



THAÍS DE ANDRADE

**CONTROLE GENÉTICO E EXPRESSÃO DE
GENES ASSOCIADOS À QUALIDADE
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO**

LAVRAS - MG

2015

THAÍS DE ANDRADE

**CONTROLE GENÉTICO E EXPRESSÃO DE GENES
ASSOCIADOS À QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES
DE MILHO**

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

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS - MG

2015

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

Andrade, Thaís de.

Controle genético e expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho / Thaís de Andrade. – Lavras : UFLA, 2015.

122 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

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

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. Heterose. 3. LEA proteínas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

THAÍS DE ANDRADE

**CONTROLE GENÉTICO E EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO**

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

APROVADA em 11 de setembro de 2015.

Dra. Flavia Barbosa Silva Botelho	UFLA
Dr . João Bosco dos Santos	UFLA
Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dra. Renata Silva-Mann	UFS

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

LAVRAS - MG

2015

A DEUS, por ser meu guia e protetor, me concedendo muito mais
bênçãos do que eu mereço.

OFEREÇO

Aos meus pais, Afonso e Cida; aos meus irmãos, Vinícius e Vanessa e ao meu
marido, Gustavo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Afonso e Cida, pelo amor incondicional, incentivo e exemplo de vida. Por me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Vinícius e Vanessa, que são pessoas com quem sempre posso contar, pelo carinho, apoio e amizade.

Ao Gustavo, que está ao meu lado em todos os momentos sejam bons, difíceis ou de muito trabalho, pelo amor, companheirismo, paciência e pela ajuda nos experimentos.

À Roseane, João Almir e Felipe, pelo carinho e suporte.

A todos os amigos que perto ou distante sempre me apoiaram, pelo carinho e companheirismo.

À Professora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela orientação, amizade, compreensão, exemplo de profissionalismo e competência.

Aos professores Renato Mendes Guimarães, Maria Laene Moreira de Carvalho e João Almir Oliveira, pelos esclarecimentos e auxílio na execução deste trabalho.

Aos pesquisadores Antônio Vieira Rodrigues e Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pelos conselhos e amizade.

Ao professor Erich Grotewold e a todos os colegas da Ohio State University, pela experiência única em minha vida.

Aos amigos Heloísa, Aline, Ricardo e Paulo, pela sincera amizade, companheirismo e ajuda essencial na execução dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Elza, Dalva e Elenir, pelo auxílio na execução dos experimentos e amizade. E também à Marli secretária da pós-graduação.

Aos estagiários do Laboratório de Sementes e alunos da Iniciação Científica, em especial a Amanda, por todo o auxílio e dedicação na execução do experimento, além da amizade.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) pela concessão de bolsa de estudos e recursos para execução do projeto.

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

Muito Obrigada!

RESUMO

No Brasil, é crescente a demanda por sementes híbridas de milho com alta qualidade, principalmente em função da adoção de tecnologias avançadas pelos produtores. Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo, se tornando uma importante característica a ser avaliada durante o processo de seleção realizado nos programas de melhoramento. Vários genes parecem estar envolvidos no controle dessa característica, sendo os que codificam as enzimas α -amilases, descritos como os de maior influência sobre a qualidade fisiológica de sementes de milho. No entanto, em pesquisas mais recentes tem sido observado que outros genes podem estar associados a esta qualidade. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar o controle genético e a expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho. Com este propósito, foi instalado um campo de produção de sementes híbridas de milho, incluindo os recíprocos, utilizando-se o sistema dialelo parcial, mais as linhagens genitoras. Foram utilizadas cinco linhagens (30, 91, 57, 43, 64). Para a avaliação da qualidade de sementes foram realizadas as determinações de teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, teste de frio, envelhecimento artificial e deterioração controlada. Foram analisados os efeitos da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, bem como os efeitos recíprocos. Foi realizada, também, a análise proteômica de LEA proteínas e das enzimas α -amilase, MDH, ADH e PGI em sementes tratadas com ABA. Na análise de transcritos foi estudada a expressão dos genes LEA, LEA D-34, α -amilase B73, α -amilase LOC 5425 e SOD. Foi observado que há expressão da heterose e efeito recíproco para a característica qualidade fisiológica de sementes de milho, além disso, genes com ação gênica aditiva e de dominância estão envolvidos no controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho. O ABA reduz a atividade da α -amilase, a germinação e a qualidade fisiológica de sementes de milho. A expressão de LEA proteínas está relacionada à qualidade fisiológica de sementes de milho. Há heterose e efeito recíproco na expressão de enzimas e proteínas associadas à qualidade fisiológica de sementes.

Palavras-chave: *Zea mays*. Heterose. LEA proteínas.

ABSTRACT

The demand for maize hybrid seeds with high quality is increasing in Brazil, mainly due to the adoption of advanced technologies by growers. It is known that physiological quality of maize seeds is influenced by genotype, becoming an important trait to be evaluated during the selection process in breeding programs. Several genes seem to be involved in the control of this trait, and those which encode the α -amylase enzymes are described as having the greatest influence on the physiological quality of maize seeds. However, recent researches has been observed that other genes may be associated with seed quality. Thus, the aim in this study was to evaluate the genetic control and the expression of genes associated with maize seed quality. For this purpose, a field was installed to obtain hybrid, reciprocal and inbred line seeds using partial diallel design. Five lines were used (30, 91, 57, 43, 64). The physiological quality of the seeds were accessed by water content, germination, first count of germination, germination speed index, cold test, accelerated aging and controlled deterioration. The heterosis effect, the general (GCA) and the specific (SCA) combining ability and the reciprocal effects were estimated. Proteomic analysis was performed for LEA proteins, α -amylase, MDH, ADH and PGI of seeds treated with ABA. Transcriptomic analysis was performed for the genes LEA, LEA D-34, α -amylase B73, α -amylase LOC 5425 and SOD. Heterosis and reciprocal effect was observed for physiological seed quality, furthermore, additive and dominant gene action were involved in genetic control of physiological quality of maize seeds. ABA reduces the activity of α -amylase, germination and physiological seed quality of maize seeds. Expression of LEA proteins is related to physiological seed quality. There are heterosis and reciprocal effect in the expression of enzymes and proteins associated with physiological seed quality.

Keywords: *Zea mays*. Gene expression. LEA proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Atividade da enzima alfa amilase em sementes de milho (linhagem 1, 2 e híbrido) embebidas na solução de paclobutrazol nas concentrações 0; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 mM.....94
- Figura 2 Atividade da enzima alfa amilase em sementes de milho (linhagem 1, 2 e híbrido) embebidas na solução de ácido abscísico nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 1,0 mM.....95
- Figura 3 Atividade da α -amilase de sementes de milho da linhagem 30, embebidas em água e em solução de ABA por diferentes períodos de tempo.....96
- Figura 4 Padrões de LEA proteínas extraídas de sementes de milho da linhagem 30, embebidas em água e em solução de ABA em diferentes tempos.....97
- Figura 5 A - Padrões isoenzimáticos da α -amilase em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA; B - Padrões isoenzimáticos da MDH em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA.....105
- Figura 6 A - Padrões isoenzimáticos da ADH em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA; B - Padrões isoenzimáticos da PGI em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA.....107
- Figura 7 Zimograma de LEA proteínas extraídas de sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA.....109
- Figura 8 Proteínas LEA extraídas de sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA.....110
- Figura 9 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes Alpha amylase (LOC542522) e Alpha amylase B73 em sementes de milho das linhagens 30 e 43 e dos híbridos 43/30 e 30/43.....112

Figura 10 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes *Late embryogenesis abundant proteins* D-34 (LEA D-34) e *Late embryogenesis abundant proteins* (LEA) em sementes de milho das linhagens 30 e 43 e dos híbridos 43/30 e 30/43.....114

Figura 11 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes SOD em sementes de milho das linhagens 30 e 43 e dos híbridos 43/30 e 30/43.....116

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Descrição das linhagens de milho utilizadas na pesquisa – Lavras – 2015.....49
- Tabela 2 Resumo da Análise de Variância para os resultados obtidos nos testes de primeira contagem de germinação (PCG), porcentagem de germinação (TG), velocidade de germinação (VG), teste de frio (TF), envelhecimento artificial (EA) e deterioração controlada (DC) de sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015.....56
- Tabela 3 Valores médios (%) de plântulas e da heterose no teste de primeira contagem de germinação (PCG) e no teste de germinação (TG) de sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015.....58
- Tabela 4 Valores médios (%) de plântulas e da heterose no teste de velocidade de germinação (VG) e no teste de frio (TF) de sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015.....61
- Tabela 5 Valores médios (%) de plântulas e da heterose no teste de envelhecimento artificial (EA) e no teste de deterioração controlada (DC) em sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015.....63
- Tabela 6 Quadrados médios das capacidades geral (CGC) e específica de combinação (CEC) e dos efeitos recíprocos (ER), maternos (EM) e não-maternos (NM), para os testes de primeira contagem de germinação (PCG), porcentagem de germinação (TG), velocidade de germinação (VG), teste frio (TF), envelhecimento artificial (EA) e deterioração controlada (DC)–Lavras– 2015...64
- Tabela 7 Estimativas dos efeitos de capacidade geral de combinação (G), capacidade específica de combinação (S), efeito recíproco (R), materno (M) e não-materno (NM) para os testes de primeira contagem de germinação (PCG), porcentagem de germinação

(TG), velocidade de germinação (VG), teste frio (TF), envelhecimento artificial (EA) e deterioração controlada (DC) – Lavras – 2015.....	68
Tabela 8 Descrição das linhagens de milho utilizadas na pesquisa – Lavras – 2015.....	63
Tabela 9 Primers utilizados na análise de <i>qRT-PCR</i>	89
Tabela 10 Porcentagem de plântulas após embebição das sementes de milho das linhagens 1 e 2 e do híbrido formado por estas linhagens em solução de paclobutrazol por período de 72 horas – Lavras – 2015.....	93
Tabela 11 Porcentagem de plântulas após embebição das sementes de milho das linhagens 1 e 2 e do híbrido formado por estas linhagens em solução de ácido abscísico (ABA) por período de 72 horas – Lavras – 2015.....	94
Tabela 12 Resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de primeira contagem de sementes de protrundidas (ICGP), primeira contagem de plântulas normais (ICGN), sementes protrundidas no teste de germinação (TGP) e plântulas normais no teste de germinação (TGN) das sementes de milho de diferentes genótipos embebidas em solução de ABA e água – Lavras – 2015.....	98
Tabela 13 Valores médios (%) de protrusão, plântulas normais e heterose observados aos quatro dias após a semeadura de sementes embebidas em água e ABA – Lavras – 2015.....	100
Tabela 14 Valores médios (%) de protrusão, de plântulas normais e heterose observados aos 10 dias após a semeadura de sementes embebidas em água e ABA - Lavras - 2015.....	102

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	14
1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Mercado de sementes de milho	16
2.2	Qualidade de sementes	17
2.3	Controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho ...	19
2.4	Enzimas associadas à qualidade fisiológica de sementes	27
2.5	Expressão gênica	32
	REFERÊNCIAS	35
	CAPÍTULO 2	45
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Instalação e condução do experimento	49
2.2	Determinação da qualidade de sementes	50
2.2.1	Teor de água	50
2.2.2	Teste de germinação	50
2.2.3	Primeira contagem de germinação	51
2.2.4	Índice de velocidade de germinação	51
2.2.5	Teste de frio sem solo	52
2.2.6	Envelhecimento acelerado	52
2.2.7	Deterioração controlada	52
2.3	Procedimento estatístico	53
2.4	Heterose	54
2.5	Estimativas das capacidades geral e específica de combinação e dos efeitos recíprocos, materno e não-materno.	54
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

3.1	Qualidade fisiológica.....	56
3.2	Análise da capacidade de combinação	64
3.2.1	Estimativas dos efeitos de capacidade geral (CGC) e específico (CEC) de combinação, efeito recíproco (ER), materno (EM) e não-materno(NM).	67
4	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	CAPÍTULO 3.....	76
1	INTRODUÇÃO	78
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1	Ensaio 1: Inibição da α -amilase durante a germinação de sementes de milho.....	80
2.1.1	Avaliação do produto e da dosagem para inibição da expressão de α -amilase	80
2.1.2	Avaliação da expressão de enzimas α -amilase e proteínas LEA em sementes submetidas a diferentes tempos de embebição com ABA	82
2.2	Ensaio 2: Expressão de genes associados à qualidade fisiológica durante a germinação de sementes de milho embebidas com ABA.	83
2.2.1	Determinação da qualidade fisiológica de sementes de milho embebidas com ABA.....	84
2.2.2	Expressão de genes associados a qualidade fisiológica por meio da técnica de eletroforese.....	85
2.2.3	Quantificação de proteínas LEA	86
2.2.4	Expressão de genes associados à qualidade fisiológica por meio da técnica de qRT-PCR	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.1	Inibição da α -amilase durante a germinação de sementes de milho	92

3.2	Qualidade fisiológica e expressão de genes em sementes de milho embebidas com água e ABA	97
4	CONCLUSÕES.....	118
	REFERÊNCIAS.....	119

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, tem sido observado aumento da demanda de sementes híbridas de milho com alta qualidade, principalmente com a comercialização de transgênicos no Brasil, o que exige das empresas produtoras altos padrões de qualidade, devendo ser associados a sistemas produtivos rentáveis. Neste novo cenário, investimentos em tecnologias são prioritários nas empresas, pois a produção de sementes é uma atividade especializada e cuidados devem ser despendidos em todas as etapas do processo produtivo.

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho tem sido realizada, principalmente, por meio de testes de germinação e vigor para a garantia de comercialização de sementes com alta qualidade, visando ao estabelecimento de uma população de plantas recomendada para cada cultivar.

Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo, pelo ambiente e pela interação entre eles (MEYER et al., 2012; ROVERI JOSÉ et al., 2004), sendo o genótipo uma importante característica a ser avaliada durante o processo de seleção realizado nos programas de melhoramento. O conhecimento do controle genético para a qualidade fisiológica de sementes é importante para a definição do processo seletivo que maximize os ganhos visando ao desenvolvimento de híbridos superiores.

O estudo da capacidade combinatória possibilita identificar as melhores combinações híbridas, visando ao lançamento de híbridos com sementes de melhor qualidade que possuam boa armazenabilidade e garantam um estande ideal no campo. Vários genes parecem estar envolvidos no controle dessa característica. Dentre esses genes os que codificam as enzimas α -amilases são descritos como os de maior influência sobre a qualidade fisiológica de sementes

de milho (BEWLEY; BLACK, 1994; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al., 2000). No entanto, outros genes podem estar associados à qualidade fisiológica a exemplo daqueles associados à tolerância à dessecação, à respiração, enzimas *scavengers*, dentre outros (LEYMARIE et al., 2012).

Dessa forma, para a avaliação da expressão de outros genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho é necessário bloquear a atividade da α -amilase. Segundo Oishi e Bewley (1990) a α -amilase é sintetizada quando a camada de aleurona torna-se sensível à giberelina. Esse processo acontece com o declínio de ácido abscísico (ABA). Assim, é possível inibir a expressão da α -amilase com a embebição das sementes em solução de ABA (SODKIEWICZ; SODKIEWICZ, 2003).

Sabe-se que à medida que a semente se desenvolve, ocorrem mudanças na expressão de diferentes proteínas as quais possuem características e funções distintas (HUGHES; GALAU, 1991). A expressão gênica é responsável pelo crescimento, desenvolvimento e resposta aos estímulos ambientais de uma planta. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN, 2001).

O entendimento da expressão desses genes e do controle genético é fundamental para o desenvolvimento de tecnologias que garantam a produção de sementes com alta qualidade. A técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) tem sido utilizada para a análise da expressão gênica em plantas e se mostra promissora para o estudo de expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho (ANDRADE et al., 2013).

Diante do exposto, objetivou-se nesta pesquisa estudar o controle genético para a característica de qualidade fisiológica e avaliar a expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mercado de sementes de milho

A produção mundial estimada de milho na safra 2014/2015 é de 991,92 milhões de toneladas, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América – USDA (2015). No Brasil, considerando a primeira e a segunda safras, a produção esperada é de mais de 80 milhões de toneladas de grãos, sendo a utilização de materiais de alta tecnologia um dos principais fatores que contribuíram para o aumento da produtividade média da cultura no Brasil que foi de 5,4 ton/ha na última (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015)

Para atender ao mercado de grãos, considerando uma área colhida de 15,8 milhões de hectares e 90% de taxa de utilização de sementes, foram produzidas aproximadamente 425 mil toneladas de sementes na safra 2013/2014 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2014). É importante observar que houve um crescimento significativo na produção de sementes de milho, que era de 172 mil toneladas em 2000/2001.

Atualmente, o milho possui expressiva importância no mercado de sementes, correspondendo a 45% desse mercado em nível nacional. Também tem sido observado aumento da utilização de sementes de híbridos simples de milho correspondendo a 71% do mercado de milho no Brasil, fato que está associado ao aumento de investimentos em alta tecnologia (ABRASEM, 2014).

Associado ao uso de sementes de híbridos simples deve-se considerar ainda que cerca de 81,5% das sementes comercializadas na última safra foram de sementes transgênicas. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Milho e Sorgo (2015) pela primeira vez em 2014, o número de cultivares transgênicas disponíveis no mercado foi maior do que o

das cultivares convencionais. Esse fato mostra a crescente demanda por tecnologias e consequentemente maior investimento por parte dos produtores, já que as sementes transgênicas possuem um custo maior quando comparadas ao das sementes convencionais.

Para atender às necessidades de um produtor cada vez mais tecnificado, é importante que as empresas produtoras de sementes invistam em programas de controle de qualidade interno, por meio dos quais são controladas todas as etapas do processo de produção, visando garantir a comercialização de sementes com alta qualidade associados a sistemas produtivos rentáveis.

2.2 Qualidade de sementes

O uso de sementes de boa qualidade é importante para garantir o estabelecimento dos cultivos e a obtenção de elevados rendimentos. A qualidade das sementes é determinada pela interação entre atributos fisiológicos, sanitários, genéticos e físicos, os quais interferem diretamente no estabelecimento de plantas no campo e no potencial de armazenabilidade das sementes.

Neste contexto, nas empresas produtoras de sementes têm sido realizados investimentos no controle de qualidade interno para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes por meio de testes de germinação e vigor para garantir a comercialização de sementes com alta qualidade.

O vigor envolve as propriedades das sementes que determinam o potencial para a germinação rápida e uniforme de sementes e o desenvolvimento de plântulas normais em uma ampla faixa de condições de campo (WANG et al., 2015). Na semente, o vigor está relacionado com o grau de deterioração, ou seja, envelhecimento, que é o resultado da soma dos processos deteriorativos que, finalmente, levam à morte.

Quando a semente atinge a maturidade fisiológica, ocorre o máximo acúmulo de matéria seca, que geralmente culmina com a máxima qualidade fisiológica, ou seja, ponto em que a semente apresenta maior germinação e vigor (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Nesse momento, a deterioração é mínima, o processo de deterioração é progressivo, inexorável e dependente da espécie vegetal e das condições de ambiente onde a semente se encontra (NAKAGAWA, 1999). O máximo vigor atingido depende de vários fatores: genéticos, das condições edafoclimáticas durante o processo de desenvolvimento de sementes, dos relacionados aos danos mecânicos, microrganismos e insetos, os decorrentes das condições ambientais durante o armazenamento e os relativos à densidade, ao tamanho e à idade das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Sementes com alto vigor favorecem a germinação mais rápida e o estabelecimento uniforme de plântulas, fatores de grande importância econômica e ecológica. Devido à alta vulnerabilidade a injúrias, doenças e estresses abióticos, a germinação é considerada uma das fases mais críticas no ciclo de vida da planta (RAJJOU et al., 2012).

O processo de germinação, sob o ponto de vista fisiológico, envolve os eventos que iniciam com a embebição da semente madura e terminam com a protrusão da radícula. Para que a germinação ocorra, há um teor mínimo de água que a semente deve atingir e este é variável com a espécie. Além disso, com abundante disponibilidade de água, ocorre maior velocidade de embebição e, neste caso, se as condições forem aeróbicas, a emergência da raiz primária ocorre precocemente. A partir da absorção de água, uma série de processos físicos, bioquímicos e fisiológicos é acelerada no interior da semente, os quais, na ausência de outro fator limitante, resultam no desenvolvimento do eixo embrionário e na emergência da plântula (GUIMARÃES; DIAS; LOUREIRO, 2008).

Os fatores que afetam a germinação são internos e externos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Os principais fatores externos, ou seja, do ambiente, que influenciam o processo germinativo são água, temperatura, luz e oxigênio. Quanto aos internos, a taxa ABA/GA (ácido abscísico/ácido giberélico) é responsável por regular a transição metabólica requerida para que ocorra germinação.

O ácido abscísico (ABA) é um composto resultante da clivagem de carotenoides que controla o acúmulo de reservas e a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas. Durante a germinação, o ABA exerce efeito inibitório com o intuito de evitar a germinação precoce de sementes em desenvolvimento ainda na planta mãe (WHITE et al., 2000).

Dessa forma, para o sucesso da germinação é necessária a produção de outra classe de hormônios, as giberelinas (GA's) que atuam ativando as enzimas amilases as quais realizam a quebra do amido.

A qualidade das sementes deve ser garantida e mantida durante os processos de produção, no campo, no processamento pós-colheita e na comercialização. Contudo, sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo, se tornando uma importante característica a ser avaliada durante o processo de seleção realizado nos programas de melhoramento.

2.3 Controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho

Nos programas de melhoramento genético de milho o principal objetivo é a obtenção de híbridos de alto desempenho. Dessa forma, o conhecimento do comportamento das linhagens em combinações híbridas (capacidade de combinação), bem como o seu potencial *per se* é fundamental para a obtenção de híbridos superiores (LEMOS et al., 2002).

O estudo da população base e dos genitores escolhidos é uma condição essencial para tornar eficiente qualquer programa de melhoramento genético. Tal procedimento permite avaliar a variabilidade genética existente na população de referência ou no grupo de pais selecionados, bem como inferir sobre os tipos e as importâncias relativas das interações gênicas que atuam na determinação dos caracteres, favorecendo a escolha do processo seletivo que maximize os ganhos esperados com a seleção. Para realizar esses estudos é comum o uso de um delineamento genético ou sistema de cruzamentos, como o dialelo (WRICKE; WEBER, 1986).

De forma geral, cruzamentos dialélicos correspondem a todos os casos em que n genitores são cruzados 2 a 2. Esses estudos têm sido utilizados para obter informações sobre o controle genético de caracteres, na escolha de genitores por meio das estimativas de capacidade de combinação e na predição de compostos (RAMALHO et al., 2012).

O modelo básico, também conhecido como dialelo balanceado, completo ou meia tabela, inclui todas as combinações possíveis entre os n genitores e também propicia informações obtidas dos genitores, recíprocos e retrocruzamentos (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). No entanto, sua utilização pode ser inviabilizada pela quantidade de genitores, pois à medida que se aumenta o número de genitores envolvidos, aumenta-se também o número de cruzamentos que tem que ser realizado.

Para reduzir o número de cruzamentos, foi proposto o uso de dialelos parciais. Esse dialelo é composto por dois grupos com genitores distintos que são cruzados. Tem como vantagem a possibilidade de incluir maior número de genitores (RAMALHO et al., 2012). Cruz, Regazzi e Carneiro (2012) e Morello, Miranda Filho e Gorgulho (2001) afirmam que adaptações dos modelos de Griffing (1956) e Gardner e Eberhart (1966) para este esquema têm possibilitado maximizar as informações sobre os grupos estudados com um número menor de

cruzamentos do que os requeridos no dialelo balanceado, além de verificar os efeitos da heterose resultante da hibridação entre os dois grupos distintos.

Segundo Cruz, Regazzi e Carneiro (2012) os principais métodos de análise dos dialelos foram propostos por Hayman (1954), Griffing (1956) e Gardner e Eberhart (1966). O método de Hayman (1954) é utilizado quando os genitores representam uma amostra da população, efeito aleatório, e deseja-se obter informações a respeito do controle genético do caráter. O método de Gardner e Eberhart (1966) é utilizado quando o objetivo é avaliar o potencial de variedades *per se* e em combinações híbridas, por meio de estimativas de efeitos varietais e da heterose manifestada no híbrido. Na metodologia proposta por Griffing (1956), o desempenho médio de cada genótipo é decomposto em capacidade geral de combinação (efeitos principais) e capacidade específica de combinação (interações).

A capacidade geral de combinação (CGC) diz respeito ao comportamento médio de um genitor numa série de combinações híbridas e gera informações a respeito da concentração de genes predominantemente aditivos em seus efeitos (G_i), auxiliando na escolha dos genitores em programas de melhoramento intrapopulacional (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). De acordo com estes autores, quando a estimativa de G_i é baixa, seja ela positiva ou negativa, indica que o valor da CGC do genitor não difere muito da média geral da população dialélica. Se os valores de G_i são altos, sejam eles positivos ou negativos, há indício de que o genitor em questão é muito superior ou inferior aos demais genitores do dialelo, com relação ao desempenho médio das progênies.

A capacidade específica de combinação (CEC) é usada para designar casos em que certas combinações híbridas apresentam relativamente melhores ou piores desempenhos que o esperado, com base na performance média dos genitores do referido híbrido, ou seja, é uma estimativa dos desvios do

comportamento de um híbrido em relação ao esperado com base na CGC. A CEC está associada aos efeitos basicamente não aditivos, como dominância e epistasia (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO 2012; CRUZ; VENCOVSKY, 1989).

As estimativas dos efeitos da CEC (S_{ij}) são úteis para determinar as melhores combinações híbridas, mas a CEC não especifica qual dos genitores deve ser utilizado como parental feminino ou masculino no cruzamento.

Para a maior parte das características a utilização de uma linhagem como parental feminino ou como parental masculino não interfere no desempenho do híbrido, mas para algumas características a orientação do cruzamento pode ser o fator responsável pelo sucesso. O uso de cruzamentos com seus respectivos recíprocos em estudos de dialelo permite estimar o efeito recíproco e conseqüentemente definir melhor como os cruzamentos devem ser orientados (BORDALLO, 2005).

A maioria das características controladas por genes nucleares não apresentam diferenças significativas entre o híbrido e seu recíproco. Caso haja efeitos citoplasmáticos os resultados dos cruzamentos recíprocos serão diferentes, onde o fenótipo dos descendentes será influenciado pelo genitor feminino. Esse tipo de herança pode ser explicada por dois mecanismos: efeito materno, em que o fenótipo dos filhos é determinado por elemento citoplasmático materno devido a seus genes nucleares; e herança extracromossômica, em que a herança é devido a genes localizados no citoplasma, principalmente em mitocôndrias e cloroplastos (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2012).

De acordo com Cockerham e Weir (1977), o efeito recíproco pode ser decomposto em materno (efeito recíproco geral) e não materno (efeito recíproco específico). Essa decomposição do efeito recíproco nos permite inferir se o efeito é causado pelo DNA citoplasmático, se é devido à interação entre o DNA citoplasmático e o nuclear, ou se é devido apenas ao efeito ambiental associado

especificamente aos pais ou aos cruzamentos. Se confirmado que o efeito recíproco foi herança materna, o caráter em questão é herdável e pode ser explorado na população. Mas, se o efeito estiver relacionado ao ambiente ou à interação genótipo ambiente, aumentaria o viés das análises genéticas (WU; MATHESON, 2001).

Wu e Matheson (2001) estudando o efeito recíproco, materno e não materno, em esquema de dialelo parcial em árvores de pinheiro, concluíram que o dialelo parcial é eficiente para estimar os parâmetros genéticos e os componentes da variância. Os mesmos autores também concluíram que a utilização dos cruzamentos recíprocos em uma estrutura de acasalamento de dialelo parcial não prejudica as análises genéticas quando comparadas às análises de dialelo parcial padrão e que os cruzamentos recíprocos devem ser utilizados quando a utilização do parental como fêmea ou macho facilita as operações de produção ou diminuem os custos.

O efeito materno, muitas vezes, está relacionado a características relacionadas à semente, uma vez que na fertilização uma das células espermáticas do grão de pólen funde-se à oosfera para formar o zigoto e a outra célula espermática funde-se a um tecido formado a partir da diferenciação dos dois núcleos polares, dando origem a uma estrutura triploide, que formará o endosperma. Sendo assim, o zigoto que dará origem a planta possui 50% da informação dos cromossomos de origem paterna e 50% de origem materna. Já o endosperma apresenta 66,66% dos cromossomos maternos e apenas 33,33% dos cromossomos paternos (VEIT et al., 1993). Sendo assim, o efeito materno sobre a expressão de genes é muito mais forte no endosperma do que em tecidos vegetativos (STUPAR; HERMANSON; SPRINGER, 2007).

Em sementes de milho, diferenças na expressão fenotípica entre híbridos e recíprocos têm sido observadas para várias características como óleo e proteína no embrião (MILLER; BRIMHALL, 1951), peso seco do embrião e endosperma

(BAGNARA; DAYNARD, 1983), germinação de sementes em baixa temperatura e tolerância a danos por secagem (KOLLIPARA et al., 2002) e tolerância à alta temperatura de secagem (ROVERI JOSÉ, 2004).

Gomes et al. (2000) estudando o efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho, observaram efeito recíproco significativo para germinação, comprimento de parte aérea e radícula. Bordallo et al. (2005) estudando o controle genético de caracteres agronômicos e proteína total em genótipos de milho doce, observaram efeito recíproco significativo para o caráter estande. Oliveira et al. (2015) estudando duas linhagens contrastantes em relação à qualidade de sementes, com seu respectivo híbrido e recíproco, também observaram efeito recíproco para a qualidade fisiológica de sementes.

Esses resultados indicam a importância da escolha dos parentais masculino e feminino para instalação de campos de produção de sementes híbridas de milho, visando à obtenção de sementes com alto potencial germinativo.

Nas análises dialélicas, quando há as informações dos pais, também é possível estudar o efeito da heterose. Heterose é o termo utilizado para descrever um fenômeno no qual híbridos F1 são geneticamente superior aos pais (SHULL, 1948). Desde a sua descoberta este fenômeno tem sido intensivamente utilizado para aumentar a produtividade, biomassa, precocidade, fertilidade, resistência a estresses bióticos e abióticos e outras características. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis por este vigor híbrido ainda não estão totalmente elucidados (HALLAUER; KARENA; MIRANDA FILHO, 2010).

A heterose é um fenômeno complexo, em grande parte controlada por vários genes e com interações alélicas, refletindo em várias características (FU et al., 2014). Muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de elucidar as bases genéticas da heterose e algumas hipóteses foram propostas. A primeira hipótese é a da dominância, no qual fatores dominantes de um dos parentais mascaram os

alelos recessivos do outro parental no heterozigoto F1 em um esquema de complementação gênica (BRUCE, 1910; DAVENPORT, 1908; JONES, 1917). A segunda hipótese refere-se à sobredominância na qual o loco heterozigoto confere melhor desempenho que o loco homozigoto (EAST, 1936; SHULL, 1948). A última é a hipótese de epistasia que se refere à superioridade da interação não alélica no heterozigoto F1 (STUBER, 1994).

Com o avanço das técnicas moleculares, teorias complementares estão sendo levantadas para ajudar elucidar este fenômeno. Chen (2013) sugere que a interação alélica de genomas parentais altera a programação de genes que aumentam o vigor, o crescimento, a tolerância a estresses e a produtividade em plantas. Muitos autores apontam a regulação epigenética como um dos fatores fundamentais para a heterose, pois altera a metilação do DNA e a expressão de RNAs pequenos em híbridos, fato relacionado às diferenças nas atividades dos genes e nos fenótipos heteróticos (GREAVES et al., 2012; GROSZMANN et al., 2011, 2013; HOFMANN, 2012; HOLLICK, 2008; SHEN et al., 2012). Outras hipóteses também foram levantadas, como a possível variação na estrutura do genoma (FU; DONNER, 2002; SONG, 2003), a função específica de proteínas e as modificações pós-transcricionais (GUO et al., 2013; PASCHOLD et al., 2010). No entanto, a maior parte dos estudos foi realizada com plantas totalmente desenvolvidas e pouco se sabe sobre as bases genéticas e moleculares da heterose na qualidade de sementes.

Alguns trabalhos foram realizados com o intuito de estudar o efeito do vigor híbrido na germinação (GOMES et al., 2000; HOECHER et al., 2006; REIS et al., 2011; ROOD et al., 1990; ROOD; LARSEN, 1988; ROVERI JOSÉ et al., 2004; SILVA et al., 2008) e estágios iniciais de desenvolvimento das plantas de milho (HOECKER et al., 2006). Em vários desses trabalhos, foi constatado que as plantas híbridas apresentam maior eficiência nos sistemas enzimáticos comparada à das linhagens parentais, o que explica o maior vigor

das sementes. Segundo Ding et al. (2012) a repressão de microRNA no híbrido que resulta em uma maior eficiência na expressão gênica, pode ser uma das razões pela qual os híbridos apresentam maior vigor de sementes comparados às linhagens parentais.

Em alguns trabalhos foi observado que a maior velocidade de germinação e o crescimento vigoroso das plântulas estavam associados à maior atividade metabólica de proteínas, RNA, e DNA nos embriões (FU et al., 2011; GUO et al., 2013; MEYER et al., 2012). Os autores verificaram, também, que no embrião híbrido, o metabolismo de proteínas e lipídeos é superior aos das linhagens, favorecendo o crescimento do eixo embrionário e a maior porcentagem de germinação das sementes. Li et al. (2009) estudando os perfis de expressão gênica entre híbridos altamente heteróticos e seus pais, assim como híbridos de baixa heterose, verificaram que ambos apresentaram maior expressão gênica que seus pais, em relação aos caracteres avaliados. Guo et al. (2013) encontraram 155 diferentes proteínas, relacionadas à germinação, nas quais houve mudança na expressão entre os híbridos e seus respectivos pais, concluindo que essas alterações nos padrões de expressão dos genes nos híbridos podem ser responsáveis pela heterose observada.

Rood e Larsen (1988) estudaram a relação de giberelinas (GAs) e amilases com a heterose. Foram utilizadas duas linhagens e seu respectivo híbrido. Os autores relataram que a maior concentração endógena de GAs nas sementes híbridas aumentou a atividade da α -amilase e, conseqüentemente, uma hidrólise mais rápida do amido, que é a principal substância de reserva para o crescimento inicial das plântulas. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que as GAs controlam a biossíntese da α -amilase e que estão envolvidas na regulação da heterose em sementes de milho.

Oliveira et al. (2015), estudando enzimas amilases em sementes de milho, observaram maior expressão dessas enzimas em sementes híbridas, mostrando que existe efeito de heterose na expressão de enzimas amilases.

Estudos relacionados ao controle genético e a variabilidade genética para a qualidade fisiológica de sementes, envolvendo diferentes enzimas associadas à qualidade fisiológica, ainda são escassos, havendo a necessidade de mais estudos sobre esse tema.

2.4 Enzimas associadas à qualidade fisiológica de sementes

A semente de milho é rica em amido, sendo esse a principal substância de reserva, representando 70% do peso total do grão (WU et al., 2009). O amido de milho comum é uma mistura de aproximadamente 28% de amilose e 72% amilopectina. Durante a germinação das sementes, as reservas insolúveis de alto peso molecular são degradadas e convertidas em formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou de produção de energia. As modificações metabólicas que ocorrem na germinação são resultados da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência (BEWLEY; BLACK, 1994). As principais enzimas associadas a esse processo são as enzimas α -amilases e β -amilase.

Durante o desenvolvimento da semente, a camada de aleurona funciona como um estoque de reservas, enquanto na germinação, constitui uma fonte de enzimas para a mobilização das reservas (FINCHER, 1989). As giberelinas (GA) estão envolvidas na regulação da mobilização das reservas, no entanto, para que a germinação e o crescimento de plântulas de milho possam ocorrer após a embebição das sementes, a secagem é necessária para sensibilizar a camada de aleurona ao ácido giberélico e ativar a síntese de α -amilase (ROSA et al., 2000).

Até o momento, infere-se que os principais genes associados diretamente à qualidade fisiológica de sementes de milho são os que codificam para enzimas amilases (LEYMARIE et al., 2012). Porém, outros genes como os relacionados à tolerância à dessecação, à respiração e enzimas *scavengers* podem estar associados à qualidade fisiológica.

Para avaliação de outros genes associados à qualidade fisiológica é necessário bloquear a atividade da α -amilase. A α -amilase é sintetizada quando a camada de aleurona torna-se sensível ao ácido giberélico. Esse processo só é permitido após a maturidade fisiológica quando ocorre o declínio de ácido abscísico (ABA) Oishi e Bewley (1990).

Sabe-se que o ABA inibe a germinação de sementes, pois este fitormônio induz a expressão de muitos genes relacionados à maturação de sementes e impede a expressão de genes associados à germinação. Em sementes de cevada a germinação se inicia quando o ácido giberélico (GA3) é sintetizado pela primeira vez no embrião e transportado para a camada de aleurona induzindo a biossíntese de α -amilase. Este processo é especificamente inibido pela produção do hormônio ABA. A inibição da biossíntese de α -amilase ocorre na fase de transcrição e a inibição da síntese de mRNA de amilase é reconhecida como uma atividade específica do ácido abscísico (ICHIKI et al., 2007).

Sodkiewicz e Sodkiewicz (2003) observaram supressão da síntese α -amilase ao embeber sementes de tritcale em solução de 0,5 mM ABA a 25 °C por três dias.

Segundo Zhang et al. (2012), um dos principais mecanismos pelos quais o ABA inibe a germinação em sementes é repressão da descondensação da cromatina em regiões específicas do DNA impedindo a transcrição de genes importantes para a germinação. Após a embebição de sementes em solução contendo ABA por diferentes períodos, estes autores observaram que a máxima

repressão ocorre até 72 horas de embebição, reduzindo seu efeito após esse período.

Outra opção é inibir a síntese de GA para, conseqüentemente, inibir a indução da síntese de α -amilases. Ziauka e Kuusien (2010), ao estudar diferentes inibidores da síntese de GA concluíram que o paclobutrazol (PBZ) é um inibidor que atua nas primeiras etapas da biosíntese de GA. Segundo Lenton, Appleford e Croker (1994), mesmo reduzindo a produção de GA, esse inibidor não apresentou efeito sobre a atividade de α -amilase durante a germinação de sementes de cevada, o que mostra que a biossíntese de GA “de novo” não é essencial para a atividade da proteína secretada. Uma possibilidade é que GA's bioativas podem estar presentes em sementes maduras ou na forma de intermediários.

Oliveira et al. (2013) observaram expressão diferenciada das enzimas amilases em sementes de linhagens com diferentes níveis de qualidade fisiológica, sendo que a maior expressão dessas enzimas não ocorreu necessariamente em sementes da linhagem de melhor qualidade. Esses autores ressaltam que além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar envolvidos no controle do caráter qualidade fisiológica de sementes, a exemplo dos genes relacionados à respiração em plantas.

A malato desidrogenase (malate dehydrogenase - MDH) é uma importante enzima no processo de respiração aeróbica, pois catalisa a conversão de malato a oxaloacetato no ciclo de Krebs, gerando energia e compostos intermediários essenciais no desenvolvimento das células (SCANDALIOS, 1974). Esta enzima está diretamente relacionada com o processo de deterioração, em que a taxa de respiração e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) é maior. Alguns autores têm associado a maior expressão desta enzima às sementes de pior qualidade (CARVALHO et al., 2014) e também às sementes em estágio avançado de deterioração (CAIXETA et al., 2014).

A álcool desidrogenase (alcohol dehydrogenase - ADH), é uma enzima relacionada à respiração anaeróbica que atua reduzindo o acetaldeído a etanol. O acetaldeído é mais tóxico que o etanol e acelera a deterioração de sementes. Assim o aumento da expressão desta enzima pode ser relacionado à maior proteção das sementes contra o efeito deletério desse composto (ANDREWS et al., 1994). Segundo Kennedy, Rumpho e Fox (1992), a ação desta enzima é essencial na fase inicial da germinação de sementes logo após a embebição e antes da ruptura da testa, devido à baixa permeabilidade do tegumento ao oxigênio. Abreu et al. (2014) observaram aumento da atividade da ADH em sementes de milho com a redução do potencial osmótico até -0,9 Mpa, utilizando-se solução de polietileno glicol (PEG 6000).

A fosfogluco-isomerase (phosphoglucose isomerase - PGI), também é uma enzima importante na qualidade de sementes, pois atua na fosforilação de açúcares na glicólise, gerando energia e esqueletos de carbonos vitais ao funcionamento da célula (LIMA et al., 2012). Baldoni (2013) observou maior expressão desta enzima em sementes de cultivares de soja com alta qualidade fisiológica.

Outro grupo importante de proteínas que também parecem estar associadas à qualidade fisiológica de sementes é o das LEA proteínas (*late embryogenesis abundant*).

Alguns autores têm observado que o aumento da expressão de LEA proteínas coincide com o aumento da qualidade fisiológica de sementes de milho (AMARA et al., 2013; ANDRADE et al., 2013; FARIA et al., 2004; ROSA et al., 2005; SILVA-NETA et al., 2015). As LEA proteínas atuam na estabilização de membranas e na proteção do citoplasma durante a desidratação, conferindo tolerância à dessecação e tolerância ao armazenamento em sementes (HONG-BO; ZONG-SUO; MING-AN, 2005).

As LEA proteínas têm sido citadas como sendo multifuncionais na tolerância às condições de estresse. Segundo Todaka et al. (2012), alta expressão dessas proteínas em cultivares de arroz conferem maior produção de grãos em condições de déficit hídrico devido à proteção das membranas celulares e de enzimas, além de evitar a agregação de proteínas durante o ajuste osmótico.

Ainda não há evidências de que as LEA proteínas possuam ação enzimática, porém Liu et al. (2013) ao estudarem a atividade de algumas enzimas “*in vitro*”, induzindo estresse oxidativo e déficit hídrico, na presença e na ausência de LEA proteínas, observaram que essas proteínas interagem com enzimas como catalase (CAT), superóxido-dismutase (SOD) e MDH, evitando modificações conformacionais e protegendo a ação destas enzimas.

Liu et al. (2013), também observaram que LEA proteínas podem se ligar a metais livres reduzindo o estresse oxidativo causado por estes metais. Segundo estes autores, a manutenção da taxa de germinação de sementes de diversas culturas em situações de estresse é maior em genótipos que produzem LEA proteínas quando comparado aos mutantes que não produzem certos grupos destas proteínas. Além disso, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), nos mutantes, foi muito maior.

Diversos fatores, condições e processos afetam a expressão de LEA proteínas durante a maturação e secagem de sementes, dentre eles a presença de ABA, já que alguns grupos de LEA têm expressão induzida por este hormônio (HONG-BO; ZONG-SUO; MING-AN, 2005). Porém, acredita-se que a aplicação exógena de ABA durante a germinação não induza a expressão de LEA proteínas já que não há evidências de que ocorra síntese “de novo” destas proteínas (AMARA et al., 2012).

Assim, estudos relacionados à expressão gênica de proteínas que possam estar associadas à qualidade fisiológica são importantes no processo de produção de sementes de milho.

2.5 Expressão gênica

A expressão gênica se refere ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteína e a regulação em qualquer uma das etapas que envolvem esse processo podem levar a uma expressão gênica diferencial. Assim, todos os eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo a resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica.

A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos, possam ser identificados e, conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada. A expressão gênica pode ser estudada por meio do fenótipo, em nível proteico ou de transcritos das células (KUHN et al., 2001).

Desde sua criação em 1993, o PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) tem sido uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular nos estudos de expressão gênica (D'HAENE; HELLEMANS, 2010). Comparado com outras técnicas de avaliação existentes, esta permite uma detecção de um dado ácido nucleico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON; SAINDRENAN, 2004).

Essa técnica tem sido utilizada, na cultura do milho, para estudar a produção de precursores de fitormônios durante a germinação (SONG et al., 2011), para quantificar a presença de transgênicos em grãos e sementes (NASCIMENTO, 2012), quantificar o nível de transcritos em órgãos vegetais (WANG et al., 2012) e estudar os processos moleculares e celulares envolvidos na heterose em estádios iniciais de desenvolvimento (GUO et al., 2013).

Andrade et al. (2013), utilizaram o qRT-PCR para estudar a expressão de LEA proteínas em sementes de linhagens com alta e baixa tolerância às altas

temperaturas de secagem e observaram alta correlação da expressão dessas proteínas com a qualidade de sementes.

Oliveira et al. (2013), utilizaram esta mesma técnica para estudar a expressão de amilases em sementes de linhagens de milho com diferentes níveis de qualidade fisiológica e concluíram que esta técnica pode ser utilizada para assistir a seleção de genótipos em programas de melhoramento, possibilitando eliminar genótipos de menor qualidade de sementes nas fases iniciais de seleção em programas de melhoramento.

Para Silva-Neta et al. (2015), o qRT-PCR também possibilitou a identificação de dois genes que podem auxiliar os melhoristas na seleção de materiais com tolerância à baixa temperatura de germinação.

Segundo Thomas (1993), a expressão de proteínas em sementes ocorre principalmente no eixo embrionário e cotilédone e, em alguns casos, no endosperma em desenvolvimento. Os padrões de expressão gênica de proteínas em sementes são altamente regulados, espacialmente e temporalmente durante o desenvolvimento de sementes e as proteínas podem ser armazenadas.

Outra técnica importante para a análise de expressão de enzimas e proteínas é a eletroforese, sendo essa técnica qualitativa e semiquantitativa, devido à separação de acordo com o peso das moléculas. Menezes et al. (2008), utilizaram a técnica da eletroforese para a identificação de cultivares de milho por meio de proteínas resistentes ao calor, e observaram diferentes padrões eletroforéticos dessas proteínas para todas as linhagens e híbridos estudados.

A técnica de eletroforese também foi utilizada por Abreu et al. (2014) para estudar a expressão de diferentes enzimas antioxidantes e proteínas resistentes ao calor em sementes de milho submetidas a estresse hídrico. Os autores observaram alta expressão das enzimas SOD e CAT nas sementes de linhagens tolerantes ao estresse hídrico.

A quantificação de proteínas totais pode ser realizada ainda pela técnica de espectrofotometria, pelo método Bradford, por meio do qual podem ser quantificadas proteínas específicas se houver um procedimento anterior de isolamento. O método Bradford também foi utilizado por Andrade et al. (2013), na quantificação de proteínas resistentes ao calor em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de milho. Os autores observaram que a quantidade total dessas proteínas aumenta com o avanço do desenvolvimento das sementes.

Diante do exposto as técnicas de PCR em tempo real, eletroforese e espectrofotometria podem ser ferramentas alternativas em estudos de expressão de proteínas relacionadas à qualidade fisiológica em sementes de milho.

REFERÊNCIAS

ABREU, V. M. et al. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.

AMARA, I. et al. Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. **Journal of plant physiology**, Stuttgart, n. 170, v. 9, p. 864-873, 2013.

AMARA, I. et al. Insights into maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 2, p. 312-329, 2012.

ANDRADE, T. et al. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. **Genetics and Molecular Research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3630-3642, 2013.

ANDREWS, D. L. et al. The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress (changes in induction of Adh1 mRNA, ADH activity, and survival of anoxia). **Plant Physiology**, Bethesda, n. 105, v. 1, p. 53-60, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário 2014**. Londrina, 2014. 34 p.

BAGNARA, D.; DAYNARD, T. B. Reciprocal differences in kernel growth among four maize inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 27, p. 357-363, 1983.

BALDONI, A. **Expressão de genes relacionados com a qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2013. 57 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BORDALLO, P. N. et al. Análise dialélica de genótipos de milho doce e comum para caracteres agronômicos e proteína total. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 123-127, 2005.

BRUCE, A. B. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. **Science**, Washington, v. 32, n. 827, p. 627-628, 1910.

CAIXETA, F. et al. Physiological and biochemical alterations during germination and storage of habanero pepper seeds. **African Journal of Agricultural Research**, Ago-Iwoye, v. 9, n. 6, p. 627-635, 2014.

CARVALHO, E. R. et al. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application of manganese. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 4, p. 317-327, 2014.

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

CHEN, Z. J. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. **Nature Reviews – Genetics**, London, v. 14, n. 7, p. 471-482, 2013.

COCKERHAM, C. C.; WEIR, B. S. Quadratic analyses of reciprocal crosses. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 187-203, 1977.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento, junho/2015**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9levantamento_jun2015.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2015.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4. ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. v. 1, 514 p.

CRUZ, C. D.; VENCOSKY, R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 425 - 438, 1989.

DAVENPORT, C. B. Degeneration, albinism and inbreeding. **Science**, Washington, v. 28, p. 454–455, 1908.

D’HAENE, B.; HELLEMANS, J. The importance of quality control during qPCR data analysis. **International Drug Discovery**, p. 18-24, 2010. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.de/dhaene-hellemans-qc-data-2010.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

DING, D. et al. MicroRNA Transcriptomic Analysis of Heterosis during Maize Seed Germination. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039578#referencas>>. Acesso em: 21 fev. 2015.

EAST, E. M. Inbreeding in corn. **Annual Report of Connecticut Agriculture Experiment Station**, New Haven, v. 31/32, p. 419–428, 1936.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - MILHO E SORGO. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo>>. Acesso em: 4 jan. 2015.

FARIA, M. A. V. R. et al. Germinabilidade e tolerância à dessecação em sementes de milho colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 276-289, 2004.

FINCHER, G. B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 305-346, 1989.

FU, D. et al. What is crop heterosis: new insights into an old topic. **Journal of Applied Genetics**, Pozna, v. 56, p. 1–13, 2014

FU, H.; DOONER, H. K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 9573–9578, 2002.

FU, Z. et al. Proteomic analysis of heterosis during maize seed germination. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, p. 1462-1472, 2011.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, May 2004.

GARDNER, C. O.; EBERHARDT, S. A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, Washington, v. 22, p. 439-452, 1966.

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

GREAVES, I. K. et al. Trans chromosomal methylation in *Arabidopsis* hybrids. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 9, p. 3570–3575, 2012.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences*, Melbourne, v. 9, p. 462-493, 1956.

GROSZMANN, M. et al. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 6, p. 2617–2622, 2011.

GROSZMANN, M. et al. The role of epigenetics in hybrid vigour. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 29, n. 12, p. 684-90, 2013.

GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO M. E. Hidratação de sementes. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Boa Vista, v. 2, p. 31-39, 2008.

GUO, B. et al. comparative proteomic analysis of embryos between a maize hybrid and its parental lines during early stages of seed germination. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065867>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative Genetics in Maize Breeding**: 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2010. 500 p.

HAYMAN, B. I. The theory and analysis of diallel crosses. **Genetics**, Austin, v. 39, p. 789-909, 1954.

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

HOFMANN, N. R. A global view of hybrid vigor: DNA methylation, small RNAs, and gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 3, p. 841, 2012.

HOLLICK, J. B. Sensing the epigenome. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, p. 398-404, 2008.

HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 45, p. 131-135, 2005.

HUGHES, D. W.; GALAU, G. A. Developmental and environmental induction of lea and leaa messenger-RNAs and the postabscission program during embryo culture. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 6, p. 605-618, June 1991.

ICHIKI, Y. et al. An environmentally acceptable method for assaying the inhibition of. ALPHA.-amylase induction. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 32, p. 120-123, 2007.

JONES, D. F. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. **Genetics**, Austin, v. 2, p. 466-479, 1917.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 100, n. 1, p. 1-6, 1992.

KOLLIPARA, K. P. et al. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation to tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 3, p. 974-992, 2002.

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

LEMOS, M. A. et al. Avaliação de dez linhagens e seus híbridos de milho superdoce em um dialelo completo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 167-170, 2002.

LENTON, J. R.; APPLEFORD, N. E. J.; CROKER, S. J. Gibberellins and α -amylase gene expression in germinating wheat grains. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.15, p. 261-270, 1994.

LEYMARIE, J. et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 1, n. 53, p. 96-106, 2012.

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

LIMA, M. D. G. S. et al. Enzyme expression in indica and japonica rice cultivars under saline stress. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 473-481, 2012.

LIU, Y. et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. **Plant and cell physiology**, Kyoto, v. 4, n. 6. p. 944-959, 2013.

MENEZES, M. et al. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 111-122, 2008.

MEYER, R. C. et al. Heterosis manifestation during early Arabidopsis seedling development is characterized by intermediate gene expression and enhanced metabolic activity in the hybrids. **Plant Journal**, Oxford, v. 71, p. 669-683, 2012.

MILLER, P. A.; BRIMHALL, B. Factors influencing the oil and protein content of corn grain. **Agronomy Journal**, Madison, v. 43, p. 305–311, 1951.

MORELLO, C. L.; MIRANDA FILHO, J. B.; GORGULHO, E. P. Partial diallel cross between exotic and adapted maize populations evaluated in acid soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 313, 2001.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2, p. 1-24.

NASCIMENTO, V. E. et al. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 784-790, 2012.

OISHI, M. Y.; BEWLEY, J. D. Distinction between the responses of developing maize kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability, α -amylase activity, and abscisic acid content. **Plant physiology**, Bethesda, v. 94, n. 2, p. 592-598, 1990.

OLIVEIRA, G. E. et al. Qualidade fisiológica e expressão das enzimas amilases em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, p. 40-48, 2013.

OLIVEIRA, G. E. et al. Relationship among physiological quality, heterosis, and amylase gene expression in maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 8623-8633, 2015.

PASCHOLD, A. et al. Molecular dissection of heterosis manifestation during early maize root development. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 120, p. 383-388, 2010.

RAJJOU, L. et al. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 507-533, 2012.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicação da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012. 565 p.

REIS, L. S. D. et al. Efeito da heterose na qualidade de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 310-315, 2011.

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

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

ROSA, S. D. V. F. et al. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, p. 91-101, 2005.

ROSA, S. D. V. F. et al. Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de milho submetidas à secagem artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 177-184, 2000.

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

SCANDALIOS, J. G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 225-258, 1974.

SHEN, H. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two Arabidopsis ecotypes and their reciprocal hybrids. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 875-892, 2012.

SHULL, G. H. What is "heterosis"? **Genetics**, Austin, v. 33, n. 5, p. 439-446, 1948.

SILVA-NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.

SILVA, N. O. et al. Genetic control of traits associated with maize seed quality. **Maydica**, Bergamo, v. 5, p. 55-62, 2008.

SODKIEWICZ, W.; SODKIEWICZ, T. Inhibition of α -amylase acting in hexaploid triticale lines by exogenous abscisic acid. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 3, p. 419-422, 2003.

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

SONG, R. et al. Gene expression of a gene family in maize based on non-collinear haplotypes. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 9055-9060, 2003.

STUBER, C. W. Heterosis in plant breeding. **Plant Breeding Reviews**, Westport, v. 12, p. 227-251, 1994.

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

THOMAS, T. L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1401, 1993.

TODAKA, D. et al. Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. **Rice**, Raleigh, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

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

WANG, G. et al. Isolation of high quality RNA from cereal seeds containing high levels of starch. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 23, n. 2, p.159-163, 2012.

WANG, W. Q. et al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 86, p. 1-15, 2015.

WHITE, C. N. et al. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 1081-1088, 2000.

WRICKE, G.; WEBER, W. E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. Berlin: W. Gruyter, 1986. 406 p.

WU, H. X.; MATHESON, A. C. Reciprocal, maternal and non-maternal effects in radiata pine diallel mating experiment on four australia sites. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, n. 3, p. 205-212, 2001.

WU, J. et al. Reactive oxygen species scavenging enzymes and down-adjustment of metabolism level in mitochondria associated with desiccation-tolerance acquisition of maize embryo. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 51, n. 7, p. 638-645, 2009.

ZHANG, L. et al. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 79, n. 3, p. 285-293, 2012.

ŽIAUKA, J.; KUUSIENĖ, S. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during in vitro culture of aspen (*Populus tremula* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, p. 221-228, 2010.

CAPÍTULO 2

Controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho

RESUMO

A utilização de sementes com alta qualidade fisiológica está diretamente relacionada à uniformidade do estande de plantas, à menor incidência de doenças transmitidas por sementes e ao maior vigor de plantas, resultando em maior produtividade no campo. Como a qualidade de sementes é influenciada pelo genótipo, esta se torna uma importante característica a ser avaliada nos programas de melhoramento. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar o controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho. Com este propósito, foi instalado um campo de produção de sementes híbridas de milho, incluindo os recíprocos, utilizando-se o sistema dialelo parcial, mais as linhagens genitoras. Foram utilizadas cinco linhagens (30, 91, 57, 43, 64). Para a análise da qualidade de sementes foram realizadas as determinações de teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, teste de frio, envelhecimento artificial e deterioração controlada. Foram estimados os efeitos de heterose, da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, bem como os efeitos recíprocos. Foi observado que há expressão da heterose e efeito recíproco na qualidade fisiológica de sementes de milho. Além disso, genes com ação gênica aditiva e de dominância estão envolvidos no controle genético da qualidade fisiológica de sementes.

Palavras-chave: Vigor. Capacidade de combinação. Efeito recíproco.

ABSTRACT

The use of high quality seeds is directly related to plant stand uniformity, lower incidence of diseases transmitted by seeds and vigorous plants, resulting in greater yield. It is known that physiological quality of maize seeds is influenced by genotype, becoming an important trait to be evaluated during the selection process in breeding programs. Thus, the aim in this study was to evaluate the genetic control of maize seed quality. For this purpose, a field was installed to obtain hybrid, reciprocal and inbred line seeds using partial diallel design. Five lines were used (30, 91, 57, 43, 64). The physiological quality of the seeds was accessed by water content, germination, first count of germination, germination speed index, cold test, accelerated aging and controlled deterioration. The heterosis effect, the general (GCA) and the specific (SCA) combining ability and the reciprocal effects were estimated. Heterosis and reciprocal effect was observed for physiological seed quality, furthermore, additive and dominant gene action were involved in genetic control of physiological quality of mayze seeds.

Key-words: Vigor. Combining ability. Reciprocal effects.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por sementes híbridas de alta qualidade fisiológica tem aumentado significativamente nos últimos anos. Como o principal objetivo dos programas de melhoramento é o aumento da produtividade, não há, na maioria das vezes, processos de seleção que incluam a característica de qualidade fisiológica de sementes. Porém, sabe-se que a utilização de sementes com alta qualidade está diretamente relacionada à uniformidade do estande de plantas, à menor incidência de doenças transmitidas por sementes e ao maior vigor de plantas, resultando em maior produtividade no campo (SILVA et al., 2008).

A qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo, pelo ambiente e pela interação entre eles (GOMES et al., 2000; MEYER et al., 2012; ROVERI JOSÉ et al., 2004), no entanto, estudos do controle genético da qualidade de sementes e das possibilidades de ganhos genéticos com a seleção ainda são escassos. Uma das formas de se estudar esta característica é usar delineamentos genéticos ou sistemas de cruzamentos, como o dialelo (WRICKE; WEBER, 1986).

Os cruzamentos dialélicos correspondem a todos os casos em que n genitores são cruzados 2 a 2. Esses estudos têm sido utilizados para obter informações sobre o controle genético de caracteres, na escolha de genitores por meio das estimativas de capacidade de combinação e na predição de compostos (RAMALHO et al., 2012).

Nas análises dialélicas, quando há as informações dos pais, também é possível estudar o efeito da heterose. Heterose é o termo utilizado para descrever um fenômeno no qual híbridos F1 são fenotipicamente superiores aos pais (SHULL, 1948).

Gomes et al. (2000) estudando o controle genético da qualidade fisiológica de sementes por meio de dialelo observaram que há o envolvimento

de genes com ação gênica aditiva e de genes de dominância e observaram efeito positivo de heterose. Também foi observado efeito recíproco para esta característica, mostrando a complexidade do controle genético para este caráter.

Para grande parte das características agronômicas, a utilização de uma linhagem como parental feminino ou como parental masculino não interfere no desempenho do híbrido, porém no caso da qualidade de sementes a escolha de determinada linhagem como parental feminino é fundamental para o sucesso do cruzamento, sendo importante o estudo deste efeito.

De acordo com Cockerham e Weir (1977), o efeito recíproco pode ser decomposto em materno (efeito recíproco geral) e não materno (efeito recíproco específico). Essa decomposição do efeito recíproco nos permite inferir se o efeito é causado pelo DNA citoplasmático, se é devido à interação entre o DNA citoplasmático e o nuclear, ou se é devido apenas ao efeito ambiental associado especificamente aos pais ou aos cruzamentos. Se confirmado que o efeito recíproco é herança materna, o caráter em questão é herdável e pode ser explorado na população. Mas se o efeito estiver relacionado ao ambiente ou à interação genótipo ambiente, aumentará o viés das análises genéticas (WU; MATHESON, 2001).

Em sementes de milho, diferenças na expressão fenotípica entre híbridos e recíprocos têm sido observadas para várias características. Oliveira et al. (2015) estudando duas linhagens contrastantes em relação à qualidade de sementes, com seu respectivo híbrido e recíproco, também observaram efeito recíproco para qualidade fisiológica de sementes.

Dessa forma, a qualidade de sementes é um fator essencial na produção agrícola e esta deve ser monitorada desde os programas de melhoramento até os processos de produção e beneficiamento de sementes. Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho, o estudo do controle genético para o caráter qualidade fisiológica de sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução do experimento

A pesquisa foi conduzida na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Essa região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Koppen. A temperatura média anual é de 19,4 °C e a pluviosidade se distribui, principalmente, de outubro a abril, com valores anuais de 1529,7 mm.

Foi instalado um campo para a produção de híbridos simples de milho, incluindo os recíprocos, utilizando-se o sistema dialelo parcial, obtendo-se todas as 12 combinações híbridas, mais as cinco linhagens genitoras, totalizando 17 materiais genéticos. Entre as linhagens utilizadas duas são classificadas de baixa qualidade fisiológica de sementes (43 e 57) e três de alta qualidade (30, 91 e 64), de acordo com seleção anterior realizada por Gomes et al. (2000) e Oliveira et al. (2013) (Tabela 1).

Tabela 1 Descrição das linhagens de milho utilizadas na pesquisa – Lavras – 2015

Linhagens	Ciclo	Grão	Porte
L30	Super Precoce	Flint / Vermelho	Médio
L43	Precoce	Meio Dente / Amarelo	Médio
L57	Precoce	Dente / Amarelo	Médio
L91	Normal	Dente / Alaranjado	Alto
L64	Super Precoce	Flint / Amarelo	Baixo

O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química do mesmo. Foi utilizado o espaçamento de 0,8 m entre linhas e 7 plantas por metro linear. A adubação de cobertura, assim como,

os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura.

Para prevenir cruzamentos indesejados, no florescimento, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando os estilo-estigmas se apresentaram receptivos foram realizados manualmente os cruzamentos e as autofecundações.

As sementes foram amostradas para determinação do teor de água e a colheita foi realizada quando estas apresentavam 25% de teor de água. As espigas foram despalhadas manualmente e em seguida submetidas à secagem artificial a 35 °C até que as sementes atingissem o teor de água de aproximadamente 13%.

2.2 Determinação da qualidade de sementes

A determinação da qualidade de sementes foi realizada por meio de testes de germinação e vigor.

2.2.1 Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105±3 °C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras para cada tratamento, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida).

2.2.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, com a semeadura em papel toalha tipo Germitest, na forma de rolo. O

papel foi umedecido com água destilada na proporção de 2,5 ml/g de papel. As sementes foram acondicionadas no germinador regulado para 25 °C e as avaliações das plântulas normais foram efetuadas no sétimo dia após a semeadura segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais das quatro repetições.

2.2.3 Primeira contagem de germinação

Efetuada em conjunto com o teste de germinação, foi realizada no quarto dia após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas que apresentaram, pelo menos, duas raízes seminais e parte aérea com dois centímetros de comprimento.

2.2.4 Velocidade de germinação

A velocidade de germinação foi determinada segundo a fórmula proposta por Edmond e Drapala (1958).

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

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

2.2.5 Teste de frio sem solo

Cinquenta sementes por repetição foram distribuídas em papel toalha tipo Germitest, umedecido com água destilada numa proporção de três vezes o seu peso seco, perfazendo um total de 200 sementes por tratamento. Os rolos foram confeccionados como no teste de germinação e após semeadura foram colocados no interior de sacos plásticos e mantidos em câmara regulada a 10 °C durante sete dias. Decorrido este prazo, os rolos foram transferidos para o germinador regulado para 25 °C e as plântulas que apresentavam pelo menos 2 cm de parte aérea, duas raízes seminais e a raiz principal aos cinco dias foram consideradas normais (DIAS; BARROS, 1995).

2.2.6 Envelhecimento acelerado

O método utilizado foi o de minicâmaras do tipo "gerbox" em que as sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas, numa temperatura de 41 °C (VIEIRA; CARVALHO, 1994), e em seguida foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente. Foram computadas as plântulas que apresentavam pelo menos dois centímetros de parte aérea, duas raízes seminais e raiz principal aos cinco dias.

2.2.7 Deterioração controlada

Elevou-se o teor de água das sementes para 25%. Para ser atingido o teor de água previamente estabelecido, adicionou às sementes a quantidade de água, calculada pela fórmula:

$$W2 = 100 - A/100 - B \times W1$$

em que: A - teor de água inicial das sementes (base no peso úmido); B – teor de água requerido; W1 – peso inicial das sementes (g); W2 – peso final das sementes (g); W2 – W1 – água a ser adicionada (WANG; HAMPTON; HILL, 1991). Em seguida, as sementes foram acondicionadas em embalagens de alumínio, as quais foram seladas a quente e mantidas por 24 horas, a 10 °C, para uniformização do teor de água das sementes. As sementes foram envelhecidas a 42 °C, por 48 horas, em câmara de germinação tipo BOD (Eletrolab®).

Após este período as sementes foram mantidas em repouso em temperatura ambiente, até atingirem um teor de água próximo a 13% para posteriormente serem submetidas ao teste de germinação como descrito anteriormente. Aos cinco dias, após a semeadura, as plântulas apresentando pelo menos dois centímetros de parte aérea, duas raízes seminais e raiz principal foram consideradas normais.

2.3 Procedimento estatístico

Nos testes de primeira contagem de germinação, porcentagem de germinação, velocidade de germinação, teste de frio, envelhecimento artificial e deterioração controlada, realizados para avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância e as médias, comparadas pelo teste agrupamento Scott Knott ao nível de 1%. As análises foram realizadas no programa estatístico R.

2.4 Heterose

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

$$h = F_1 - \frac{(L_1 + L_2)}{2}$$

em que:

F_1 – média da geração F_1 do híbrido simples;

L_1 – média da linhagem utilizada como parental masculino do híbrido simples;

L_2 – média da linhagem utilizada como parental feminino do híbrido simples.

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

Com base nos resultados da análise de variância, as somas de quadrados dos tratamentos foram decompostas em capacidade geral e específica de combinação e efeitos recíprocos, este último foi desdobrado em materno e não materno.

Adaptando o modelo proposto por Griffing (1956) para descrever as observações experimentais, tem-se a caracterização apresentada a seguir:

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

Em que:

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

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

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

μ : média geral;

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

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

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

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

E_{ij} : erro experimental médio.

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

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Qualidade fisiológica

O teor de água médio das sementes no momento da realização dos testes para a avaliação da qualidade fisiológica foi de 13 com variação máxima de 1%.

De acordo com os resultados da análise de variância, há diferenças significativas entre os genótipos para todos os testes realizados, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 2). É importante observar que o coeficiente de variação foi baixo para todos os testes realizados.

Tabela 2 Resumo da Análise de Variância para os resultados obtidos nos testes de primeira contagem de germinação (PCG), porcentagem de germinação (TG), velocidade de germinação (VG), teste de frio (TF), envelhecimento artificial (EA) e deterioração controlada (DC) de sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015

FV	GL	QM					
		PCG	TG	VG	TF	EA	DC
Genótipos	16	151,75*	75,50*	0,77*	101,65*	818,88*	955,49*
Erro	51	7,156	2,078	0,024	3,411	22,196	16,098
Total	67						
Média Geral		92,7	97,7	5,5	96,5	86,2	42,3
CV (%)		2,88	1,47	2,85	1,91	5,45	9,47

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

Nos híbridos utilizados neste trabalho, o número que aparece primeiro refere-se ao da linhagem utilizada como parental feminino e o segundo número indica o da linhagem utilizada como parental masculino.

De uma maneira geral, pelos dados de germinação e vigor foi observada superioridade dos híbridos em relação às linhagens quanto à qualidade fisiológica de sementes. Esses resultados estão de acordo com diversos trabalhos

nos quais foi observada heterose na germinação e no vigor de sementes (GOMES et al., 2000; HOECHER et al., 2006; ROOD et al., 1990; ROOD; LARSEN, 1988; ROVERI JOSÉ et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Pelos resultados do teste de primeira contagem de germinação, a qualidade das sementes das linhagens 64 e 91, classificadas anteriormente como de alta qualidade, foi superior a das demais linhagens e igual aos híbridos de desempenho superior. Já em sementes das linhagens 43 e 57, classificadas como de baixa qualidade, verificou-se os piores valores. Considerando todos os genótipos, para as sementes do híbrido 43/30 foram observados os menores valores de germinação aos quatro dias (Tabela 3).

Para o teste de primeira contagem de germinação, foi observada heterose em relação à média dos pais para todos os híbridos. Apesar de o híbrido 43/30 apresentar desempenho muito inferior à média dos pais com heterose de -10,5, quando se considera o respectivo híbrido recíproco (30/43), a estimativa da heterose foi de 12%. Efeito recíproco significativo também foi observado para as combinações 64/43 e 64/57.

Segundo Meyer et al. (2012), durante os estágios iniciais de desenvolvimento do embrião, há maior expressão gênica e maior atividade metabólica em sementes dos híbridos em relação à observada em sementes dos parentais, o que propicia maior eficiência no uso de recursos e, portanto, melhor desempenho do híbrido.

Em relação ao teste de germinação (Tabela 3), a menor porcentagem entre as linhagens foi observada em sementes da linhagem 57. Em sementes da linhagem 43 foi observada alta porcentagem de germinação, no entanto em sementes do híbrido 43/30, que possui esta linhagem como mãe, verificou-se a menor porcentagem de germinação entre todos os genótipos avaliados, sendo o único híbrido que apresentou porcentagem de germinação de sementes menor que 98.

A heterose variou entre -16% (43/30) e 4,5% (57/64). Houve efeito recíproco significativo apenas para a combinação 43/30. Reis et al. (2011) ao estudarem a manifestação da heterose na germinação de sementes de linhagens e híbridos F1 de milho doce, observaram maior porcentagem de germinação em sementes híbridas. Segundo estes autores é evidente o envolvimento de fitomônios como auxina e giberelina no melhor desempenho de sementes híbridas.

Tabela 3 Valores médios (%) de plântulas e da heterose no teste de primeira contagem de germinação (PCG) e no teste de germinação (TG) de sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015

Genótipos	PCG			Genótipos	TG		
	%		Heterose		%		Heterose
L30	89	b	-	L30	98	A	-
L43	82	c	-	L43	98	A	-
L57	81	c	-	L57	93	C	-
L91	94	a	-	L91	99	A	-
L64	94	a	-	L64	96	B	-
H1 (43/30)	75	d	-10.5	H1 (43/30)	82	D	-16
H2 (30/43)	98	a	12.5	H2 (30/43)	100	A	2
H3 (30/57)	95	a	10	H3 (30/57)	99	A	3.5
H4 (57/30)	93	a	8	H4 (57/30)	98	A	2.5
H5 (43/91)	97	a	9	H5 (43/91)	99	A	0.5
H6 (91/43)	96	a	8	H6 (91/43)	100	A	1.5
H7 (57/91)	97	a	9.5	H7 (57/91)	99	A	3
H8 (91/57)	95	a	7.5	H8 (91/57)	100	A	4
H9 (43/64)	90	b	2	H9 (43/64)	99	A	2
H10 (64/43)	97	a	9	H10 (64/43)	99	A	2
H11 (57/64)	90	b	2.5	H11 (57/64)	99	a	4.5
H12 (64/57)	97	a	9.5	H12 (64/57)	98	A	3.5

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

No teste de velocidade de germinação (VG), é fornecido o número médio de dias para a germinação. Foi observada, entre as linhagens, germinação mais rápida de sementes da linhagem 91 (Tabela 4). Em sementes da linhagem 30, classificada anteriormente como de alta qualidade, foi observada germinação mais lenta. Apesar da lenta germinação das sementes da linhagem 30, em sementes do híbrido 30/57, que possui esta linhagem como mãe, foi verificada a germinação mais rápida entre os materiais testados, assim como em sementes do híbrido 64/57. Foi observado também em todos os híbridos que possuem a linhagem 43 como parental feminino germinação lenta das sementes.

Para o teste de velocidade de germinação os valores de heterose negativos são desejáveis, uma vez que o objetivo é diminuir o tempo de germinação dos genótipos. Dessa forma, foi observada heterose variando de -0,9% para o híbrido 30/57 a 0,46% para o híbrido 43/91, resultados coerentes com os observados no teste de primeira contagem de germinação. Houve efeito recíproco para todas as combinações com exceção da combinação 57/91. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Gomes et al. (2000), os quais observaram heterose de até 21,18% para o vigor de sementes, avaliado por este teste. Estes autores concluíram que a heterose na velocidade de germinação está relacionada à maior eficiência do sistema enzimático, possibilitando a rápida ativação da função metabólica do embrião.

Altos valores de heterose, avaliada pelo teste de VG, também foram observados por Silva et al. (2008) em sementes híbridas de milho. Para estes autores, uma rápida germinação é importante, pois quanto menor o tempo que a semente fica no solo menor será a exposição ao ataque de pragas e microrganismos, além de estresses abióticos. Dessa forma, a velocidade de germinação é uma condição determinante do bom estabelecimento da cultura no campo.

No teste de frio, a linhagem 91 apresentou o melhor desempenho entre as linhagens e similar aos híbridos de alto desempenho (Tabela 4). O pior valor, entre as linhagens, foi observado para a linhagem 64, antes classificada como sendo de alta qualidade. Silva-Neta et al. (2015), ao estudarem o comportamento desta mesma linhagem, a classificaram como tolerante a baixas temperaturas durante a germinação. Porém, segundo Oliveira et al. (2013), apesar da classificação de alta qualidade, a linhagem 64 apresenta baixo desempenho em condições desfavoráveis. Apesar da baixa qualidade no teste de frio em sementes da linhagem 64, em sementes do híbrido 64/57, que possui esta linhagem como mãe, observou-se alto vigor. O pior valor entre todos os genótipos foi observado em sementes do híbrido 43/30, com valor de heterose de -18,5%. O contrário foi observado para o seu híbrido recíproco que apresentou alto vigor e heterose de 2,5%, mostrando a significância do efeito recíproco que foi observado para todas as combinações, com exceção da combinação 43/91.

Tabela 4 Valores médios (%) de plântulas e da heterose no teste de velocidade de germinação (VG) e no teste de frio (TF) de sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015

Genótipos	VG			Genótipos	TF		
	Média		Heterose		%		Heterose
L30	5,9	e	-	L30	96	B	-
L43	5,98	e	-	L43	97	B	-
L57	5,3	c	-	L57	97	B	-
L91	5,1	b	-	L91	99	A	-
L64	5,8	d	-	L64	93	C	-
H1 (43/30)	6,1	e	0.16	H1 (43/30)	78	D	-18.5
H2 (30/43)	5,7	d	-0.24	H2 (30/43)	99	A	2.5
H3 (30/57)	4,7	a	-0.9	H3 (30/57)	97	B	0.5
H4 (57/30)	5,3	c	-0.3	H4 (57/30)	98	A	1.5
H5 (43/91)	6	e	0.46	H5 (43/91)	99	A	1
H6 (91/43)	5,7	d	0.16	H6 (91/43)	98	A	0
H7 (57/91)	5,2	b	0	H7 (57/91)	97	B	-1
H8 (91/57)	5,1	b	-0.1	H8 (91/57)	100	A	2
H9 (43/64)	6	e	0.11	H9 (43/64)	99	A	4
H10 (64/43)	5,3	c	-0.59	H10 (64/43)	96	B	1
H11 (57/64)	5,5	c	-0.05	H11 (57/64)	97	B	2
H12 (64/57)	4,8	a	-0.75	H12 (64/57)	99	A	4

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

Kollipara et al. (2002), cruzaram linhagens contrastantes para tolerância a baixas temperaturas durante a germinação e observaram altos valores de heterose nos híbridos gerados. Os autores também observaram, por meio do teste frio, efeito recíproco entre os híbridos, sendo que o híbrido com maior valor de germinação foi aquele que tinha como parental feminino a linhagem de maior qualidade neste teste, mostrando a importância da escolha do genitor feminino para a obtenção de sementes com tolerância à baixa temperatura na germinação.

Para o teste de envelhecimento artificial, entre as linhagens, a pior qualidade foi observada em sementes da linhagem 57 e a melhor qualidade em

sementes da linhagem 30 (Tabela 5). Entre os híbridos, a pior qualidade foi observada para o híbrido 43/30 e a melhor qualidade foi observada para os híbridos 30/43, 91/57 e 64/57.

Observa-se, no teste de envelhecimento artificial, altos valores de heterose, variando entre -10,5 para o híbrido 43/30 e 38 para o híbrido 64/57. Efeito recíproco significativo foi observado na maioria das combinações, com exceção de 43/91 e 43/64. Roveri José et al. (2004), ao estudarem um dialelo parcial formado por seis linhagens de alta tolerância à dessecação e seis linhagens de baixa tolerância também observaram altos valores de heterose e efeito recíproco, quando as sementes foram avaliadas pelo teste de envelhecimento artificial.

Em relação ao teste de deterioração controlada, entre as linhagens, a melhor qualidade foi observada em sementes da linhagem 30 e as piores qualidades foram observadas em sementes das linhagens 43 e 64 (Tabela 5). Apesar da baixa qualidade apresentada por estas linhagens, as sementes dos híbridos formados por elas (43/64 e 64/43) apresentaram qualidade superior, mostrando o alto efeito de heterose sob condições de alta temperatura, que foi de 36,5 e 41,5, respectivamente.

No teste de deterioração controlada foi observada heterose positiva para todos os híbridos. Efeito recíproco significativo foi observado para quase todas as combinações, com exceção da combinação 57/91.

Tabela 5 Valores médios (%) de plântulas e da heterose no teste de envelhecimento artificial (EA) e no teste de deterioração controlada (DC) em sementes de linhagens e híbridos de milho – Lavras – 2015

Genótipos	EA			Genótipos	DC		
	%		Heterose		%		Heterose
L30	90	b	-	L30	36	c	-
L43	81	d	-	L43	18	f	-
L57	36	e	-	L57	23	e	-
L91	86	c	-	L91	30	d	-
L64	86	c	-	L64	15	f	-
H1 (43/30)	75	d	-10.5	H1 (43/30)	29	d	2
H2 (30/43)	98	a	12.5	H2 (30/43)	59	a	32
H3 (30/57)	88	c	25	H3 (30/57)	51	b	21.5
H4 (57/30)	92	b	29	H4 (57/30)	55	a	25.5
H5 (43/91)	86	c	2.5	H5 (43/91)	31	d	7
H6 (91/43)	86	c	2.5	H6 (91/43)	54	b	30
H7 (57/91)	91	b	30	H7 (57/91)	57	a	30.5
H8 (91/57)	96	a	35	H8 (91/57)	59	a	32.5
H9 (43/64)	93	b	9.5	H9 (43/64)	53	b	36.5
H10 (64/43)	90	b	6.5	H10 (64/43)	58	a	41.5
H11 (57/64)	90	b	29	H11 (57/64)	47	b	28
H12 (64/57)	99	a	38	H12 (64/57)	37	c	18

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

Vale ressaltar que os testes de envelhecimento artificial e de deterioração controlada estimam o potencial de armazenamento das sementes. Dessa forma, sementes híbridas, devido ao seu sistema enzimático mais robusto, teriam maior capacidade de manter a qualidade, durante o armazenamento (GOMES et al., 2000).

Vigor híbrido também tem sido observado para características expressas logo após a emergência como comprimento de raiz principal e densidade de raízes seminais (HOECKER et al., 2006).

Efeito recíproco foi observado em todos os testes de germinação e vigor realizados nesta pesquisa. Esses resultados reforçam a importância da escolha dos parentais masculino e feminino no momento da instalação de campos de produção de sementes, visando à obtenção de sementes com alta qualidade (GOMES et al., 2000). Assim, o estudo da capacidade de combinação das linhagens para qualidade de sementes, bem como a natureza do efeito recíproco, é importante para auxiliar os melhoristas durante os processos de seleção.

3.2 Análise da capacidade de combinação

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

Pelos resultados da análise de variância verificou-se efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade para os dados obtidos para todos os testes utilizados para avaliar a qualidade fisiológica (Tabela 6).

Tabela 6 Quadrados médios das capacidades geral (CGC) e específica de combinação (CEC) e dos efeitos recíprocos (ER), maternos (EM) e não maternos (NM), para os testes de primeira contagem de germinação (PCG), porcentagem de germinação (TG), velocidade de germinação (VG), teste frio (TF), envelhecimento artificial (EA) e deterioração controlada (DC) – Lavras – 2015

FV	GL	QM					
		PCG	TG	VG	TF	EA	DC
CGC	4	106,463*	64,826*	1,7317*	48,639*	99,318*	943,412*
CEC	6	129,460*	67,527*	0,3645*	71,166*	71,517*	1395,313*
ER	6	204,249*	160,333*	0,5391*	142,916*	114,583*	506,667*
EM	4	236,333*	125,625*	0,6544*	118,375*	85,500*	444,875*
NM	2	140,083*	229,750*	0,3084*	192,000*	172,750*	630,250*
Erro	51	7,156	2,078	0,0247	2,745	4,137	13,764

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

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

A significância dos quadrados médios dos ER indica a existência de diferenças significativas entre os híbridos e seus respectivos recíprocos. O efeito significativo dos desdobramentos dos ER nos permite estudar a natureza do efeito recíproco. Neste caso, como os dois fatores são significativos, os ER são de natureza materna (EM), causada pelo DNA citoplasmático e suas interações entre o DNA citoplasmático e o nuclear, e não materna (NM) relacionadas aos efeitos ambientais e suas interações com o genótipo (WU; MATHESON, 2001).

Pelos resultados dos quadrados médios dos efeitos de CGC e CEC foram observadas magnitudes semelhantes para o teste de germinação. Para os testes de primeira contagem de germinação, teste de frio e deterioração controlada os componentes quadráticos associados à CEC foram maiores do que aqueles associados à CGC, evidenciando a maior importância dos efeitos não aditivos em relação aos demais. Já para os testes de velocidade de germinação e envelhecimento artificial foram observadas magnitudes maiores para os componentes quadráticos da CGC em relação à CEC. Em muitos trabalhos, quando a CGC apresenta magnitude superior a CEC indica-se o predomínio dos efeitos aditivos no controle do caráter, mas de acordo com Ramalho et al. (2012) essa afirmação só é válida se a frequência alélica média dos genitores for 0,5, pois os locos em heterozigose não contribuem com a estimativa da CGC. Contudo, quando há dominância e a frequência média dos genitores é diferente

de 0,5, o que deve ser a maioria dos casos, não é correto inferir que a estimativa de CGC maior que a de CEC indica predomínio de efeitos aditivos.

Gomes et al. (2000) estudando a capacidade de combinação de linhagens de milho para qualidade fisiológica de sementes, concluíram que a magnitude dos componentes quadráticos evidencia a maior importância da CEC em relação a CGC, ou seja, dos efeitos não aditivos no controle do caráter. Por outro lado, Silva et al. (2008) ao estudarem o controle genético de características associadas à qualidade de sementes de milho em populações de meios irmãos intra e interpopulacionais, observaram que a variância dos desvios aditivos intra e interpopulacionais ($2\sigma_{r12}$ ou $2\sigma_{r21}$) foram maiores, evidenciando menor importância da dominância no controle do caráter.

Na presente pesquisa, nos componentes quadráticos do ER observou-se alta magnitude, similar aos componentes da CEC. Este fato mostra a importância do efeito recíproco para a qualidade de sementes. Esses resultados estão de acordo com Silva et al. (2008) que observaram efeito recíproco nos caracteres associados à qualidade de sementes.

Por meio do desdobramento do ER foram observadas maiores magnitudes dos componentes quadráticos maternos para os testes de primeira contagem de germinação e índice de velocidade de germinação e maiores magnitudes dos componentes quadráticos não maternos para porcentagem de germinação, teste frio, envelhecimento acelerado e deterioração controlada, o que demonstra a complexidade do controle do caráter qualidade fisiológica de sementes.

Roveri José et al. (2004) estudando o controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho, observaram que há predominância do efeito recíproco para a tolerância à alta temperatura de secagem e relacionaram este fato ao efeito materno. No entanto, estes autores

não desdobraram o efeito recíproco e como pode ser observado neste trabalho o efeito não materno tem grande participação no efeito recíproco.

3.2.1 Estimativas dos efeitos de capacidade geral (CGC) e específico (CEC) de combinação, efeito recíproco (ER), materno (EM) e não materno (NM).

Houve variação das estimativas dos efeitos da CGC (G_i) entre as linhagens e os testes empregados, o que pode ter ocorrido devido à diferença entre as metodologias dos testes, fazendo com que cada genótipo se comportasse de maneira diferente sob as condições específicas de cada teste (Tabela 7).

Para os testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio, envelhecimento acelerado e deterioração controlada foram observadas maiores estimativas positivas para a linhagem 91 (Tabela 7). Entre as estimativas negativas, maiores valores foram observados para a linhagem 57 no teste de primeira contagem de germinação, para a linhagem 30 no teste de germinação e teste de frio e para a linhagem 43 nos testes de deterioração controlada e envelhecimento artificial. O baixo valor de G_i indica que a média dos híbridos em que a linhagem i participa não difere da média geral do dialelo. Os altos valores de G_i , positivo ou negativo, indicam que o genitor foi pior ou melhor que os demais genitores incluídos no dialelo, em relação à média dos seus híbridos para o referido teste (CRUZ; VENCOVSKY, 1989). Neste caso, a linhagem 91 foi a que mais contribuiu para aumentar a porcentagem de germinação dos híbridos.

Pelo teste de velocidade de germinação, utilizado nesta pesquisa, quanto menor o valor de VG mais vigorosa é a semente. Dessa forma, a interpretação da estimativa de G_i é oposta, uma vez que o objetivo é reduzir o número de dias para a germinação, o que é importante para o estabelecimento da população de plantas. Assim, observa-se maior G_i negativo para a linhagem 57 e positivo para

a linhagem 43. Ou seja, a linhagem 57 apresenta maior concentração de alelos favoráveis para reduzir a expressão do caráter, dias para a germinação.

Tabela 7 Estimativas dos efeitos de capacidade geral de combinação (G), capacidade específica de combinação (S), efeito recíproco (R), materno (M) e não materno (N) para os testes de primeira contagem de germinação (PCG), porcentagem de germinação (TG), velocidade de germinação (VG), teste frio (TF), envelhecimento artificial (EA) e deterioração controlada (DC) – Lavras – 2015

Parâmetro	PCG	TG	VG	TF	EA	DC
G1 ₃₀	-1,486	-2,017	0,081	-1,559	0,108	3,868
G2 ₄₃	-0,518	-0,573	0,272	-0,809	-2,481	-6,041
G3 ₅₇	-1,668	1,127	-0,289	0,941	-1,231	2,259
G4 ₉₁	2,826	1,483	-0,105	1,316	2,796	6,056
G5 ₆₄	1,576	-0,205	0,046	0,066	2,046	-4,882
S21	-4,039	-5,248	0,042	-5,500	-3,304	-3,180
S13	4,861	1,802	-0,279	2,000	2,696	3,270
S24	1,648	1,252	0,148	1,125	1,759	1,382
S25	0,148	1,939	-0,118	1,875	1,259	21,070
S34	2,298	-0,698	0,034	-0,375	1,009	2,582
S35	1,298	0,739	-0,121	0,375	2,009	4,020
R12	11,500	9,000	-0,200	10,000	9,000	15,500
R31	-1,000	-0,500	0,300	0,500	2,000	-0,500
R42	-0,500	0,500	-0,150	0,000	0,500	-9,500
R52	3,500	0,000	-0,350	-1,000	-1,000	1,000
R43	-1,000	0,500	-0,050	1,000	0,000	0,000
R53	3,500	-0,500	-0,350	0,500	0,500	-7,500
M1	4,559	4,154	0,116	3,971	2,941	8,037
M2	-3,275	-2,221	0,175	-2,279	-2,309	-2,338
M3	0,142	0,279	-0,046	0,471	0,941	2,162
M4	-2,316	-0,346	-0,006	-0,529	-0,184	-4,588
M5	1,934	-1,221	-0,281	-1,029	-0,934	-3,213
N12	3,417	4,375	-0,156	4,000	3,750	5,125
N31	-3,417	-4,375	0,156	-4,000	-3,750	-5,125
N42	1,708	2,125	-0,048	2,000	1,375	7,000
N43	1,708	2,250	-0,109	-2,000	2,375	-1,875
N52	-1,708	-2,125	0,048	2,000	-1,375	-7,000
N53	-1,708	-2,250	0,109	-2,000	-2,375	1,875

De uma forma geral, na linhagem 91 foi observada maior concentração de alelos favoráveis e esta pode ser utilizada como genitor, em programas de melhoramento, para formar populações com alta qualidade de sementes. Esses resultados estão de acordo com os observados por vários autores os quais observaram que as sementes da linhagem 91 possuem alta tolerância à seca (ABREU et al., 2014), alta tolerância à sementeira em baixas temperaturas (SILVA-NETA et al., 2015) e alta qualidade fisiológica (ANDRADE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013). Já a linhagem 43 apresenta menor concentração de alelos favoráveis, classificada como a pior linhagem para qualidade fisiológica de sementes. Isso pode ser observado nos resultados dos testes velocidade de germinação, envelhecimento artificial e deterioração controlada. Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Andrade et al. (2013) e Oliveira et al. (2013), os quais classificaram a linhagem 43 como de baixa qualidade de sementes.

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

De uma forma geral, o híbrido 30X57 foi o que apresentou maiores estimativas de S_{ij} , em todos os testes avaliados. O mesmo aconteceu nos testes fisiológicos, nos quais este híbrido apresentou desempenho superior aos demais e altos valores de heterose.

No teste de deterioração controlada são observadas estimativas do efeito da CEC com altas magnitudes. É importante ressaltar o valor de S_{ij} do híbrido 43X64 que foi de 21,07. Para este híbrido a heterose foi de 36,5, para o mesmo

teste, mostrando a contribuição dos genes de dominância no controle deste caráter.

O efeito recíproco R_{ij} refere-se à diferença entre o híbrido H_{ij} , no qual i é o parental feminino e j o parental masculino, e o híbrido H_{ji} , em que j é o parental feminino e i o parental masculino. Quando são comparados o híbrido 43X30 e seu recíproco 30X43, observa-se um alto valor na estimativa de R_{ij} para todos os testes. O mesmo pode ser observado para os testes fisiológicos, nos quais o híbrido 43X30 apresentou menor desempenho em relação ao seu recíproco.

De acordo com Cockerham e Weir (1977) o efeito recíproco pode ser desdobrado em efeito materno e não materno. Esse desdobramento do R permite inferir a respeito das causas genéticas do efeito recíproco. O efeito materno é causado por genes citoplasmáticos ou pela interação entre o DNA citoplasmático e o nuclear, portanto o caráter é herdável e pode ser explorado em programas de melhoramento (WU; MATHESON, 2001).

De maneira geral, as estimativas dos efeitos não maternos foram similares às dos efeitos maternos. O mesmo foi observado nos componentes quadráticos (Tabela 6), nos quais os quadrados médios maternos e não maternos foram de alta magnitude e variaram para cada teste. Observa-se que para a linhagem 43 todas as estimativas do efeito materno (M_2) são contrárias ao sentido da seleção, confirmando os resultados anteriores nos quais os híbridos que possuem esta linhagem como mãe apresentaram baixa qualidade. Com estes resultados infere-se que a linhagem 43, identificada como de baixa qualidade anteriormente (ANDRADE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013), não deve participar nos cruzamentos como parental feminino.

O desdobramento do efeito recíproco é de fundamental importância para o entendimento do controle genético da qualidade fisiológica de sementes, permitindo ao melhorista tomar decisões mais assertivas em relação a este

caráter. Nesta pesquisa foi possível observar que o efeito recíproco para a qualidade fisiológica de sementes de milho não é devido apenas a causas maternas, havendo grande influência do efeito ambiental. Assim, devido à complexidade do caráter, é necessário melhorar as condições experimentais para aumentar os ganhos genéticos.

4 CONCLUSÕES

Há expressão da heterose para a característica de qualidade fisiológica em sementes de milho.

No controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho estão envolvidos genes de efeito aditivo e não aditivo.

Há efeito recíproco para qualidade fisiológica de sementes, o que permite a escolha dos genitores femininos ideais para os cruzamentos.

REFERÊNCIAS

ABREU, V. M. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.

ANDRADE, T. et al. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. **Genetics and molecular research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3630-3642, 2013.

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

COCKERHAM, C. C.; WEIR, B. S. Quadratic analyses of reciprocal crosses. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 187-203, 1977.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2012. 480 p.

CRUZ, C. D.; VENCOVSKY, R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 425 - 438, 1989.

DIAS, M. C. L.; BARROS, A. S. R. **Avaliação da qualidade sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 41 p. (Circular, 88).

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

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

GRIFFING, B. A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. **Heredity**, London, v. 10, p. 31-50, 1956.

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

KOLLIPARA, K. P. et al. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation to tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 3, p. 974-992, 2002.

MEYER, R. C. et al. Heterosis manifestation during early Arabidopsis seedling development is characterized by intermediate gene expression and enhanced metabolic activity in the hybrids. **Plant Journal**, Oxford, v. 71, p. 669-683, 2012.

OLIVEIRA, G. E. et al. Qualidade fisiológica e expressão das enzimas amilases em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, p. 40-48, 2013.

OLIVEIRA, G. E. et al. Relationship among physiological quality, heterosis, and amylase gene expression in maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 8623-8633, 2015.

RAMALHO, M. A. P et al. **Aplicação da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

REIS, L. S. D. et al. Efeito da heterose na qualidade de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 310-315, 2011.

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

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

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

SILVA-NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.

SILVA, N. O. et al. Genetic control of traits associated with maize seed quality. *Maydica*, Bergamo, v. 5, p. 55-62, 2008.

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

WANG, Y. R.; HAMPTON, J. G.; HILL, M. J. Red clover vigour testing - Effect of three test variables. *Seed Science and Technology*, Zürich, v. 22, n. 1 p. 99-105, 1991.

WRICKE, G.; WEBER, W. E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. Berlin: Walter de Gruyter, 1986. 406 p.

WU, H. X.; MATHESON A. C. Reciprocal, maternal and non-maternal effects in radiata pine diallel mating experiment on four australia sites. *Forest Genetics*, Zvolen, v. 8, n. 3, p. 205-212, 2001.

CAPÍTULO 3

Expressão de genes associados à qualidade fisiológica durante a germinação de sementes de milho

RESUMO

O uso de sementes de boa qualidade é importante para o sucesso do estabelecimento dos cultivos e na obtenção de elevados rendimentos. A qualidade fisiológica e a heterose para esta característica parecem estar associadas à expressão de enzimas α -amilases. No entanto, mais recentemente, há evidências de que a expressão de outras proteínas sejam também importantes para esta característica em sementes de milho. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica, o efeito de heterose e a expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho. Com este propósito, foi instalado um campo de produção de sementes híbridas de milho, incluindo os recíprocos, utilizando-se o sistema dialelo parcial, mais as linhagens genitoras. Foram utilizadas cinco linhagens (30, 91, 57, 43, 64). As sementes foram embebidas em água e em solução de ABA 1,0 mM por 72 horas. Para a análise da qualidade de sementes foram realizados os testes de primeira contagem de germinação e porcentagem de germinação. Foi realizada, também, a análise proteômica de proteínas LEA e das enzimas α -amilase, MDH, ADH e PGI em sementes tratadas com ABA. Na análise de transcritos foi estudada a expressão dos genes LEA, LEA D-34, α -amilase B73, α -amilase LOC 5425 e SOD. Foi observado que o ABA reduz a atividade da α -amilase e a qualidade fisiológica de sementes de milho. A expressão de LEA proteínas está relacionada à qualidade fisiológica de sementes de milho. Há heterose e efeito recíproco na expressão de enzimas e proteínas associadas à qualidade fisiológica de sementes.

Palavras-chave: Heterose. Enzimas. LEA proteínas.

ABSTRACT

The use of good quality seeds is important for the successful establishment of crops and to obtain high yields. The physiological quality and heterosis for this trait seem to be associated with the expression of α -amylase enzymes. However, more recently, there are some evidences that expression of other proteins is also important for this trait in maize seeds. Thus, the aim in this study was to evaluate the physiological seed quality, heterosis and expression of genes associated with maize seed quality. For this purpose, a field was installed to obtain hybrid, reciprocal and inbred line seeds using partial diallel design. Five lines were used (30, 91, 57, 43, 64). The physiological quality of the seeds were accessed by germination and first count of germination. Proteomic analysis was performed for LEA proteins, α -amylase, MDH, ADH and PGI of seeds treated with ABA. Transcriptomic analysis was performed for the genes LEA, LEA D-34, α -amylase B73, α -amylase LOC 5425 and SOD. It was observed that ABA reduces the activity of α -amylase and physiological seed quality of maize seeds. Expression of LEA proteins is related to physiological seed quality. There are heterosis and reciprocal effect in the expression of enzymes and proteins associated with physiological seed quality.

Key-words: Heterosis. Enzymes. LEA protein.

1 INTRODUÇÃO

O uso de sementes de boa qualidade é importante para o estabelecimento de cultivos e na obtenção de elevados rendimentos. A qualidade de sementes envolve as propriedades que determinam o potencial para a germinação rápida e uniforme e o desenvolvimento de plântulas normais em uma ampla faixa de condições de campo (WANG et al., 2015).

Em muitos trabalhos tem sido observada heterose para a característica de qualidade fisiológica de sementes, sendo a maior eficiência do sistema enzimático apontada como uma das principais causas da ocorrência de heterose em sementes (GOMES et al., 2000). Até o momento, os genes que codificam as enzimas α -amilases são descritos como os de maior influência sobre a qualidade fisiológica de sementes de milho. No entanto, em pesquisas mais recentes tem sido observado que outros genes como os relacionados à tolerância à dessecação e enzimas *scavengers* podem estar associados a esta característica.

Oliveira et al. (2013) observaram que a maior expressão de α -amilases não ocorreu, necessariamente, em sementes de linhagem de milho de melhor qualidade, havendo vários outros genes envolvidos no controle do caráter qualidade fisiológica de sementes.

Alguns autores têm observado que o aumento da expressão de LEA (*late embryogenesis abundant*) proteínas coincide com o aumento da qualidade fisiológica de sementes de milho (AMARA et al., 2013; ANDRADE et al., 2013; SILVA-NETA et al., 2015). Apesar da conhecida importância das LEA proteínas na superação de condições de estresse, estudos que relacionem estas proteínas com a qualidade fisiológica de sementes ainda são escassos.

Liu et al. (2013), também observaram que LEA proteínas podem se ligar a metais livres reduzindo o estresse oxidativo. Segundo estes autores, a manutenção da taxa de germinação de sementes de diversas culturas em

situações de estresse é maior em genótipos que produzem LEA proteínas quando comparado aos mutantes que não produziam certos grupos dessas proteínas.

Diversos fatores e condições afetam a expressão de LEA proteínas durante a maturação e secagem de sementes, dentre eles a presença de ABA, já que alguns grupos de LEA têm expressão induzida por este fitormônio (HONG-BO; ZONG-SUO; MING-AN, 2005). Porém, acredita-se que a aplicação exógena de ABA durante a germinação não induza a expressão de LEA proteínas já que não há evidências de que ocorra síntese “de novo” dessas proteínas (AMARA et al., 2012).

Para a avaliação de outros genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho é necessário bloquear a atividade da α -amilase, pois a alta expressão desta enzima pode mascarar a expressão de outras proteínas. A germinação se inicia quando o ácido giberélico (GA3) é sintetizado no embrião e transportado para a camada de aleurona induzindo a biossíntese de α -amilase. Esse processo é especificamente inibido pela produção do hormônio ABA, que impede a síntese de mRNA de amilase (ICHIKI et al., 2007).

Outra opção é inibir a síntese de GA para, conseqüentemente, inibir a indução da síntese de α -amilases. Ziauka e Kuusien (2010), ao estudarem diferentes inibidores da síntese de GA concluíram que o paclobutrazol (PBZ) é um inibidor que atua nas primeiras etapas da biossíntese de GA.

O estudo da expressão de diferentes genes envolvidos na qualidade fisiológica de sementes é fundamental para conhecer os processos envolvidos nesta característica, visando à produção de sementes com alta qualidade. Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho, avaliar a qualidade fisiológica, o efeito da heterose e a expressão e proteínas relacionadas à qualidade fisiológica em sementes de linhagens e híbridos de milho por meio das técnicas de *PCR* em tempo real, eletroforese e espectrofotometria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada na área experimental do Departamento de Agricultura e no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Essa região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Köppen. A temperatura média anual é de 19,4 °C e a pluviosidade se distribuem, principalmente de outubro a abril, com valores anuais de 1529,7 mm.

2.1 Ensaio 1: Inibição da α -amilase durante a germinação de sementes de milho

Em uma primeira etapa da pesquisa foi avaliado o melhor produto e a dosagem para inibição da α -amilase durante a germinação de sementes de milho. Para isso, foram utilizadas as sementes das linhagens 1 e 2 e do híbrido composto por essas linhagens. Além disso, para que a avaliação da inibição fosse realizada quando a expressão da α -amilase é máxima, sementes da linhagem 30 foram submetidas a diferentes tempos de embebição com o produto e dose escolhidos e foi avaliada a expressão α -amilase e de proteínas LEA, por meio da técnica de eletroforese.

2.1.1 Avaliação do produto e da dosagem para inibição da expressão de α -amilase

Duas repetições com 180 sementes cada foram colocadas em placas de petri de 15 cm sobre duas folhas de papel filtro umedecido com 20 ml de solução de paclobutrazol (PBZ), nas concentrações de 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mM e

ácido abscísico (ABA), nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0mM, além da testemunha sem o inibidor e mantidas a temperatura de 25 °C por três dias. Após esse período, foi instalado o teste de germinação e parte das sementes foi utilizada para a avaliação da expressão da enzima α -amilase por meio da técnica de eletroforese.

A germinação foi conduzida com quatro repetições de 50 sementes, com a semeadura entre rolo de papel toalha tipo Germitest umedecido com as soluções anteriormente descritas na proporção de 2,5 mL/g de papel. Os rolos de papel Germitest com as sementes foram colocados em sacos plásticos semiabertos, para evitar a evaporação do produto e mantidas em BOD regulada para 25 °C. A avaliação das plântulas foi realizada em contagem única aos seis dias. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas das quatro repetições. Também foi avaliado o comprimento de raiz e parte aérea das plântulas.

Para avaliação da inibição da α -amilase utilizando o PBZ foi utilizado o esquema fatorial 3X5, sendo três genótipos e cinco concentrações do produto. Já para a avaliação da inibição da α -amilase utilizando o ABA, foi utilizado o esquema fatorial 3X4, sendo três genótipos e quatro concentrações do produto. Em ambos os casos foram utilizadas quatro repetições e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott.

Para a análise da expressão da enzima α -amilase, endospermas das sementes embebidas nas diferentes soluções foram triturados na presença de PVP e nitrogênio líquido. Foi acrescentada solução tampão (Tris HCl 0,2 M pH 8,0 + 0,1% de β mercaptoetanol), na proporção de 250 μ L por 100 mg de amostra e homogeneizado em vórtex, mantido *overnight* em geladeira, seguido de centrifugação a 16.000 xg, por 30 minutos a 4 °C. A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador) acrescentado 0,5% de amido. O sistema gel/eletrodo utilizado

foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 μ L do sobrenadante da amostra e a corrida efetuada a 120 V, por 6 horas. A revelação foi realizada conforme Alfenas et al. (2006).

2.1.2 Avaliação da expressão de enzimas α -amilase e proteínas LEA em sementes submetidas a diferentes tempos de embebição com ABA

Sementes da linhagem 30 foram embebidas em água e em solução de ABA na concentração de 1,0mM pelos períodos de 5, 12, 24, 48 e 72 horas. As sementes foram armazenadas a -80 °C até o momento das avaliações por meio da técnica de eletroforese.

Para a análise da expressão da enzima α -amilase, os endospermas das sementes embebidas com água e com a solução de ABA nos diferentes tempos foram triturados na presença de PVP e nitrogênio líquido. A extração da enzima, a corrida eletroforética e a revelação foram feitas conforme descrito anteriormente no tópico 2.1.1.

Para a análise da expressão de proteínas LEA, os embriões das sementes embebidas com água e com solução de ABA nos diferentes tempos foram triturados na presença de PVP e nitrogênio líquido. Foi acrescentada solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e transferidos para microtubos de capacidade de 1500 μ L. Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 xg 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 μ L de extrato + 40 μ L de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH

7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (BLACKMAN et al., 1991). Foram aplicados 50µL do extrato com proteínas LEA + 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 150 v e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS et al., 2006).

2.2 Ensaio 2: Expressão de genes associados à qualidade fisiológica durante a germinação de sementes de milho embebidas com ABA

Foi instalado um campo para a produção de híbridos simples de milho, incluindo os recíprocos, utilizando-se o sistema dialelo parcial, obtendo-se todas as 12 combinações híbridas, mais as cinco linhagens genitoras, totalizando 17 materiais genéticos. Entre as linhagens utilizadas duas são classificadas de baixa qualidade fisiológica de sementes (43 e 57) e três de alta qualidade (30, 91 e 64), de acordo com seleção anterior realizada por Gomes et al. (2000) e Oliveira et al. (2013) (Tabela 8).

Tabela 8 Descrição das linhagens de milho utilizadas na pesquisa – Lavras – 2015

Linhasgens	Ciclo	Grão	Porte
L30	Super Precoce	Flint / Vermelho	Médio
L43	Precoce	Meio Dente / Amarelo	Médio
L57	Precoce	Dente / Amarelo	Médio
L91	Normal	Dente / Alaranjado	Alto
L64	Super Precoce	Flint / Amarelo	Baixo

O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química do mesmo. Foi utilizado o espaçamento de 0,8 m e

7 plantas por metro linear. A adubação de cobertura, assim como, os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura.

Para prevenir cruzamentos indesejados, no florescimento, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando os estilo-estigmas se apresentaram receptivos foram realizados manualmente os cruzamentos e as autofecundações.

As sementes foram amostradas para determinação do teor de água e a colheita foi realizada quando estas apresentavam 25% de teor de água. As espigas foram despalhadas manualmente e em seguida submetidas à secagem artificial a 35 °C até que as sementes atingissem o teor de água de aproximadamente 13%.

2.2.1 Determinação da qualidade fisiológica de sementes de milho embebidas com ABA

A avaliação da qualidade das sementes embebidas com a solução de ABA foi realizada por meio de teste de germinação e primeira contagem de germinação nos quais foram computadas protrusão radicular e porcentagem de plântulas. Os testes foram conduzidos com quatro repetições de 50 sementes, com a semeadura entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada e com solução de 1,0mM de ABA na proporção de 2,5 ml/g de papel. Os rolos de papel Germitest com as sementes foram colocados em sacos plásticos semiabertos, para evitar a evaporação do produto e mantidas em BOD regulada para 25 °C. Os resultados foram expressos em porcentagem média de protrusão radicular e plântulas normais.

Para a análise estatística foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 X 17 (com ou sem ABA e dezessete genótipos). Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da

análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de agrupamento Scott Knott ao nível de 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico R.

2.2.2 Expressão de genes associados à qualidade fisiológica por meio da técnica de eletroforese

A escolha dos tecidos para extração das proteínas foi feita de acordo com Andrade (2013). Para a análise da expressão da enzima α -amilase, os endospermas das sementes embebidas com água e com solução de 1,0mM de ABA por 72 horas foram triturados na presença de PVP e nitrogênio líquido. A extração da enzima, a corrida eletroforética e a revelação foram feitas conforme descrito anteriormente no tópico 2.1.1.

Para a análise da expressão de proteínas LEA, os embriões das sementes embebidas com água e com solução de 1,0mM ABA por 72 horas foram triturados na presença de PVP e nitrogênio líquido. A extração da enzima, a corrida eletroforética e a revelação foram feitas conforme descrito anteriormente no tópico 2.1.2.

Para a análise da expressão das enzimas alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH) e phosphoglucose isomerase (PGI) foram utilizadas sementes inteiras embebidas com água e com solução de 1,0mM ABA por 72 horas. Após a trituração na presença de PVP e nitrogênio líquido, foram adicionados 250 μ l do tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8,0) e 0,1% de β mercaptoetanol em amostras de 100 mg do material macerado. A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida *overnight* em geladeira, seguido de centrifugação a 16.000 xg, por 30 minutos a 4 °C. A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 μ L do sobrenadante da amostra e a corrida efetuada a 120

V, por 4 horas. Ao término da corrida, os géis foram revelados na presença de substratos específicos para cada enzima (ALFENAS et al., 2006).

2.2.3 Quantificação de proteínas LEA

Os embriões das sementes embebidas com água e com solução de 1,0mM de ABA por 72 horas foram moídos por um minuto e quinze segundos em mortar sobre gelo, na presença de solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e transferidos para microtubos de capacidade de 1500µL. Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 xg 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. Os microtubos com o sobrenadante foram colocados em banho-maria em ebulição por cinco minutos. Em seguida foi realizada a determinação de proteínas segundo o método *Bradford* (BRADFORD, 1976) utilizando-se albumina de soro bovino para a construção da curva de calibração. Foram utilizados 5 mL de solução corante e 100 µL da amostra preparada. O resultado da quantificação foi expresso em µg/g de semente.

2.2.4 Expressão de genes associados à qualidade fisiológica por meio da técnica de qRT-PCR

A expressão dos genes associados à qualidade fisiológica 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.

Para a extração do RNA das sementes embebidas com água e com solução de 1,0mM de ABA por 72 horas, foram macerados na presença de nitrogênio líquido, endospermas para a avaliação da expressão de α -amilase, embriões para avaliação da expressão de LEA proteínas e sementes inteiras para a avaliação da enzima SOD. Foi utilizado o reagente *Pure Link RNA Plant*[®] (*Invitrogen*), seguindo as especificações do manual do fabricante.

Foram transferidos 100 mg do material macerado para o microtubo, juntamente a 500 μ L do reagente *Pure Link RNA Plant*[®] gelado (4 °C) e homogeneizados em vórtex. Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por dois minutos, à temperatura ambiente, com velocidade de 14.000 xg, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de NaCl 5 M e as amostras homogeneizadas em vórtex, por cinco segundos. Na sequência, foram adicionados 300 μ L de clorofórmio e os tubos foram submetidos à inversão por 5 vezes. Para separar as fases, as amostras foram submetidas à centrifugação de 14.000 xg, durante dez minutos, à temperatura de 4 °C, e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado um volume equivalente à fase aquosa de isopropanol gelado e homogenizados em vórtex, durante cinco segundos. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por dez minutos e posteriormente foram submetidas à centrifugação também por dez minutos a 4° C e 14.000 xg. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto, à temperatura ambiente (14.000 xg). O líquido residual foi removido do tubo utilizando pipeta e o RNA foi ressuscitado em 20 μ L de água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

A integridade e pureza do RNA foram avaliadas em todas as etapas com a utilização da eletroforese em gel de agarose desnaturante (corados com

SYBR[®] *Green II*, *Applied Biosystems*) e em espectrofotômetro (*NanoVue*). Foram separadas alíquotas para evitar o descongelamento diário do RNA estoque, evitando a sua degradação e contaminação.

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

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

Após o processo de extração e purificação, os RNAm foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Foi utilizado *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA*[®] da *Applied Biosystems*, segundo protocolo recomendado pelo fabricante. Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um *mix* contendo 2 µL do tampão da enzima, 2 µL do *primer RT Random Primers*, 0,8 µL do *mix dNTP* (100 mM), 1 µL *MultiScribe*TM *Reverse Transcriptase*, e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador *Multigene Gradient Labnet*, programado em três etapas: 10 min a 25 °C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37 °C para ação da enzima e 5 min a 85 °C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20 °C.

A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio de *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de DNA genômico de milho, e utilizado o *primer* correspondente ao gene constitutivo

Zeína. Foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização das ampliações.

Para o desenho dos *primers* os genes-alvo foram baseados em diferentes enzimas e proteínas associadas à qualidade fisiológica de sementes de milho, após revisão bibliográfica.

As sequências dos genes-alvo escolhidos foram encontradas por meio de busca no banco de dados do genoma milho sequenciado no *GenBank*. Com base nessas sequências foram desenhados os *primers* utilizando-se o *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*. As sequências dos *primers* estão representadas na Tabela 9. Foram utilizados como controle endógeno os genes da Ubiquitina e ADH (SCHOLDBERG, 2009).

Tabela 9 *Primers* utilizados na análise de *qRT-PCR* – Lavras – 2015

Gene		Sequência 5'-----3'
Alpha amylase B73	F	CCGGCTCCACGCAGAAC
	R	TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
Alpha amylase (LOC542522)	F	TGCAGCCTCCTAGTGCTTGTAC
	R	TGGAAGAGGACCTGGGATTG
<i>Late embryogenesis abundant protein D-34</i>	F	CCGGCTCCACGCAGAAC
	R	TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
<i>Late embryogenesis abundant protein</i>	F	TGCAGCCTCCTAGTGCTTGTAC
	R	TGGAAGAGGACCTGGGATTG
SOD	F	TGGAGCACCAGAAGATGA
	R	CTCGTGTCCACCCTTCC
Ubiquitina	F	AAGCCAAGATCCAGGACAA
	R	TTGCTTTCCAGCGAAGATGA
Desidrogenase Alcoólica ADH	F	AGGACGCTGAGTTAAGACC
	R	CACATTTGGCAGATCAGTGC

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

Para as análises foi utilizado o aparelho de *real-time PCR Sistem 7500* (*Applied Biosystems*). A *qRT-PCR* foi realizada utilizando o *SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) e as amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA extraído. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foram utilizados 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG com ROX* (*Invitrogen*) para um volume final 10,0 µL/amostra. Controles negativos, compostos por água, e controles endógenos foram incluídos em todas as análises. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A coleta de dados foi realizada por meio do *software v. 2.0.1*, do sistema *7500 de PCR em tempo real* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o método *Ct* comparativo para quantificação relativa, em que os *Ct's* (*Ciclo threshold*) das amostras foram normalizados usando os *Ct's* dos controles endógenos. Para isso, previamente foi realizado um experimento de validação, a fim de verificar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e endógenos são similares e próximas de 100%. As curvas padrão, para o teste de eficiência, 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 do cDNA para ser utilizada em cada reação, que foi de 1:5.

Para análise dos resultados foram considerados como sendo amostras calibradoras as amostras que apresentaram a menor expressão para cada gene. Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de mRNA's das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de mRNA's dos controles. Após a obtenção dos dados brutos, estes foram analisados por

meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene-alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct$ (amostra) - Ct (controle endógeno) e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Inibição da α -amilase durante a germinação de sementes de milho

O teor de água médio das sementes no momento da realização dos testes para a avaliação da qualidade fisiológica foi de 13% com variação máxima de 1%.

Para ambos os produtos utilizados para a inibição da α -amilase, a avaliação da germinação, foi realizada aos 6 dias em contagem única. De maneira geral, as plântulas estavam bem desenvolvidas com parte aérea maior de 7cm para os híbridos e 5cm para as linhagens, o sistema radicular variou de 14 a 20 cm para híbrido e de 9 a 12 cm para as linhagens.

Em relação ao percentual de plântulas normais provenientes de sementes embebidas em solução de paclobutrazol (Tabela 10) foi observada a inibição da germinação apenas em sementes da linhagem 1, na qual a menor porcentagem de germinação ocorreu na concentração de 1,00 mM.

Tabela 10 Porcentagem de plântulas após embebição das sementes de milho das linhagens 1 e 2 e do híbrido formado por essas linhagens em solução de paclobutrazol por período de 72 horas – Lavras -2015

Concentração Paclob (mM)	Híbrido	Linhagem	
		L1	L2
0	96 aA	93 aA	97 aA
0,1	96 aA	84 bB	95 aA
0,3	98 aA	84 bB	99 aA
1,0	98 aA	71 bD	99 aA
3,0	96 aA	78 bC	96 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em relação às sementes embebidas em ABA (Tabela 11), houve inibição da germinação das sementes de todos os materiais avaliados. Os menores valores de germinação foram observados em sementes embebidas em solução com concentração de 1,0 mM para o híbrido e a linhagem 1. Já para a linhagem 2 não houve diferença na porcentagem de germinação nas concentrações de 0,50 e 1,0 mM.

Tabela 11 Porcentagem de plântulas após embebição das sementes de milho das linhagens 1 e 2 e do híbrido formado por essas linhagens em solução de ácido abscísico (ABA) por período de 72 horas – Lavras – 2015

Concentração ABA(mM)	Híbrido	Linhagem	
		L1	L2
0	99 aA	96aA	94 aA
0,25	71 aB	67 aB	68 aB
0,5	69 aB	36 cC	51 bC
1,0	3 bC	5 bD	56 aC

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quando foi utilizado o paclobutrazol durante o processo de embebição das sementes, houve redução da qualidade fisiológica em sementes da linhagem 1, mesmo em concentrações baixas do produto, quando comparado aos resultados observados em sementes da linhagem 2 e do híbrido (Tabela 10). No entanto, em sementes da linhagem 1 não foi observada redução na expressão da enzima α -amilase independentemente da concentração do paclobutrazol utilizado (Figura 1).

Segundo Lenton, Appleford e Croker (1994), mesmo reduzindo a síntese “de novo” de giberelinas (GA), o inibidor paclobutrazol pode não apresentar efeito sobre a atividade de α -amilase durante a germinação de sementes, já que

GA's bioativas ou na forma de intermediários podem estar presentes em sementes maduras. Já o ABA atua diretamente sobre a indução da biossíntese da enzima α -amilase, conseqüentemente suprimindo a mobilização de reservas por meio desta enzima.

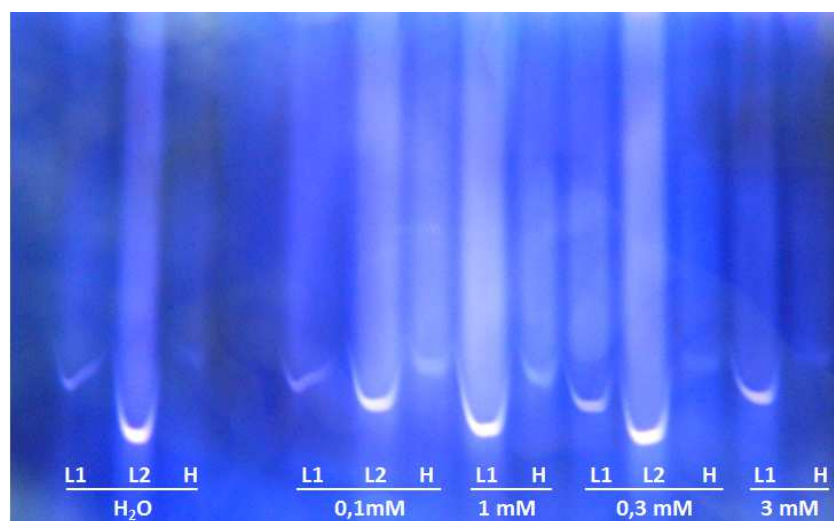


Figura 1 Atividade da enzima alfa amilase em sementes de milho (linhagem 1, 2 e híbrido) embebidas na solução de paclobutrazol nas concentrações 0; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 mM

Quando foi utilizada a solução de ácido abscísico, foi observada menor expressão da enzima α -amilase em sementes da linhagem 2, principalmente nas concentrações de 0,5 e 1mM (Figura 2). Em sementes embebidas em água não foi possível diferenciar a expressão desta enzima em sementes dos três genótipos avaliados. Ao comparar estes resultados com os de porcentagem de plântulas normais (Tabela 11), também houve redução mais acentuada da qualidade fisiológica nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM. Deve-se ressaltar que o maior percentual de plântulas normais foi observado em sementes da linhagem 2, quando as mesmas foram embebidas em solução de ABA na concentração de

1mM. No entanto, em sementes submetidas a este tratamento observa-se menor expressão da enzima α -amilase em detrimento da observada em sementes da linhagem 1 e do híbrido. Assim, infere-se que outras enzimas podem estar envolvidas no controle da qualidade fisiológica de sementes de milho.

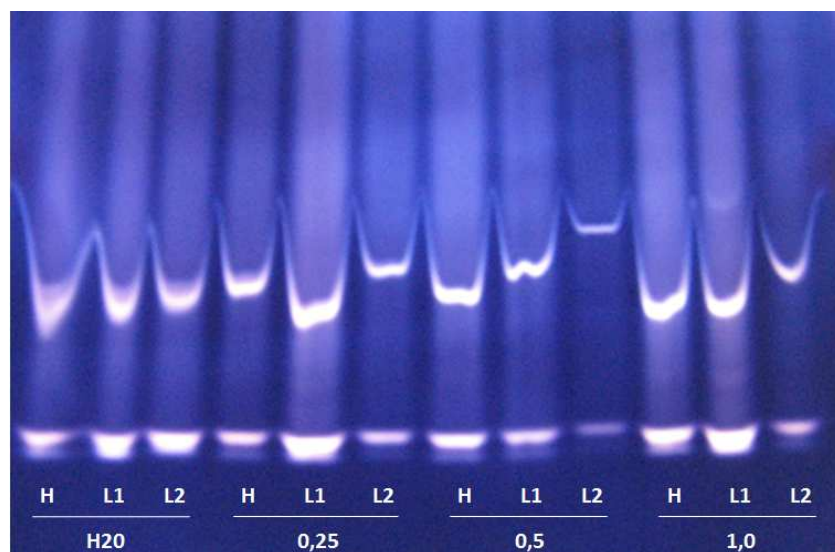


Figura 2 Atividade da enzima alfa amilase em sementes de milho (linhagem 1, 2 e híbrido) embebidas na solução de ácido abscísico nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 1,0 mM

Em função dos resultados obtidos selecionou-se o ABA. Assim, nos próximos experimentos foi utilizada a solução de ABA na concentração de 1mM.

Em relação à embebição de sementes em água e em solução de ABA 1,0 mM por diferentes períodos, foi possível observar que a expressão de α -amilase aumenta com o tempo de embebição (Figura 3). De acordo com Kigel e Galili (1995), as α -amilases não estão presentes nas sementes secas e após a embebição das sementes o hormônio GA é secretado no embrião e transportado para a camada de aleurona induzindo a síntese “de novo” de α -amilases. Esse processo

é inibido especificamente pelo hormônio ABA (ICHIKI et al., 2007). Observa-se, nas sementes embebidas em ABA, redução da expressão da α -amilase, principalmente após 48 horas de embebição. Segundo Zhang et al. (2012), a máxima repressão da biossíntese de α -amilase por ABA ocorre até 72 horas após a embebição, reduzindo seu efeito após esse período.

A expressão de LEA proteínas foi reduzida com o tempo de embebição (Figura 4). Essas proteínas são expressas principalmente durante o desenvolvimento da semente e sua expressão é reduzida após germinação (HONG-BO; ZONG-SUO; MING-AN, 2005). Segundo Wang et al. (2015), a redução da expressão ocorre 18 horas após a embebição. Também foi possível observar maior expressão de LEA proteínas em sementes embebidas em ABA em relação a observada em sementes embebidas em água. Para Liu et al. (2013), essas proteínas atuam na manutenção da taxa de germinação em condições de estresse.

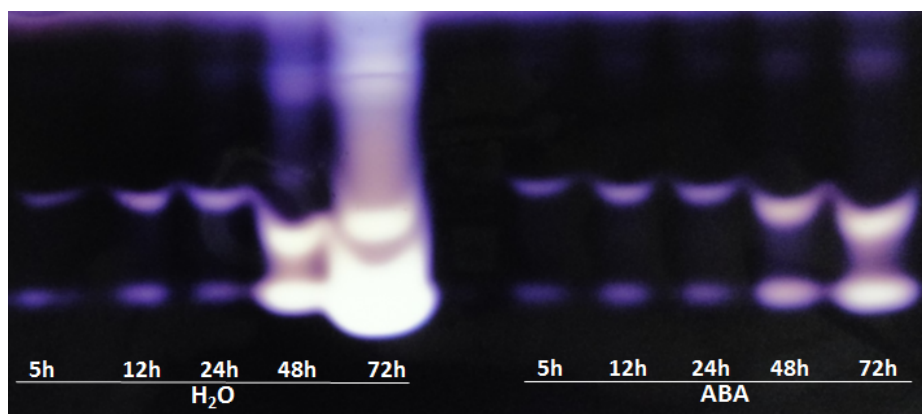


Figura 3 Atividade da α -amilase de sementes de milho da linhagem 30, embebidas em água e em solução de ABA por diferentes períodos de tempo

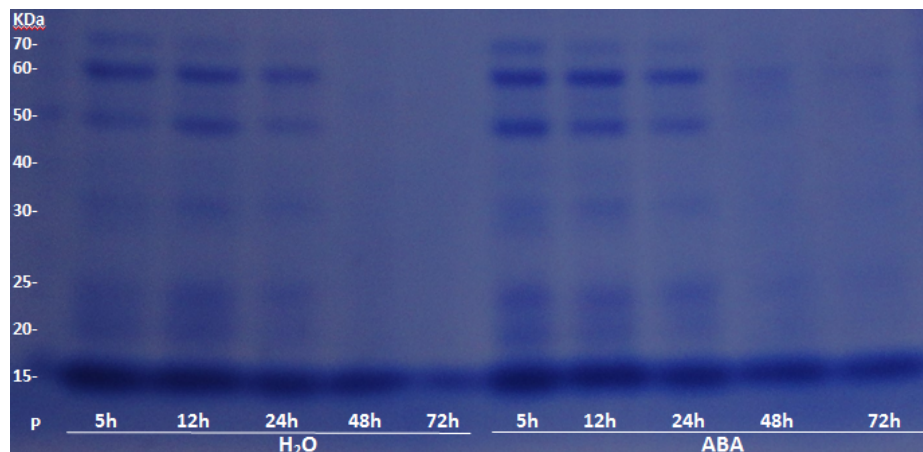


Figura 4 Padrões de LEA proteínas extraídas de sementes de milho da linhagem 30, embebidas em água e em solução de ABA em diferentes tempos

Em função desses resultados, nos próximos testes foi utilizado o tempo de embebição de 72 horas das sementes em solução de ABA, uma vez que a inibição da α -amilase é máxima (ZHANG et al. 2012), permitindo assim estudar outras enzimas envolvidas no processo de germinação e qualidade de sementes. Além disso, após este período de embebição ainda é possível observar a expressão da LEA proteína.

3.2 Qualidade fisiológica e expressão de genes em sementes de milho embebidas com água e ABA

De acordo com os resultados da análise de variância, houve interação significativa entre genótipos e tratamentos (solução de ABA e água) para todos os testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 12).

Tabela 12 Resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de primeira contagem de sementes de protrundidas (1CGP), primeira contagem de plântulas normais (1CGN), sementes protrundidas no teste de germinação (TGP) e plântulas normais no teste de germinação (TGN) das sementes de milho de diferentes genótipos embebidas em solução de ABA e água – Lavras – 2015

FV	GL	QM			
		1CGP	1CGN	TGP	TGN
Genótipos (Gen)	16	333.54**	737.06**	344.50**	59,783
Tratamento (Trat)	1	202048.2**	84301.4**	481.88**	303061.7**
Gen*Trat	16	223.57**	737.06**	75.319**	141.82**
Erro	10 2	18.401	18.9705	5.5686	57.392
Média		59.43	24.90	96.35	48.44
CV (%)		7.22	17.49	2.45	15.64

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

No teste de primeira contagem de germinação (Tabela 13), avaliada aos quatro dias após a semeadura, menores valores de protrusão radicular foram observadas em sementes embebidas em solução de ABA quando comparados aos observados em sementes embebidas em água. A redução expressiva da porcentagem de protrusão em sementes embebidas em solução de ABA ocorre devido ao impedimento da expressão de genes associados à germinação, por este hormônio (ICHIKI et al., 2007).

Em sementes embebidas em água, apenas para o híbrido 43/30 verificou-se menor número de sementes protrundidas em relação aos demais genótipos. Neste material foi observado ainda desempenho inferior à média dos pais com heterose negativa de 20,5%. Já em relação aos demais híbridos, não houve diferença significativa em relação à média dos pais. Em sementes das linhagens 43 e 64 embebidas em solução de ABA, houve a menor porcentagem

de protrusão radicular em relação às demais linhagens. Já entre os híbridos, em todas as combinações nas quais a linhagem 43 participou como parental feminino foi observada menor porcentagem de protrusão radicular. Houve efeito recíproco em todas as combinações híbridas, exceto para a combinação 57/91.

Na primeira contagem, não foram observadas plântulas normais quando as sementes foram embebidas em solução de ABA. Segundo Sodkiewicz e Sodkiewicz (2003), o ABA causa redução do desenvolvimento de plântulas, provavelmente como resposta à menor disponibilidade de energia, devido à redução na atividade hidrolítica na região do embrião. Já em sementes embebidas em água, a maior porcentagem de plântulas normais, entre as linhagens, foi observada para a linhagem 30. Entre os híbridos, maior porcentagem de plântulas normais foi observada para o híbrido 30/57. Os valores de heterose neste teste variaram entre – 17% (43/91) e 46.5% (30/57).

Tabela 13 Valores médios (%) de protrusão, plântulas normais e heterose observados aos quatro dias após a semeadura de sementes embebidas em água e ABA – Lavras – 2015

Genótipos	1 Contagem Protrusão						Genótipos	1 Contagem Normais					
	H2O			ABA				H2O			ABA		
	%	Heterose		%	Heterose			%	Heterose		%	Heterose	
L30	98	Aa	-	18	Be	-	L30	46	Ae	-	0	Ba	-
L43	99	Aa	-	13	Bf	-	L43	34	Ag	-	0	Ba	-
L57	97	Aa	-	16	Be	-	L57	39	Af	-	0	Ba	-
L91	100	Aa	-	16	Be	-	L91	40	Af	-	0	Ba	-
L64	99	Aa	-	11	Bf	-	L64	24	Ah	-	0	Ba	-
H1 (43/30)	78	Ab	-20.5	7	Bf	-8.5	H1 (43/30)	40	Af	0	0	Ba	0
H2 (30/43)	100	Aa	1.5	20	Bd	4.5	H2 (30/43)	63	Ac	23	0	Ba	0
H3 (30/57)	99	Aa	1.5	49	Ba	32	H3 (30/57)	89	Aa	46.5	0	Ba	0
H4 (57/30)	98	Aa	0.5	31	Bc	14	H4 (57/30)	54	Ad	11.5	0	Ba	0
H5 (43/91)	100	Aa	0.5	8	Bf	-6.5	H5 (43/91)	20	Ah	-17	0	Ba	0
H6 (91/43)	99	Aa	-0.5	22	Bd	7.5	H6 (91/43)	79	Ab	42	0	Ba	0
H7 (57/91)	99	Aa	0.5	23	Bd	7	H7 (57/91)	34	Ag	-5.5	0	Ba	0
H8 (91/57)	100	Aa	1.5	24	Bd	8	H8 (91/57)	48	Ae	8.5	0	Ba	0
H9 (43/64)	100	Aa	1	14	Bf	2	H9 (43/64)	40	Af	11	0	Ba	0
H10 (64/43)	98	Aa	-1	27	Bc	15	H10 (64/43)	74	Ab	45	0	Ba	0
H11 (57/64)	99	Aa	1	17	Be	3.5	H11 (57/64)	52	Ad	20.5	0	Ba	0
H12 (64/57)	98	Aa	0	35	Bb	21.5	H12 (64/57)	66	Ac	34.5	0	Ba	0

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

Em relação aos valores de germinação avaliada aos dez dias após a semeadura (Tabela 14), apenas nas sementes das linhagens 30, 43 e 64 e dos híbridos 43/30 e 43/64 foi observada menor protrusão radicular quando as sementes foram embebidas em solução de ABA, comparado às sementes embebidas em água. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de a máxima ação inibitória do ABA ocorrer até 72 horas após a embebição, reduzindo seu efeito após esse período (ZHANG et al., 2012).

Nas sementes embebidas em água, assim como na primeira contagem, apenas em sementes do híbrido 43/30 foi observada menor protrusão radicular entre todos os genótipos, com heterose negativa de 16,5%. Para os demais híbridos não foi verificada diferença significativa em relação à média dos pais. Em sementes embebidas em solução de ABA, também foi observada a menor porcentagem de protrusão em sementes do híbrido 43/30, com heterose negativa de 27%. Efeito recíproco significativo só foi observado para a combinação 43/30.

Em relação às plântulas normais no teste de germinação, para as sementes embebidas em solução de ABA, não houve diferenças significativas entre os genótipos, com resultados próximos a zero, inferior aos observados em sementes embebidas em água. Sodkiewicz e Sodkiewicz (2003), também observaram baixa porcentagem de plântulas normais após aplicação exógena de ABA em sementes de triticale. Segundo estes autores há influência do ABA em etapas posteriores à germinação. Em sementes embebidas em água, menor porcentagem de plântulas normais foi observada nos híbridos 43/40 e 57/30, com heterose negativa de 15,5% e 19%, respectivamente.

Tabela 14 Valores médios (%) de protrusão, de plântulas normais e heterose observados aos 10 dias após a semeadura de sementes embebidas em água e ABA – Lavras – 2015

Genótipos	Final protrusão						Genótipos	Final normais					
	H2O			ABA				H2O			ABA		
	(%)	Heterose	(%)	Heterose	(%)	Heterose		(%)	Heterose	(%)	Heterose	(%)	Heterose
L30	98	Aa		82	Bd		L30	98	Aa		0	Ba	
L43	99	Aa		88	Bc		L43	95	Aa		0	Ba	
L57	98	Aa		97	Aa		L57	94	Aa		2	Ba	
L91	100	Aa		99	Aa		L91	100	Aa		0	Ba	
L64	99	Aa		93	Bb		L64	91	Aa		0	Ba	
H1 (43/30)	82	Ab	-16.5	63	Be	-22	H1 (43/30)	81	Ab	-15.5	0	Ba	0
H2 (30/43)	100	Aa	1.5	99	Aa	14	H2 (30/43)	99	Aa	2.5	2	Ba	2
H3 (30/57)	99	Aa	1	97	Aa	7.5	H3 (30/57)	99	Aa	3	2	Ba	1
H4 (57/30)	98	Aa	0	99	Aa	9.5	H4 (57/30)	77	Ab	-19	10	Ba	9
H5 (43/91)	100	Aa	0.5	100	Aa	6.5	H5 (43/91)	99	Aa	1.5	1	Ba	1
H6 (91/43)	100	Aa	0.5	100	Aa	6.5	H6 (91/43)	100	Aa	2.5	0	Ba	0
H7 (57/91)	100	Aa	1	99	Aa	1	H7 (57/91)	99	Aa	2	0	Ba	-1
H8 (91/57)	100	Aa	1	98	Aa	0	H8 (91/57)	100	Aa	3	0	Ba	-1
H9 (43/64)	100	Aa	1	95	Ba	4.5	H9 (43/64)	100	Aa	7	0	Ba	0
H10 (64/43)	98	Aa	-1	98	Aa	7.5	H10 (64/43)	96	Aa	3	0	Ba	0
H11 (57/64)	99	Aa	0.5	96	Aa	1	H11 (57/64)	97	Aa	4.5	3	Ba	2
H12 (64/57)	97	Aa	-1.5	99	Aa	4	H12 (64/57)	96	Aa	3.5	0	Ba	-1

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

Em relação à expressão de enzimas, de uma maneira geral, foi observada redução da expressão da enzima α -amilase em sementes embebidas em solução de ABA em relação às sementes embebidas em água (Figura 5A). Também foram observados menores valores de germinação em sementes embebidas com solução de ABA (Tabelas 13 e 14). Para White et al. (2000), o ABA possui a importante função de inibir a viviparidade, ou seja, a germinação precoce de sementes ainda na planta-mãe e induzir a expressão de genes associados à maturação, porém sua presença inibe a expressão de enzimas hidrolíticas como a α -amilase, reduzindo a disponibilidade de energia para o embrião e, conseqüentemente, inibindo o processo germinação.

Entre as linhagens foi observada maior expressão da α -amilase em sementes das linhagens 30 e 57 e entre os híbridos a maior expressão foi observada nos híbridos formados por estas linhagens (30/57 e 57/30). Em sementes do híbrido 30/57 observou-se alta porcentagem de plântulas normais, tanto na primeira contagem como na contagem final, porém nas sementes do híbrido 57/30 foi verificada menor qualidade fisiológica, podendo-se inferir que outras enzimas estão envolvidas no controle da qualidade de sementes.

Foi observado efeito recíproco para a expressão da α -amilase em todas as combinações nas quais houve participação da linhagem 43 (43/30, 43/91 e 43/64), sendo que a maior expressão foi observada em sementes do híbrido que possuem a linhagem de qualidade fisiológica superior como parental feminino.

Em relação à expressão da enzima MDH (Figura 5B), também foi observada redução na expressão em sementes embebidas em ABA, em consonância com os resultados obtidos nos testes fisiológicos. Porém, estes resultados são contrários àqueles obtidos por Caixeta et al. (2014) e Carvalho et al. (2014), em sementes de pimenta habanero e soja, respectivamente, que associaram a maior atividade desta enzima a cultivares com sementes de baixa qualidade fisiológica de sementes e sementes em estágios avançados de

deterioração. Para Brandão Júnior, Carvalho e Vieira (1999), não foi possível observar correlação desta enzima com a qualidade fisiológica, concluindo que a MDH é um marcador ineficiente na indicação da qualidade fisiológica.

Entre as linhagens, maior expressão da MDH foi observada em sementes das linhagens 30 e 64 e entre os híbridos, maior expressão foi observada em sementes de híbridos formados por estas linhagens (43/64 e 64/43). Gomes et al. (2000), ao estudar a expressão desta enzima em sementes de diferentes genótipos de milho, observaram que os padrões eletroforéticos permaneceram praticamente inalterados para híbridos e linhagens, mesmo após o envelhecimento das sementes, não sendo um bom indicador para o estudo da heterose.

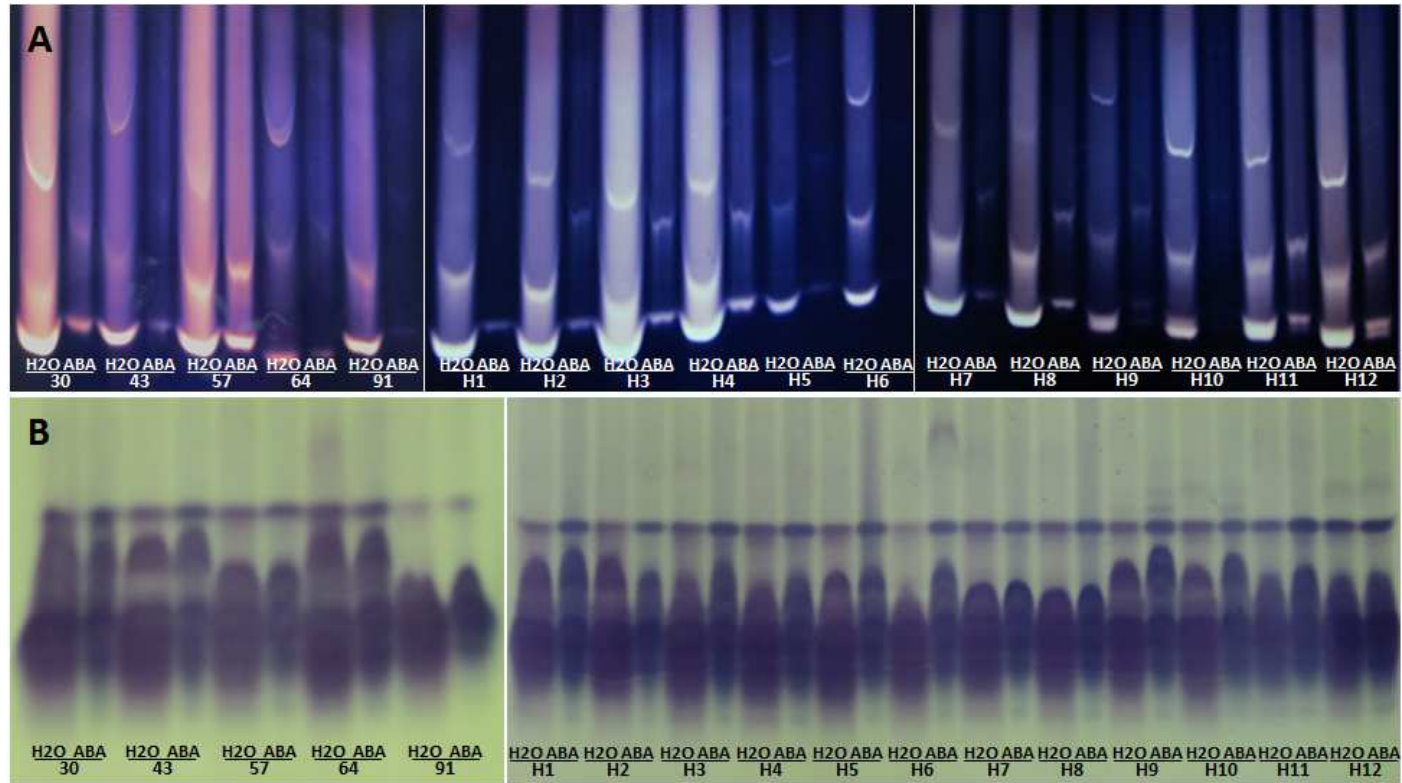


Figura 5 A - Padrões isoenzimáticos da α -amilase em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA; B - Padrões isoenzimáticos da MDH em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA

Para a enzima ADH (Figura 6A), não foi possível observar consistência nos resultados da expressão em relação à embebição das sementes em solução de ABA, já que para alguns genótipos a expressão foi maior em sementes embebidas em água e para outros a expressão foi maior em sementes embebidas em solução de ABA.

Maior expressão da ADH, entre as linhagens, foi observada em sementes da linhagem 64. Entre os híbridos, maior expressão foi observada nas sementes dos híbridos 43/64 e 64/43, nestes genótipos foram observadas isoformas que não foram expressas nas linhagens parentais. Neste caso, a heterose pode ser explicada pela interação alélica sobredominante. Segundo Ramalho et al. (2012), quando há sobredominância o desempenho do híbrido ultrapassa o limite dos pais. Uma hipótese que explica este fenômeno é a produção de uma enzima funcional pela combinação de subunidades produzidas nos pais que isoladamente não seriam funcionais.

Nos híbridos 43/64 e 64/43 a heterose positiva também foi observada para a porcentagem de plântulas normais aos quatro e aos dez dias após a semeadura. Diversos autores associaram a alta expressão desta enzima com sementes de alta qualidade fisiológica (ABREU et al., 2014; CAIXETA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014).

A expressão da enzima PGI (Figura 6B), assim como no caso da ADH, não apresentou consistência nos resultados, em relação à embebição das sementes em solução de ABA. Entre as linhagens, maior expressão foi observada em sementes das linhagens 64 e 57. Já entre os híbridos, a maior expressão foi observada em sementes dos genótipos 43/64 e 64/43, também foi possível observar sobredominância devido à presença de isoformas que não estavam presentes nas linhagens parentais. Segundo Hoecker et al. (2008), a maior defesa contra radicais livres pode estar relacionada à performance superior dos híbridos.

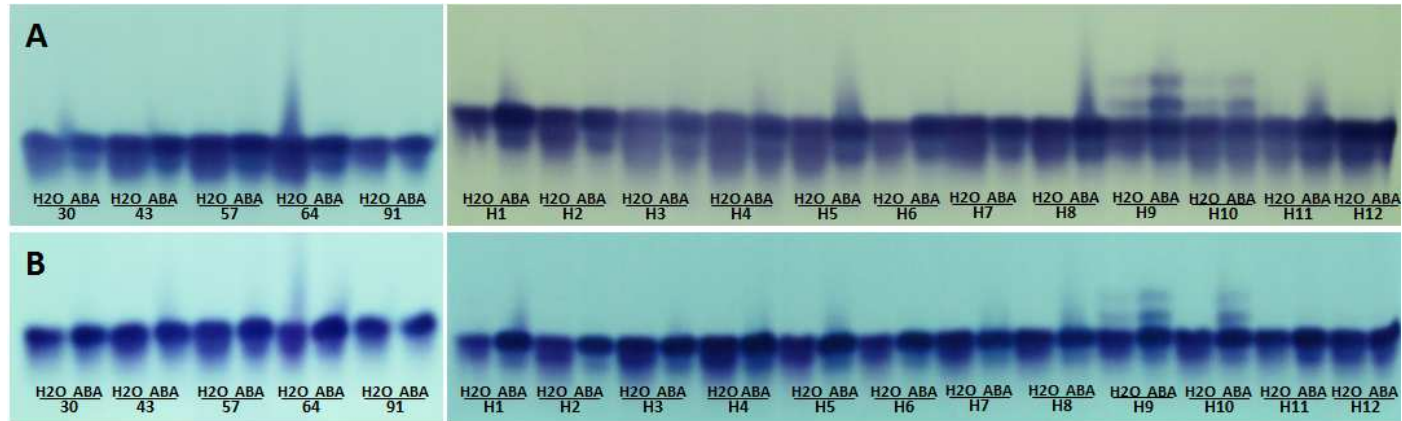


Figura 6 A - Padrões isoenzimáticos da ADH em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA; B - Padrões isoenzimáticos da PGI em sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA

A expressão de LEA proteínas (Figura 7), ao contrário das enzimas α -amilase e MDH, foi maior em sementes embebidas com ABA, sendo observada expressão principalmente de proteínas de peso até 40 kDa. Para alguns autores, as LEA proteínas são responsáveis pela manutenção da taxa de germinação em condições de estresse (LIU et al., 2013; TODAKA et al., 2012). Para Fu et al. (2011) as proteínas com peso entre 12 e 40 KDa atuam como protetores durante a germinação. Estes autores sugerem ainda que estas proteínas estejam relacionadas ao aparecimento da heterose durante a germinação.

Entre as linhagens, alta expressão de proteínas LEA foi observada em sementes das linhagens 30 e 91, classificadas como de alta qualidade fisiológica de sementes. Já entre os híbridos, alta expressão foi observada em sementes dos híbridos 30/57 e 57/30, os quais apresentaram alta porcentagem de protrusão radicular aos quatro e dez dias após a semeadura. Alta correlação entre a expressão de LEA proteínas e qualidade fisiológica de sementes também foi observada por diversos autores (AMARA et al., 2013; ANDRADE et al., 2013; FARIA et al., 2004; ROSA et al., 2005; SILVA-NETA et al., 2015). Dessa forma, a expressão de LEA proteínas pode ser utilizada em programas de melhoramento, auxiliando na seleção de genótipos superiores em relação à qualidade de sementes de milho.

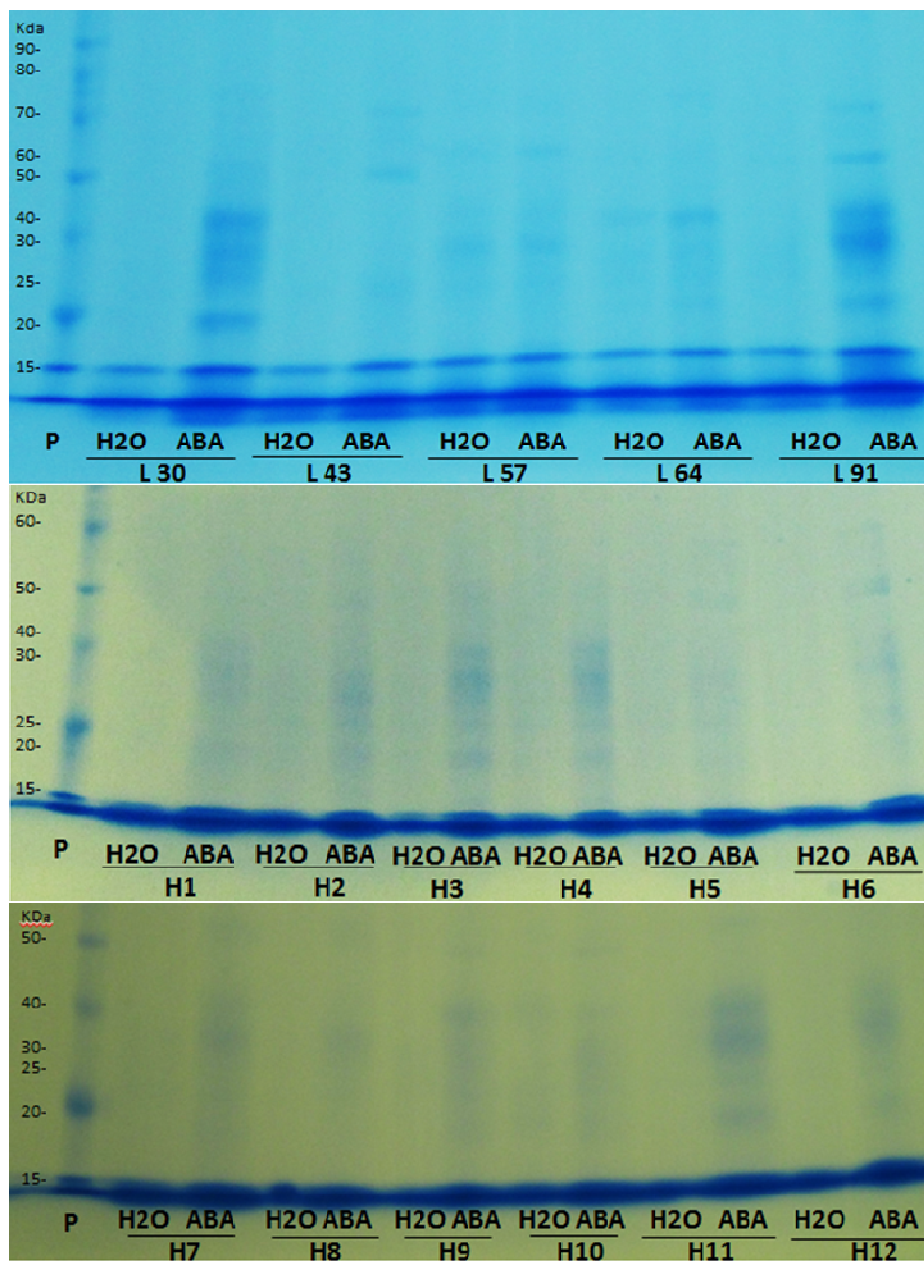


Figura 7 Zimograma de LEA proteínas extraídas de sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de ABA

Em relação à quantificação de LEA proteínas por meio de espectrofotometria (Figura 8), de uma maneira geral, maiores quantidades dessas foram observadas em sementes embebidas em solução de ABA em relação às observadas em sementes embebidas em água.

Entre as linhagens, maiores quantidades de LEA proteínas foram observadas em sementes das linhagens 30 e 91, em sementes embebidas em ABA. O mesmo resultado foi observado na análise de LEA proteínas por meio de eletroforese. A menor quantidade foi observada em sementes da linhagem 43 embebidas em água. Entre os híbridos, também foi observada alta quantidade da proteína em sementes do híbrido 30/57, embebidas em solução de ABA.

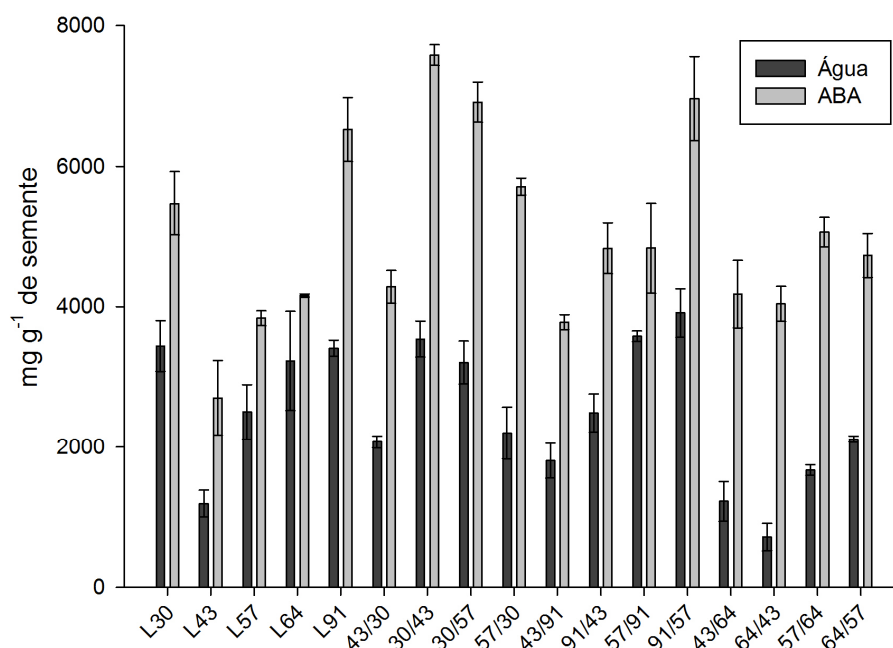


Figura 8 Proteínas LEA extraídas de sementes de milho de diferentes genótipos, embebidas em água e em solução de aba

Pelos resultados das análises de transcritos, observa-se que a expressão dos genes Alpha amylase (LOC542522) e Alpha amylase B73 foi inibida na

presença de solução de ABA 1mM (Figura 9). Segundo Ichiki et al. (2007), a inibição da biossíntese de α -amilase por ABA ocorre na fase de transcrição. Guo e Ho (2008) ao estudar a influência do ABA na germinação de diferentes cereais também observaram a inibição da biossíntese de α -amilase a nível transcricional.

Nas sementes embebidas em água, para ambos os genes de α -amilase estudados, foi possível observar que a expressão é maior na linhagem de alta qualidade (linhagem 30) em comparação à observada em sementes da linhagem de baixa qualidade (linhagem 43). Entre os híbridos, foi observada maior expressão em relação aos pais em sementes do híbrido 30/43 que possui a linhagem de alta qualidade como parental feminino. Estes resultados estão de acordo com os observados nos testes fisiológicos, nos quais também foi observada heterose e efeito recíproco para este híbrido. Segundo Oliveira et al. (2013), a expressão de α -amilase pode ser utilizada para assistir a seleção de genótipos em programas de melhoramento, possibilitando a eliminação de genótipos de menor qualidade nas fases iniciais de seleção em programas de melhoramento.

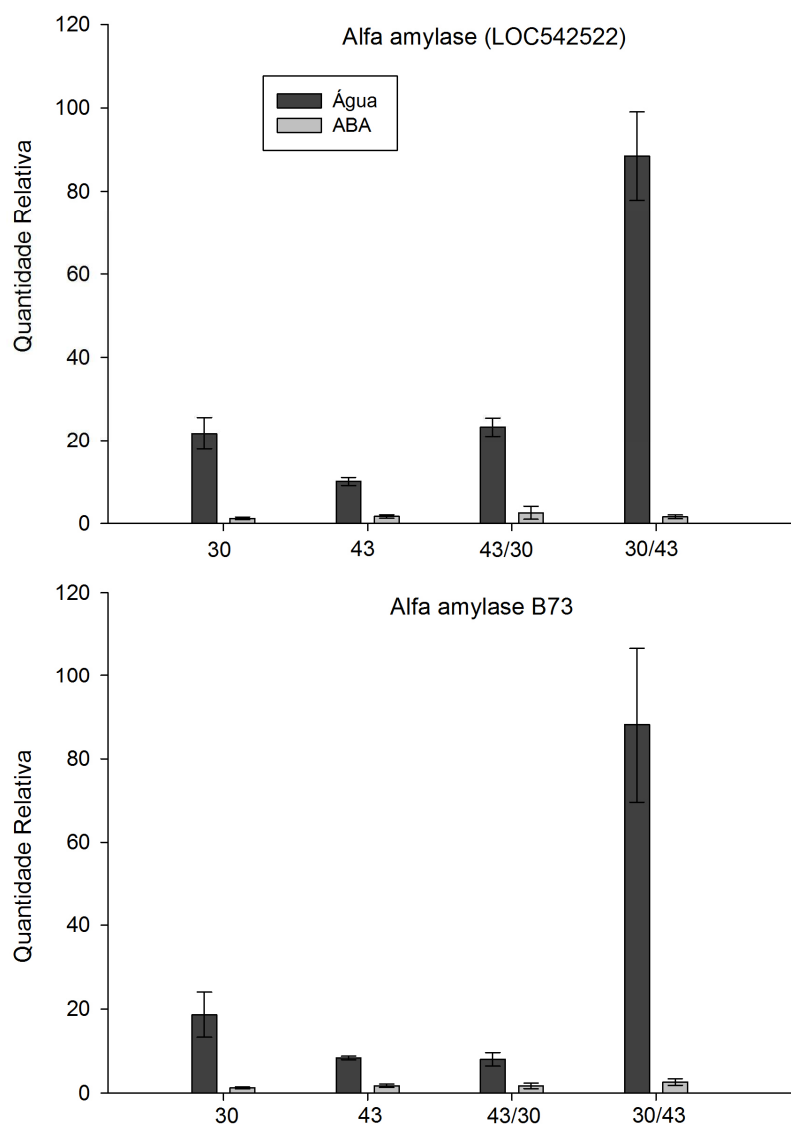


Figura 9 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes Alpha amylase (LOC542522) e Alpha amylase B73 em sementes de milho das linhagens 30 e 43 e dos híbridos 43/30 e 30/43

É importante ressaltar que a expressão do gene Alpha amylase B73 em sementes do híbrido 43/30 foi menor que a observada em sementes da linhagem 30, quando as mesmas foram embebidas em água. Este resultado está em consonância com os observados nos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes. Infere-se que o valor de heterose negativo também esteja associado à baixa qualidade fisiológica de sementes da linhagem 43.

Para os genes LEA D34 e LEA, maior expressão foi observada nas sementes embebidas em ABA 1 mM (Figura 10). Estes resultados também foram observados na análise da expressão de LEA proteínas por meio das técnicas de eletroforese e espectrofotometria. Para Liu et al. (2013), as LEA proteínas atuam como protetores em condições de estresse para manter a taxa de germinação nessas condições, o que pode justificar a germinação de sementes mesmo com a baixa expressão de α -amilase.

Para o gene LEA maior expressão foi observada em sementes do híbrido 30/43, também em consonância com os resultados observados nos testes fisiológicos. Porém, para o gene LEA D-34, maior expressão foi observada em sementes do híbrido 43/30. É importante ressaltar que existem diferentes genes que codificam para LEA proteínas e por meio das técnicas de eletroforese e espectrofotometria é possível avaliar ao mesmo tempo a expressão de vários genes, diferente do que ocorre na técnica de qRT-PCR.

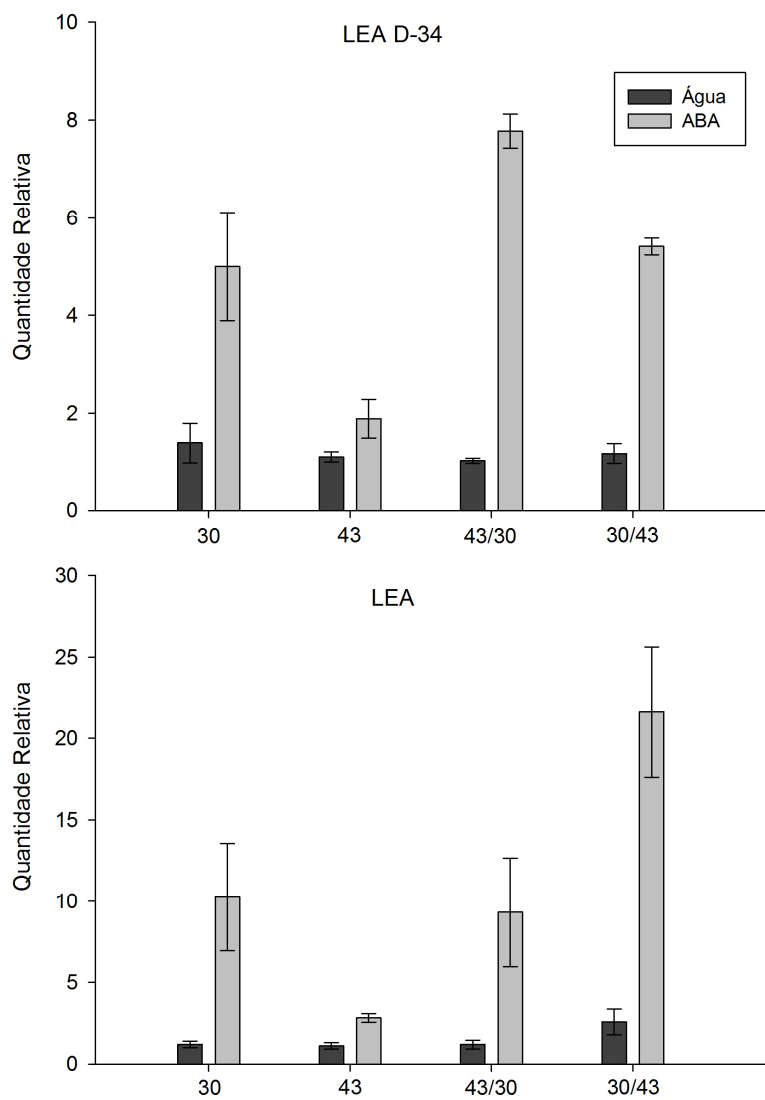


Figura 10 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes *Late embryogenesis abundant proteins* D-34 (LEA D-34) e *Late embryogenesis abundant proteins* (LEA) em sementes de milho das linhagens 30 e 43 e dos híbridos 43/30 e 30/43

Maior expressão do gene SOD foi observada em sementes embebidas em solução de ABA 1 mM, assim como para os genes responsáveis pela produção de LEA proteínas. Segundo Liu et al. (2013), LEA proteínas se ligam à enzima SOD evitando modificações conformacionais e protegendo a atividade dessas enzimas em situação de estresse.

Maior expressão do gene SOD, entre os genótipos, foi observada em sementes do híbrido 30/43, evidenciando a presença de heterose e efeito recíproco para este genótipo (Figura 11). Hoecker et al. (2008), ao estudar a manifestação da heterose na expressão gênica de raízes primárias de milho, observaram que dentre os vários genes analisados o responsável pela produção da enzima SOD foi o que exibiu a maior expressão nos híbridos em relação aos pais. Segundo estes autores, a maior expressão de SOD e consequente maior defesa contra espécies reativas de oxigênio está diretamente relacionada à performance superior dos híbridos nos primeiros estágios logo após a germinação. Paschold et al. (2010), também concluíram que a expressão de SOD contribui para a manifestação da heterose nas fases iniciais de desenvolvimento de plântulas de milho.

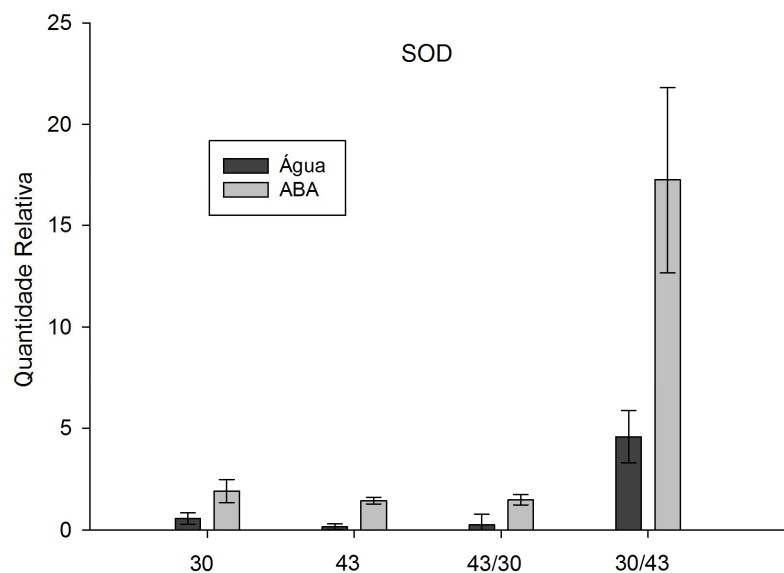


Figura 11 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes SOD em sementes de milho das linhagens 30 e 43 e dos híbridos 43/30 e 30/43

No entanto, segundo Meyer et al. (2012), a heterose durante a germinação e nos primeiros estágios de desenvolvimento das plantas não pode ser atribuída a apenas um ou poucos genes, mas sim à maior expressão gênica global e maior atividade metabólica nos híbridos que levam a uma maior eficiência no uso de recursos e resultam em melhor desempenho. Além disso, Paschold et al. (2010) observaram heterose ao estudar o perfil proteômico de raízes primárias de sementes de híbridos de milho, porém o mesmo não foi observado ao estudar o perfil transcriptômico correspondente, ressaltando a importância dos processos pós-transcricionais, como a modificação de proteínas, que também podem estar relacionados com a heterose.

A presença de efeito materno foi observada na expressão dos genes Alpha amylase (LOC542522), Alpha amylase B73 em sementes embebidas em água e dos genes LEA e SOD em sementes embebidas em ABA para o híbrido

30/43. Estes resultados estão de acordo os observados nas avaliações fenotípicas nas quais o híbrido 30/43 também apresentou qualidade fisiológica superior ao seu recíproco. Dessa forma, a expressão desses genes pode auxiliar o melhorista na escolha dos genitores a serem utilizados como parental feminino visando à obtenção de híbridos com alta qualidade fisiológica de sementes.

4 CONCLUSÕES

O ABA reduz a atividade da α -amilase e a qualidade fisiológica de sementes de milho.

A expressão de LEA proteínas e das enzimas α -amilase e SOD está relacionada à qualidade fisiológica de sementes de milho.

Há heterose e efeito recíproco na expressão de enzimas e proteínas associadas à qualidade fisiológica de sementes, o que permite a escolha dos genitores femininos ideais para os cruzamentos.

REFERÊNCIAS

ABREU, V. M. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 574 p.

AMARA, I. et al. Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. **Journal of plant physiology**, Stuttgart, n. 170, v. 9, p. 864-873, 2013.

AMARA, I. et al. Insights into maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 2, p. 312-329, 2012.

ANDRADE, T. et al. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. *Genetics and molecular research: GMR, Ribeirão Preto*, v. 12, n. 3, p. 3630-3642, 2013.

ANDRADE, T. **Qualidade fisiológica e expressão de proteínas resistentes ao calor em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de milho**. 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.

CAIXETA, F. et al. Physiological and biochemical alterations during germination and storage of habanero pepper seeds. **African Journal of Agricultural Research**, Ago-Iwoye, v. 9, n. 6, p. 627-635, 2014.

CARVALHO, E. R. et al. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application of manganese. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 4, p. 317-327, 2014.

FARIA, M. A. V. R. et al. Germinabilidade e tolerância à dessecação em sementes de milho colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 276-289, 2004.

FU, Z. et al. Proteomic analysis of heterosis during maize seed germination. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, p. 1462-1472, 2011.

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

GUO, W. J.; HO, T. H. D. An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, p. 1710-1722, 2008.

HOECKER, N. et al. Comparison of maize (*Zea mays* L.) F1-hybrid and parental inbred line primary root transcriptomes suggests organ-specific patterns of nonadditive gene expression and conserved expression trends. **Genetics**, Austin, v. 179, p. 1275-1283, 2008.

HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 45, p. 131-135, 2005.

ICHIKI, Y. et al. An environmentally acceptable method for assaying the inhibition of ALPHA.-amylase induction. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 32, p. 120-123, 2007.

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

LENTON, J. R.; APPLEFORD, N. E. J.; CROKER, S. J. Gibberellins and α -amylase gene expression in germinating wheat grains. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 15, p. 261-270, 1994.

LIU, Y. et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 4, n. 6. p. 944-959, 2013.

MEYER, R. C. et al. Heterosis manifestation during early Arabidopsis seedling development is characterized by intermediate gene expression and enhanced metabolic activity in the hybrids. **Plant Journal**, Oxford, v. 71, p. 669-683, 2012.

OLIVEIRA, G. E. et al. Qualidade fisiológica e expressão das enzimas amilases em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras v. 37, p. 40-48, 2013.

PASCHOLD, A. et al. Molecular dissection of heterosis manifestation during early maize root development. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 120, p. 383-388, 2010.

RAMALHO, M. A. P. et al. Aplicação da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

ROSA, S. D. V. F. D. et al. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, p. 91-101, 2005.

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

SILVA-NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.

SODKIEWICZ, W.; SODKIEWICZ, T. Inhibition of α -amylase acting in hexaploid triticale lines by exogenous abscisic acid. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 3, p. 419-422, 2003.

TODAKA, D. et al. Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. **Rice**, Raleigh, v. 5, p. 1-9, 2012.

WANG, W. Q. et al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 86, p. 1-15, 2015.

WHITE, C. N. et al. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 1081-1088, 2000

ZHANG, L. et al. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 79, n. 3, p. 285-293, 2012.

ŽIAUKA, J.; KUUSIENĖ, S. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during in vitro culture of aspen (*Populus tremula* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, p. 221-228, 2010.