabela 2 Análise de Variância para os resultados dos testes de germinação realizados a 25°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	23	962.4896	41.84737	1.002	0.4743 ^{ns}
ERRO	65	3006.75	41.76042		
CV (%) = 13.52			Média: 95.6		

ns: não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Do autor (2017).

Não houve diferença estatística nos resultados de germinação entre linhagens e híbridos quando os testes foram realizados a 25°C. Todos os materiais apresentaram germinação superior a 90%, evidenciando elevado potencial germinativo (Tabela 3). O percentual de germinação variou entre 100 a 90% e a heterose variou de -8,5 a 3.

Tabela 3 Valores médios em porcentagem para os resultados obtidos nos testes de germinação (GER) e protrusão (PROT), realizados a 25°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.

Parental Feminino	Parental Masculino	Trat	GER(%)	Heterose
44	44	1	99 A	-
54	54	2	96 A	-
57	57	3	94 A	-
63	63	4	96 A	-
64	64	5	98 A	-
91	91	6	99 A	-
63	44	7	99 A	1.25
64	44	8	90 A	-8.5
91	44	9	100 A	0.5
63	54	10	97 A	0.75
64	54	11	100 A	3
91	54	12	100 A	1.75

Continuação...					
63	57	13	97	A	2.25
64	57	14	90	A	-6
91	57	15	100	A	3
44	63	16	100	A	2.25
54	63	17	96	A	0.25
57	63	18	90	A	-4.75
44	64	19	99	A	0.5
54	64	20	100	A	2.5
57	64	21	98	A	1.5
44	91	22	99	A	-0.5
54	91	23	97	A	-1
57	91	24	95	A	-1.5

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Fonte: Do autor (2017).

Quando as sementes foram colocadas para germinar a 10°C, verificou-se diferença estatística entre os resultados de porcentagem de germinação e porcentagem de sementes com protrusão radicular (Tabela 4) para os materiais avaliados.

Tabela 4 Resumo da Análise de Variância para os resultados obtidos nos testes de germinação (GER) e protrusão (PROT), realizados a 10°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.

FV	GL	QM	
		GER	PROT
Genótipos	23	4546.6*	221.52*
Erro	65	133.2	3.99
Total	88		
Média Geral		39.04	94.88
CV (%)		29.56	2.105289

*Significativo a 1% pelo teste F.

Fonte: Do autor (2017).

Esse resultado é interessante, pois revela que a qualidade fisiológica das sementes avaliadas pelo teste de germinação foi semelhante sob temperatura favorável para germinação de sementes de milho. No entanto, com a redução da temperatura, houve redução significativa dos resultados de germinação dos materiais avaliados.

Os resultados do presente trabalho concordam com os resultados obtidos por Farooq et al. (2008), os quais verificaram que houve efeito significativo da baixa temperatura em sementes de milho híbrido para a característica de germinação e crescimento das plântulas. Na pesquisa realizada por Farooq et al. (2008), as baixas temperaturas aumentaram o tempo para

que as plântulas emergissem, aumentaram também a expressão da enzima superóxido dismutase, além de reduzir a porcentagem de emergência, o coeficiente de uniformidade de emergência e o comprimento das raízes e do sistema radicular.

Resultados semelhantes também foram encontrados em um experimento com três condições de temperatura, e trinta híbridos diferentes, no qual foi verificado efeito significativo do genótipo em diferentes condições de temperatura e foi constatado que, de maneira geral, em condições de baixa temperatura, o sistema radicular e a parte aérea da planta são menos desenvolvidos porque o estresse causado pelo frio reduz significativamente a divisão e o alongamento celular (WIJEWARDANA et al., 2015).

Vale ressaltar que, na presente pesquisa, foram consideradas como germinadas aquelas sementes que originaram plântulas com um centímetro de parte aérea e um centímetro de sistema radicular, com pelo menos duas adventícias e, foram consideradas como protruídas as sementes com radícula de no mínimo 0,5 centímetros.

Para os resultados de protrusão (Tabela 5), pode-se observar que, entre os parentais, a linhagem 91 foi a que apresentou maior porcentagem de protrusão, seguida pelas linhagens 44, 57 e 64. Na linhagem 54 foi observado o menor percentual de sementes com protrusão entre as linhagens avaliadas. A heterose para a característica de protrusão variou de -21,25 a 10,75 e, de acordo com os resultados de heterose dos híbridos e dos recíprocos, pode-se concluir que existe efeito de heterose e efeito do recíproco para a característica de tolerância ao frio durante o processo germinativo. Esses resultados reforçam ainda mais a importância de se analisar as melhores combinações híbridas não só visando a melhor produtividade final, mas também a alta qualidade fisiológica das sementes, uma vez que a semente é o insumo primordial para o estabelecimento da cultura no campo.

Tabela 5 Valores médios em porcentagem para os resultados obtidos nos testes de germinação (GER) e protrusão (PROT), realizados a 10°C em sementes de linhagens e híbridos de milho.

Parental Feminino	Parental Masculino	Trat	PROT	Heterose	GER	Heterose
44	44	1	97 B	-	0 C	-
54	54	2	79 D	-	0 C	-
57	57	3	96 B	-	3 C	-
63	63	4	90 C	-	3 C	-
64	64	5	97 B	-	25 C	-

Continuação...

91	91	6	100	A	-	16	C	-
63	44	7	100	A	6.75	68	A	66.25
64	44	8	99	A	2	17	C	4.25
91	44	9	95	B	-3.75	81	A	73.25
63	54	10	63	E	-21.25	0	C	-1.25
64	54	11	95	B	7	15	C	2.75
91	54	12	100	A	10.25	46	B	37.75
63	57	13	96	B	3.25	21	C	17.75
64	57	14	96	B	-0.5	28	C	14.25
91	57	15	99	A	1.25	88	A	78.75
44	63	16	99	A	5.75	33	C	31.25
54	63	17	95	B	10.75	83	A	81.25
57	63	18	90	C	-2.75	18	C	14.75
44	64	19	100	A	3	74	A	61.25
54	64	20	100	A	12	48	B	35.25
57	64	21	95	B	-1.5	81	A	66.75
44	91	22	100	A	1.25	60	B	51.75
54	91	23	97	A	7.75	81	A	73.25
57	91	24	99	A	0.75	88	A	78.25

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Fonte: Do autor (2017).

Para o cruzamento 63/54 e o seu recíproco 54/63 verifica-se uma variação entre as heteroses destes cruzamentos de 32 pontos. Quando a linhagem 54 foi utilizada como parental feminino, o resultado de protrusão foi superior ao observado quando se utilizou a linhagem 63 como parental feminino. Apesar da linhagem 63 ter sido introduzida no dialelo parcial no grupo dos materiais tolerantes à baixa temperatura de germinação, pode-se constatar que, para a mesma, houve resultados inferiores de protrusão e germinação em relação às linhagens 64 e 91, o que pode ser explicado pela complexidade do controle desta característica.

Os resultados obtidos nesse cruzamento não corroboram com os encontrados por Kocová et al. (2009). Os autores afirmaram que para se obter melhores resultados de tolerância ao frio em plantas híbridas, o material mais tolerante deve ser sempre utilizado como o parental feminino. Nos outros cruzamentos em que se utilizou a linhagem 54 como parental feminino e masculino, não houve diferença estatística para os resultados de protrusão entre os cruzamentos e seus recíprocos, apesar de a linhagem 54 ter sido caracterizada como de baixa tolerância à baixa temperatura. Observa-se ainda, que nestes cruzamentos, quando a linhagem 54 foi utilizada como parental feminino os valores de heterose foram positivos e altos, quando comparados à maioria dos outros resultados.

Nos cruzamentos 57/63 e 57/64 observa-se efeito negativo da heterose, o que sugere que a linhagem 57 não é um bom parental feminino para a característica de prostração em condições de baixa temperatura.

Com relação à tolerância ao frio, é muito importante que as sementes tenham uma rápida germinação e originem plântulas normais mesmo na condição de baixa temperatura. Nesse sentido, a avaliação da porcentagem de prostração é importante para verificar se as sementes têm o processo germinativo iniciado mesmo em condições de baixa temperatura. No entanto, é fundamental que a plântula se desenvolva de maneira rápida e uniforme.

O que pode ser observado ainda na Tabela 5 é que em muitos materiais com altos valores de porcentagem de prostração radicular, não foram observados valores significativos de germinação.

A permanência das sementes prostradas abaixo do solo pode favorecer o ataque de pragas e doenças. Além disso, quanto mais tempo a plântula demorar a emergir, menos competitiva ela será em relação às plantas daninhas. A utilização de sementes de baixo vigor está associada ao aumento da biomassa de plantas daninhas de 169-210% e diminuição da produtividade das culturas de 16-21% (RASMUSSEN, 2000).

Assim, em condições de baixas temperaturas é necessário que a germinação das sementes e a emergência das plântulas ocorram de maneira rápida e uniforme para permitir maior exploração da área, reduzindo a competição com plantas daninhas e também o escape de pragas e fungos do solo. Assim, é necessário que a plântula tenha potencial genético para suportar baixas temperaturas.

Com relação ao teste de germinação, como dito anteriormente, pode-se observar na Tabela 5 que muitos materiais que apresentaram alta porcentagem de sementes com prostração não apresentaram plântulas no padrão para serem consideradas como normais. Para tolerar condições de baixa temperatura é necessário estabelecimento rápido e uniforme do estande de plantas, sendo assim fundamental que se avalie não só a capacidade da semente em iniciar o processo germinativo, mas sim, avaliar a capacidade de as sementes originarem plântulas normais mesmo em condições de frio.

De uma maneira geral, os resultados de germinação dos híbridos foram superiores aos observados em sementes das linhagens (Tabela 5). Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos nos quais foi observada heterose na germinação e no vigor de sementes (GOMES et al., 2000; HOECHER et al., 2006; ROOD et al., 1990; ROOD; LARSEN, 1988; JOSÉ et al., 2004).

Nas sementes das linhagens 44 e 54 apesar de ter sido observada elevada porcentagem de protrusão, não se observou plântulas com o padrão estabelecido após 21 dias de semeadura. Nos híbridos em que a linhagem 44 foi utilizada como parental feminino, apesar de observada elevada porcentagem de protrusão, não se verificou o mesmo comportamento em relação à porcentagem de germinação.

Para todos os cruzamentos analisados observou-se efeito da heterose, com exceção do observado nos cruzamento 63/54 no qual não houve diferença estatística dos resultados observados para o teste de germinação.

A heterose variou de -1,25 a 81,25, evidenciando que o vigor híbrido pode e deve ser explorado para produção de híbridos tolerantes à baixa temperatura durante o processo de germinação. Esses resultados corroboram com Meyer, Pospisil e Scholten (2007), os quais afirmam que, durante os estágios iniciais de desenvolvimento do embrião, há maior expressão gênica e maior atividade metabólica em sementes dos híbridos em relação à observada em sementes dos parentais o que propicia maior eficiência metabólica e, portanto, melhor desempenho do híbrido.

Assim como para os resultados de porcentagem de protrusão, no cruzamento 54/63 verificou-se o maior efeito de heterose (81,25). No entanto, no cruzamento recíproco 63/54 não houve efeito de heterose (-1,25). Esses resultados reforçam que, para a combinação híbrida entre os parentais 63 e 54, a linhagem 54 deve ser utilizada como parental feminino para que se obtenha na geração F1 sementes com característica de tolerância ao frio.

Em uma avaliação geral, maiores valores de heterose foram observados quando nos cruzamentos estavam envolvidas as linhagens 91, 54 e 57, independentemente de terem sido utilizadas como parental masculino ou feminino.

Kollipara et al. (2002), cruzaram linhagens contrastantes para tolerância à baixas temperaturas durante a germinação e observaram altos valores de heterose nos híbridos gerados. Os autores também observaram, por meio do teste de frio, efeito recíproco entre os híbridos, sendo que o híbrido com maior valor de germinação foi aquele que tinha como parental feminino a linhagem de maior qualidade neste teste, mostrando a importância da escolha do genitor feminino para a obtenção de sementes com tolerância à baixas temperaturas na germinação. No entanto, no presente trabalho, não se identificou uma correlação direta entre maior tolerância ao frio e utilização da linhagem mais tolerante como parental feminino.

- **Análise da Capacidade de Combinação**

Os quadrados médios para a capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, dos efeitos recíprocos (ER) e seus desdobramentos, efeitos materno (EM) e não materno (NM) encontram-se na Tabela 6.

Pelos resultados da análise de variância, verificou-se efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade para os dados obtidos para porcentagem de sementes com protrusão radicular e porcentagem de germinação realizada a 10°C.

Tabela 6 Quadrados médios das capacidades geral (CGC) e específica de combinação (CEC) e dos efeitos recíprocos (ER), maternos (EM) e não-maternos (NM), para os testes de porcentagem de protrusão (PROT) e porcentagem de germinação (TG).

FV	GL	QM	
		GER	PROT
CGC	5	3650.8910*	498.9621*
CEC	9	5821.9893*	163.7987*
ER	9	7850.2611*	285.4505*
Erro	65	133.2154	3.989552

*Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Fonte: Do autor (2017).

A CGC refere-se ao desempenho médio de um genitor em combinações híbridas e sua significância na análise de variância refere-se à existência de variabilidade entre os efeitos da CGC (G_i) associados aos genes aditivos. A significância para CEC (S_{ij}) permite associar aos efeitos não aditivos, pois a CEC é uma estimativa dos desvios do comportamento de um híbrido em relação ao esperado com base na CGC (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012; CRUZ; VENCOVSKY, 1989).

A significância dos quadrados médios dos efeitos recíprocos (ER) indica a existência de diferenças significativas entre os híbridos e seus respectivos recíprocos (WU; MATHESON, 2001).

Pelos resultados dos quadrados médios dos efeitos de CGC e CEC, foi observado que, para o teste de germinação, o efeito da CEC foi superior ao efeito da CGC, evidenciando a maior importância dos efeitos não aditivos. A maior importância dos efeitos não aditivos na qualidade fisiológica de sementes também foi relatado por Cabral et al. (2013) ao avaliarem sementes de dez linhagens de milho pipoca em cruzamentos dialélico completo com recíproco. Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Gomes et al. (2000) para qualidade

fisiológica de sementes de milho tropical, no qual os autores concluíram que houve efeito significativo para CGC e CEC, e que os efeitos não aditivos foram mais significativos quando avaliou-se a emergência de plântulas, índice de velocidade de germinação, comprimento de parte aérea e raiz de plântulas, o índice de velocidade de emergência, entre outros.

Na presente pesquisa, para a porcentagem de protrusão, o efeito da CGC teve maior magnitude em relação à CEC, evidenciando predominância dos efeitos aditivos na expressão do caracter.

Pode-se observar, ainda, que o efeito do recíproco foi significativo tanto para a porcentagem de germinação, quanto para protrusão radicular, à 10°C, Tabela 5.

- **Estimativas dos efeitos de capacidade geral (CGC) e específico (CEC) de combinação, efeito recíproco (ER)**

As estimativas dos efeitos da CGC (G_i) variaram para porcentagem de protrusão radicular e porcentagem de germinação, o que revela o desempenho diferencial das linhagens em combinações híbridas, para a característica de tolerância ao frio, quando avaliada por meio destas análises (Tabela 7).

Tabela 7 Estimativas dos efeitos de capacidade geral de combinação (G), capacidade específica de combinação (S), efeito recíproco materno (M) e não materno (N) para os testes de porcentagem de protrusão (PROT) e porcentagem de germinação (GER) quando germinadas a 10°C.

Parâmetro	PROT	GER
G1 ₄₄	2.392	3.659
G2 ₅₄	-5.408	-9.591
G3 ₅₇	0.058	-1.611
G4 ₆₃	-3.208	-7.140
G5 ₆₄	2.192	-2.964
G6 ₉₁	3.975	17.646
S14	5.442	14.440
S15	-0.458	16.164
S16	-1.825	15.754
S24	-8.758	18.940
S25	5.342	-18.986
S26	4.808	10.404
S34	1.775	-11.290
S35	-2.125	11.434
S36	-0.158	32.674
M1	0.838	3.533
M2	-5.384	-13.783

Continuação...		
M3	1.949	-5.650
M4	3.968	2.117
M5	-0.032	16.867
M6	-1.338	-3.083
N14	3.630	16.083
N15	-1.370	-26.067
N16	-2.259	9.983
N24	-8.148	-25.350
N25	2.852	38.150
N26	5.296	-12.800
N34	4.519	9.267
N35	-1.481	-12.083
N36	-3.037	2.817

Fonte: Do autor (2017).

Para protrusão radicular, as maiores estimativas positivas de CGC foram observadas para as linhagens 44, 64 e 91, o que indica que esses genitores foram melhores que os demais avaliados quando utilizados nas combinações híbridas, quanto à tolerância ao frio, avaliada por meio da porcentagem de sementes com protrusão radicular (Tabela 7).

Entre as estimativas negativas, maiores valores foram observados para a linhagem 54 e 63. Assim, esses genitores foram piores que os demais avaliados, contribuindo para um baixo desempenho nas combinações híbridas em condições de baixa temperatura. Já para a linhagem 57, apesar da estimativa positiva da CGC, o valor estimado foi baixo em relação às demais linhagens, o que indica que a média de protrusão radicular em sementes dos híbridos em que a linhagem 57 foi utilizada como genitor, não difere da média geral do dialelo.

De uma maneira geral, a linhagem 91 foi a que mais contribuiu para aumentar a porcentagem de protrusão radicular nas sementes híbridas, enquanto que a linhagem 54 foi a que não contribuiu de maneira efetiva à resposta a baixa temperatura.

Por meio dessa avaliação, é importante ressaltar que o menor valor de heterose foi observado quando a linhagem 54 foi utilizada como parental masculino em combinação com a linhagem 63 (Tabela 5).

Com relação à estimativa da CGC para o teste de porcentagem de germinação, as maiores estimativas positivas de CGC foram observadas para as linhagens 44 e 91. Para a linhagem 91 verificou-se a maior estimativa positiva de CGC em relação às demais linhagens.

Para a linhagem 91 também foi observada CGC positiva para o teste de porcentagem de protrusão. Assim, pode-se afirmar que a linhagem 91 foi a linhagem com melhor

desempenho quando em combinações híbridas para a característica de tolerância ao frio quando avaliada por meio das porcentagens de germinação e protrusão radicular à 10°C.

Assim, infere-se que essa linhagem contém maior concentração de alelos favoráveis para tolerância a baixas temperaturas durante o processo germinativo e que a mesma pode ser explorada em programas de melhoramento para a característica de tolerância ao frio.

Nas linhagens 54, 57, 63 e 64 observaram-se estimativas negativas para a CGC, sendo que a menor, observada para a linhagem 54, contribui para um baixo desempenho das sementes dos híbridos dos quais participou, para a característica de tolerância ao frio.

O efeito da CEC (S_{ij}) é o desvio de certas combinações híbridas que são relativamente superiores ou inferiores ao que seria esperado com base na capacidade geral de combinação de suas linhagens genitoras e está associado aos efeitos de dominância dos genes, e epistasia envolvendo dominância. Quanto maior o valor, mais divergentes são as combinações, embora sejam também influenciadas pela frequência gênica média do dialelo (CRUZ; VENCOSKY, 1989).

Para o teste de porcentagem de protrusão, não foram observados resultados expressivos da CEC para todas as combinações híbridas testadas. Vale ressaltar que para a característica porcentagem de protrusão, com exceção da linhagem 54, as demais linhagens apresentaram resultados elevados, o que fez com que os resultados de heterose não fossem tão expressivos.

O cruzamento entre as linhagens 44x63 resultou nos melhores resultados de CEC em relação aos demais cruzamentos para a característica de protrusão.

No teste de germinação o híbrido 57x91 foi o que apresentou maiores estimativas de S_{ij} . Esse híbrido apresentou 78,25% de heterose, mostrando a contribuição dos genes de dominância no controle deste caráter.

Para a característica de tolerância ao frio durante o processo germinativo em cultivares de milho, o efeito recíproco provou ser significativo, e foi significativamente evidenciada a superioridade dos cruzamentos tolerantes x susceptíveis em relação aos susceptíveis x tolerantes. Uma importante contribuição desse efeito recíproco se deve ao efeito materno. É interessante notar que o efeito materno para a característica de tolerância a baixa temperatura está relacionado com a capacidade per se da linhagem parental, indicando que maior o efeito per se, maior o efeito materno (FRASCAROLI; LANDI 2013).

De acordo com Cockerham e Weir (1977) o efeito recíproco pode ser desdobrado em efeito materno e não materno. Este desdobramento do R permite inferir a respeito das causas genéticas do efeito recíproco. O efeito materno é causado por genes citoplasmáticos ou pela interação entre o DNA citoplasmático e o nuclear, portanto o caráter é herdável e pode ser explorado em programas de melhoramento, enquanto que o efeito não materno está

diretamente relacionado aos efeitos do ambiente sobre o genótipo (WU; MATHESON, 2001). A ocorrência de efeito materno deve ser sempre considerada durante a escolha dos cruzamentos híbridos, uma vez que já foi demonstrado que existe efeito do parental feminino na característica de qualidade de sementes. O desdobramento do efeito recíproco é de fundamental importância para o entendimento do controle genético da tolerância a baixas temperaturas durante o processo germinativo, permitindo ao melhorista tomar decisões mais assertivas em relação a este caráter.

Os resultados obtidos reforçam a importância de se testar as melhores combinações híbridas visando a obtenção de híbridos com melhor tolerância a baixa temperatura durante o processo de germinação. Ressalta-se, também, que para os materiais analisados a capacidade per se de cada material tem grande influência no desempenho do híbrido. Outra característica de destaque é a existência do efeito recíproco.

- **Expressão gênica**

A tolerância ao frio é uma característica complexa que está associada a vários fatores como a qualidade fisiológica, características bioquímicas e expressão de enzimas antioxidantes. Estas enzimas são importantes para a remoção de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Em plantas superiores, as espécies reativas de oxigênio, são geradas durante o metabolismo aeróbico normal, como a fotossíntese e respiração. No entanto, em condições de estresse, como baixas temperaturas, as EROS são produzidas em níveis elevados, podendo resultar em danos ao DNA, proteínas e lipídios. Sob condições de estresses bióticos e abióticos, as enzimas antioxidantes desempenham um importante papel na remoção de EROS.

Nas Figuras 1 e 2 pode-se observar a expressão das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), nas linhagens 54, 64 e no híbrido 64x54 e seu recíproco 54x64. Vale ressaltar que para esses cruzamentos, houve efeito do recíproco e, quando o mesmo foi desdobrado, evidenciou-se efeito materno para os cruzamentos realizados com os parentais 54 e 64, considerando-se germinação das sementes a 10°C. No presente trabalho o cruzamento 54x64 originou sementes com maior tolerância a baixas temperaturas, do que o recíproco 64x54.

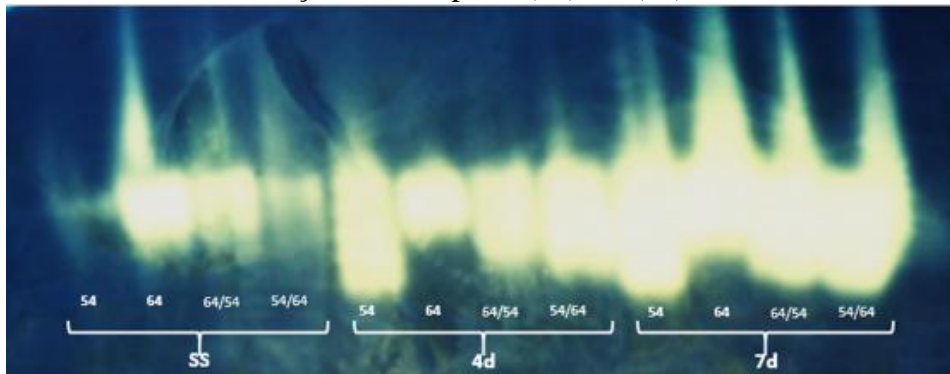
Apesar de a linhagem 64 ter sido considerada como tolerante a baixa temperatura durante o processo germinativo, a mesma não se comportou como um bom parental feminino no cruzamento com a linhagem 54.

Com os resultados da expressão da enzima antioxidante catalase (Figura 1), pode-se verificar que em sementes secas, na linhagem 54 foi observada menor expressão do que em sementes da linhagem 64. A expressão da catalase em sementes híbridas foi maior naquelas provenientes do cruzamento 64x54, provavelmente em função da maior expressão em sementes da linhagem 64. No entanto, quando as sementes foram colocadas para germinar na temperatura de 10°C, pôde-se observar uma inversão na expressão da enzima nas sementes dos materiais avaliados, ou seja, maior expressão em relação à observada em sementes da linhagem 64. Já a expressão foi semelhante em sementes híbridas.

Ressalta-se, ainda, que independentemente do genótipo, maior expressão da enzima foi observada em sementes submetidas a 10°C por período de sete dias durante a germinação. Esta é uma resposta em relação à condição de mais estresse. Sabe-se que o estresse ao frio é maior em sementes com maior teor de água.

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água, protegendo as células da oxidação causada por radicais livres. Quanto mais acelerado o metabolismo da semente, maior a produção de EROS, e essa produção se acentua em condição de estresse. A expressão semelhante da catalase nos híbridos evidencia que existe efeito heterótico para expressão dessa enzima, quando as sementes de milho são embebidas sob baixas temperaturas.

Figura 1 Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10 °C por 4 (4d) e 7 (7d) dias. UFLA, Lavras, 2017.



Fonte: Do autor (2017).

Na Figura 2, pode-se observar a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD). Essa enzima é considerada como a primeira no processo de defesa antioxidante e atua anulando a ação dos superóxidos, catalisando sua conversão a peróxido de hidrogênio.

Em sementes da linhagem 54 foi observada a maior expressão da SOD em todos os tratamentos avaliados, inclusive em sementes secas. Porém, de uma maneira geral, a

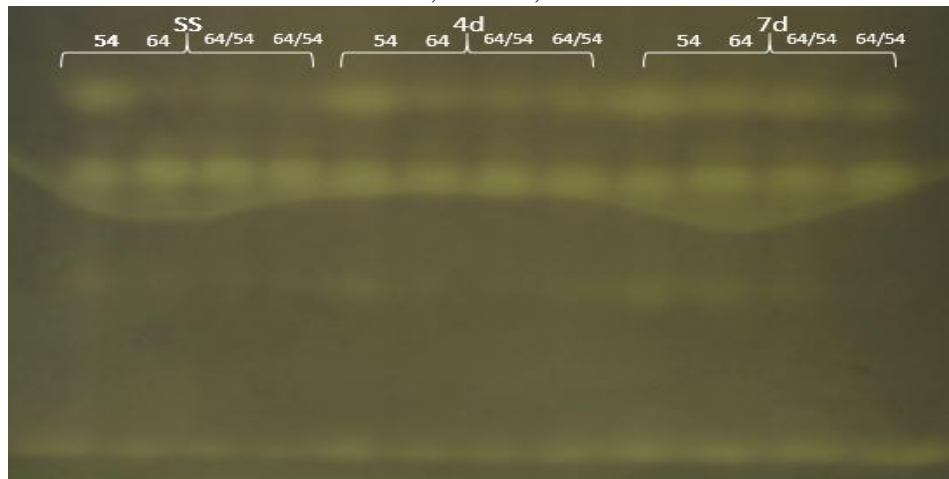
expressão da SOD foi maior quando as sementes foram submetidas à baixa temperatura. Após sete dias de embebição à 10°C, houve aumento na intensidade das bandas, apesar do polimorfismo ter sido semelhante em sementes submetidas aos demais tratamentos.

Farooq et al. (2008), trabalhando com sementes híbridas de milho, verificaram que houve efeito significativo da baixa temperatura sobre a germinação, crescimento das plântulas, estabilidade de membrana e atividade enzimática antioxidante. As baixas temperaturas aumentaram o tempo para que as plântulas emergissem, aumentaram também a expressão da enzima superóxido dismutase, além de reduzir a porcentagem de emergência de plântulas.

Guo et al. (2006), também verificaram aumento da expressão das enzimas SOD e CAT em genótipos de arroz após 3 dias de exposição a baixa temperatura.

Xi et al. (2010), relatam que em plantas com maior expressão de SOD e outras enzimas scavenging estão associados ao aumento da tolerância a estresses e, de acordo com Baek e Skinner (2003), o aumento da tolerância ao frio pode ser acompanhado pelo aumento da expressão de genes específicos que codificam enzimas antioxidantes.

Figura 2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10°C por 4 (4d) e 7 (7d) dias. UFLA, Lavras, 2017.



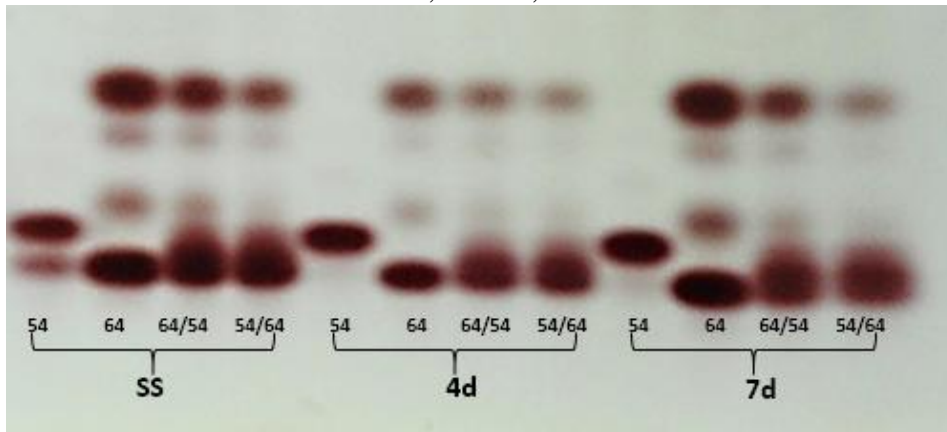
Fonte: Do autor (2017).

Em relação à esterase, foi observada maior atividade desta enzima (Figura 3) em sementes expostas a baixa temperatura de germinação por sete dias. Em sementes da linhagem 64, observou-se maior expressão do que nas sementes da linhagem 54 e consequentemente em sementes híbridas da combinação 64x54 também houve maior expressão da EST em relação às do híbrido 54x64.

Maior expressão da enzima esterase também foi observada em sementes da linhagem 64 em relação à observada em sementes híbridas (64/54 e 54/64), quando as sementes foram germinadas por 7 dias à 10°C. Isto pode estar associado à menor peroxidação em sementes híbridas, uma vez que a esterase está associada à oxidação de ésteres de membrana.

A esterase participa em reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídeos de membrana em sementes, provocando a peroxidação de lipídios. Vale ressaltar que a estabilidade da membrana é um dos fatores fundamentais para tolerância das sementes à baixa temperatura de germinação.

Figura 3 Atividade da enzima esterase (EST) em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10°C por 4 (4d) e 7 (7d) dias. UFLA, Lavras, 2017.



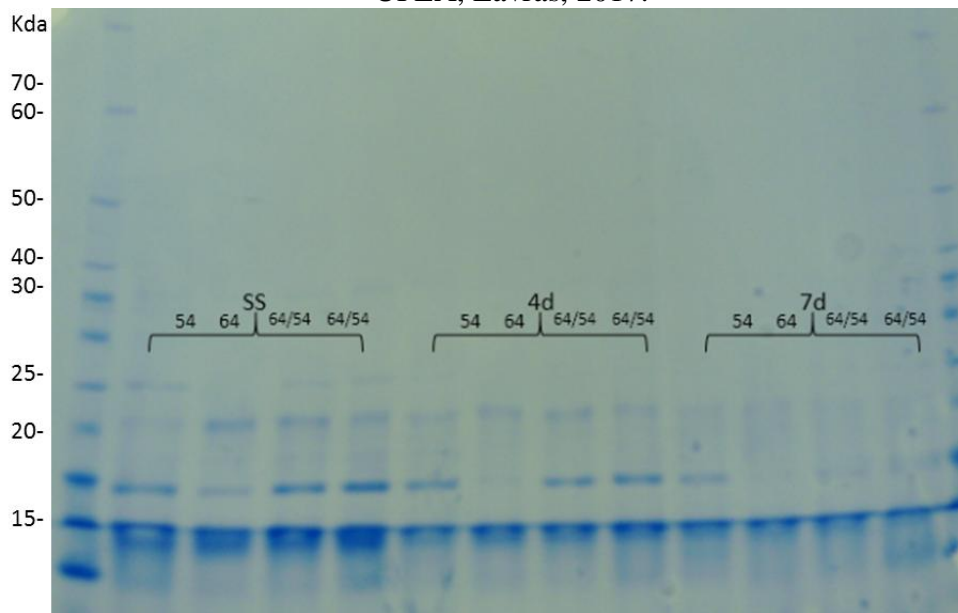
Fonte: Do autor (2017).

Na Figura 4, está representado o zimograma da expressão de proteínas resistentes ao calor. Padrões similares foram observados em sementes secas das linhagens parentais e dos híbridos. No entanto, em condição de estresse, houve menor expressão em sementes da linhagem 64 em relação aos demais materiais. Em sementes híbridas e de seus recíprocos, observou-se expressão semelhante, diferentemente do observado na expressão das enzimas CAT, SOD e EST, para as proteínas resistentes ao calor a expressão em sementes híbridas não foi semelhante à observada nas sementes do parental feminino. Nas condições estudadas, a expressão em sementes híbridas das proteínas resistentes ao calor foi semelhante à expressão observada em sementes do parental 54.

Importante observar que, aos sete dias de embebição à 10°C, há desaparecimentos de bandas (pesos moleculares 32,4 e 18,5). Sabe-se que, com o avanço do processo de embebição, há perda da tolerância à dessecação. Além disso, poderia estar associado também à perda de tolerância ao frio.

De acordo com Menezes et al. (2008), padrões de proteínas resistentes ao calor apresentam-se polimórficos e estáveis em sementes de milho com diferentes níveis de qualidade, o que faz dessa classe de proteínas um excelente marcador na identificação de cultivares.

Figura 4 Atividade de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho secas (SS) e submetidas à embebição a 10°C por 4 (4d) e 7 dias (7d).
UFLA, Lavras, 2017.



Fonte: Do autor (2017).

A maior expressão de proteínas tolerantes ao calor em sementes da linhagem 54 em relação às da linhagem 64 pode ter contribuído para o melhor desempenho dos híbridos quando a linhagem 54 foi utilizada como parental feminino.

Os mecanismos envolvidos na tolerância ao frio têm sido estudados também por meio da expressão de transcritos em uma gama de espécies, incluindo *Arabidopsis thaliana* (CHEN; MURATA, 2002), trigo (WINFIELD et al., 2010), cevada (GREENUP et al., 2011). A técnica de PCR em tempo real, permite conhecer a expressão relativa do gene alvo, ou seja, permite quantificar a expressão e assim fazer uma análise mais aprofundada da influência do gene na característica de interesse.

Pelos resultados da análise da expressão gênica, de uma maneira geral, observa-se variação da expressão dos genes analisados nas sementes secas e após 4 e 7 dias de embebição a 10°C.

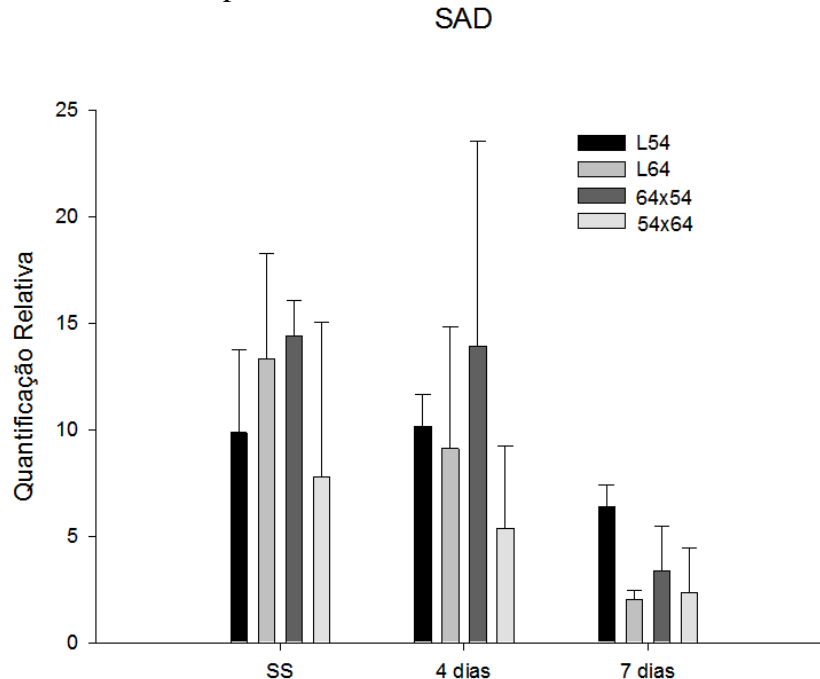
De maneira geral, a expressão de Putative stearyl- ACP dessaturase (SAD), que atua na instauração de ácidos graxos (Figura 5) foi menor nas sementes embebidas a 10°C por período de sete dias, o que indica que na condição de estresse causado pela baixa temperatura a atividade da SAD foi reduzida para todos os genótipos avaliados.

Não foi observada diferença significativa da expressão do gene SAD em sementes secas e naquelas submetidas à 10°C por período de quatro dias. No entanto, aos 7 dias esta diferença foi muito significativa.

As SAD dessaturases convertem ácido graxo saturado para insaturado, sendo que, a conversão de ácidos graxos saturados em insaturados, é um importante mecanismo de tolerância das plantas em condições de baixa temperatura.

Em *Arabidopsis thaliana*, a expressão de dessaturases (FAD8) foi fortemente induzida por baixa temperatura (GIBSON, 1994). Liu et al. (2006) estudando o efeito da temperatura na cultura do tomate, verificaram que a expressão das dessaturases (LeFAD7), foi induzida por estresse causado por baixa temperatura (4° C), mas inibida pela alta temperatura (45°) nas folhas. Em arroz, o gene OsFAD2 sugere conferência à resistência a estresses em plantas crescidas sob condições de temperatura desfavorável (SHI et al., 2012). Kodama et al. (1995) observaram que a insaturação dos ácidos graxos é um dos fatores envolvidos na tolerância a baixas temperaturas, nas folhas jovens de tabaco.

Figura 5 Expressão do gene *SAD* em sementes de milho secas e embebidas a 10°C por 4 e 7 dias. UFLA, Lavras, 2017.



Fonte: Do autor (2017).

O sistema enzimático de defesa antioxidante em plantas compreendem principalmente a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e glutathione peroxidase (GPX).

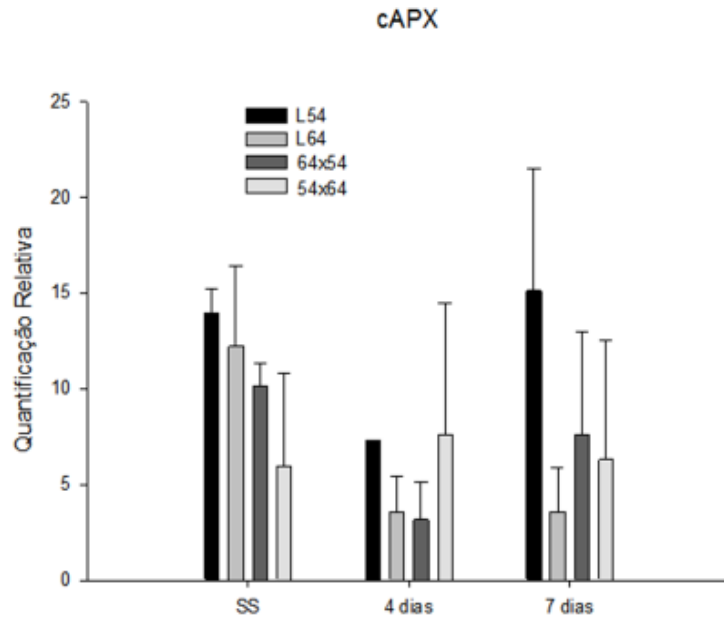
As enzimas superóxido dismutase são uma família de metaloenzimas que catalisam a dismutação de radicais superóxidos tóxicos para O_2 e H_2O_2 e, por isso, desempenham um papel fundamental no sistema de defesa antioxidante nas plantas (KAYIHAN et al., 2012).

As Ascorbato Peroxidase (APX) são proteínas que neutralizam os peróxidos utilizando ascorbato. Essas proteínas fazem parte do grupo dos principais antioxidantes em células vegetais. Quando superóxidos são geradas como subproduto da fotossíntese ou produto da oxidação de NADPH, as superóxido dismutase (SOD) convertem rapidamente os superóxidos em moléculas neutras e relativamente estáveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As APXs limpam os peróxidos de hidrogênio e os neutralizam por meio do ciclo da ascorbato-glutathione (WANG et al., 2014).

Em sementes secas, a atividade da ascorbato peroxidase (Figura 6) foi maior em sementes das linhagens em relação a dos híbridos. Após sete dias de embebição, em sementes da linhagem 54 houve a maior expressão da APX em relação aos demais genótipos. Pode-se inferir que esse material estava produzindo quantidade maior de peróxido, o que demanda mais produção de APX.

Aos quatro dias de embebição a $10^\circ C$, houve, em relação às sementes secas, redução da expressão do gene APX em sementes dos materiais L54, L64 e 64x54. Já em sementes do híbrido 54/64 não houve diferença significativa na expressão desse gene em sementes secas e naquelas embebidas por quatro dias a $10^\circ C$. Já, aos sete dias, observa-se aumento da expressão desse gene, em relação ao quarto dia, em sementes da L54 e do híbrido 64x54.

Figura 6 Expressão do gene APX em sementes de milho seca e embebidas a 10°C por 4 e 7 dias. UFLA, Lavras, 2017.



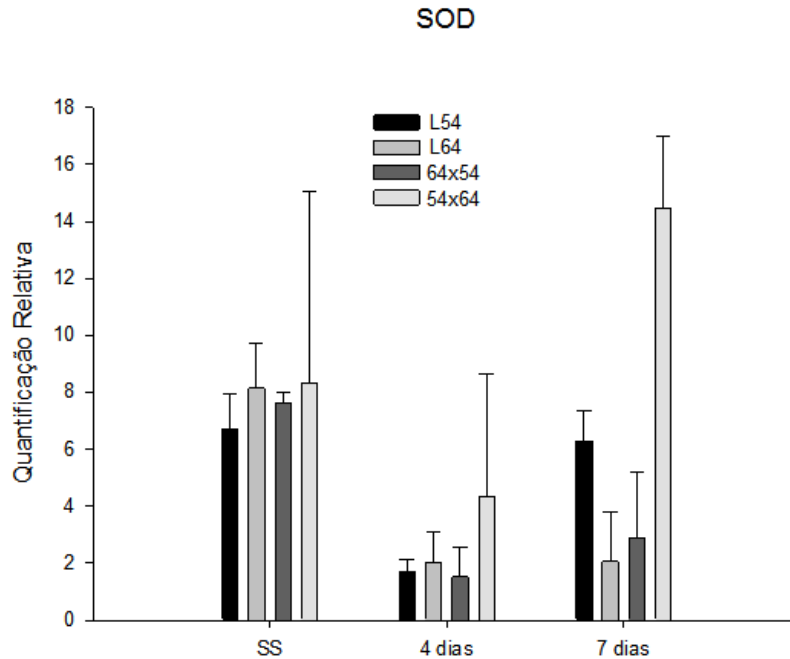
Fonte: Do autor (2017).

Para a enzima superóxido dismutase (SOD) a variação da expressão nas sementes secas foi menor entre os quatro genótipos avaliados (Figura 7). No entanto, em condição de estresse causado pela baixa temperatura, foi observada maior expressão da SOD nas sementes do cruzamento 54x64. Nesse cruzamento foi observada a melhor porcentagem de germinação quando comparado aos demais genótipos analisados.

Em sementes secas não houve variação da expressão da SOD em sementes dos materiais L54 e 64x54 e em sementes dos materiais L64 e 54x64. No entanto, em sementes híbridas 54x64 houve mais expressão da SOD do que em sementes da L54 e nos híbridos 64x54.

Aos quatro dias de embebição a 10°C, houve redução significativa da expressão do gene SOD em sementes de todos os genótipos estudados. Aos quatro dias maior expressão foi observada em sementes do híbrido 54x64, assim como aos sete dias.

Figura 7 Expressão do gene SOD em sementes de milho secas e embebidas a 10°C por 4 e 7 dias. UFLA, Lavras, 2017.



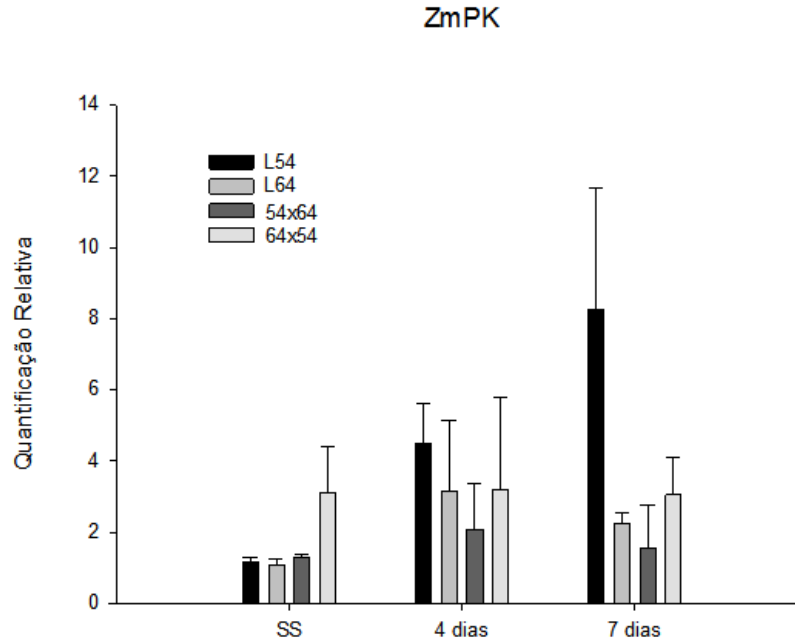
Fonte: Do autor (2017).

Na Figura 8, está representada a expressão do gene ZmMPK. O acúmulo de ABA e peróxido de hidrogênio contribui para maior expressão desse gene (LIN et al., 2009).

A expressão de ZmMPK foi maior nas sementes embebidas a 10°C aos 4 e 7 dias, do que nas sementes secas para os materiais L54, L64 e 54x64. Maior expressão desse gene foi verificada em sementes embebidas por 7 dias a 10°C em sementes da linhagem 54. Em sementes dessa linhagem foi observada menor porcentagem de protrusão radicular em relação às demais linhagens. Também não foram observadas plântulas com o padrão estabelecido nessa pesquisa. Essa intolerância à baixa temperatura pode ser devido ao acúmulo de EROS e também ao maior teor de ácido abscísico, já que esses dois fatores podem ter contribuído para maior expressão do ZmMPK.

Ácido abscísico (ABA) é um fito hormônio conhecido por modular o desenvolvimento das plantas em resposta aos estresses (CHRISTMANN et al., 2006). ABA regula importantes aspectos do desenvolvimento da planta, incluindo a iniciação e manutenção da dormência das sementes. Esse hormônio estabiliza o estado de dormência das sementes para assegurar que a germinação ocorra sob uma adequada condição ambiental (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Figura 8 Expressão do gene ZmPK em sementes de milho seca e embebidas a 10°C por 4 e 7 dias. UFLA, Lavras, 2017.



Fonte: Do autor (2017).

Os resultados da análise do controle genético por meio dos quais foram observados efeito de heterose e efeito de recíproco, com grande influência dos efeitos não maternos, associados aos resultados de proteômica e transcriptômica reforçam a complexidade da característica de tolerância ao frio em sementes de milho durante o processo germinativo. A importante influência de efeitos não aditivos e a existência de heterose e efeito recíproco, reforçam a importância de se testar as combinações híbridas quanto à característica tolerância ao frio, assim como a escolha de qual genitor será utilizado como parental feminino e qual será utilizado como masculino.

Por essas considerações pode-se sugerir que pesquisas na área de sementes, focadas nos estudos de combinações híbridas atreladas a análises bioquímicas e moleculares, podem trazer a compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância a estresses abióticos e contribuir para a seleção e desenvolvimento de materiais tolerantes a esses estresses.

5 CONCLUSÕES

Há heterose para a característica de tolerância ao frio durante o processo de germinação em sementes de milho.

Os genes de efeito não aditivo são de maior magnitude para germinação de sementes de milho.

Existe efeito recíproco para a característica de tolerância ao frio durante a germinação em sementes de milho.

Há maior expressão das enzimas catalase, superóxido dismutase e esterase em sementes de milho, aos sete dias de germinação, à 10°C em relação às sementes secas.

Há menor expressão do gene Putative stearyl- ACP dessaturase (SAD) em sementes de milho, aos sete dias de embebição, a 10°C.

Há menor expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho, aos sete dias de embebição a 10°C em relação aos demais tratamentos.

Há variações da expressão dos genes APX, SOD e ZMPX em sementes secas e embebidas sob baixa temperatura, assim como entre os genótipos estudados.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, 2006.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 57-T4.
- ALLAM, M. et al. Identification of QTLs involved in cold tolerance in sweet× field corn. **Euphytica**, Wageningen, v. 208, n. 2, p. 353-365, 2016.
- BAEK, K. H.; SKINNER, D. Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 6, p. 1221-1227, 2003.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHEKAR SHETTY, H.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical-changes, associated with accelerated aging of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.
- BECK, E. H.; HEIM, R.; HANSEN, J. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. **Journal of Biosciences**, Bagalore, v. 29, n. 4, p. 449-459, 2004.
- BLACKMAN, M. J. et al. Proteolytic processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 29-33, 1991.
- BORDALLO, P. N. et al. Diallel analysis of sweet and regular corn genotypes for agronomic characters and total protein content. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 123-127, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- BYFIELD, G. E.; UPCHURCH, R. G. Effect of temperature on delta-9 stearoyl-ACP and microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 4, p. 1698-1704, 2007.
- CABRAL, P. D. S. et al. Genetic effects on seed quality in diallel crosses of popcorn. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 6, p. 502-511, 2013.
- CARENA, M. J. Development of cold and drought tolerant short-season maize germplasm for fuel and feed utilization. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, 2000.
- CAUSSE, M. et al. Sucrose phosphate synthase: an enzyme with heterotic activity correlated with maize growth. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 4, p. 995-1001, 1995.
- CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 250-257, 2002.

- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 444-451, 2007.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Gene regulation during cold acclimation in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 126, n. 1, p. 52-61, 2006.
- CHRISTMANN, A. et al. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 3, p. 314-325, 2006.
- COCKERHAM, C. C.; WEIR, B. S. Quadratic analyses of reciprocal crosses. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 187-203, 1977.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Editora da UFV, 2012.
- CRUZ, C. D.; VENCOVSKY, R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 425-438, 1989.
- CRUZ, J. C. et al. **Milho**: cultivares para 2015/2016. Disponível em: <<http://www.apps.agr.br/upload/Cultivares%20de%20Milho%20dispon%C3%ADveis%20no%20mercado%20na%20safra%202015%2016.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- DJEMEL, A. et al. Genetic effects of the critical factors of sugary1 fitness. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 154, n. 1, p. 40-57, 2016.
- DRAGICEVIC, V. et al. Stimulative influence of germination and growth of maize seedlings originating from aged seeds by 2, 4-D potencies. **Homeopathy**, Alexandria, v. 102, n. 3, p. 179-186, 2013.
- FAROOQ, M. et al. Activation of antioxidant system by KCl improves the chilling tolerance in hybrid maize. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 194, n. 6, p. 438-448, 2008.
- FIEDLER, K. et al. Genetic dissection of the temperature dependent emergence processes in sorghum using a cumulative emergence model and stability parameters. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 125, n. 8, p. 1647-1661, 2012.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.
- FRACHEBOUD, Y. et al. Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 2, p. 241-253, 2004.
- FRASCAROLI, E.; LANDI, P. Divergent selection in a maize population for germination at low temperature in controlled environment: study of the direct response, of the trait inheritance and of correlated responses in the field. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 3, p. 733-746, 2013.
- FUJINO, K. et al. Molecular identification of a major quantitative trait locus, qLTG3-1, controlling low-temperature germinability in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 34, p. 12623-12628, 2008.
- FUNNEKOTTER, B. et al. Acclimation-induced changes in cell membrane composition and influence on cryotolerance of in vitro shoots of native plant species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Dordrecht, v. 114, n. 1, p. 83-96, 2013.

- GARDNER, C. O.; EBERHART, S. A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, Washington, v. 22, n. 3, p. 439-452, 1966.
- GIBSON, S. et al. Cloning of a Temperature-Regulated Gene Encoding a Chloroplast [omega]-3 Desaturase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 106, n. 4, p. 1615-1621, 1994.
- 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.
- GREENUP, A. G. et al. Transcriptome analysis of the vernalization response in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e17900, 2011.
- GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 9, n. 4, p. 463-493, 1956.
- GUO, Z. et al. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 11, p. 828-836, 2006.
- GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 187-223, 1990.
- HODGES, D. Mark et al. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p. 857-863, 1997.
- 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, 2006.
- HOWARTH, C. J.; OUGHAM, H. J. Gene expression under temperature stress. **New Phytologist**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 1-26, 1993.
- IWATA, N.; FUJINO, K. Genetic effects of major QTLs controlling low-temperature germinability in different genetic backgrounds in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome**, Ottawa, v. 53, n. 10, p. 763-768, 2010.
- JANMOHAMMADI, M.; ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S. Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. **Phytochemistry**, New York, v. 117, p. 76-89, 2015.
- JIANG, P. et al. Dynamic QTL analysis for activity of antioxidant enzymes and malondialdehyde content in wheat seed during germination. **Euphytica**, Wagenigen, v. 190, n. 1, p. 75-85, 2013.
- JOHNOVÁ, P. et al. Plant responses to ambient temperature fluctuations and water-limiting conditions: a proteome-wide perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1864, n. 8, p. 916-931, 2016.
- JOSÉ, S. C. B. R. et al. Electrophoretic patterns of the alpha-amilase enzyme in corn seeds submitted to high drying temperature. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 77-83, 2004a.
- JOSÉ, S. C. B. R. et al. Tolerância de sementes de linhagens de milho à alta temperatura de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1107-1114, 2004b.

- KAYIHAN, C. et al. Cu/Zn superoxide dismutase activity and respective gene expression during cold acclimation and freezing stress in barley cultivars. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, n. 4, p. 693-698, 2012.
- KIM, G. et al. Viability estimation of pepper seeds using time-resolved photothermal signal characterization. **Infrared Physics & Technology**, Exeter, v. 67, p. 214-221, 2014.
- KOČOVÁ, M. et al. The influence of low-temperature on the photochemical activity of chloroplasts and activity of antioxidant enzymes in maize leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, n. 3, p. 475-483, 2009.
- KODAMA, H. et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 107, n. 4, p. 1177-1185, 1995.
- KOLLIPARA, K. P. et al. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 3, p. 974-992, 2002.
- KORN, M. et al. Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between Arabidopsis thaliana accessions of widely varying freezing tolerance. **Plant, cell & Environment**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 813-827, 2008.
- KURBIDAEVA, A. S.; NOVOKRESHCHENOVA, M. G. Genetic control of plant resistance to cold. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 47, n. 6, p. 646-661, 2011.
- LASHKARI, M. et al. Effect of plant density on yield and yield components of different corn (*Zea mays* L.) hybrids. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, Dubai, v. 10, n. 3, p. 450-457, 2011.
- LINDQVIST, Y. et al. Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. **The EMBO Journal**, Lausanne, v. 15, n. 16, p. 4081, 1996.
- LIN, F. et al. Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 11, p. 3221-3238, 2009.
- LIU, X.Y. et al. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast Omega-3 fatty acid desaturase enhances thermal tolerance. **Journal of Integrative Plant Biology**, Medford, v. 48, n. 9, p. 1096-1107, 2006.
- 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.
- LI, X. et al. Induction of chilling tolerance in wheat during germination by pre-soaking seed with nitric oxide and gibberellin. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 71, n. 1, p. 31-40, 2013.
- MAGALHAES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.
- MENEZES, M. et al. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 111-122, 2008.

- MEYER, S.; POSPISIL, H.; SCHOLTEN, S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 381-391, 2007.
- MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 133, n. 3, p. 481-489, 2008.
- MIURA, K. et al. Mapping quantitative trait loci controlling low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**, Tokyo, v. 51, p. 293-299, 2001.
- MORELLO, C. L.; MIRANDA FILHO, J. B.; GORGULHO, E. P. Partial diallel cross between exotic and adapted maize populations evaluated in acid soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 313, 2001.
- PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Dordrecht, v. 108, n. 2, p. 279-286, 2012.
- PEŠEV, N. V. Genetic factors affecting maize tolerance to low temperatures at emergence and germination. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 40, n. 8, p. 351-356, 1970.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- PINNELL, E. L. Genetic and environmental factors affecting corn seed germination at low temperatures. **Agronomy Journal**, Madison, v. 41, p. 545-550, 1949.
- RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012.
- RASMUSSEN, K. et al. Barley seed vigour and mechanical weed control. **Weed Research**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 219-230, 2000.
- REVILLA, P. et al. Inheritance of cold tolerance at emergence and during early season growth in maize. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 6, p. 1579-1585, 2000.
- ROOD, S. B. et al. Gibberellins and heterosis in maize: quantitative relationships. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 2, p. 281-286, 1990.
- ROOD, S. B.; LARSEN, K. M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 223-233, 1988.
- ŞAHİN-ÇEVİK, M. Identification and expression analysis of early cold-induced genes from cold-hardy Citrus relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Gene**, Amsterdam, v. 512, n. 2, p. 536-545, 2013.
- SASAKI, K. et al. Confirmation of novel quantitative trait loci for seed dormancy at different ripening stages in rice. **Rice Science**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 207-212, 2013.
- SATOH, T. et al. Identification of QTLs controlling low-temperature germination of the East European rice (*Oryza sativa* L.) variety Maratteli. **Euphytica**, Wageningen, v. 207, n. 2, p. 245-254, 2016.

- SCHOLDBERG, T. A. et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 57, n. 7, p. 2903-2911, 2009.
- SHAN, X. et al. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 32-38, 2013.
- SHI, J. et al. A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa*. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 29, n. 3, p. 743-757, 2012.
- SILVA-NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 126, n. 1, p. 45-51, 2006.
- UEMURA, M.; STEPONKUS, P. L. Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 112, n. 2, p. 245-254, 1999.
- WANG, C.; YANG, Q.; WANG, C. Isolation and functional characterization of ZmDBP2 encoding a dehydration-responsive element-binding protein in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 29, n. 1, p. 60-68, 2011.
- WANG, Y. Y. et al. The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 239, n. 4, p. 909-919, 2014.
- WIJEWARDANA, C. et al. Screening corn hybrids for cold tolerance using morphological traits for early-season seeding. **Crop Science**, Madison, v. 55, n. 2, p. 851-867, 2015.
- WINFIELD, M. O. et al. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 749-771, 2010.
- WU, H. X.; MATHESON, A. C. Reciprocal, maternal and non-maternal effects in radiata pine diallel mating experiment on four Australia sites. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, n. 3, p. 205-212, 2001.
- XI, D. M. et al. Seed-specific overexpression of antioxidant genes in *Arabidopsis* enhances oxidative stress tolerance during germination and early seedling growth. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 796-806, 2010.
- YANG, X. et al. Characterization of a global germplasm collection and its potential utilization for analysis of complex quantitative traits in maize. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 28, n. 4, p. 511-526, 2011.
- YAN, W.; HUNT, L. A. Biplot analysis of diallel data. **Crop science**, Madison, v. 42, n. 1, p. 21-30, 2002.
- YU, J. et al. Analysis of cold tolerance in sorghum under controlled environment conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 21-30, 2004.