



THAÍS LIMA MARQUES

**EXPRESSÃO GÊNICA EM SEMENTES, ESPIGAS E
PLÂNTULAS DE LINHAGENS DE MILHO ASSOCIADA À
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO**

**LAVRAS-MG
2018**

THAÍS LIMA MARQUES

**EXPRESSÃO GÊNICA EM SEMENTES, ESPIGAS E PLÂNTULAS DE LINHAGENS
DE MILHO ASSOCIADA À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO**

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

Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Orientador
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Coorientadora

**LAVRAS- MG
2018**

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

Marques, Thaís Lima.

Expressão gênica em sementes, espigas e plântulas de
linhagens de milho associada à tolerância ao déficit hídrico / Thaís
Lima Marques. - 2018.

62 p.

Orientador(a): Renzo Garcia Von Pinho.

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

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

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

THAÍS LIMA MARQUES

**EXPRESSÃO GÊNICA EM SEMENTES, ESPIGAS E PLÂNTULAS DE LINHAGENS
DE MILHO ASSOCIADA À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO**

**GENE EXPRESSION IN SEEDS, EARS AND SEEDLINGS OF MAIZE LINES
ASSOCIATED WITH TOLERANCE TO WATER DEFICIT**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2018

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho UFLA

Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho UFLA

Dra. Marcela Pedroso Mendes Resende UFG



Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Orientador

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Coorientadora

**LAVRAS- MG
2018**

*Aos meus pais, Maria José e Paulo Roberto, por serem meus exemplos.
Pelo carinho, amor, incentivo e apoio incondicional em toda a minha vida.*

Com todo amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser meu Senhor e Salvador iluminando meus caminhos e me concedendo oportunidades, como essa conquista.

Aos meus pais, Maria José e Paulo Roberto, por todo amor, incentivo e conselhos a continuar firme na caminhada e ao meu irmão Guilherme pela amizade e por nunca medir esforços para me incentivar a continuar.

À minha família, tios e primos, por estarem ao meu lado, me receberem e acolherem em Lavras, especialmente a minha avó Clarice por todo carinho.

Ao meu namorado, Gabriel, pela amizade, companheirismo, paciência e incentivo nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Renzo Garcia Von Pinho, e a minha coorientadora, Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por permitirem e auxiliarem na realização dessa pesquisa, e por confiarem em meu trabalho.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos, respectivamente.

A todos os professores do departamento de Biologia, exemplos de dedicação e por contribuírem com ensinamentos para meu aprendizado.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Flávia Botelho e Dra. Marcela Resende, pelas valiosas contribuições.

Aos pós-doutorados, Dra. Heloisa Oliveira dos Santos, Dr. Marcus Vinicius Prado Alves, Dr. Renato Vasconcellos e Dra. Elise de Matos Pereira pela disposição sempre que precisei.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica por todo auxílio e dedicação na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Jaqueline e Geraldo, pela disponibilidade e auxílio na execução dos experimentos.

Aos amigos do Departamento de Biologia, do Setor de Sementes e demais colegas da pós-graduação, em especial a Samanta, Yasmin, Brena, João, Bruno, Élcio e Rubens, pelo apoio e por compartilharem comigo as mesmas angústias e alegrias.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que essa etapa da minha vida fosse especial e inesquecível.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O conhecimento de genes relacionados ao déficit hídrico em sementes e em plântulas pode ser uma importante ferramenta para auxiliar e acelerar o processo de seleção de genótipos de milho mais adaptados às condições de seca. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar a expressão de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho. Foram utilizadas linhagens previamente selecionadas quanto a tolerância ao déficit hídrico, sendo duas linhagens tolerantes (L91-T e L32-T) e duas linhagens não tolerantes (L57-NT e L24-NT). Avaliou-se a qualidade inicial das sementes por meio do teste de germinação e envelhecimento acelerado. Para a emergência e índice de velocidade de emergência (IVE), sementes das quatro linhagens foram semeadas em substrato contendo areia, ajustada para 70% e 10% da capacidade de retenção de água, constituindo-se a condição sem estresse e com estresse hídrico, respectivamente; posteriormente avaliou-se o comprimento radicular e da parte aérea das plântulas. Para as análises proteômicas, utilizaram-se sementes secas, ponta de espigas e plântulas com três, cinco e sete dias após a semeadura submetidas a duas condições contrastantes quanto a disponibilidade hídrica de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT). Foi avaliada a expressão das enzimas catalase, peroxidase, esterase e das proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de eletroforese. Na análise de transcritos foi estudado a expressão dos genes associados a tolerância ao estresse *ZmPP2C*, *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmDBP3*, *ZmAN13*, *ZmALDH9*, *ZmLEA3* e *AOX2* pela técnica de *qRT-PCR*. Pode-se concluir que há maior expressão na ponta de espigas da linhagem L91-T das enzimas catalase, peroxidase e esterase. Há redução da expressão da enzima catalase e esterase em plântulas de sete dias para ambas as linhagens analisadas. Maior atividade das proteínas resistentes ao calor ocorre nas sementes secas da linhagem L91-T. Foram identificados genes potenciais como marcadores para seleção de linhagens de milho tolerantes ao déficit hídrico.

Palavras-chave: *qRT-PCR*. Eletroforese. Proteômica. Estresse abiótico. *Zea mays*.

ABSTRACT

The knowledge of genes related to water deficit in seeds and seedlings can be an important tool to aid and accelerate the process of selection maize genotypes more adapted to water deficit. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression of genes related to the tolerance to water deficit in maize lines. Were used maize lines previously selected for tolerance to water deficit, two tolerant lines (L91-T and L32-T) and two not tolerant lines (L57-NT and L24-NT). The initial seed quality was evaluated by germination and accelerated aging test. For emergence and emergency speed index (ESI), the seeds of the four lines were seeded in substrate with sand, adjusted to 70% and 10% of the water retention capacity, consisting of no stress and stress condition, respectively; than, it was evaluated the root and shoot length of the seedlings. For proteomic analyzes, dry seeds, ears tips and seedlings were used with three, five and seven days after seeding submitted to two contrasting conditions of water availability of two maize lines (L91-T and L57-NT). The expression of catalase, peroxidase, esterase and heat-resistant proteins were evaluated by the electrophoresis technique. In the transcript analysis were studied the expression of the genes associated to stress tolerance *ZmPP2C*, *ZmDREB2A/2.1S*, *ZmDBP3*, *ZmAN13*, *ZmALDH9*, *ZmLEA3* and *AOX2* by the *qRT-PCR* technique. Can be conclude that, higher expression were obtained for ears tip in L91-T lines for catalase, peroxidase and esterase. There was a reduction in the enzyme expression of the catalase and esterase in seedlings after seven days of planting, for both lines analysed. Higher activity of the resistant heat proteins activity occurred in dry seeds of line L91-T. Were identified potential genes as markers for the selection of maize lines tolerant to water deficit.

Keywords: *qRT-PCR*. Electrophoresis. Proteomics. Abiotic stress. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Expressão da enzima catalase em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).41
- Figura 2 - Expressão da enzima peroxidase em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).43
- Figura 3 - Expressão da enzima esterase em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).44
- Figura 4 - Expressão das proteínas resistentes ao calor em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).46
- Figura 5 - Expressão do gene ZmALDH9 em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).47
- Figura 6 - Expressão do gene ZmAN13 em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).48
- Figura 7 - Expressão do gene ZmPP2C em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).49
- Figura 8 - Expressão do gene ZmDREB2A/2.1S em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).50
- Figura 9 - Expressão do gene AOX2 em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).51

- Figura 10 - Expressão do gene ZmDBP3 em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT)..... 52
- Figura 11 - Expressão do gene ZmLEA3 em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT)..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Primers</i> utilizados na análise de <i>qRT-PCR</i>	33
Tabela 2 -	Resultados médios da porcentagem de plântulas normais do teste de germinação de quatro linhagens de milho.	35
Tabela 3 -	Resultados médios da porcentagem de plântulas normais do teste de envelhecimento acelerado de quatro linhagens de milho.	36
Tabela 4 -	Valores médios de emergência (%) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).....	37
Tabela 5 -	Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).....	37
Tabela 6 -	Valores médios de comprimento de raiz (cm) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).....	38
Tabela 7 -	Valores médios de comprimento da parte aérea (cm) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).	39
Tabela 1A -	Resumo da análise de variância para a germinação de sementes de quatro linhagens de milho.....	61
Tabela 2A -	Resumo da análise de variância para a germinação de sementes de quatro linhagens de milho submetidas ao envelhecimento acelerado.....	61
Tabela 3A -	Resumo da análise de variância para porcentagem de emergência (E%), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (PA) de quatro linhagens de milho submetidas a diferentes disponibilidades hídricas (DH), sem estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água).....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Cultura do milho no Brasil	15
2.2	Danos à planta desencadeados pelo déficit hídrico.....	16
2.3	Efeitos do estresse hídrico em sementes	17
2.4	Mecanismos de tolerância à seca.....	19
2.5	Melhoramento genético visando tolerância ao estresse hídrico	21
2.6	Expressão de genes relacionados ao estresse hídrico	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Localização	26
3.2	Seleção de linhagens de milho contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico	26
3.3	Multiplicação das sementes das linhagens	26
3.4	Avaliação inicial da qualidade fisiológica das sementes.....	27
3.4.1	Teste de Germinação	27
3.4.2	Teste de Envelhecimento Acelerado.....	28
3.5	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas ao estresse hídrico	28
3.6	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	29
3.7	Análises proteômicas	29
3.7.1	Análise das enzimas catalase, peroxidase e esterase por meio da técnica de eletroforese.....	30
3.7.2	Análise de proteínas resistentes ao calor.....	31
3.8	Análise da expressão de transcritos por meio da técnica de <i>qRT-PCR</i>	31
3.8.1	Extração e purificação do <i>RNA</i>	32
3.8.2	Transcrição reversa para síntese do <i>cDNA</i>	32
3.8.3	Desenho dos primers.....	32
3.8.4	Análise dos resultados.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Avaliação inicial da qualidade fisiológica das sementes.....	35
4.2	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas ao estresse hídrico	36
4.3	Análises proteômicas	40
4.4	Análises transcriptômicas	46
5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE A.....	62

1 INTRODUÇÃO

O estresse devido a baixa disponibilidade hídrica é uma variável climática que afeta a produção de grãos de milho no Brasil (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2017). Tal condição provoca alterações no desenvolvimento das plantas refletindo diretamente na produtividade, sendo considerado o fator que mais limita o desenvolvimento vegetal e o principal agente causador de redução da produção de grãos (VON PINHO et al., 2002).

Neste contexto, um dos objetivos mais relevantes nos programas de melhoramento genético atualmente consiste em aumentar a tolerância das plantas aos estresses ambientais. Contudo, os mecanismos que controlam a tolerância, como a tolerância ao déficit hídrico, são complexos envolvendo a expressão de vários genes, dificultando a identificação (ASHRAF, 2010).

A planta quando sujeita ao estresse busca adaptar-se a tal condição por meio da expressão de genes específicos. Os genes responsivos ao déficit hídrico são, em grande maioria, regulados por ácido abscísico (ABA), relacionado com a indução de diferentes sistemas de defesa antioxidante, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, e antioxidantes não enzimáticos. No entanto, existem genes que não são regulados por ABA, indicando a existência de diversos mecanismos moleculares reguladores na expressão (DING et al., 2012; LIU et al., 2013).

Muitos genes tem sido reportados como de potencial importância para aumentar a tolerância de plantas ao déficit hídrico, como os genes da família *ZmDREB*, e os genes *ZmALDH9*, *ZmLEA3* e *ZmAN13* (JIN et al., 2007; LIU et al., 2013; WANG; DONG, 2009; ZHOU et al., 2012). As diferenças na tolerância ao déficit hídrico entre as plantas ocorrem devido as diferenças quantitativas na expressão de genes, possibilitando por meio do estudo da análise de expressão gênica o conhecimento de genótipos superiores quanto a tolerância a seca.

Assim, visando auxiliar os programas de melhoramento quanto à seleção de cultivares de milho mais adaptadas às condições de baixa disponibilidade hídrica, uma ferramenta promissora para a caracterização e identificação precoce de genótipos tolerantes ao estresse consiste no conhecimento da expressão de genes relacionados ao déficit hídrico em sementes e em plântulas de milho, por meio da identificação de marcadores funcionais.

Diante disso, objetivou-se neste trabalho avaliar a expressão de genes associados ao déficit hídrico em sementes, tecidos de espiga e plântulas desenvolvidas em condições

normais de cultivo e em condições de déficit hídrico, por meio das análises proteômica e transcriptômica. Em específico, buscou-se definir potenciais genes marcadores visando a seleção precoce de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do milho no Brasil

A cultura do milho apresenta grande importância na economia brasileira, representando aproximadamente 42,1% da produção total de grãos no país. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017), foram produzidos 97,71 milhões de toneladas de grãos de milho na safra 2016/2017.

Este cereal é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros sendo realizado em duas épocas de semeadura, a primeira safra, denominada de safra de verão; e a segunda safra, denominada de safrinha. No cultivo de verão, a semeadura ocorre na época tradicional durante o período chuvoso, entre fins de agosto até os meses de outubro/novembro, e em praticamente todos os estados brasileiros. Na safra de verão 2016/2017 a produção foi de 30,46 milhões de toneladas, com um aumento de aproximadamente 18,1% em relação a safra 2015/2016 (CONAB, 2017). A segunda safra referente ao milho de sequeiro, onde concentra-se a maior produção de grãos de milho, a semeadura é realizada de janeiro até meados de abril, quase sempre após a soja precoce, principalmente na região Centro-Oeste e os estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais (CRUZ et al., 2010).

O aumento das áreas de cultivo, principalmente no cultivo safrinha, e o aperfeiçoamento dos sistemas de produção ao longo dos últimos anos, tem contribuído para a elevação da produção de grãos de milho (BERGAMASCHI et al., 2006). No entanto, ainda se observam algumas limitações relacionadas as condições climáticas, especificamente temperatura, fotoperíodo, salinidade e o regime hídrico (CRUZ et al., 2010). O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é o principal agente causador da queda de produção de grãos de milho, sendo intensificados no cultivo safrinha, em que apresentam um menor potencial de produtividade e os riscos aumentam devido ao menor índice pluviométrico e temperaturas mais baixas presentes nesse época (VON PINHO et al., 2002).

A produção da safrinha de 2016/2017 representou mais de 68% do total da produção de milho, com aproximadamente 67,3 milhões de toneladas de grãos. Já na produção da safrinha de 2015/2016 houve redução recorde superior em 24,7% em relação à safra 2014/2015, e a produtividade da cultura foi a menor vista nos últimos dez anos com 3,9 mil kg/ha, representando uma diminuição de 29%. Tal redução na produção ocorreu principalmente devido ao déficit hídrico (CONAB, 2017). De acordo com a CONAB (2017), em algumas regiões do país a deficiência hídrica causou uma redução significativa na

produção da cultura do milho, a exemplo dos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, nos quais houve perdas de até 100% em algumas lavouras.

Assim, visando a diminuição dos efeitos do déficit hídrico, é importante o desenvolvimento de genótipos que utilizam a água com mais eficiência e que sejam mais tolerantes ao estresse. Por meio da seleção de germoplasmas com variabilidade genética suficiente para um alto potencial de rendimento e adaptáveis à condição de baixa disponibilidade hídrica (LANGRIDGE; PALTRIDGE; FINCHER, 2006).

2.2 Danos à planta desencadeados pelo déficit hídrico

A água compõe os diferentes tecidos e órgãos das plantas, sendo, portanto, necessária como reagente no metabolismo vegetal, translocação de solutos, na turgescência celular e na abertura e fechamento estomático (LAWLOR; CORNIC, 2002). Sob condições de baixa disponibilidade hídrica, o desenvolvimento vegetal é influenciado pelas alterações nos processos fisiológicos, morfológicos, moleculares e bioquímicos (BARNABÁS; JÄGER; FEHÉR, 2008; SHAO et al., 2008).

As plantas possuem diferentes sensibilidades à seca ao longo das fases de crescimento e desenvolvimento (CATTIVELLI et al., 2008; DARYANTO et al., 2016). O primeiro sintoma aparente é a diminuição da área foliar, devido a redução de turgor celular, o que desencadeia o fechamento estomático com o objetivo da planta sobreviver ao estresse por um tempo prolongado (KARAMANOS; PAPATHEOHARI, 1999).

Durante a floração, a baixa disponibilidade hídrica provoca atraso na floração feminina em relação a antese, aumentando o intervalo entre os florescimentos feminino e masculino, e provocando falhas da fertilização, podendo também desencadear a formação de gametas anormais, principalmente os gametas femininos (BARNABÁS et al., 2008; CATTIVELLI et al., 2008; DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2016). Além disso, ocorre redução do período de enchimento de grãos, o que diminui o acúmulo de amido no grão e acarreta expressiva redução na produtividade, já que o amido representa mais de 65% do peso seco de grãos (BARNABÁS et al., 2008).

De acordo com Entringer et al. (2014), uma característica observada nas plantas sob condições de seca é o enrolamento das folhas, sendo controlada por poucos genes, 1 ou 2, predominantemente aditivos e pouco influenciados pelo ambiente. Ainda segundo o autor, as plantas de milho que apresentam o fenótipo de folhas enroladas, mesmo em condições ideais

de cultivo, são naturalmente mais tolerantes ao estresse hídrico e, permitem ao pesquisador fazer inferência da qualidade do germoplasma para o uso em programas de melhoramento visando a tolerância a seca.

Por meio de pesquisas tem sido observado que a planta, quando sujeita ao déficit hídrico, desencadeia um maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas moléculas tóxicas são formadas nas plantas em resposta aos estresses bióticos e abióticos (APEL; HIRT, 2004; KEUNEN et al., 2013; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004). As espécies reativas de oxigênio (EROS) provocam um estresse oxidativo nas plantas e afetam o sistema de defesa de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica (ASHRAF, 2010); sendo, portanto, a peroxidação de lipídios na membrana um dos eventos mais significativos por causar diminuição da fluidez e modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ; GARCIA; LEMOS FILHO, 2002).

A intensidade do estresse oxidativo em uma célula é determinada pela abundância de espécies reativas de oxigênio, principalmente nas formas de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^{\bullet}) e oxigênio “singlet” (1O_2). Tais moléculas são produzidas sobretudo como subprodutos de várias vias metabólicas ou, ainda são geradas com a destruição do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresse (APEL; HIRT, 2004). A principal região de produção de EROS nas células durante o estresse são as organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com fluxos de elétrons sustentados, entre elas os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (APEL; HIRT, 2004; KEUNEN et al., 2013).

2.3 Efeitos do estresse hídrico em sementes

Apesar do interesse em pesquisas visando a tolerância a estresses em plantas, poucos trabalhos têm sido relacionados às sementes. As sementes são cruciais para a obtenção de um bom estado de plantas e para o desenvolvimento satisfatório de plântulas. Contudo, na presença de estresses, estas podem ser altamente vulneráveis, provocando perda de vigor ou até mesmo a morte (KRANNER et al., 2010).

O primeiro estresse severo experimentado pelas sementes, desde que não tenha ocorrido estresse durante sua formação na planta mãe, é a dessecação durante a maturação. Um conjunto de mecanismos de proteção é induzido pela secagem, preparando a semente para a sobrevivência no estado seco e permitindo a resistência às condições adversas. Com a

maturação progressiva das sementes, a atividade fotossintética é reduzida e a respiração, ainda que pequena, é uma fonte para a produção de espécies reativas de oxigênio (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008). Mecanismos de proteção e reparação são observados em sementes com a finalidade de resistir às condições ambientais adversas, além de algumas características multifuncionais como a presença de epiderme protetora, tolerância a dessecação e dormência (KRANNER et al., 2010).

Em condições favoráveis de campo, as sementes de milho absorvem água, entumecem e começam a germinar. A enzima alfa amilase atua no processo germinativo por disponibilizar carboidratos suficientes para o desenvolvimento do embrião por meio da hidrólise do amido, sendo que sua maior expressão ocorre entre cinco a sete dias e reduz gradualmente até o fim do ciclo germinativo (FRANCO et al., 2002). A radícula é a primeira a apresentar alongação, seguida pelo coleótilo com plúmula fechada e as três ou quatro raízes seminais laterais.

A água atua nos processos metabólicos de desenvolvimento, sendo responsável pela manutenção da organização do sistema de membranas celulares (LAWLOR; CORNIC, 2002). Não obstante, estresses causados pela baixa disponibilidade hídrica durante o início do ciclo germinativo podem impedir a germinação, alterando a velocidade, o tempo e a uniformidade, além de comprometer a produção e o estabelecimento da cultura. Deficiências hídricas posteriores podem paralisar o crescimento, bem como retardar o desenvolvimento reprodutivo das plantas (BARNABÁS; JÄGER; FEHÉR, 2008).

Segundo Moterle et al. (2008), a porcentagem de plântulas normais fortes de híbridos de milho pipoca é reduzida quando sujeitas ao déficit hídrico. E quanto mais negativo for o potencial hídrico, menores são os comprimentos da parte aérea das plântulas de milho (ÁVILA; BRACCINI; SCAPIM, 2007). Em trabalho realizado por Abreu et al. (2014) foi identificado que o estresse hídrico de -0,9 MPa afeta a qualidade fisiológica e o vigor das sementes das linhagens de milho avaliadas.

Por fim, a alta tolerância e a vulnerabilidade à estresses em certos estágios do ciclo de vida das sementes constituem importantes tópicos a serem desenvolvidos em pesquisas futuras. Não obstante, conceitos relacionados a expressão de genes em períodos de estresses bióticos e abióticos também merecem destaque, as quais compõem modelos desafiadores para a abordagem em estudos.

2.4 Mecanismos de tolerância à seca

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é um dos principais estresses abióticos estudados, e a capacidade da planta de resistir a tal condição, ou seja, seu grau de tolerância, varia com o seu estágio de desenvolvimento (ASHRAF, 2010). Uma série de eventos ocorre nas plantas quando sujeitas à um determinado estresse, o qual inicia pela percepção do estresse e encerra-se com a expressão de um conjunto de genes alvo, promovendo uma adaptação a essa condição adversa (PASTORI; FOYER, 2002).

Os mecanismos de resistência das plantas são, geralmente, divididas em três categorias sendo elas escape, prevenção e tolerância. Na categoria escape, a planta apresenta um ciclo de vida curto, ou seja, é capaz de completar seu ciclo de vida antes que o déficit hídrico se torne severo o suficiente para causar danos fisiológicos. Na prevenção, ocorre o retardo à desidratação, o qual consiste na manutenção do estado favorável de água na planta por meio do uso de mecanismos como, o fechamento estomático e senescência. Já na categoria de tolerância, consiste na capacidade da planta em manter seu metabolismo sob baixo potencial hídrico e de recuperar-se após o estresse (BARNABÁS et al., 2008).

Um mecanismo de regulação das plantas ao estresse são os fitormônios, em que um dos sinais a longo prazo que operam durante o estresse devido a seca é o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) (BRAY, 2002). Quando sujeita ao déficit hídrico, a planta aumenta as concentrações de ABA na raiz, o qual atua aumentando a condutividade hidráulica e o crescimento radicular. O ABA também é transportado para a parte aérea da planta por meio do xilema, causando o fechamento dos estômatos e reduzindo a expansão foliar o que, conseqüentemente, previne a desidratação dos tecidos. Porém, um alto nível de ABA em órgãos reprodutivos de plantas provoca a inibição da divisão celular e prejudica, além do florescimento, o desenvolvimento e a formação das sementes (BARNABÁS et al., 2008).

Há efeitos significativos nos níveis de fitormônios como o ácido abscísico (ABA), ácido indolacético, zeatina, e giberelina, em folhas de milho quando submetidas ao déficit hídrico por meio de polietileno glicol (WANG et al., 2009). Segundo Wang et al. (2009), há aumento do nível de ácido indolacético nas folhas de milho durante o início de adaptação ao estresse, porém, posteriormente esse nível diminui drasticamente em resposta ao déficit hídrico. O nível de ABA aumenta drasticamente nas folhas após 24 horas de exposição a seca, permanecendo elevado até o final do ciclo da cultura. Já os níveis de zeatina e giberilina são reduzidos nas folhas de milho submetidas ao estresse hídrico, possibilitando, segundo os autores, que tais hormônios sejam eficazes em proteger plantas de milho sob estresse.

Outro mecanismo importante que permite que as plantas mantenham a absorção de água e a turgescência celular sob estresse de baixa disponibilidade hídrica é o ajuste osmótico por meio de compostos osmólitos, contribuindo para o aumento da taxa fotossintética, do crescimento vegetativo e da manutenção dos processos fisiológicos. O acúmulo de osmólitos nas raízes permite o desenvolvimento contínuo ou mesmo aumentado da raiz em solos mais profundos e úmidos, fornecendo às plantas acesso a um reservatório maior de água no qual a cultura possa sobreviver (CATTIVELLI et al., 2008; SERRAJ; SINCLAIR, 2002). Diante disso, tal característica tem sido utilizada em programas tradicionais de melhoramento de plantas visando aumento da produtividade em ambientes com déficit hídrico (CLAUSSEN, 2005).

Em plantas expostas a seca, observa-se acúmulo de solutos como betaína, glicina-betaína, prolina, manitol, poliaminas e trealose (GROVER et al., 2001). Outros osmólitos produzidos em resposta ao estresse incluem sacarose, polióis (álcool de açúcar, pinitol) e oligossacarídeos.

O déficit hídrico, como mencionado, desencadeia um maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as plantas protegem suas células e compartimentos subcelulares dos efeitos tóxicos das EROS com o auxílio de compostos protetores, como glutatona, ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenoides, e de várias enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase, peroxirredoxina e polifenol oxidase (APEL; HIRT, 2004; ASHRAF, 2010; REDDY et al., 2004). Portanto, é observado em plantas sob déficit hídrico aumento da atividade de enzimas antioxidantes relacionadas ao aumento da tolerância a seca (ZHU, 2002).

Nos mecanismos enzimáticos de destoxificação, a enzima superóxido dismutase, a qual consiste num grupo de metaloenzimas capazes de livrar a célula do processo oxidativo, atua como a primeira linha de defesa contra EROS por meio da transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio (CARNEIRO et al., 2011). O peróxido de hidrogênio produzido pela superóxido dismutase pode ser convertido em água e oxigênio pela enzima catalase, ou pode ser convertido em água pela ação da enzima ascorbato peroxidase (LEE; KIM; LEE, 2001). Em relação ao metabolismo de lipídios, a esterase é uma enzima degradativa a qual atua em reações de hidrólise de ésteres.

Diante disso, o aumento da expressão de enzimas antioxidantes sob condições de déficit hídrico é variável entre as diversas espécies e mesmo entre diferentes cultivares da mesma espécie. A regulação realizada pelas enzimas pode ser perdida se o estresse for severo,

aumentando a produção de radicais livres, levando a peroxidação lipídica e causando em última instância a degradação das membranas e a morte celular (REDDY et al., 2004).

2.5 Melhoramento genético visando tolerância ao estresse hídrico

No melhoramento genético, por meio do melhoramento convencional e/ou a engenharia genética, são desenvolvidos genótipos de alta qualidade e rendimento. São técnicas eficientes para a adaptação das culturas em ambientes propensos à seca, além de contribuir para a redução da vulnerabilidade da produção agrícola frente às mudanças climáticas (ASHRAF, 2010; DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2016).

Pesquisas vem sendo realizadas visando a obtenção de cultivares tolerantes a seca. Bänziger et al. (2004) reporta que cientistas do CIMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo) realizam programas de melhoramento na região do sul da África desde 1997, além de outros institutos como o CRI (Crop Research Institute) e algumas universidades (ASHRAF, 2010).

O desenvolvimento de genótipos altamente produtivos e tolerantes à estresses abióticos, entre eles o estresse pela baixa disponibilidade hídrica, é desafiador para os melhoristas (DURÃES et al., 2005). O controle genético da tolerância ao estresse hídrico em milho é complexo, sendo tipicamente quantitativo e influenciado pela interação genótipos por ambientes (ASHRAF, 2010; BÄNZIGER et al., 2004; ROY; TUCKER; TESTER, 2011).

A interação genótipos por ambientes (GxE) pode ocorrer devido a variação ambiental no tempo e severidade dos déficits hídricos, necessitando a realização de pesquisas em diversos locais para uma correta decisão de seleção (BÄNZIGER et al., 2004). Segundo Câmara et al. (2007), a eficiência de seleção para produção de grãos em ambientes com déficit hídrico é reduzida devido à alta proporção da variação ambiental em relação a genética, provocando redução da herdabilidade do caráter e dificultando a seleção de genótipos superiores.

O melhoramento vegetal para qualquer característica necessita de uma quantidade significativa de variação genética. Tal variabilidade pode ser obtida por novas combinações de alelos, por meio de cruzamentos entre diferentes genótipos e por meio da introdução de novos germoplasmas de outros programas de melhoramento existentes (ASHRAF, 2010). Deste modo, deseja-se a obtenção de genótipos de alta produtividade e performance, garantindo o sucesso no melhoramento.

De acordo com Cooper et al. (2014) as principais fases dos programas de melhoramento visando a tolerância ao déficit hídrico são escolha de germoplasma, fenotipagem e seleção. O processo de fenotipagem ou caracterização de recursos genéticos para diversos atributos, consiste na avaliação e mensuração dos caracteres afetados pelo ambiente. Para uma eficiente fenotipagem da caracterização do déficit hídrico em condições controladas de campo, deve-se basear em três pontos chaves: escolha de características das plantas que são relacionadas ao estresse de seca; descrição do potencial de água no solo e na planta; e o *background* genético e estágio de desenvolvimento da cultura que melhor expressa a tolerância (DURÃES et al., 2004).

Devido a dificuldade de identificar um parâmetro fisiológico como um indicador confiável de boa performance em ambiente seco é sugerido que o desempenho de rendimento da variedade seja utilizado como principal indicador de tolerância (VOLTAS; LÓPEZ-CÓRCOLES; BORRÁS, 2005). Segundo Bernier et al. (2008), a seleção indireta sob condições de seca é a estratégia mais utilizada pelos pesquisadores em programas de melhoramento de cereais.

Uma alternativa para a seleção, de acordo com Betrán et al. (2003) é a avaliação de caracteres secundários relacionados à tolerância a seca e com maior herdabilidade, como por exemplos os caracteres “*stay-green*”, enrolamento das folhas e intervalo entre os florescimentos feminino e masculino (IFMF) (ABREU, 2013; ENTRINGER et al., 2014). Contudo, essas características são visíveis no final do ciclo da cultura e demandam, em sua maioria, maior tempo e mão de obra.

Assim, visando auxiliar e acelerar os programas de melhoramento quanto a seleção de cultivares de milho mais adaptadas às condições de seca, uma ferramenta promissora é o conhecimento da expressão de genes relacionados a tolerância ao déficit hídrico em sementes e em plântulas de milho, para a caracterização precoce de genótipos tolerantes e intolerantes ao estresse pela baixa disponibilidade hídrica.

2.6 Expressão de genes relacionados ao estresse hídrico

O gene consiste em um segmento de *DNA* situado em uma região específica de um determinado cromossomo, o qual participa da manifestação fenotípica de um dado caráter. Sua expressão é um processo em que a informação contida no gene é traduzida em *RNA* e/ou proteínas. Contudo, não são todos os genes que se expressam em todas as células, dividindo-se em dois grandes grupos. O primeiro grupo, denominado de genes constitutivos,

são os genes responsáveis por funções comuns, como por exemplo genes de *rRNA*, *tRNA* e de várias enzimas e, portanto, se expressam em todas as células. O segundo grupo, denominado de genes induzidos ou específicos, são genes que se expressam apenas em algumas células e em certos momentos do ciclo de vida da planta e, portanto, responsáveis por funções específicas (RAMALHO et al., 2012).

Genes com expressões específicas só se expressam em determinados tecidos dos órgãos das plantas, e são induzidos por fatores ambientais externos e internos ao indivíduo, como por exemplo o estresse pela baixa disponibilidade hídrica. A resposta das plantas ao déficit hídrico é complexa pois envolve a expressão de vários genes e interações destes com os ambientes. As diferenças de tolerância ao estresse nas diferentes cultivares ou nos diferentes estádios de desenvolvimento podem resultar em diversas expressões de genes, desde a percepção do sinal até a regulação gênica (CHINNUSAMY; SCHUMAKER; ZHU, 2004).

De modo geral, os produtos gênicos induzidos pelo estresse podem ser classificados em:

1) Genes que protegem as plantas contra os estresses ambientais: inclui proteínas funcionais, responsáveis por proteger as células contra a desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores, sendo eles a prolina, manitol, trealose e betaínas, proteínas resistentes ao calor, chaperonas e enzimas detoxificadoras (MOLINARI et al., 2004; SERRAJ; SINCLAIR, 2002; ZHOU et al., 2007). Vários genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese dessas moléculas foram isolados, como colina desidrogenase e colina oxidase (síntese de glicina betaína), manitol-1-fosfato desidrogenase (síntese de manitol), trehalose-6-fosfato desidrogenase (síntese de trealose), e D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (síntese de prolina). Esses genes podem ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas com maior tolerância a estresses abióticos (MOLINARI et al., 2004).

2) Genes que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses: inclui as proteínas reguladoras, quinases e fatores de transcrição envolvidos na regulação da transdução de sinais e expressão gênica e provavelmente funcionam em resposta da planta ao estresse. São vários fatores de transcrição, entre eles proteínas quinases, fosfatases, enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios e outras moléculas (SEKI et al., 2002).

3) Genes de funções desconhecidas (SEKI et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005): são os genes responsivos ao estresse que não são regulados por ácido abscísico (ABA), mas por outros mecanismos moleculares. Deste modo, indica-se a existência

de uma via dependente de ABA e outra via independente de ABA (LIU et al., 2013). Segundo Ding et al. (2012) o aumento da tolerância da planta ao estresse hídrico por meio do ABA está relacionado com a indução de diferentes sistemas de defesa antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase; e antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, glutatona e carotenoides.

Na via independente de ABA identificou-se uma família de fatores de transcrição conhecida como *DREB* (Dehydration responsive element binding protein – Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação) a qual está relacionada na ativação de genes envolvidos à tolerância ao estresse hídrico. A família *DREB* no genoma do milho são subdivididos em dois grupos, os *ZmDREB1s* e os *ZmDREB2s*, ambos compostos por aproximadamente 10 membros cada (LIU et al., 2013).

Liu et al. (2013) em sua pesquisa concluíram que os genes do tipo *ZmDREB1* são altamente expressos em raízes, sendo a maior resposta observada em *ZmDREB1.7*. Porém, o autor complementa que os genes do tipo *ZmDREB2* apresentaram reduzida expressão nos diferentes tecidos da variedade de milho B73 desenvolvida em condição de déficit hídrico, sendo que o gene *ZmDREB2.8* exibiu a maior resposta na raiz. Segundo Santos (2016), a expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* foi menor na parte aérea de plântulas e maior nas raízes de plântulas de todos os genótipos de milho avaliados sob condição de baixa disponibilidade hídrica.

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

A superexpressão do gene *ZmDBP3*, membro do subgrupo A1 da família *CBF/DREBs*, extraído de folhas de plântulas de milho aumentou a tolerância a seca e ao frio em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (WANG; DONG, 2009). De acordo com Santos (2016), entre os genótipos de milho classificados como tolerantes a maior expressão em sementes ocorreu na linhagem 32-T e no híbrido 91x75-T; nos demais genótipos, a expressão do gene em sementes foi reduzida ou nula. Em todos os genótipos utilizados ocorreu a expressão do referido gene na parte aérea das plântulas desenvolvidas na condição sem estresse hídrico, ou seja, em condições com 70% da capacidade de retenção de água (SANTOS, 2016).

A expressão do gene *ZmLEA3* em folhas de tabaco resultou em um aumento na tolerância ao estresse osmótico e oxidativo (LIU et al., 2013). O gene *ZmALDH9* é útil para a seleção de cultivares de milho com tolerância a seca (ZHOU et al., 2012). Contudo, Santos (2016) afirma que a expressão desses dois genes foi reduzida em raízes e parte aérea de plântulas de milho desenvolvidas em condição de déficit hídrico.

A expressão do gene *ZmPP2C* foi observado em plantas expostas ao estresse salino e hídrico, e pelos resultados foi verificado que a superexpressão do gene aumenta a sensibilidade das plantas ou reduz a sua tolerância ao estresse salino e hídrico (LIU et al., 2013). Para este gene, *ZmPP2C*, no trabalho realizado por Santos (2016) houve menor expressão na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse.

Levando em consideração tais aspectos apresentados, a possibilidade de avaliação da expressão de genes para a seleção de genótipos com características de interesse é fundamental, por possibilitar um menor trabalho, tempo e resultado quando comparado a análises em plantas. Além disso, permite-se a caracterização precoce de genótipos tolerantes em sementes e em tecidos de plântulas de milho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização

A pesquisa foi conduzida na Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras-MG (21°14'S, 40°17'W, altitude de 918,80 m). 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.

A multiplicação das sementes das linhagens foi conduzida no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária (Fazenda Muquém) da Universidade Federal de Lavras, e as análises de qualidade fisiológica de sementes e as análises moleculares foram realizadas no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Seleção de linhagens de milho contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico

A escolha das linhagens utilizadas na pesquisa foi realizada conforme os resultados obtidos no trabalho desenvolvido por Abreu (2016), no qual foram analisadas 26 linhagens do programa de melhoramento de milho da empresa Genesseds Recursos Genéticos Ltda., classificando as linhagens em dois grupos contrastantes em relação a tolerância ao déficit hídrico.

Dentre as linhagens classificadas por Abreu (2016), escolheu-se para a realização desta pesquisa duas linhagens que mais se destacaram quanto a tolerância ao déficit hídrico (T), as linhagens L91-T e L32-T, e duas linhagens consideradas não tolerantes ao déficit hídrico (NT), L57-NT e L24-NT.

3.3 Multiplicação das sementes das linhagens

Após a seleção das linhagens contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico instalou-se um campo experimental para a multiplicação das sementes de milho, durante a safra 2016/2017, sendo o plantio realizado no dia 18 de novembro de 2016. O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química do mesmo. Utilizou-se um espaçamento de 0,8 metros entre linhas e seis plantas por metro linear.

A adubação de cobertura, assim como os demais tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com as necessidades da cultura.

As autofecundações para a obtenção das sementes das quatro linhagens foram realizadas manualmente. Por ocasião do florescimento, protegeu-se as espigas antes da emissão dos estilo-estigmas, por meio de sacos plásticos. Quando houve receptividade dos estilo-estigmas, os pendões das plantas doadoras de pólen foram cobertos com saco de papel para evitar a contaminação e, no dia seguinte, realizou-se a autofecundação. As polinizações foram feitas para a obtenção de quantidade suficiente de sementes para a realização da pesquisa.

As sementes foram amostradas para a determinação do teor de água e quando estas atingiram 25% de teor de água realizou-se a colheita manualmente. A secagem das espigas foi realizada em secador de espigas a 35°C até atingirem o teor de água de 13%, e posteriormente estas foram debulhadas manualmente.

Realizou-se a classificação das sementes quanto ao tamanho em peneiras de crivos circulares (22 e 20) e aquelas que ficaram retidas em maiores quantidades nestas peneiras foram utilizadas para a pesquisa. As sementes foram tratadas com o fungicida VITAVAX-THIRAM 200, na dosagem de 300 ml por 100 kg de sementes, e foram armazenadas em câmara fria à 10°C até o momento da realização das análises fisiológicas e moleculares.

3.4 Avaliação inicial da qualidade fisiológica das sementes

3.4.1 Teste de Germinação

Avaliou-se a germinação das sementes das quatro linhagens. Para isso as sementes foram semeadas em substrato de papel “germitest”, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, e mantidas em germinadores com temperatura de 25°C por sete dias. As avaliações foram realizadas no quarto e sétimo dia após a semeadura, obtendo-se a porcentagem de sementes germinadas e a proporção do número de sementes que originou plântulas normais como descrito nas Regras para Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

3.4.2 Teste de Envelhecimento Acelerado

As quatro linhagens foram avaliadas quanto ao vigor das sementes por meio do teste de envelhecimento acelerado, pelo método de minicâmaras do tipo “gerbox”. As sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior do “gerbox” contendo 40 ml de água, permanecendo incubadas durante 96 horas, em uma temperatura de 42°C. Em seguida efetuou-se o teste de germinação como descrito nas Regras para Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

3.5 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas ao estresse hídrico

As sementes das quatro linhagens foram avaliadas em duas condições quanto à disponibilidade hídrica. Na primeira condição, denominada de ambiente sem estresse, a umidade do substrato foi ajustada para 70% da capacidade de retenção de água e; na segunda condição, denominada ambiente com estresse, a capacidade de retenção de água ajustada para 10%.

Em cada condição, 50 sementes de cada linhagem foram semeadas em bandejas de plástico (20 cm x 22 cm x 12 cm) contendo o substrato areia e colocadas para germinar em câmara de crescimento a 25°C. Visando manter a umidade do substrato em 70% e 10% da capacidade de retenção de água, realizou-se diariamente a reposição da água com base no peso inicial de cada bandeja. Após sete dias, as plântulas foram retiradas do substrato e lavadas em água corrente.

Foram avaliadas as seguintes características:

- a) emergência de plântulas: porcentagem de plântulas emergidas ao sétimo dia após a semeadura, por meio da avaliação dos pressupostos para a análise de variância realizou-se a transformação dos dados em $\text{arc seno}\sqrt{x/100}$;
- b) índice de velocidade de emergência: número de plântulas emergidas por dia, realizado em conjunto com o teste de emergência, com o cálculo realizado pela fórmula proposta por Maguire (1962);

$$IVE = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \dots + \frac{E_n}{N_n}$$

em que:

IVE = índice de velocidade de emergência;

E_1, E_2, E_n = número de plantas emergidas, na primeira, segunda, até a última contagem;

N_1, N_2, N_n = número de dias da semeadura à primeira contagem, segunda, até a última contagem;

- c) comprimento radicular: comprimento médio da raiz principal das plântulas ao sétimo dia após a semeadura, oriundas do teste de emergência em bandeja sob duas condições contrastantes quanto a disponibilidade hídrica. Os resultados foram expressos em centímetros (cm) por plântula;
- d) comprimento da parte aérea: comprimento médio da parte aérea das plântulas ao sétimo dia após a semeadura, oriundas do teste de emergência em bandeja sob duas condições contrastantes quanto a disponibilidade hídrica. Os resultados foram expressos em centímetros (cm) por plântula.

3.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para o teste de germinação e envelhecimento acelerado, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes.

Com relação as análises de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento radicular e comprimento da parte aérea, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 4x2, sendo quatro linhagens avaliadas em duas condições quanto a disponibilidade hídrica com quatro repetições.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software R* e as comparações de médias por meio do teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. Para todas as análises realizadas foram testados os pressupostos para a análise de variância.

3.7 Análises proteômicas

Para as análises proteômicas as sementes de duas linhagens, classificadas como contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico, L91-T e L57-NT, foram semeadas em

substrato contendo areia com 70% e 10% de capacidade de retenção de água no solo, constituindo as condições sem estresse e com estresse hídrico, respectivamente. As plântulas inteiras, ou seja, a radícula juntamente com a parte aérea e ainda o resíduo de endosperma, foram removidas com três, cinco e sete dias após a semeadura, lavadas e armazenadas em *deep-freezer* até o início das análises moleculares.

As sementes das duas linhagens, L91-T e L57-NT, foram semeadas em vasos para o crescimento da planta e obtenção de espigas. As espigas foram protegidas antes da emissão dos estilo-estigmas por meio de sacos plásticos, e no período entre 5 a 10 dias após a emissão dos estilo-estigmas, coletou-se apenas as pontas das espigas com aproximadamente 3 a 5 cm de comprimento. Posteriormente foram armazenadas em *deep-freezer* até o início das análises moleculares.

Portanto, os tratamentos utilizados nas análises proteômicas foram sementes secas, ponta de espigas e plântulas com três, cinco e sete dias após a semeadura de duas linhagens de milho, L91-T e L57-NT. Sendo que as plântulas foram submetidas a duas condições contrastantes de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).

3.7.1 Análise das enzimas catalase, peroxidase e esterase por meio da técnica de eletroforese

Para a análise da expressão das enzimas catalase, peroxidase e esterase, as plântulas, sementes secas e ponta de espigas foram trituradas na presença de PVP (Polivinilpirrolidona) e nitrogênio líquido em mortário de porcelana sobre gelo e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de -86°C em *deep-freezer* (ALFENAS, 2006).

Para a extração das enzimas catalase e esterase, utilizou-se o tampão Tris HCL 0,2 M pH 8,0 + 0,1% de mercaptoetanol; e para a enzima peroxidase utilizou-se o tampão de extração Fosfato + 0,1% de mercaptoetanol, ambos na proporção de 250 μl por 100 mg de amostra. O material foi homogeneizado em *vortex* e mantido overnight em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C (ALFENAS, 2006).

Realizou-se a corrida eletroforética em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Aplicou-se 60 μl do sobrenadante das amostras no gel e em seguida a corrida eletroforética foi efetuada a 120 V durante 5 horas. Terminada a corrida, revelou-se os géis

conforme Alfenas (2006), com modificações. As enzimas foram quantificadas por meio do *software ImageJ*®, em *pixel*² (2016).

3.7.2 Análise de proteínas resistentes ao calor

Para a análise da expressão de proteínas resistentes ao calor as plântulas, sementes secas e ponta de espigas foram trituradas na presença de PVP (Polivinilpirrolidona) e nitrogênio líquido em cadinho de porcelana sobre gelo e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de -86°C em *deep-freezer* (ALFENAS, 2006).

Adicionou-se às amostras maceradas, a solução tampão (50 mM tris-HCL-7,5; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração). Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi 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 70 µl de extrato + 40 µl de solução tampão da amostra (2,5 ml de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg 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 (protocolos contidos em ALFENAS, 2006).

Foram aplicados 60 µl do extrato com proteínas resistentes ao calor mais 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 com Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (protocolos contidos em ALFENAS, 2006). Foi realizado a quantificação das proteínas por meio do *software ImageJ*®, em *pixel*² (2016).

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

Para as análises transcriptômicas os tratamentos utilizados foram sementes secas, ponta de espigas e plântulas coletadas sete dias após a semeadura de duas linhagens de milho, L91-T e L57-NT. Sendo que as plântulas foram submetidas a duas condições contrastantes de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).

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

3.8.1 Extração e purificação do RNA

Para a extração do *RNA* as plântulas, sementes secas e ponta de espigas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido. Posteriormente adicionou-se o reagente *Pure Link RNA Plant® (Invitrogen)*, seguindo as especificações do manual do fabricante. A integridade do *RNA* foi verificada em gel de agarose 1% (corados com *GelRed, Biotium*). A quantificação do *RNA* foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com *DNase Free* para evitar qualquer contaminação com *DNA*. Para isso utilizou-se o *KitDNase Turbo Free® AMBIOM* de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para comprovar a eficiência do tratamento com *DNase* realizou-se uma reação de *PCR* convencional com todas as amostras, comprovando a não amplificação do *DNA*. Nessa reação como controle positivo foi utilizado uma amostra de *DNA* de sementes de milho e os *primers* dos genes de referência ubiquitina (*UBI*) e beta-actina (*βACT*) (MANOLI et al., 2012; HU et al., 2011). As amplificações foram avaliadas em gel de agarose 1,5% (corado com *GelRed, Biotium*). As amostras tratadas com *DNase* foram novamente quantificadas em espectrofotômetro.

3.8.2 Transcrição reversa para síntese do cDNA

Após o processo de extração e purificação, os *RNAm* foram utilizados como molde para a síntese de *cDNA*. Utilizou-se o kit *High Capacity DNA Reverse Transcription cDNA®* da *Applied Biosystems*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.8.3 Desenho dos primers

Para a análise da expressão gênica pela técnica de *qRT-PCR*, os genes-alvo foram escolhidos com base em revisão prévia de literatura considerando a sua importância nos estudos de tolerância ao déficit hídrico na cultura do milho.

As sequências foram encontradas por meio de busca no banco de dados do genoma milho sequenciado no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (BENSON et al., 2012). Com base nessas sequências desenhou-se os *primers* utilizando-se o *software Primer Express 3.0* (*Applied Biosystems*).

As sequências dos *primers* utilizados estão apresentadas na Tabela 1. Como genes de referência foram utilizados os genes da ubiquitina (*UBI*) e beta-actina (*βACT*) (MANOLI et al., 2012; HU et al., 2011).

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

Gene	Função		Sequência 5'-----3'	Referências
<i>ZmPP2C</i>	Regulador na resistência a estresses abióticos	F R	GGAAGCTCCGATAACATCACAGT TCTTTGTCTCGCTCGCTGATTTC	Liu et al. (2013)
<i>ZmDREB2A</i> <i>/2.1S</i>	Proteínas de elemento de ligação que respondem a desidratação	F R	GCAGCCCGGAAGGAAGAA GATGACAGCTGCCACTGACGTA	Qin et al. (2007)
<i>ZmDBP3</i>	Proteínas de elemento de ligação que respondem a desidratação	F R	CATGAGCTGGGATCTATACTAC CAAGGTATCAACGTCCTCA	Wang e Dong (2009)
<i>ZmAN13</i>	Função reguladora em resposta ao estresse abiótico	F R	AGCTGTTGCCCAAGTCGAGTT GCTGGGTCCGGCAACAT	Jin et al. (2007)
<i>ZmALDH9</i>	Desintoxicar os aldeídos por oxidação de seus ácidos carboxílicos correspondentes	F R	CATCTACGTGCAGGAAGGGAT TTGGCTGACACTCGGGTTG	Zhou et al. (2012)
<i>ZmLEA3</i>	Biossíntese de osmoprotetores	F R	CCACGAGACCACCTACAACCT CCTTTCTGGAGGAGCAAC	Liu et al. (2013)
<i>AOX2</i>	Rota alternativa da respiração/antioxidante	F R	CCAAGACGCTGATGGATAAAGG AGCCATACCGCCTCTGGAA	Pastore et al. (2007)
<i>UBI</i>	Gene de referência	F R	AAGGCCAAGATCCAGGACAA TTGCTTTCCAGCGAAGATGA	Manoli et al. (2012)
<i>βACT</i>	Gene de referência	F R	TGTCCATCACTTGTGAAGCCTCCT ACGACCTTAGCCAATATCGCACCA	Hu et al. (2011)

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

Fonte: Do autor (2018).

3.8.4 Análise dos resultados

Para a análise de expressão dos genes selecionados utilizou-se o aparelho *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*), com método de detecção via *SYBR Green*. Foram utilizadas amostras de *cDNA* obtidas das plântulas desenvolvidas sob diferentes condições de disponibilidade hídrica, sementes secas e ponta de espigas das duas linhagens de milho, L91-T e L57-NT, em triplicatas biológicas. As condições térmicas da reação foram de 2 minutos a

50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando-se com 15 segundos a 95°C. Ao fim da ciclagem, uma curva de desnaturação de 60-95°C mostrou a especificidade da reação de *PCR*. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foi utilizado 1,0 µl de *cDNA* (diluído 1:5), 0,4 µl de *primer forward/reverse* (10 µM), 5 µl de *Master MixSYBR green* (*Applied Biosystems*) e 3,6 µl de água ultrapura, para um volume final de 10,0 µl/amostra. Os controles negativos e as curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Utilizou-se três repetições biológicas em três replicatas técnicas para cada gene em estudo, sendo os resultados normalizados usando o Ciclo *Threshold* (CT) obtidos pela expressão dos genes de referência ubiquitina (*UBI*) e beta-actina (*βACT*) (MANOLI et al., 2012; HU et al., 2011).

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

As amostras de menor expressão, para cada gene, foram utilizadas como amostras calibradoras e a expressão relativa foi analisada pelo modelo matemático proposto por Pfaffl (2001) a qual incorpora a eficiência dos *primers* da *qRT-PCR*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação inicial da qualidade fisiológica das sementes

Segundo o resumo da análise de variância dos resultados do teste de germinação (TABELA 1A, APÊNDICE A), não há diferença significativa entre as linhagens avaliadas na primeira e segunda contagem. As sementes das quatro linhagens em estudo apresentam valores altos de germinação, sendo os valores obtidos essenciais para a continuidade dos demais testes realizados na pesquisa (TABELA 2).

Tabela 2 - Resultados médios da porcentagem de plântulas normais do teste de germinação de quatro linhagens de milho.

Linhagens	Germinação (%)	
	Primeira contagem	Segunda contagem
L91-T	100 a	100 a
L32-T	96 a	97 a
L24-NT	96 a	96 a
L57-NT	96 a	97 a
CV (%)	2,6	2,0

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

Fonte: Do autor (2018).

Avaliou-se também o vigor inicial das sementes por meio do teste de envelhecimento acelerado, em que o resumo da análise de variância dos dados das quatro linhagens está apresentado na Tabela 2A, do Apêndice A. Observam-se diferenças significativas em relação ao vigor de sementes das diferentes linhagens analisadas por meio do teste de *Tukey* (TABELA 3). Segundo Oliveira et al. (2013), o genótipo influencia a qualidade fisiológica das sementes tornando, portanto, a seleção para essa característica importante nos programas de melhoramento.

Entre as quatro linhagens avaliadas, verifica-se maior vigor em sementes da linhagem L91-T. Em trabalho realizado por Abreu (2016) e Santos (2016), também foi observado um alto vigor para as sementes da linhagem L91-T. Observa-se que em sementes da linhagem L57-NT, linhagem considerada não tolerante ao déficit hídrico, é observado um baixo vigor.

Tabela 3 - Resultados médios da porcentagem de plântulas normais do teste de envelhecimento acelerado de quatro linhagens de milho.

Linhagens	Germinação (%)
L91-T	98 a
L32-T	86 b
L24-NT	94 ab
L57-NT	70 c
CV (%)	4,8

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.
Fonte: Do autor (2018).

O alto vigor é uma condição necessária para a tolerância a estresses abióticos, como estresses devido a baixa disponibilidade hídrica, o qual sementes de milho com elevado vigor inicial apresentam desempenho relativamente superior em condições de déficit hídrico (PIANA e SILVA, 1998). De acordo com Trachsel et al. (2016), plântulas vigorosas apresentam um rápido estabelecimento da cultura, possuindo um sistema radicular bem desenvolvido e profundo, o que conseqüentemente ocorre uma melhoria na absorção de água e nutrientes em condições de baixa disponibilidade hídrica.

4.2 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas ao estresse hídrico

O resumo das análises de variância dos dados de porcentagem de emergência (%E), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento radicular (CR) e comprimento da parte aérea (PA) estão apresentadas na Tabela 3A, do Apêndice A. Observa-se diferenças significativas entre as linhagens para todos os caracteres avaliados. Ocorre diferença entre as médias dos ambientes com e sem estresse hídrico apenas para PA, e observa-se interação significativa entre as linhagens e os ambientes para CR e PA.

Em relação a emergência de plântulas, nota-se diferenças entre as linhagens submetidas a condição sem estresse hídrico (70% da capacidade de retenção de água), onde maior valor é observado em sementes da linhagem L91-T, e menor valor observado em sementes da linhagem L24-NT (TABELA 4).

Verifica-se que na condição de estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água), as quatro linhagens avaliadas não apresentam diferenças significativas quanto a emergência de plântulas. De uma maneira geral, observa-se que o vigor inicial das sementes das linhagens pode ser considerado alto e esta condição proporcionou valores altos de emergência, mesmo sob condições de baixa disponibilidade hídrica.

Tabela 4 - Valores médios de emergência (%) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).

Linhagens	Emergência ¹	
	Sem estresse	Com estresse
L91-T	100 A a	99 A a
L32-T	97 AB a	96 A a
L24-NT	95 B a	97 A a
L57-NT	98 AB a	98 A a
CV (%)	5,2	

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

¹Dados transformados em $\text{arc seno} \sqrt{x/100}$

Fonte: Do autor (2018).

Em relação aos valores de índice de velocidade de emergência (IVE), observa-se diferenças significativas entre as linhagens, obtendo maiores valores para as linhagens L91-T e L57-NT em ambas as condições de disponibilidade hídrica, sem estresse e com estresse hídrico (TABELA 5). Abreu (2016) avaliando a emergência de plântulas e o índice de velocidade de emergência em linhagens de milho submetidas a condição de baixa disponibilidade hídrica observou maiores valores para a linhagem L91-T.

Tabela 5 - Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).

Linhagens	IVE	
	Sem estresse	Com estresse
L91-T	12,5 A a	12,2 A a
L32-T	11,1 B a	10,6 B a
L24-NT	10,7 B a	11,3 B a
L57-NT	13,1 A a	13,0 A a
CV (%)	3,6	

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

Fonte: Do autor (2018).

Verifica-se que o estresse hídrico ao qual as sementes foram submetidas não influencia significativamente nos valores de emergência e do índice de velocidade de emergência para todas as linhagens avaliadas. Portanto, tal resultado indica que o desempenho das plântulas é

similar nas duas condições de disponibilidade hídrica, ou seja, nas condições com ou sem estresse hídrico, provavelmente em função do alto vigor inicial das sementes.

As plântulas das quatro linhagens oriundas do teste de emergência em bandeja desenvolvidas em condições contrastantes quanto à disponibilidade de água no substrato foram avaliadas quanto ao comprimento radicular e ao comprimento da parte aérea.

Quando não submetidas ao estresse hídrico, em linhagens consideradas tolerantes ao déficit hídrico, L91-T e L32-T, são observados maiores comprimentos radiculares em relação as linhagens não tolerantes, L24-NT e L57-NT. Com relação as plântulas desenvolvidas em condições de estresse, destaca-se a linhagem L91-T com um maior comprimento radicular, em contraste com a linhagem L57-NT que apresentou um menor comprimento (TABELA 6). Abreu (2016) também observou um menor comprimento radicular em plântulas da linhagem L57-NT.

Segundo Bengough et al. (2011), é essencial considerar o desenvolvimento radicular das plantas em resposta a seca nos programas de melhoramento visando a tolerância ao déficit hídrico, visto que genótipos com maior comprimento radicular podem apresentar um maior nível de tolerância ao estresse.

Tabela 6 - Valores médios de comprimento de raiz (cm) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).

Linhagens	Comprimento radicular	
	Sem estresse	Com estresse
L91-T	20,1 A b	22,7 A a
L32-T	20,1 A a	18,6 B a
L24-NT	16,2 B b	18,7 B a
L57-NT	13,8 B a	14,7 C a
CV (%)	8,3	

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

Fonte: Do autor (2018).

Ainda com relação ao comprimento radicular, verifica-se que nas linhagens L91-T e L24-NT o comprimento é significativamente maior no ambiente com baixa disponibilidade hídrica em relação ao ambiente sem estresse, destacando, portanto, que plântulas de milho quando submetidas ao estresse hídrico podem apresentar um crescimento radicular relativamente maior. Segundo Serraj e Sinclair (2002), em plantas expostas a seca são observados acúmulo de osmólitos nas raízes, permitindo um desenvolvimento contínuo ou

mesmo aumentado do sistema radicular, fornecendo as plantas acesso a um reservatório maior de água.

Quanto ao comprimento da parte aérea, nas linhagens L91-T e L57-NT verifica-se um maior comprimento em comparação com as linhagens L32-T e L24-NT, para as duas condições de disponibilidade hídrica (TABELA 7). Abreu (2016) também observou maior comprimento da parte aérea para as linhagens L91-T e L57-NT quando submetidas a condição sem estresse hídrico, porém em condições de estresse maior comprimento foi observado apenas para a linhagem L91-T.

Observa-se que em todas as quatro linhagens analisadas, o comprimento da parte aérea é significativamente maior nas plântulas não submetidas ao estresse em relação as plântulas submetidas a condição de estresse hídrico, evidenciando que a deficiência hídrica no solo reduz o desenvolvimento de plântulas e o alongamento celular (MARCOS FILHO, 2015). Segundo Ávila, Braccini e Scapim (2007) quanto mais negativo o potencial hídrico, menores serão os comprimentos da parte aérea em plântulas de milho.

Tabela 7 - Valores médios de comprimento da parte aérea (cm) de quatro linhagens de milho sob duas condições de disponibilidade hídrica, sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) e com estresse hídrico (10% da capacidade de retenção de água).

Linhagens	Comprimento da parte aérea	
	Sem estresse	Com estresse
L91-T	16,6 A a	13,1 A b
L32-T	12,8 B a	9,7 C b
L24-NT	12,5 B a	11,1 B b
L57-NT	16,4 A a	12,9 A b
CV (%)	5,0	

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

Fonte: Do autor (2018).

Nota-se que o estresse hídrico afeta o desenvolvimento da parte aérea em todas as linhagens analisadas, não observado no desenvolvimento radicular, o qual continuou a se alongar em condições de baixa disponibilidade hídrica. Sharp et al. (2004) em sua pesquisa conclui que apesar das raízes se tornarem mais finas dependendo da intensidade e duração do estresse, o desenvolvimento radicular é geralmente menos afetado em comparação ao desenvolvimento da parte aérea.

A planta quando sujeita ao déficit hídrico, aumenta as concentrações de ácido abscísico (ABA) na raiz, o qual atua aumentando a condutividade hidráulica e o crescimento

radicular. Porém quando o ABA é transportado por meio do xilema para a parte aérea da planta, ocorre o fechamento estomático e uma redução na expansão foliar, visando prevenir a desidratação dos tecidos (BARNABÁS et al., 2008).

Diante dos dados apresentados fica evidenciado o efeito da baixa disponibilidade hídrica no desenvolvimento de plântulas, destacando-se o desempenho superior da linhagem L91-T em todas as análises realizadas. Importante ressaltar o benefício da análise do crescimento radicular de plântulas de milho por auxiliar na seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento, visto que em condições de baixa disponibilidade hídrica maior comprimento radicular é observado em plântulas tolerantes ao estresse.

4.3 Análises proteômicas

Para a realização das análises proteômicas e transcriptômicas foram selecionadas duas linhagens contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico, L91-T e L57-NT. As duas linhagens foram escolhidas dentre as quatro linhagens utilizadas no trabalho pois apresentaram resultados discrepantes, quanto ao vigor, e em trabalhos realizados por Abreu (2016) e Santos (2016). Nestes trabalhos a linhagem L91-T foi classificada com maior tolerância ao déficit hídrico e a linhagem L57-NT com menor tolerância.

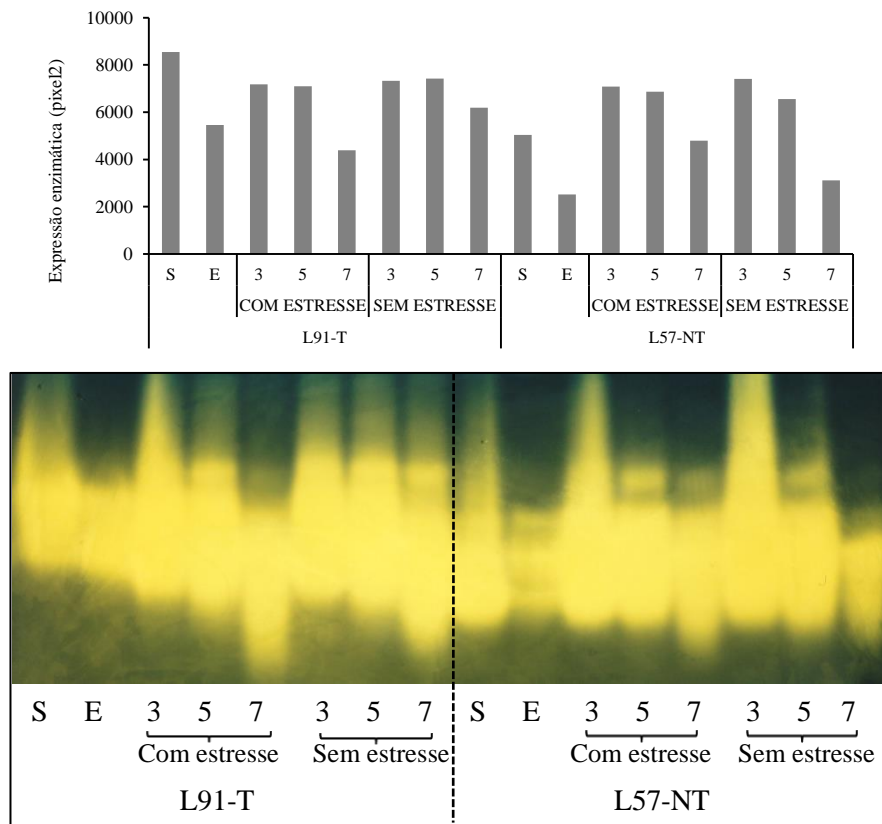
Com relação a atividade da enzima catalase, observa-se maior expressão nas sementes secas em relação à observada na ponta de espigas para as duas linhagens avaliadas, L91-T e L57-NT, sendo que a maior expressão ocorre na linhagem L91-T em comparação com a linhagem L57-NT (FIGURA 1).

Avaliando a expressão da enzima em plântulas com diferentes dias de desenvolvimento, observa-se redução na expressão da catalase nas plântulas de sete dias, para ambas as linhagens analisadas, evidenciando, desta forma, maior atividade da enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento da plântula. Resultado similar foi encontrado em trabalho desenvolvido por Zhang e Kirkham (1994), em que a atividade da enzima catalase na maioria das espécies de trigo analisadas apresentaram um aumento ou permaneceram constantes e, posteriormente diminuíram à medida que foi aumentado o tempo de exposição ao déficit hídrico.

Observa-se que a expressão da catalase se manteve mais uniforme comparando-se as plântulas nas duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse e sem estresse, sendo, porém, observado maior alteração na expressão nas plântulas com sete dias. Nota-se que nas plântulas com sete dias, há aumento na expressão da enzima nas plântulas submetidas ao

estresse hídrico na linhagem não tolerante ao estresse, linhagem L57-N7. Já para a linhagem tolerante (L91-T), as plântulas com sete dias apresentam uma redução na expressão da enzima quando submetidas a baixa disponibilidade hídrica.

Figura 1 - Expressão da enzima catalase em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

A tolerância de plantas ao déficit hídrico é uma característica complexa associada a vários fatores, como a expressão de enzimas antioxidantes. Em condições de estresses bióticos e abióticos, espécies reativas de oxigênio (EROS) são acumuladas nas plantas, resultando em danos ao *DNA*, proteínas e lipídios (ASHRAF, 2010). Sob tais condições, como baixa disponibilidade hídrica, as enzimas antioxidantes desempenham importante papel na remoção das EROS de células e de compartimentos subcelulares das plantas (SOFO et al., 2015). A enzima catalase atua na conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e na proteção de células da oxidação causada por radicais livres (LEE; KIM; LEE, 2001).

Santos (2016) analisando a expressão da enzima catalase nas linhagens L91-T e L57-

NT, observou maior expressão nas sementes secas e na parte aérea de plântulas, em contraste com as raízes as quais apresentaram menor expressão. O aumento considerável da atividade da catalase em folhas pode proteger os cloroplastos, que sob condições de estresse apresentam fluxos de elétrons sustentados e são os principais produtores e alvos da ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

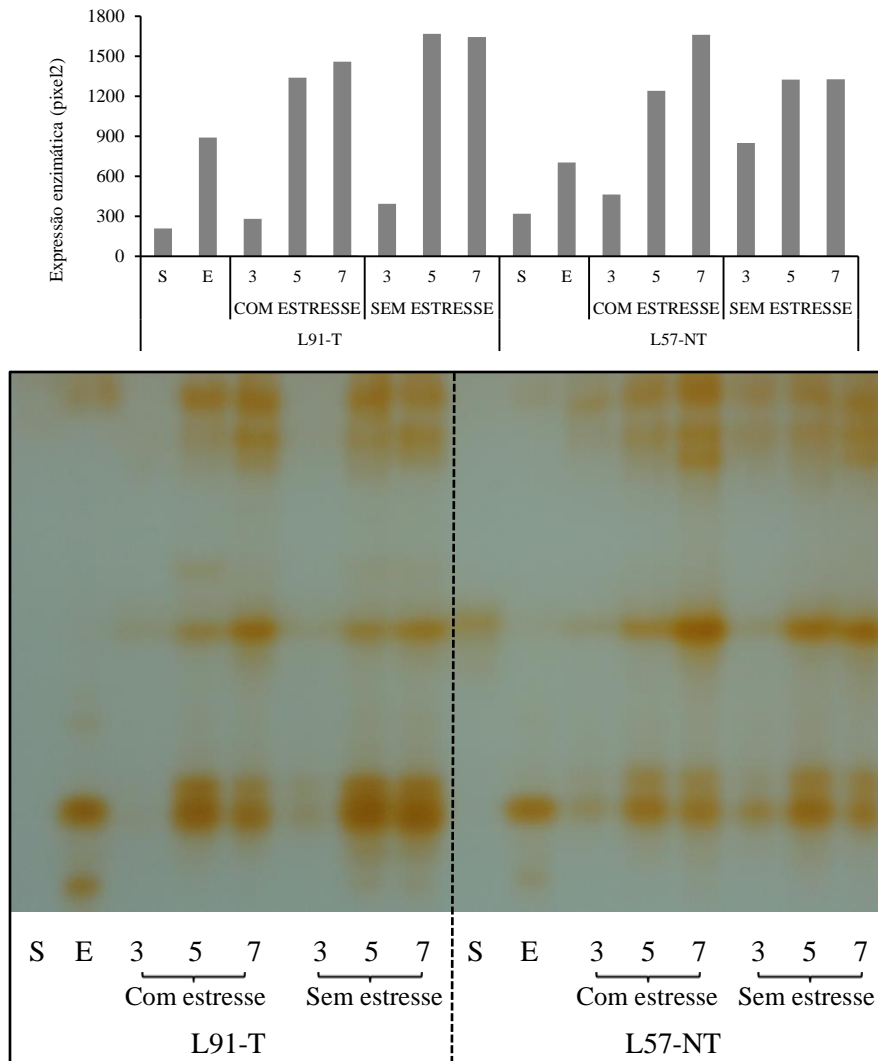
Assim como a catalase, a enzima peroxidase protege as células da oxidação causada por radicais livres. Ao contrário do observado para a enzima catalase, nota-se maior atividade da enzima peroxidase nas espigas em relação as sementes secas para as duas linhagens avaliadas, sendo que a maior expressão nas sementes secas ocorre para a linhagem L57-NT e a maior expressão nas espigas é observada na linhagem L91-T (FIGURA 2).

Com relação a expressão da enzima peroxidase em plântulas com diferentes dias de crescimento, nota-se uma reduzida expressão da enzima nas plântulas de três dias em comparação com as plântulas de cinco e sete dias. O aumento da atividade da peroxidase nas plântulas com cinco e sete dias após a semeadura pode ser explicado pela alta atividade metabólica devido a uma maior respiração, implicando em produção de radicais livres e consequente aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a enzima peroxidase (SILVA NETA et al., 2015).

Importante ressaltar que ao considerar as isoformas com menores pesos moleculares, é observada maior expressão desta enzima em plântulas com cinco e sete dias, e em espigas da linhagem L91-T, linhagem tolerante ao déficit hídrico, quando comparada à observada para a linhagem não tolerante, L57-NT.

Verifica-se que assim como para a enzima catalase, na linhagem L91-T não há um aumento da expressão da enzima peroxidase nas plântulas desenvolvidas em condições de estresse hídrico em comparação com as plântulas em condição sem estresse; contudo, para a linhagem L57-NT, há maior expressão da enzima peroxidase nas plântulas com sete dias desenvolvidas em condição de estresse. Resultado similar foi encontrado por El-Tayeb (2006) o qual avaliando a expressão da enzima peroxidase em folhas de duas cultivares de *Vicia faba*, Giza 40 considerada tolerante e Giza 667 não tolerante ao déficit hídrico, observou aumento na expressão da enzima peroxidase em plantas submetidas ao déficit hídrico apenas para a cultivar não tolerante.

Figura 2 - Expressão da enzima peroxidase em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

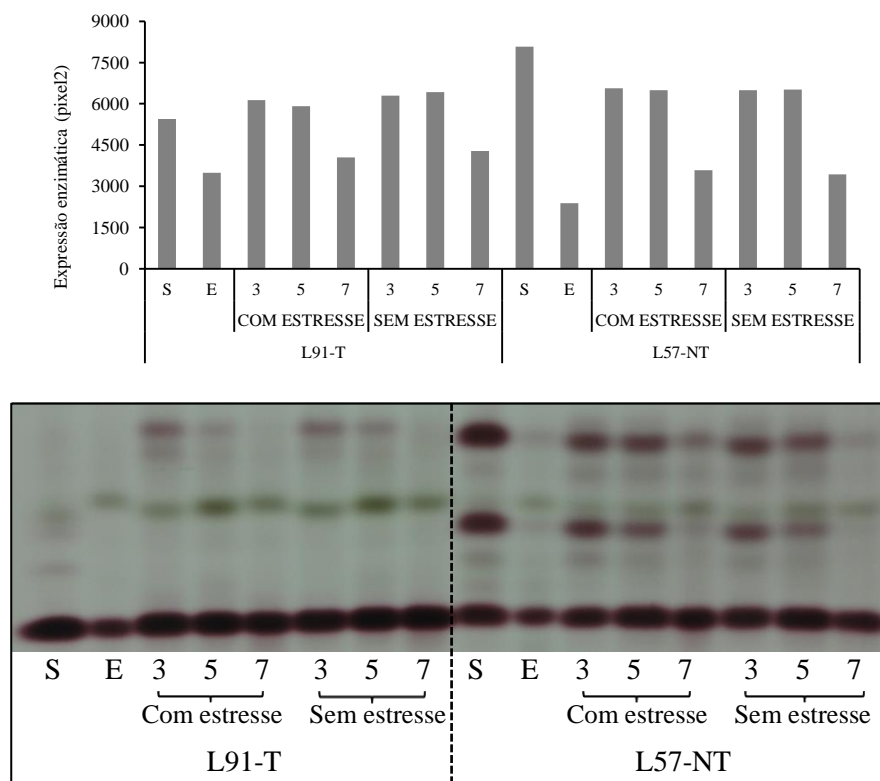
Em geral, verifica-se maior atividade da enzima catalase e peroxidase para a linhagem L91-T, considerada tolerante ao déficit hídrico. Zhu (2002) afirma que a maior tolerância da planta a baixa disponibilidade hídrica está relacionada a um aumento na atividade enzimática, corroborando o resultado aqui apresentado.

A enzima esterase está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios, sendo uma enzima degradativa envolvida em reações de hidrólise de ésteres. É possível observar uma maior expressão da esterase em sementes secas da linhagem L57-NT (FIGURA 3). Já para as sementes secas da linhagem L91-T, há uma menor expressão em relação as sementes da

linhagem L57-NT, que de acordo com Dutra (2014) pode estar associada a alta qualidade fisiológica das sementes.

Avaliando-se a atividade da enzima esterase em plântulas com diferentes dias de desenvolvimento, esta foi mais expressiva nas plântulas com três e cinco dias após a semeadura, para as duas linhagens analisadas, independentemente da condição de disponibilidade hídrica, evidenciando, assim como para a enzima catalase, uma maior expressão da esterase nos estágios iniciais de desenvolvimento da plântula.

Figura 3 - Expressão da enzima esterase em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

Em trabalho realizado por Abreu (2013), foi observado aumento na intensidade das bandas da enzima esterase com a redução do potencial hídrico, principalmente para a linhagem L91-T. Contudo observa-se na Figura 3, que a atividade da enzima, para as duas linhagens analisadas, não apresenta diferenças em relação as plântulas desenvolvidas em condição de estresse hídrico com as plântulas desenvolvidas em condição sem estresse, ou seja, a expressão da enzima esterase não é alterada com o estresse devido a baixa

disponibilidade hídrica.

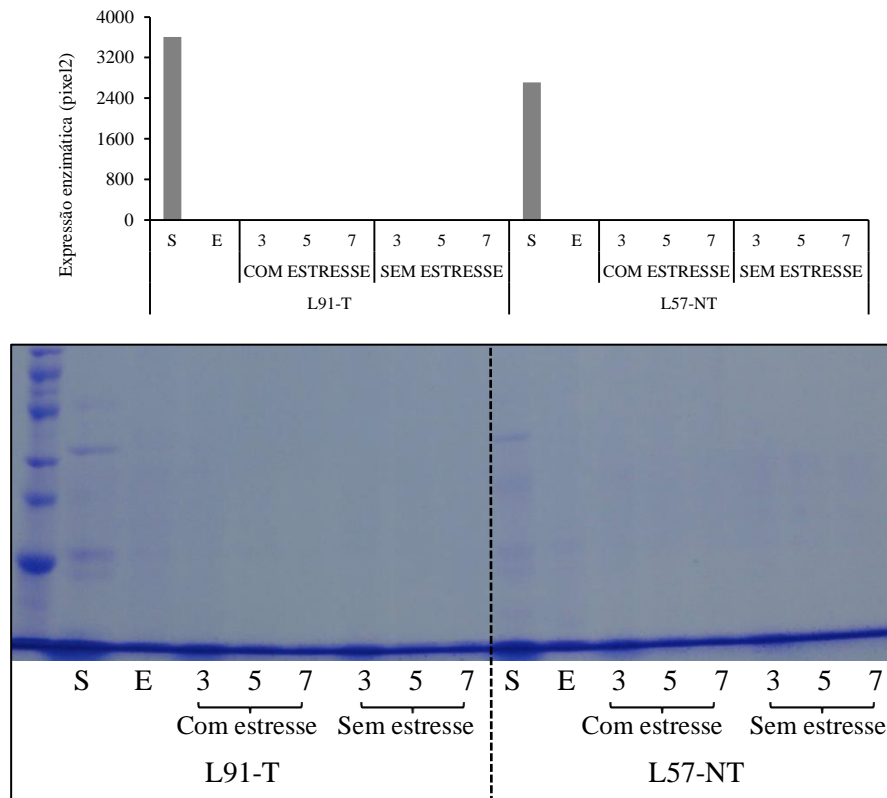
É evidente no zimograma maior número de isoformas da esterase para a linhagem não tolerante ao estresse, L57-NT. Portanto, para a linhagem L57-NT há maior expressão da enzima em relação a linhagem L91-T, assim como observado por Santos (2016), em que avaliando a atividade da enzima esterase, observou maior expressão para os genótipos classificados como intolerantes ao déficit hídrico. Para a linhagem L91-T, Santos (2016) observou menor expressão desta enzima, independentemente da condição de disponibilidade hídrica, semelhante ao observado nesta pesquisa, Figura 3, com exceção para o tecido ponta de espiga, o qual há uma maior expressão na linhagem tolerante (L91-T) em comparação com a linhagem não tolerante a baixa disponibilidade hídrica (L57-NT).

Com relação as proteínas resistentes ao calor, estas estão envolvidas na tolerância a dessecação e são expressas durante o desenvolvimento da semente, sendo acumuladas no final da maturidade fisiológica (ROSA et al., 2005).

No zimograma das proteínas resistentes ao calor, representado na Figura 4, não é verificado importantes polimorfismos. Observa-se a expressão das proteínas apenas nas sementes secas. Nas sementes secas da linhagem L91-T, sementes com alto vigor, há maior atividade destas proteínas em relação as sementes secas da linhagem L57-NT, sendo o mesmo resultado observado em trabalho realizado por Santos (2016).

As proteínas resistentes ao calor são responsáveis pela proteção e estabilização da membrana celular, em que tem sido verificada importante relação entre a expressão de proteínas resistentes ao calor e a qualidade fisiológica das sementes (ROSA et al., 2005; SILVA NETA, 2014).

Figura 4 - Expressão das proteínas resistentes ao calor em sementes secas (S), ponta de espigas (E), plântulas com três dias (3), cinco dias (5) e sete dias (7) após a semeadura, sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água) de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

4.4 Análises transcriptômicas

Estudos com relação aos mecanismos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico tem sido realizados por meio da avaliação do controle genético e da expressão de transcritos (LIU et al., 2013; WANG; DONG, 2009; ZHOU et al., 2012). A técnica de *PCR* em tempo real é amplamente utilizada por permitir a quantificação da expressão do gene alvo, auxiliando a análise de genes associados à tolerância a estresses abióticos.

Por meio dos resultados da análise da expressão de transcritos, em sementes seca, ponta de espigas e plântulas de duas linhagens de milho, L91-T e L57-NT, sendo as plântulas desenvolvidas em condições com estresse e sem estresse hídrico, observa-se uma grande variação na expressão dos genes nos diferentes tecidos avaliados.

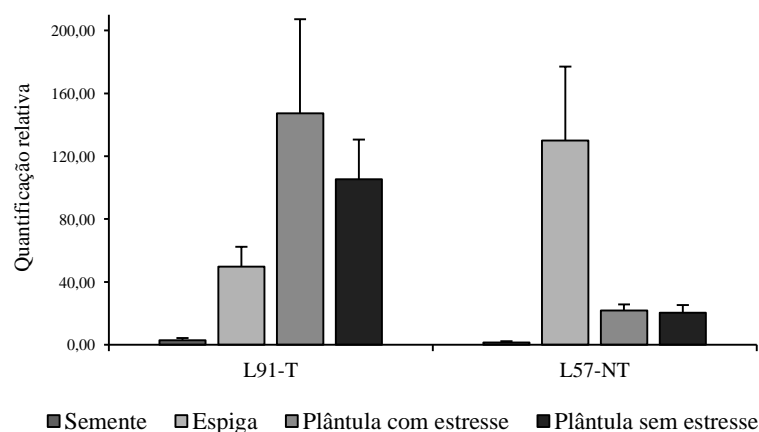
Na Figura 5, está representada a expressão relativa do gene *ZmALDH9*. Observa-se reduzida expressão nas sementes secas e uma maior expressão na ponta de espigas para as

duas linhagens avaliadas, sendo maior a expressão na ponta de espigas observada para a linhagem L57-NT.

A superfamília de genes aldeído desidrogenase (*ALDH*) foi caracterizada pelo grande desempenho na adaptação de plantas a vários estresses abióticos, como o gene *ZmALDH9*, o qual apresenta importante papel na tolerância de plantas ao déficit hídrico (ZHOU et al., 2012). Santos (2016) estudando a expressão do gene, observou maior expressão deste em parte aérea de plântulas desenvolvidas em condição sem estresse hídrico e, no geral, tal gene não se expressou em raízes desenvolvidas em condição de baixa disponibilidade hídrica.

Na linhagem L91-T, verifica-se maior expressão em plântulas, a qual é maior nas plântulas desenvolvidas em condição de estresse hídrico. A planta quando sujeita ao déficit hídrico desencadeia um maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), e que de acordo com Rodrigues et al. (2006), tal aumento da atividade do gene *ZmALDH9* é considerado uma estratégia de defesa eficiente para eliminar as substâncias tóxicas causadas pelas EROS, promovendo maior adaptação da planta a essa condição adversa de baixa disponibilidade hídrica.

Figura 5 - Expressão do gene *ZmALDH9* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

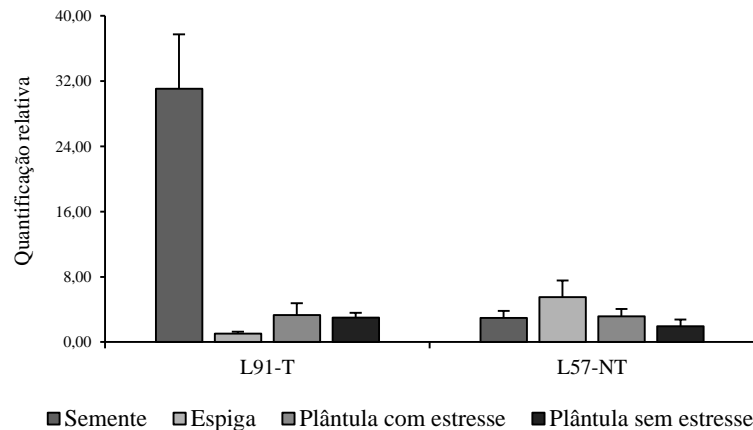
Observa-se em geral, maior atividade do gene *ZmALDH9* nas plântulas da linhagem tolerante (L91-T) em relação a linhagem não tolerante (L57-NT) ao déficit hídrico. Esse resultado é condizente com a afirmação de Zhou et al. (2012), que considerou que a maior

expressão do gene está relacionada à maior tolerância da planta ao estresse pela baixa disponibilidade hídrica.

A expressão relativa do gene *ZmANI3* está representada na Figura 6. O gene *ZmANI3* pertence a família *ZNF-ANI* e em geral, nas plantas, a maioria dos genes dessa família está envolvida em respostas a estresses abióticos, a qual desempenha função de forma específica ao estresse (JIN et al., 2007).

Pode-se observar por meio da quantificação relativa, reduzida expressão do gene em plântulas desenvolvidas nas duas condições de disponibilidade hídrica, com e sem estresse, para as duas linhagens em estudo. Com relação a expressão do gene em ponta de espigas, esta é relativamente maior para a linhagem L57-NT em comparação com a linhagem L91-T.

Figura 6 - Expressão do gene *ZmANI3* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

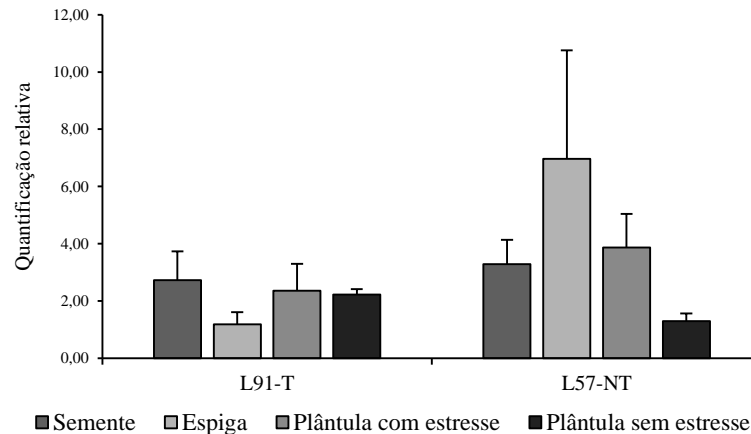
Observa-se importante expressão do gene *ZmANI3* em sementes secas da linhagem L91-T, linhagem esta considerada tolerante ao estresse. Com relação a linhagem L57-NT, a expressão em sementes secas é menor. O fato desse gene se expressar mais em sementes secas da linhagem tolerante ao estresse, permite ser um importante potencial como um bom marcador na seleção precoce de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, sem a necessidade de avaliação em plântulas.

Com relação ao gene *ZmPP2C*, maior expressão é observada em ponta de espigas da linhagem L57-NT. As plântulas da linhagem L57-NT desenvolvidas em condições de estresse hídrico, as quais desencadeiam maior acúmulo de substâncias tóxicas causadas pelas espécies

reativas de oxigênio (EROS), apresentam maior atividade do gene em relação as plântulas desenvolvidas sem estresse (FIGURA 7).

Para a linhagem L91-T, a expressão do gene é maior em sementes secas, seguidas pelas plântulas desenvolvidas sob estresse hídrico e sem estresse, porém em espigas observa-se uma menor expressão. Santos (2016) avaliando a atividade do gene *ZmPP2C* observou que em todos os genótipos ocorreu uma redução na expressão do gene em parte aérea de plântulas sob condições de baixa disponibilidade hídrica.

Figura 7 - Expressão do gene *ZmPP2C* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

Com relação a sementes secas e ponta de espigas, a expressão é maior na linhagem não tolerante (L57-NT) em relação à linhagem tolerante ao déficit hídrico (L91-T). Liu et al. (2009) avaliando a expressão do gene *ZmPP2C* em plantas observou que uma superexpressão do gene reduz a tolerância das plantas ao déficit hídrico, o que pode ser observado na Figura 7, em geral, uma maior expressão do gene *ZmPP2C* para a linhagem não tolerante ao déficit hídrico (L57-NT).

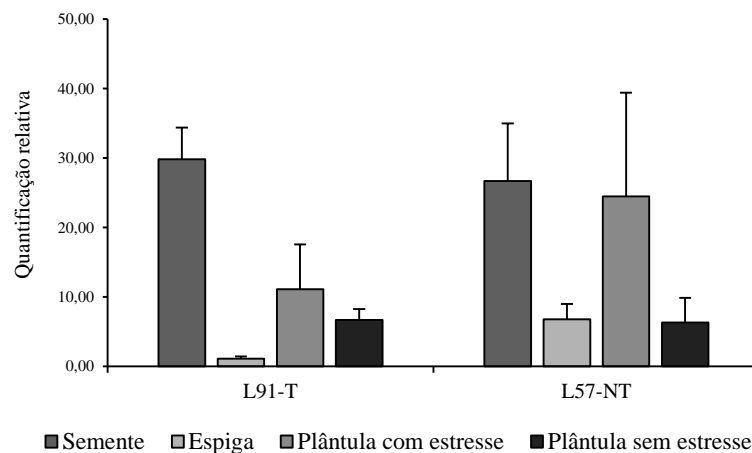
A expressão relativa do gene *ZmDREB2A/2.1S* está representada na Figura 8. Segundo Liu et al. (2013) uma família de fatores de transcrição identificada como *DREB* (Dehydration responsive element binding protein – Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação) está relacionada à ativação de genes envolvidos à tolerância ao déficit hídrico.

Na linhagem L91-T, a expressão do gene encontra-se maior em sementes secas e menor em ponta de espigas. Analisando as plântulas, a expressão é relativamente maior nas

plântulas desenvolvidas em condições de estresse em comparação as plântulas desenvolvidas sem estresse hídrico. Em relação a linhagem L57-NT, assim como para a linhagem L91-T, pode-se observar maior expressão do gene em sementes secas e em plântulas submetidas ao estresse hídrico. A expressão em ponta de espigas é relativamente menor em comparação com a expressão em sementes.

O fato da expressão do gene ser maior em plântulas desenvolvidas em condições de baixa disponibilidade hídrica em comparação com as plântulas em condições sem estresse, para as duas linhagens analisadas, demonstra o aumento da atividade do gene para combater o efeito tóxico das espécies reativas de oxigênio (EROS) acumuladas nas plântulas desenvolvidas em condições de déficit hídrico, visando o aumento da tolerância da planta a condição de seca.

Figura 8 - Expressão do gene *ZmDREB2A/2.1S* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

De acordo com Qin et al. (2007), uma superexpressão do gene *ZmDREB2A/S* mostrou maior tolerância das plantas ao déficit hídrico. Em geral, maior expressão do gene é observado para as sementes secas da linhagem L91-T, seguida pelas sementes secas da linhagem L57-NT. Em ponta de espigas, maior expressão ocorre para a linhagem L57-NT. Nas duas linhagens analisadas, a expressão em plântulas é maior em condições de estresse, sendo maior para a linhagem L57-NT.

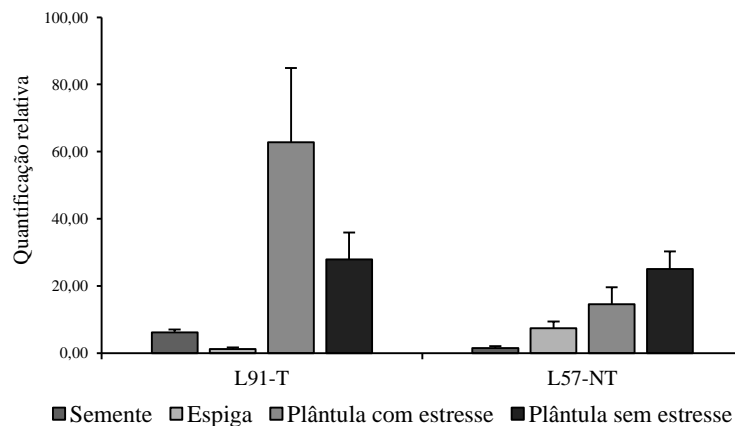
Na Figura 9 está representada a expressão relativa do gene oxidase alternativa 2 (*AOX2*). De acordo com Silva Neta et al. (2015), o gene *AOX* tem sido um importante

marcador funcional na seleção de plantas resistentes a estresses abióticos, como o gene *AOX1* apresentando um grande potencial como bom marcador na seleção de genótipos tolerantes a baixas temperaturas.

Pode-se observar menor expressão do gene *AOX2* em sementes secas e na ponta de espigas para as duas linhagens em estudo, sendo a maior expressão nas sementes secas da linhagem L91-T e a maior expressão na ponta de espigas observada na linhagem L57-NT. Em plântulas da linhagem L57-NT é observada menor expressão em comparação com as plântulas da linhagem L91-T, sendo a maior expressão em plântulas desenvolvidas sem estresse hídrico.

Para a linhagem L91-T, observa-se uma maior expressão do gene *AOX2* em plântulas, ocorrendo, diferentemente da linhagem L57-NT, maior expressão em plântulas desenvolvidas sob condições de déficit hídrico, onde o efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROS) são mais acentuados. De acordo com Pastore et al. (2007), o gene *AOX* pode proteger as plantas submetidas às condições de estresses bióticos e abióticos contra os efeitos tóxicos das EROS.

Figura 9 - Expressão do gene *AOX2* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

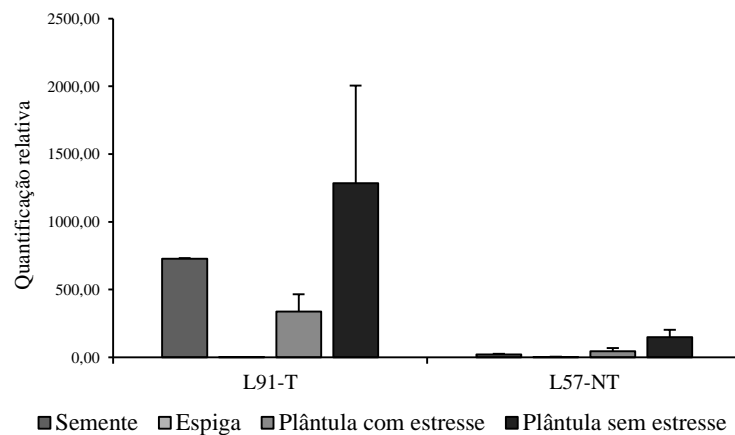
A maior expressão do gene nas plântulas desenvolvidas em condições de estresse para a linhagem tolerante sugere, que sob estresse abiótico, como o déficit hídrico, o gene *AOX2* é ativado para se opor ao estresse oxidativo, atuando como um sistema de defesa antioxidante em plantas (PASTORE et al., 2007). O fato do gene *AOX2* se expressar mais em plântulas da

linhagem tolerante ao estresse, permite ser um importante potencial como um bom marcador na seleção precoce de genótipos tolerantes a baixa disponibilidade hídrica.

A expressão relativa do gene *ZmDBP3* encontra-se representada na Figura 10. Em trabalho realizado por Wang e Dong (2009) foi observado que uma superexpressão do gene *ZmDBP3*, membro do subgrupo A1 da família *CBF/DREBs*, desencadeou aumento na tolerância a seca e ao frio em plantas transgênicas de *Arabidopsis*.

Nas pontas de espigas para as duas linhagens a expressão do gene *ZmDBP3* é praticamente nula e menor expressão é observada para a linhagem não tolerante ao déficit hídrico, L57-NT, em todos os tratamentos analisados. Porém na linhagem classificada como tolerante ao déficit hídrico, L91-T, pode-se observar maior expressão do gene em sementes secas e em plântulas, sendo a maior expressão em plântulas desenvolvidas em condição sem estresse hídrico.

Figura 10 - Expressão do gene *ZmDBP3* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

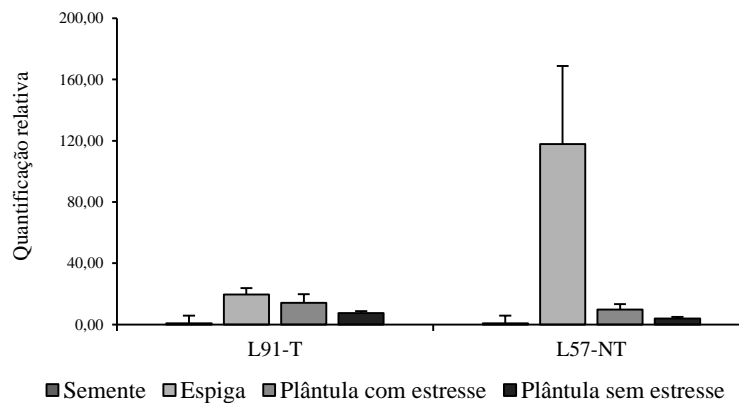
Diante disso, o fato de o gene *ZmDBP3* ser mais expresso na linhagem tolerante ao estresse, faz com que este possa ser importante potencial como marcador para seleção precoce de genótipos tolerantes ao déficit hídrico. Ressalta-se também o fato de o gene se expressar em sementes, permitindo a seleção precoce, sem a necessidade de germinar as sementes para a obtenção de plântulas.

Na Figura 11 está representado a expressão relativa do gene *ZmLEA3*. Maior expressão do gene é observado na ponta de espigas da linhagem L57-NT. No geral, para a

linhagem L91-T há baixa expressão nos diferentes tratamentos analisados, com maior expressão na ponta de espigas. Em plântulas da linhagem L91-T e L57-NT, a expressão é maior em plântulas desenvolvidas em condição de estresse hídrico em comparação com as plântulas desenvolvidas em condição sem estresse, visto que em condições de baixa disponibilidade hídrica as plantas são sujeitas a um maior estresse oxidativo.

Segundo Liu et al. (2013) uma superexpressão do gene *ZmLEA3* em folhas de tabaco resultou em um aumento da tolerância ao estresse osmótico e oxidativo. Contudo Santos (2016) observou em todos os genótipos analisados uma redução da expressão do gene em parte aérea e raízes, sob condições de déficit hídrico.

Figura 11 - Expressão do gene *ZmLEA3* em sementes secas, ponta de espigas e plântulas sob duas condições de disponibilidade hídrica, com estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água), de duas linhagens de milho (L91-T e L57-NT).



Fonte: Do autor (2018).

Os resultados observados nas análises fisiológicas, proteômicas e transcriptômicas reforçam a complexidade envolvida na característica tolerância ao déficit hídrico. Isto evidencia a necessidade de estudos visando auxiliar os programas de melhoramento de plantas na obtenção de genótipos tolerantes ao estresse.

Os estudos fisiológicos de sementes juntamente com as análises proteômicas auxiliam na seleção de genótipos superiores. Contudo, a avaliação da expressão de genes possibilita acelerar a seleção de materiais com característica de interesse, tornando uma importante ferramenta devido ao menor trabalho, tempo e espaço exigido. A expressão de genes que torna possível a identificação de linhagens tolerantes ao déficit hídrico, como os genes *ZmAN13* e *ZmDBP3* avaliados neste trabalho, podem atuar como marcadores funcionais visando a seleção de genótipos tolerantes ao estresse, principalmente porque a expressão do

gene ocorre em sementes, sem a necessidade de germinar as sementes, implicando em menor tempo e espaço para a seleção.

Diante disso, pela complexidade dos aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nos caracteres de tolerância ao déficit hídrico, recomenda-se outras pesquisas na área de sementes avaliando a expressão de mais genes em maior número de genótipos e utilizando diferentes restrições hídricas.

5 CONCLUSÕES

Há maior expressão na ponta de espigas da linhagem L91-T das enzimas catalase, peroxidase e esterase.

Há redução da expressão da enzima catalase e esterase em plântulas de sete dias para ambas as linhagens analisadas.

Maior atividade das proteínas resistentes ao calor ocorre nas sementes secas da linhagem L91-T.

Os genes *ZmAN13*, *AOX2* e *ZmDBP3* são potenciais marcadores moleculares para seleção de linhagens de milho tolerantes ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. de. **Seleção indireta para tolerância à seca em milho por meio de características agronômicas e de sementes**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- ABREU, V. M. de. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, PR; v. 36, p. 40-47, 2014.
- ABREU, V. M. de. **Análise dialélica e estratégias para a seleção de genótipos de milho submetidos ao estresse hídrico nas fases de germinação e emergência de plântulas**. 2016. 139 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 574 p.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, USA; v. 55, p. 373–399, 2004.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. **Biotechnology Advances**, New York, USA; v. 28, n. 1, p. 169–183, 2010.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. D. L. E.; SCAPIM, C. A. Teste de comprimento de plântulas sob estresse hídrico na avaliação do potencial fisiológico das sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF; v. 29, n. 2, p. 117–124, 2007.
- BÄNZIGER, M. et al. Breeding for improved drought tolerance in maize adapted to southern Africa. In: International Crop Science Congress, 4., 2004, Brisbane, Australia. **Anais eletrônicos...** Brisbane, Australia: 2004. CD-ROM.
- BARNABÁS, B.; JÄGER, K.; FEHÉR, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, England; v. 31, n. 1, p. 11–38, 2008.
- BENGOUGH, A. G. et al. Root elongation , water stress , and mechanical impedance : a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 62, n. 1, p. 59–68, 2011.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, England; v. 41, p. 36–42, 2012.
- BERGAMASCHI, H. et al. Deficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF; v. 41, n. 2, p. 243–249, 2006.
- BERNIER, J. et al. Breeding upland rice for drought resistance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, England; v. 88, n. 6, p. 927–939, 2008.
- BETRÁN, F. J. et al. Genetic Analysis of Inbred and Hybrid Grain Yield under Stress and Nonstress Environments in Tropical Maize. **Crop Science**, Madison, USA; v. 43, p. 807–817,

2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, Brasília, DF; 2009, 399 p.

BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water- deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, England; v. 25, p. 153–161, 2002.

CÂMARA, T. M. M. et al. Parâmetros genéticos de caracteres relacionados à tolerância à deficiência hídrica em milho tropical. **Bragantia**, Campinas, SP; v. 66, n. 4, p. 595–603, 2007.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF; v. 33, n. 4, p. 754–763, 2011.

CATTIVELLI, L. et al. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, Amsterdam, Netherlands; v. 105, n. 1–2, p. 1–14, 2008.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 55, n. 395, p. 225–236, 2004.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science**, Limerick, Irish; v. 168, n. 1, p. 241–248, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de Safra Brasileira: grãos**, 2016/2017: décimo segundo levantamento; v. 4. n. 12, p. 1-158, 2017. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2018.

COOPER, M. et al. Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US corn-belt : discovery to product. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 65, n. 21, p. 6191–6204, 2014.

CRUZ, J. C. et al. Cultivo do Milho. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG; v. 6, n. 2, p. 1-10, 2010. Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27037/1/Plantio.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. A. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PLoS ONE**, San Francisco, USA; v. 11, n. 5, p. 1–15, 2016.

DING, Y. et al. ZmCPK11 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 64, n. 4, p. 871–884, 2012.

- DURÃES, F. O. et al. Fenotipagem associada a tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores. **Circular Técnica**, v. 39, p. 1-18, 2004. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/487708/1/Circ39.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2018.
- DURÃES, F. O. M. et al. Caracterização fenotípica de linhagens de milho quanto ao rendimento e à eficiência fotossintética. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG; v. 4, n. 3, p. 355–361, 2005.
- DUTRA, S. M. F. **Expressão de genes relacionados à tolerância a altas temperaturas durante a germinação de sementes de milho**. 2014. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, [S.l.]; v. 3, n. 3, p. 175–182, 2008.
- EL-TAYEB, M. A. Differential response of two *Vicia faba* cultivars to drought: growth, pigments, lipid peroxidation, organic solutes, catalase and peroxidase activity. **Acta Agronomica Hungarica**, Budapest, Hungary; v. 54, n. 1, p. 25–37, 2006.
- ENTRINGER, G. C. et al. Genetic control of leaf curl in maize. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, SP; v. 13, n. 1, p. 1672–1678, 2014.
- FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant physiology**, Lancaster, USA; v. 155, p. 93–100, 2011.
- FRANCO, Â. L. et al. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, Germany; v. 269, p. 397–412, 2002.
- GROVER, A.; KAPOOR, A.; LAKASHMI, O. S.; AGARWAL, S.; SAHI, C.; KATIYAR-AGARWAL, S.; AGARWAL, M.; DUBEY, H. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Netherlands; v. 80, n. 2, p. 206–216, 2001.
- HU, Y. et al. Trichostatin A Selectively Suppresses the Cold-Induced Transcription of the ZmDREB1 Gene in Maize. **PLoS ONE**, San Francisco, USA; v. 6, n. 7, p. 1–13, 2011.
- JIN, Y. et al. Phylogenetic and expression analysis of ZnF-AN1 genes in plants. **Genomics**, San Diego, USA; v. 90, p. 265–275, 2007.
- KARAMANOS, A. J.; PAPTATHEOHARI, A. Y. Assessment of drought resistance of crop genotypes by means of the Water Potential Index. **Crop Science**, Madison, USA; v. 39, p. 1792–1797, 1999.
- KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, England; v. 36, n. 7, p. 1242–1255, 2013.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, [S.1.]; v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.

LANGRIDGE, P.; PALTRIDGE, N.; FINCHER, G. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, London, England; v. 4, n. 4, p. 343–354, 2006.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, England; v. 44, n. 2, p. 275–294, 2002.

LEE, D. H.; KIM, Y. S.; LEE, C. B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, Jena, Netherlands; v. 745, p. 737–745, 2001.

LIU, L. et al. Over-expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (*ZmPP2C*) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought. **Journal of Plant Physiology**, Jena, Netherlands; v. 166, p. 531–542, 2009.

LIU, S. et al. Genome-Wide Analysis of *ZmDREB* Genes and Their Association with Natural Variation in Drought Tolerance at Seedling Stage of *Zea mays* L. **PLoS Genetics**, San Francisco, USA; v. 9, n. 9, p. 1–17, 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, USA; v. 2, n. 1, p. 176–177, 1962.

MANOLI, A. et al. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. **Journal of Plant Physiology**, Jena, Netherlands; v. 169, p. 807–815, 2012.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Piracicaba: ABRATES, 2015. 659 p.

MOLINARI, H. B. C. et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, Limerick, Irish; v. 167, n. 6, p. 1375–1381, 2004.

MOTERLE, L. M. et al. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, MG; v. 32, n. 6, p. 1810–1817, 2008.

PASTORE, D. et al. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 58, n. 2, p. 195–210, 2007.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant physiology**, Lancaster, USA; v. 129, n. 2, p. 460–468, 2002.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, England; v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001.

- PIANA, Z.; SILVA, W. R. DA. Respostas de sementes de milho, com diferentes níveis de vigor, à disponibilidade hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF; v. 33, n. 9, p. 1525–1531, 1998.
- QIN, F. et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea Mays* L. **The Plant Journal**, [S.l.]; v. 50, n. 1, p. 54–69, 2007.
- QUEIROZ, C. G. S.; GARCIA, Q. S.; LEMOS FILHO, J. P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, PR; v. 14, n. 1, p. 59–63, 2002.
- RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na Agropecuária**. 5 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 565 p.
- REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, Netherlands; v. 161, n. 11, p. 1189–1202, 2004.
- RODRIGUES, S. M. et al. Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 57, n. 9, p. 1909–1918, 2006.
- ROSA, S. D. V. F. et al. Enzimas removedores de radicais livres e proteínas Lea associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF; v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.
- SANTOS, M. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico em sementes e em tecidos de plântulas de milho**. 2016. 79. p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- SEKI, M. et al. Monitoring the expression pattern of around 7000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, [S.l.]; v. 31, n. 3, p. 279–292, 2002.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation : can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, England; v. 25, p. 333–341, 2002.
- SHARP, R. E. et al. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England; v. 55, n. 407, p. 2343–2351, 2004.
- SILVA NETA, I. C. **Expressão de genes relacionado à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho**. 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- SILVA NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, SP; v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.

SOFO, A. et al. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.1.]; v. 16, p. 13561–13578, 2015.

TRACHSEL, S. et al. Identification of QTL for Early Vigor and Stay-Green Conferring Tolerance to Drought in Two Connected Advanced Backcross Populations in Tropical Maize (*Zea mays* L.). **PLoS ONE**, San Francisco, USA; v. 11, p. 1-22, 2016.

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

VOLTAS, J.; LÓPEZ-CÓRCOLES, H.; BORRÁS, G. Use of biplot analysis and factorial regression for the investigation of superior genotypes in multi-environment trials. **European Journal of Agronomy**, [S.1.]; v. 22, n. 3, p. 309–324, 2005.

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

WANG, C.-T.; DONG, Y.-M. Overexpression of maize ZmDBP3 enhances tolerance to drought and cold stress in transgenic Arabidopsis plants. **Biologia**, Bratislava, Slovakia; v. 64, n. 6, p. 1108, 2009.

WANG, L. et al. Coronatine enhances chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by improving the antioxidative defence system. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Malden, USA; v. 195, n. 5, p. 377–383, 2009.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Oxford, England; v. 10, n. 2, p. 88–94, 2005.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, Japan; v. 35, n. 5, p. 785–791, 1994.

ZHOU, M.-L. et al. Aldehyde dehydrogenase protein superfamily in maize. **Functional & Integrative Genomics**, [S.1.]; v. 12, n. 4, p. 683–691, 2012.

ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, USA; v. 53, n. 1, p. 247–273, 2002.

APÊNDICE A

Tabela 1A - Resumo da análise de variância para a germinação de sementes de quatro linhagens de milho.

Fatores	GL	QM	
		Germinação 1 ^a contagem	Germinação 2 ^a contagem
Linhagens	3	19,0	12,9167
Erro	12	6,5	3,9167
Total	15		
CV (%)		2,6352	2,0324

Tabela 2A - Resumo da análise de variância para a germinação de sementes de quatro linhagens de milho submetidas ao envelhecimento acelerado.

Fatores	GL	QM Germinação
Linhagens	3	627,0*
Erro	12	17,1667
Total	15	
CV (%)		4,7761

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

Tabela 3A - Resumo da análise de variância para porcentagem de emergência (E%), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (PA) de quatro linhagens de milho submetidas a diferentes disponibilidades hídricas (DH), sem estresse (10% da capacidade de retenção de água) e sem estresse (70% da capacidade de retenção de água).

Fatores ¹	GL	QM			
		E%	IVE	CR	PA
Linhagens	3	0,0406*	8,9144*	74,3515*	27,6253*
DH	1	0,0002	0,0436	9,4758	65,7613*
Linhagens*DH	3	0,0037	0,4903	7,0809*	2,0826*
Erro	24	0,0055	0,1779	2,2606	0,4379
Total	31				
CV (%)		5,2055	3,5728	8,2995	5,0392

¹DH=disponibilidade hídrica; Linhagens*DH=interação entre linhagens e disponibilidade hídrica.

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