



VIVIANE MARIA DE ABREU

**SELEÇÃO INDIRETA PARA TOLERÂNCIA À
SECA EM MILHO POR MEIO DE
CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E DE
SEMENTES**

LAVRAS – MG

2013

VIVIANE MARIA DE ABREU

**SELEÇÃO INDIRETA PARA TOLERÂNCIA À SECA EM MILHO POR
MEIO DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E DE SEMENTES**

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS – MG

2013

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

Abreu, Viviane Maria de.

Seleção indireta para tolerância a seca em milho por meio de características agronômicas e de sementes / Viviane Maria de Abreu.
– Lavras : UFLA, 2013.

95 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Estresse hídrico. 3. População de plantas. 4. Qualidade fisiológica de sementes. 5. Seleção indireta. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

VIVIANE MARIA DE ABREU

**SELEÇÃO INDIRETA PARA TOLERÂNCIA À SECA EM MILHO POR
MEIO DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E DE SEMENTES**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 10 de maio de 2013.

Dr. Renzo Garcia Von Pinho UFLA

Dr. João Almir de Oliveira UFLA

Dr. João Cândido Souza UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

LAVRAS - MG

2013

Aos meus pais, José Mauro de Abreu e Maria Nazaré do Carmo Abreu, por todo apoio, confiança, incentivo; As minhas avós Zilda Inácia de Abreu (*inmemoriam*) e Nazaré Cândida do Carmo (*in memoriam*), por serem meu exemplo de vida.

Com todo amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha caminhada e me conceder mais esta conquista.

Aos meus pais, José Mauro de Abreu e Maria Nazaré do Carmo Abreu, pelo incentivo, apoio, amor e compreensão.

A toda minha família (tios, primos, padrinhos), por estarem sempre ao meu lado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Édila Vilela de Resende Von Pinho, por ter me acolhido desde o início do curso com muito carinho e atenção, e pelo exemplo de dedicação e amor à profissão.

Aos coorientadores Renzo Von Pinho e Renato Mendes Guimarães, pelo auxílio prestado durante a execução da pesquisa.

Aos professores do Setor de Sementes, por todo conhecimento transmitido que muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

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

Aos amigos da UNIFENAS, Paulo Henrique, Iara, Thaís, Rogério, Juliana, entre outros, pois foi lá onde tudo começou.

Aos amigos da graduação, em especial, Daniela, Iracema, João, Fernando, Joana, Laís, Iolanda, Raul, pelo apoio e compreensão nas horas em que não pude estar sempre presente.

Aos amigos da Pós-graduação, Helena, Luciane, Anderson, Michele, Natássia, Renata, Sophia, Diego, Gabriel, por compartilhar comigo as mesmas angústias e alegrias.

Aos companheiros de trabalho do G-Milho, em especial, Chefe (Leandro), Jovem (Álvaro), Gabi, Xuxu (Evellyn), Linhagem (Cinthia), Mamute (João Paulo), Fiote (Vitor), Muco (Marco Antônio), Bruno, Karpet (Rodolfo), Pato (Luiz), Pelanka (Rafael), Cateto (Juan), Zé Red (Arthur), Nextel (Lucas), Carroça (Rafaela) Mateus, Calil, Peixe (Ewerton), Ivan, Cadiquê (Micaela), por toda a ajuda na condução dos experimentos em campo e pelos vários momentos de diversão.

À Gabriella, pela amizade, dedicação e companheirismo.

Às estagiárias temporárias Evellyn, Cinthia e principalmente Izabel, por se disporem a me ajudar com os experimentos de madrugada, contem comigo sempre que precisarem.

Às estagiárias do laboratório de sementes, Glória e Marcela (pé de milho), porque sem vocês não teria feito quase nada;

Aos funcionários do setor de sementes, Wilder, Walbert, Elenir, Elza, Viviana, pelo auxílio na execução dos experimentos e amizade.

À Alexana, pelo exemplo de vida e profissionalismo, pelos ensinamentos sobre pesquisa e sobre a vida.

À Heloísa, pela disponibilidade e ajuda com as correções da dissertação.

A todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

A caracterização precoce de genótipos, por meio de avaliações da qualidade fisiológica de sementes, bem como o estudo dos caracteres associados à tolerância à deficiência hídrica, podem fornecer parâmetros que auxiliarão na seleção de novas cultivares em programas de melhoramento. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar cinco linhagens de milho quanto à tolerância à seca, por meio da qualidade fisiológica, utilizando-se de testes de germinação, vigor e da expressão de proteínas em sementes e de caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca. Foram utilizadas cinco linhagens de milho do programa de melhoramento da empresa Geneseeds Recursos Genéticos Ltda., cultivadas em quatro populações de plantas, 40, 60, 80 e 100 mil plantas ha⁻¹. Nessas condições foram avaliados os seguintes caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca: prolificidade, *stay green*, intervalo entre os florescimentos feminino e masculino. Foi avaliada ainda a qualidade fisiológica das sementes por meio dos testes de germinação, envelhecimento acelerado, teste frio, análises das enzimas alfa amilase, esterase, catalase, superóxido desmutase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase e de proteínas resistentes ao calor. Em outro experimento, foi avaliada a qualidade fisiológica das sementes submetidas a diferentes potenciais hídricos (0.0, -0.3, -0.6, -0.9 MPa), por meio dos testes de germinação e vigor, além das análises das enzimas alfa amilase, esterase, catalase, glutamato oxalacetato transaminase, superóxido desmutase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase e proteínas resistentes ao calor. As linhagens 63, 64 e 91 foram as que apresentaram maiores valores de produtividade e prolificidade. Os menores valores de intervalo entre o florescimento masculino e feminino foram observados para as linhagens 63, 54 e 91. Não houve a influência das populações de plantas sobre a qualidade fisiológica de sementes de milho, sendo que os maiores valores de germinação e vigor foram observados em sementes das linhagens 64, 44 e 91. Maiores valores de germinação sob condições de restrição hídrica foram observados em sementes da linhagem 63. No entanto, maior vigor de sementes nessas condições foi observado em sementes das linhagens 91 e 44. Em relação à expressão das isoenzimas, para as linhagens 44 e 91 observou-se maior atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, enzimas essas consideradas como enzimas do sistema antioxidantes. Para as avaliações de produção, prolificidade e intervalo entre os florescimentos feminino e masculino, as linhagens 63, 64 e 91 mostraram-se as mais promissoras quanto à tolerância à seca. O aumento da população de plantas não interfere na qualidade fisiológica das sementes. Melhor qualidade fisiológica é observada em sementes das linhagens 64, 44 e 91.

Palavras-chave: *Zea mays*. Estresse hídrico. População de plantas. Qualidade de sementes. Seleção indireta.

ABSTRACT

Early characterization of genotypes through assessments of the physiological quality of seeds, as well as the study of traits associated with tolerance to drought stress, can provide parameters that will assist in the selection of new cultivars in breeding programs. The objective of this study was to evaluate five maize inbred lines by means of the physiological quality, using the germination, vigor and expression of proteins in seeds and indirect traits related to drought tolerance. We used five maize lines from the corn breeding program of the company Geneseeds Recursos Genéticos Ltda. grown at four plant densities, 40, 60, 80 and 100 thousand plants ha⁻¹. In these conditions, the following characters evaluated indirectly related to drought tolerance: prolificacy, stay green and interval between female and male flowering, as related to drought tolerance. The physiological quality of the seeds was also assessed through the tests of germination, accelerated aging, cold test, analysis of the enzymes alpha amylase, esterase, catalase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase and heat resistant proteins. In another experiment, we evaluated the physiological quality of seeds subjected to different water potentials (0.0, -0.3, -0.6, -0.9 MPa) by means of germination and vigor tests, as well as analyses of the enzymes alpha amylase, esterase, catalase, glutamate oxaloacetate transaminase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase and heat resistant proteins. Lines 63, 64 and 91 showed the greatest yields and prolificacy. The lower range values between male and female flowering observed for the lines 63, 54 and 91. There was no influence of planting densities on the physiological quality of maize seeds, and the highest germination and seed vigor values were observed in lines 64, 44 and 91. Higher values of germination under conditions of water restriction observed in seed production 63. However, higher vigor of seeds in these conditions observed in seeds of the lines 91 and 44. Regarding isoenzyme expression profiles, for the lines 44 and 91 observed higher activity of SOD and CAT, considered as enzymes of the antioxidant system. Evaluations of production, prolificacy and interval between male and female flowerings, the lines 63, 64 and 91 shown to be the most promising for tolerance to drought. Increasing plant population does not interfere with physiological seed quality. Better physiological quality of seeds observed in lines 64, 44 and 91.

Keywords: *Zea mays*. Water stress. Plant population. Seed quality. Indirect selection.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	12
1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Estresse hídrico	14
2.1.1	Caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca	16
2.2	Influência do estresse hídrico sobre a qualidade fisiológica de sementes	20
3	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29
	CAPÍTULO 2 Avaliação de linhagens de milho quanto à tolerância à seca	39
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	Instalação e condução dos experimentos	43
2.2	Avaliação de caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca	45
2.3	Avaliação da qualidade das sementes produzidas sob diferentes populações de plantas	46
2.4	Análises isoenzimáticas em sementes produzidas sob diferentes populações de plantas	49
2.5	Análises estatísticas	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	Caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca	51
3.2	Qualidade fisiológica de sementes produzidas sob diferentes populações de plantas	57
3.3	Expressões de proteínas em sementes produzidas nas diferentes populações de plantas	61
4	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	CAPÍTULO 3 Desempenho fisiológico e expressão de isoenzimas em sementes de milho submetidas a diferentes potenciais hídricos	70
1	INTRODUÇÃO	72
2	MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1	Instalação e condução dos experimentos	74
2.2	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas a diferentes potenciais hídricos com forma de imposição do estresse hídrico	75
2.3	Análises de proteínas em sementes submetidas aos diferentes potenciais hídricos	77
2.4	Análises estatísticas	79

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1	Qualidade Fisiológica das sementes submetidas aos diferentes potenciais hídricos	80
3.2	Expressão das isoenzimas	85
4	CONCLUSÕES	91
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
	REFERÊNCIAS	93

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é um dos fatores que mais limitam o desenvolvimento de cultivos agrícolas. Mais de 90% da área de milho cultivados no mundo é de sequeiro, e as perdas em produtividade anual em decorrência da seca ficam em torno de 15% do potencial de rendimento total. As perdas são mais intensas em países tropicais que dependem de uma temporada de chuvas relativamente imprevisível para o crescimento da cultura, e menos significativas em áreas temperadas, onde a irrigação é mais comum e a precipitação é mais distribuída ao longo da temporada (EDMEADES, 2008).

No Brasil, os efeitos da estiagem na produção agrícola são evidentes, principalmente na região Nordeste e Sul. No entanto, em outras regiões do país, dependendo da safra agrícola, a estiagem tem causado prejuízos significativos.

No intuito de minimizar esse problema, em programas de melhoramento de plantas têm sido realizadas seleções de cultivares de alto desempenho e ao mesmo tempo tolerantes à seca. A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento de novos genótipos comerciais mais tolerantes ao déficit hídrico (SHAO et al., 2008).

A caracterização precoce de genótipos, por meio de avaliações da qualidade fisiológica de sementes, bem como o estudo dos caracteres associados à tolerância a estresses abióticos, pode fornecer parâmetros que auxiliam a seleção de cultivares produtivas e mais adaptadas nessas condições de estresse.

Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar linhagens de milho visando à tolerância à seca por meio da qualidade fisiológica de sementes e caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estresse hídrico

Todo fator de influência externa, biótico ou abiótico, que causa danos à planta, pode ser considerado um estresse, e a capacidade que a planta apresenta para resistir a tais fatores é chamada de tolerância (TAIZ; ZEIGER, 2004). Vários são os tipos de estresse que podem afetar a produtividade das culturas e até mesmo restringir o cultivo de determinada espécie, entre eles, a alta e baixa temperatura, salinidade e a restrição hídrica (SONG; LEI; TIAN, 2005).

Os diversos tipos de estresses são geralmente relacionados entre si e podem causar danos semelhantes à célula (LANGRIDGE; NICK; GEOFF, 2006; ZHU, 2002) e ainda uma série de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, as quais podem restringir o desenvolvimento da planta e a produtividade final (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003). Em resposta à incidência de um determinado estresse, uma série de eventos acontece nas plantas, o qual se inicia pela percepção desse estresse e finaliza com a expressão de um conjunto de genes-alvo, por meio de rotas e componentes comuns em resposta ao estresse, conferindo a essas plantas uma adaptação a essa determinada condição adversa (PASTORI; FOYER, 2002).

Em programas de melhoramento genético, busca-se a obtenção de genótipos comerciais visando à alta produção de grãos em condições normais de cultivo, no entanto, quando da incidência de estresse hídrico, a produtividade pode ser afetada negativamente (FROVA et al., 1999).

O milho é uma cultura que apresenta extrema sensibilidade a estresses hídricos, principalmente durante a sua fase reprodutiva. O período de maior sensibilidade à deficiência hídrica é no florescimento feminino, mais

precisamente entre 2 dias antes e 22 dias após (BÄNZINGER et al., 2000). O déficit hídrico durante esse período poderá comprometer a produção final. O acúmulo de matéria seca nos grãos está diretamente relacionado com a fotossíntese e uma vez que esse processo é afetado pela limitação hídrica, a assimilação de carboidratos torna-se prejudicada, resultando em menor acúmulo de matéria seca nos grãos (MAGALHÃES et al., 2006).

Quando o estresse hídrico incide nessa fase, são observados os maiores danos. Apenas dois dias de estresse hídrico no florescimento é capaz de diminuir o rendimento em mais de 20%, quatro a oito dias pode provocar mais de 50% de perdas, pois é nessa época em que ocorre a definição do rendimento de grãos (DURÃES et al., 2004). A seca durante esse período pode inibir o florescimento, provocar falhas na fertilização e aborto dos embriões, resultando na queda da produção (WESTGATE, 1994). Observa-se ainda um maior desenvolvimento da inflorescência masculina, o que garante a produção e a liberação do grão de pólen, mas, no entanto, inibe o desenvolvimento da espiga e retarda a emissão dos estilo-estigmas, ocasionando uma assincronia entre os florescimentos (BOYLE; BOYER; MORGAN, 1991; SANGOI, 1996).

O melhoramento vegetal para tolerância ao déficit hídrico pode contribuir também para tolerância a outros tipos de estresses, como deficiência de nitrogênio (KAMARA et al., 2005) e tolerância a altas densidades de plantio.

A escolha da densidade de plantas utilizada em plantios de milho pode ser em função de várias características, tais como cultivar, disponibilidade hídrica, época de plantio, fertilidade do solo, entre outras. No entanto, a disponibilidade hídrica é a mais limitante para a produção (MATZENAUER et al., 2002). Nesse sentido, em programas de melhoramento têm sido realizadas seleções de genótipos de milho que apresentem elevada produtividade em condições de altas densidades de plantio (80 a 100 mil plantas por hectare) e reduzidos espaçamentos entre linhas (DOURADO NETO et al., 2003).

A tolerância ao aumento da densidade de plantio estaria relacionada à tolerância ao estresse hídrico, sem provocar, no entanto, reduções na produtividade em condições normais de umidade (MUGO; EDMEADES; KIRUBI, 2003).

O melhoramento para densidade de plantio é uma prática importante para aperfeiçoar a produtividade de cultivares de milho (CARENA; SANTIAGO; ORDÁS, 1998). Em condições de alta densidade populacional tem-se um aumento na competição por luz, água e nutrientes disponíveis no solo, o que simularia uma condição de estresse hídrico (NAKASEKO; GOTOH; SATO 1978). O adensamento também estimula a dominância apical, isso favorece o desenvolvimento do pendão, causa a esterilidade feminina e reduz o número de espigas por planta e grãos por espiga (SANGOI; SALVADOR, 1998a). O caráter protândrico da espécie é acentuado em condições de altas densidades de plantio, contribuindo para a produção e liberação do grão de pólen em detrimento do desenvolvimento das espigas e estilo-estigmas (SANGOI; SALVADOR, 1998b).

Plantas de milho cultivadas em altas densidades de plantio podem apresentar um atraso na emissão dos estilo-estigmas assim como as plantas submetidas a déficit hídrico. Desse modo, é possível o melhoramento para tolerância à seca em condições normais de umidade por meio de elevadas populações de plantio (BECK et al., 1996; BOLAÑOS; EDMEADES, 1993; SANGOI; SALVADOR, 1996).

2.1.1 Caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca

O melhoramento genético convencional para obtenção de genótipos produtivos em condições de estresse hídrico deve ser realizado em condições experimentais controladas rigorosamente, o que é demorado e trabalhoso

(CÂMARA et al., 2007; KEBEDE et al., 2001; RIBAUT et al., 1997). Portanto, é essencial a utilização de caracteres que estejam relacionados à tolerância ao déficit hídrico e à produção de grãos, os quais possam ser empregados em condições normais de cultivos (CÂMARA et al., 2007).

Os principais caracteres a serem avaliados em programas de melhoramento visando à tolerância a déficit hídrico são a prolificidade, o intervalo entre florescimentos masculino e feminino (IFMF), a senescência retardada das folhas e colmo (*stay green*). Esses caracteres são adequados por serem correlacionados com a produção de grãos em condições de sequeiro, apresentarem, na maioria das vezes, alta herdabilidade, pela facilidade de avaliação em larga escala e por não estarem associados à perda de produtividade em condições ideais de umidade (BÄNZINGER et al., 2000; KAMARA et al., 2003; RIBAUT et al., 1996, 1997).

O intervalo entre os florescimentos masculino e feminino (IFMF) é uma das características mais importantes a ser avaliada visando o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao déficit hídrico (AGRAMA; MOUSSA, 1996; BÄNZINGER et al., 2000; BOLAÑOS; EDMEADES, 1996; XIAO, 2004). O IFMF é uma característica singular e de alta herdabilidade, fácil mensuração e é totalmente independente das diferenças de maturação entre as cultivares (BOLAÑOS; EDMEADES, 1993). O retardamento na emissão dos estilóides, observado na incidência do estresse hídrico durante o florescimento, provoca uma assincronia entre os florescimentos femininos e masculinos (BOLANOS; EDMEADES, 1996; RIBAUT et al., 1996), o que tende a afetar a produção de grãos. Quanto maior for o período de seca menor será a produtividade (RIBAUT et al., 1996; KAMARA et al., 2003).

Baixos valores de intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF) indicam um sincronismo no florescimento, resultante da adaptação a determinado estresse, e está associado ao rendimento de grãos sob condições

adversas (DURÃES et al., 1998). Reduzido IFMF é parcialmente consequência de um maior potencial hídrico da planta durante o florescimento, diminui o abortamento das espigas e apresenta estreita correlação com o número de espigas por planta (BÄNZIGER; EDMEADES; LAFITTE, 2002).

A prolificidade em cultivares de milho tem sido relacionada com a capacidade de adaptação a várias condições de estresses, como aumento da densidade populacional e a tolerância a déficits hídricos (HALLAUER; TROYER, 1972; MOTTO; MOLL, 1983; BOLANOS; EDMEADES, 1993).

A seleção para prolificidade tende a ser eficiente por ser um caráter de alta herdabilidade e correlacionado com a produção de grãos (CARENA; SANTIAGO; ORDÁS, 1998). No entanto, o aumento da prolificidade geralmente ocasiona o quebramento do colmo e acamamento de plantas, características que reduzem a produtividade (THOMISON; JORDAN, 1995). Nesse sentido, faz-se necessário associar a obtenção de cultivares prolíficas juntamente a outras características, tais como a senescência retardada de folhas e colmo (*stay green*), para minimizar os efeitos indesejáveis de quebramento de colmos e o acamamento (CÂMARA et al., 2007).

O caráter *stay green* está associado a várias características desejáveis, tais como maior resistência a pragas e doenças, menor quebramento de colmo, menor acamamento de plantas, maior tolerância ao estresse hídrico (DUVICK; CASSMAN, 1999). Em relação à tolerância ao déficit hídrico, o caráter *stay green* parece ter influência principalmente na etapa de pós-florescimento. Nesse período, a senescência retardada de folhas e colmo provoca um acúmulo de fotoassimilados no final do estágio de enchimento de grãos, facilitando o crescimento da semente. O resultado disso é um maior número de sementes desenvolvidas por espiga, um maior peso médio e um melhor rendimento (ZAIDI et al., 2004). A conservação de uma copa verde ativa e da mobilização de carboidratos estocados no colmo e folhas, após o período de fertilização e

estabelecimento da espiga, é essencial para alta produção de grãos sob estresse terminal (CAMPOS et al., 2004; KAMARA et al., 2003).

Estudando a tolerância à seca na cultura do milho, Chapman e Edmeades (1999) concluíram que os genótipos com elevado *stay-green*, alta prolificidade e reduzido intervalo entre os florescimentos masculino e feminino são menos afetados por estresses hídricos. Essa maior resistência a estresse biótico e abiótico devido à característica de *stay green* pode ser explicada pela prolongação da fotossíntese após o enchimento dos grãos, e o maior fornecimento de carboidratos para colmos, folhas e raízes (CARMO et al., 2007). Segundo Zaidi et al. (2004), o caráter *stay green* esta diretamente relacionado com a tolerância a estresses hídricos após a floração. De acordo com Costa et al. (2008), o caráter *stay-green* em milho interage significativamente com o ambiente.

Em estudos de Betran et al. (2003), foram analisados 12 híbridos de milho e 7 linhagens parentais, relatou-se que as diferenças na produção de grãos entre os híbridos e as linhagens aumentaram com a intensificação do estresse hídrico. A heterose média nos três anos de avaliação foi de 167% para produção de grãos e 53% para o índice de colheita. Dass et al. (2001) avaliando 166 genótipos de milho, compreendidos por linhagens e híbridos, sob diferentes condições de estresse (sem estresse, estresse leve, estresse intermediário e estresse severo), confirmaram que a altura da planta foi afetada severamente com restrição da irrigação, houve aumento no intervalo entre florescimentos com a imposição do estresse e na maioria dos genótipos avaliados, os híbridos foram mais tolerantes em comparação com linhagens na fase da floração e espigamento.

2.2 Influência do estresse hídrico sobre a qualidade fisiológica de sementes

A tolerância a condições de déficit hídrico é variável dependendo do estágio de desenvolvimento da cultura. No entanto, é importante a identificação precoce de genótipos que apresentem tolerância a estresse hídrico, o que justifica o estudo relacionado a esse estresse durante o processo de germinação (THAKUR; SHARMA, 2005).

Durante a germinação das sementes, ocorre uma série de reações de hidrólise e síntese de substâncias e tecidos, as quais exigem plena disponibilidade de água. Além de mediar os processos metabólicos do desenvolvimento, a água é responsável pela manutenção da organização do sistema de membranas celulares (MARCOS FILHO, 2005).

O processo de germinação inicia-se com a absorção de água e a embebição acompanha um padrão trifásico. A velocidade da embebição depende da superfície de contato entre a semente e a água, das condições físicas das sementes, da temperatura e da pressão hidrostática (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; POPINIGIS, 1977). Em condições normais de campo, as sementes de milho absorvem água, intumescem e começam a germinar. A radícula é a primeira a apresentar alongação, seguida pelo coleóptilo com plúmula fechada e as três ou quatro raízes seminais laterais (SILVA et al., 2006).

Déficits hídricos durante o processo de germinação podem impedir a germinação, alterar a velocidade, o tempo e a uniformidade da germinação, comprometendo o estabelecimento da cultura. Deficiências posteriores poderão paralisar o crescimento, bem como retardar o desenvolvimento reprodutivo das plantas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). Entretanto, os níveis de respostas em relação a essas variáveis, dependem tanto do grau de estresse quanto da tolerância ou resistência da espécie (KRANNER et al., 2010).

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

Apesar de ser adquirida durante o desenvolvimento das sementes, a qualidade fisiológica pode ser perdida por processos deteriorativo e, na presença de condições estressantes, a deterioração é um processo inevitável. A perda da viabilidade das sementes durante a deterioração é devido à redução na capacidade de sintetizar proteínas devido ao declínio de compostos como ribossomos, RNA mensageiro e alterações pós-traducionais ocorridas com o envelhecimento das sementes. Nesse sentido, a análise de enzimas relacionadas com o metabolismo de reservas ou biossíntese de novos tecidos são ideais para determinar o estágio de deterioração (VIEIRA et al., 2002). A diminuição da umidade e da temperatura, por exemplo, fazem com que o metabolismo desacelere (VIEIRA et al., 2002). Com a análise de determinadas isoenzimas, é possível identificar pontos iniciais de deterioração e ainda determinar a causa desses eventos e suas consequências (CAMARGO, 2003).

Nos programas de controle de qualidade interno a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho tem sido realizada, principalmente, por meio de testes de germinação, teste de frio e teste de envelhecimento artificial (FARIA et al., 2002) . Além dos testes fisiológicos, em algumas pesquisas, têm sido associadas à expressão de enzimas, por meio da técnica de eletroforese, com a qualidade fisiológica de sementes de milho (BRANDÃO JÚNIOR et al., 1999).

O uso de marcadores isoenzimáticos é justificado pelo fato de que os polimorfismos estão mais perto da expressão fenotípica final do que os

polimorfismos de DNA (SOUZA et al., 2005; TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995), fato explicado pelo novo conceito de gene (RESENDE et al., 2011).

Em milho, a enzima alfa amilase, ao promover a hidrólise do amido, disponibiliza os carboidratos necessários ao desenvolvimento do embrião, possibilitando assim o processo germinativo (FRANCO et al., 2002). A síntese e a secreção dessa enzima no escutelo ocorrem de forma rápida, no máximo até o quarto dia. Já a camada de aleurona tem a capacidade de secretar maior quantidade de α -amilase e por um período de tempo maior. A máxima expressão dessa enzima se dá entre cinco e sete dias e vai gradualmente diminuindo até o fim da germinação (SUBBARAO; DATTA; SHARMA, 1998).

Maior expressão dessa enzima foi observada por Oliveira et al. (2013) em sementes de milho embebidas. Com a embebição das sementes, as enzimas responsáveis pela degradação do amido em sementes de milho são “sintetizadas de novo”, através da ativação pela giberelina liberada na camada de aleurona, a qual é sintetizada no momento da embebição dessas sementes (XIE et al., 2007). No entanto, Oliveira (2013) ressalta também que além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar envolvidos no controle do caráter qualidade fisiológica de sementes, como exemplo, os genes relacionados diretamente com a respiração.

No campo, cerca de 60 a 65% da água disponível no solo encontra-se retida a uma força de -0,03 MPa a -0,50 MPa, estando facilmente disponível às plantas. O restante, contido entre -0,5 e -1,5 MPa, é de difícil absorção, podendo ocasionar sintomas de murcha nas plantas (BÄNZIGER et al., 2000). Pressupõe-se que em solos na capacidade de campo, onde a água está retida a uma tensão de -0,01MPa a -0,04MPa, a germinação ocorra normalmente (MARCOS FILHO, 2005).

Um dos primeiros fatores observados em condições de déficits hídricos é a redução na velocidade de germinação, principalmente em solos com tensões superiores a $-0,2\text{MPa}$ (ROSSETTO, 1997). A queda na porcentagem de germinação é detectada quando a água é retida com tensões superiores a $-0,4$ a $-0,6\text{MPa}$ (ROSSETTO, 1997; SÁ, 1987). Tensões superiores a $-0,8$ a $-1,2\text{MPa}$ impedem a germinação.

A imposição do estresse hídrico em condições de laboratório pode ser feita utilizando-se várias soluções osmóticas, tais como cloreto de potássio, manitol, cloreto de cálcio, polietilenoglicol (PEG). Soluções de polietileno glicol e manitol, compostos não tóxicos e inertes, têm sido usualmente utilizados como agentes osmóticos para simular condições de estresse hídrico (PARMAR; MOORE, 1968). O PEG é um composto quimicamente inerte, considerado como um agente osmótico, constituído por macromoléculas as quais dificultam a absorção de água pelo tegumento (VILLELA; DONI FILHO; SEQUEIRA, 1991)

Ao verificar o grau de tolerância de dois híbridos de milho em relação à restrição hídrica pelos potenciais osmóticos de $-0,3$; $-0,6$; $-0,9$ e $-1,2\text{Mpa}$, Queiroz (2010) relatou que a diminuição do potencial hídrico, simulado pelo polietilenoglicol (PEG 6000), provocou reduções de até 52% no índice de germinação de sementes. Quanto maior foi a restrição hídrica imposta as sementes, menor foi o índice de velocidade de germinação e maior foi o tempo médio gasto para germinação.

Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de quatro cultivares de soja foi avaliada por Meneses (2007), por meio dos potenciais osmóticos $0,0$; $-0,2$; $-0,4$; $-0,6$; $-0,8$; $-1,0\text{MPa}$ impostos pelo PEG 6000. O aumento crescente da concentração de PEG 6000 na solução restringiu a embebição pelas sementes dos genótipos, reduzindo a porcentagem e a velocidade de germinação dos mesmos.

A porcentagem de germinação de 15 genótipos de arroz, estudados por Pirdashti et al. (2003), foi reduzida com o aumento no potencial osmótico em soluções de PEG 6000, de modo em que a germinação foi paralisada em -1,0 MPa.

O efeito do potencial hídrico induzido por PEG 6000 foi avaliado por Braccini et al. (1998), por meio de 7 potenciais diferentes, tendo o autor concluído que ao nível de -0,6MPa a germinação e o vigor de cultivares de soja foram praticamente nulos. Torres et al. (1998) afirmaram que a tensão de -0,4MPa é a ideal para estimar o desempenho de sementes de tomate.

Avaliando a qualidade fisiológica de sementes de híbridos simples de milho-pipoca, sob condição de estresse hídrico induzido por polietileno glicol, Moterle et al. (2008) concluíram que a diminuição do potencial hídrico do substrato é prejudicial à germinação das sementes e ao crescimento das plântulas e a tolerância ao estresse hídrico independe da qualidade inicial das sementes. Também Vaz de Melo et al. (2012) avaliando a germinação e o vigor de sementes de três cultivares de milho-pipoca sob estresse térmico e hídrico, simulado com soluções de PEG 6000, verificaram a redução da porcentagem de germinação, do comprimento da parte aérea e aumento do índice de velocidade de germinação (IVG) com o aumento da restrição hídrica. De acordo com o autor, estresse hídrico provocado pelos potenciais osmóticos abaixo de -0,4 MPa ocasionaram menor velocidade de germinação nas sementes de milho-pipoca.

Embora sejam conhecidos os efeitos gerais do estresse hídrico no crescimento das plantas, os efeitos primários do déficit hídrico em níveis bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005; ZHU, 2002).

Os produtos gênicos induzidos pelo estresse podem ser classificados em três grandes grupos: 1- aqueles que protegem a planta contra os estresses ambientais; 2- aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses e 3- os de funções desconhecidas (SEKI et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

O estresse hídrico desencadeia vários processos bioquímicos e fisiológicos importantes e ainda afeta o sistema de defesa de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica. Esse causa o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como radicais superóxido, H_2O_2 e OH (PASTORI; FOYER, 2002). A formação de eros tem sido relatada por vários autores como produto do estresse biótico e abiótico (FOYER; NOCTOR, 2000; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004). A intensidade do estresse oxidativo em uma célula é determinada pela abundância de eros, principalmente nas formas de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (NOCTOR; FOYER, 1998).

Crescentes evidências indicam que eros também funcionam como moléculas sinalizadoras envolvidas em plantas na regulação do desenvolvimento e respostas de defesa da planta. As plantas protegem suas células e compartimentos subcelulares dos efeitos citotóxicos das EROS com o auxílio de compostos protetores, como glutatona, ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenoides (MITTLER, 2002; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004), além de várias enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO).

Em plantas sob estresse hídrico, observa-se um aumento na atividade dessas enzimas relacionado ao aumento na tolerância à seca (ZHU, 2002). Nesse sentido, o equilíbrio entre essas enzimas antioxidantes é fundamental para a regulação dos níveis de EROS nas células. Nos mecanismos enzimáticos

de destoxificação, a SOD atua como a primeira linha de defesa contra EROS, transformando o superóxido em peróxido de hidrogênio.

A SOD consiste num grupo de metaloenzimas capazes de livrar a célula do processo oxidativo, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos. O peróxido de hidrogênio produzido pela SOD pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT ou, somente a água pela ação da APX. O ascorbato pode reduzir radical livre de oxigênio com ou sem a catálise da APX e pode indiretamente regenerar antioxidantes ligados à membrana como o α -tocoferol (NOCTOR; FOYER, 1998).

A catalase é uma enzima tetramérica encontrada nos peroxissomos, que são organelas especializadas. Essa enzima tem a função de consumir o peróxido de hidrogênio produzido em condições estressantes e ainda remover as EROS (MALLICK; MOHN, 2000).

Estresses bióticos e abióticos, tais como estresse hídrico, estresse salino, incidência de altas temperaturas e infestação por patógenos tem sido relacionados ainda com alterações no padrão de síntese de proteínas específicas (ARAÚJO; MARGIS-PINHEIRO; RUMJANEK, 1998). No entanto, para cada tipo de estresse existe uma especificidade na síntese proteica.

Alguns genes de proteases têm sua expressão regulada por estresse osmótico e suas enzimas têm a função de promover a limpeza de outras proteínas degradadas durante o estresse, entre elas a ubiquitina, proteína que marca outras proteínas alvos da degradação proteolítica e as proteínas do choque térmico que protegem as proteínas desativadas por desidratação. Proteínas do choque térmico (HSPs – *Heat Shock Proteins*) são específicas ao estresse de altas temperaturas, mas a sua síntese também é induzida em condições de déficit hídrico (ARAÚJO; MARGIS-PINHEIRO; RUMJANEK, 1998). Em uma pesquisa realizada com linhagens de milho contrastantes em relação à tolerância a estresse hídrico e térmico, verificaram-se diferenças no

padrão de síntese de HSPs. Uma HSP de 45 kDa foi observada apenas nas plantas tolerantes (RISTIC; GIFFORD; CASS, 1991).

Proteínas LEA podem apresentar função importante da proteção e estabilização da membrana celular, retendo água e evitando a cristalização de moléculas durante a desidratação (TAIZ; ZEIGER, 2004). Enquanto as proteínas LEA são principalmente ativas durante o desenvolvimento das sementes, seus respectivos genes são também induzidos em resposta ao estresse hídrico e estresse ao frio, em fase vegetativa e estruturas reprodutivas (BOSTOCK; QUATRANO, 1998).

3 CONCLUSÕES

Os caracteres prolificidade, *stay green*, intervalo entre florescimentos feminino e masculino podem ser usados na avaliação indireta para tolerância à seca.

O estudo precoce da tolerância à seca é possível com a restrição hídrica imposta a semente por meio de substâncias osmóticas.

REFERÊNCIAS

AGRAMA, H. A.; MOUSSA, M. E. Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) **Euphytica**, Wageningen, v. 91, n. 1, p. 89-97, 1996.

ARAÚJO, J. L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N. G. **Proteínas de choque térmico e tolerância a altas temperaturas em plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 27 p. (Documentos, 80).

BÄNZINGER, M. et al. **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize**: from theory to practice. Mexico: CIMMYT, 2000. 68 p.

BECK, D. et al. Progresso no desenvolvimento de tolerância à seca e nitrogênio baixo do solo na cultura do milho. In: CONFERÊNCIA ANUAL DE MILHO e SORGO PESQUISA, 51., 1996. Chicago. **Anais ...** Washington: Semente Americana da Associação Comercial, 1996. p. 85-111.

BETRAN, F. J. et al. Genetic analysis of inbred and hybrids grain yield under stress and non stress environments in tropical maize. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 807-817, 2003.

BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass, and radiation utilization. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 31, p. 233-252. 1993.

BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 65-80, 1996.

BOSTOCK, R. M.; QUATRANO, R. S. Regulation of em gene expression in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, p. 356-1363, 1998.

BOYLE, M. G.; BOYER, J. S.; MORGAN, P. W. Stem infusion of liquid culture-medium prevents reproductive failure of maize at low water potential. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1246-1252, 1991.

BRACCINI, A. L. et al. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 9, p. 1451-1459, 1998.

BRANDÃO JUNIOR, 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.

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

CAMPOS, H. et al. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 19-34, 2004.

CARENA, M. J.; SANTIAGO, I.; ORDÁS, A. Direct and correlated responses to recurrent selection for prolificacy in maize at two plant densities. **Maydica**, Bergamo, v. 43, n. 2, p. 95-102, 1998.

CARMO, S. L. M. et al. Avaliação do “stay green” em famílias segregantes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 953-957, 2007.

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

CHAPMAN, S. C.; EDMEADES, G. O. Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: direct and correlated responses among secondary traits. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1315-1324, 1999.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

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

DASS, S. et al. Morphological traits determining drought tolerance in maize. **Indian Journal of Agricultural Research**, Haryana, v. 35, p. 190-193, 2001.

DOURADO NETO, D. D. et al. Efeito da população de plantas e do espaçamento sobre a produtividade de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, p. 63-77, 2003.

DURÃES, F. O. M. et al. **Fenotipagem associada à tolerância a seca em milho parauso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores**. Sete Lagoas: Embrapa, 2004. 17 p. (Circular Técnica, 39).

DURAES, F. O. M. et al. Intervalo entre florescimentos masculino e feminino como parâmetro fenotípico útil ao melhoramento de milho tropical para tolerância à seca. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Resumos...** Recife: IPA, 1998. p. 27.

DUVICK, D. N.; CASSMAN, K. G. Post-green revolution trends in yield potential of temperature maize in the North-Central United States. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 6, p. 1622-1630, 1999.

EDMEADES, G. **Drought tolerance in maize: an emerging reality**. Ithaca: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, 2008. (ISAAA Brief, 39).

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: _____. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 21-54.

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

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, Cambridge, v. 146, p. 359-388, 2000.

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

FROVA, C. et al. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 280-288, 1999.

HALLAUER, A. R.; TROYER, A. F. Prolific corn hybrids and minimizing risk of stree. In: ANNUAL HYBRID CORN INDUSTRY – RESEARCH CONFERENCE, 27., 1972, Chicago. **Proceedings...** Washinton: ASTA, 1972. p. 1-19.

KAMARA, A. Y. et al. Performance of diverse maize genotypes under nitrogen deficiency in the northern Guinea savana of Nigeria. **Experimental Agriculture**, New York, v. 41, n. 2, p. 199-212, 2005.

KAMARA, A.Y. et al. Reproductive and stay-green trait responses of maize hybrids, improved open-pollinated varieties and farmers' local varieties to terminal drought stress. **Maydica**, Bergamo, v. 48, n. 1, p. 29-37, 2003.

KEBEDE, H. et al. Quantitative trait loci influencing drought tolerance in grain sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 103, p. 266-176, 2001.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 655-673, 2010.

LANGRIDGE, P.; NICK, P.; GEOFF, F. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, London, v. 4, p. 343-354, 2006.

MAGALHÃES, P. C. **Fisiologia da produção do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica, 76).

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactiveoxygenspecies: response to alga cells. **Journal of PlantPhysiology**, Stuttgart, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

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

MATZENAUER, R. et al. **Consumo de água e disponibilidade hídrica para milho e soja, no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fepagro, 2002. 105 p. (Boletim Fepagro, 10).

MENESES, C. H. S. G. **Potencial hídrico induzido por polietilenoglicol-6000 na qualidade fisiológica de sementes de algodão**. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Philadelphia, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOTERLE, L. M. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1810-1817, nov./dez. 2008.

MOTTO, M.; MOLL, R. H. Prolifacy in maize: a review. **Maydica**, Bergamo, v. 28, p. 53-76, 1983.

MUGO, S. N.; EDMEADES, G. O.; KIRUBI, D. T. Genetic improvement for drought tolerance increases tolerance to high plant density in tropical maize under low input levels. In: ARNEL R. HALLAUER INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON PLANT BREEDING, 1., 2003, Mexico. **Book of Abstracts...** Mexico: CIMMYT, 2003. p. 50-51.

NAKASEKO, K.; GOTOH, K.; SATO, H. Phisio-ecological studies on prolificacy in maize . **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 212-220, 1978.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

OLIVEIRA, G. E. et al., Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, Jan./Feb. 2013.

PARMAR, M. T.; MOORE, R. P. Carbowax 6000, mannitol and sodium chloride for simulating drought conditions in germination studies of corn (*Zea mays* L.) of strong and weak vigor. **Agronomy Journal**, Madison, v. 60, n. 1, p. 192-195, 1968.

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

PIRDASHTI, H. et al. Effect of water stress on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Pakistan Journal of Agronomy**, Faisalabad, v. 2, n. 4, p. 217-222, 2003.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica**. 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RESENDE, K. F. M. et al. Implication of the changing concept of genes on plant breeder's work. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 11, n. 4, p. 345-351, Dec. 2011.

RIBAUT, J. M. et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize: flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 7, p. 905-914, 1996.

RIBAUT, J. M. et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize: yield components and marker-assisted selection strategies. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 887-896, 1997.

RISTIC, Z.; GIFFORD, D. J.; CASS, D. D. Heat shock proteins in two lines of *Zea mays* L. that differ in drought and heat response. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 97, p. 1430-1434, 1991.

ROSSETTO, C. A. V. et al. Comportamento das sementes de soja durante a fase inicial do processo de germinação. **Sciência Agrícola**, Piracicaba, v. 54, p. 1-2, jan./ago. 1997.

SÁ, M. E. **Relações entre qualidade fisiológica, disponibilidade hídrica e desempenho de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1987. 147 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1987.

SANGOI, L.; SALVADOR, R. J. Influência da altura da planta e número de folhas na produção do milho em densidades elevadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 297-306, 1998a.

SANGOI, L.; SALVADOR, R. J. Performance agronômica de genótipos de milho malesterile e fértil em duas populações de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 377-388, 1996.

SANGOI, L.; SALVADOR, R. J. Susceptibilidade à seca de milho em floração: Uma nova abordagem para superar o problema. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 699-706, 1998b.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 279-292, Aug. 2002.

SHAO, H. et al. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 215-225, 2008.

SILVA, P. R. F. et al. **Arranjo de plantas e sua importância na definição da produtividade em milho**. Porto Alegre: Evangraf, 2006. 63 p.

SONG, S. Q.; LEI, Y. B.; TIAN, X. R. Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 52, n. 6, p. 897-904, 2005.

SOUZA, R. et al. Atividade isoenzimática em plantas de trigo infectadas com o vírus SBWMV. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 845-852, set. 2005.

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

TAIZ, E.; ZEIGER, L. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THAKUR, M.; SHARMA, A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. **Journal of Arid Environments**, London, v. 62, p. 517–523, 2005.

THOMISON, P. R.; JORDAN, D. M. Plant population effects on maize hybrids differing in ear growth habit and prolificacy. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 8, n. 3, p. 394-400, July/Sept. 1995.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 87 p.

TORRES, S. B. et al. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de tomate pelo teste de estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 653-657, maio 1998.

VAZ DE MELO, A. et al. Germinação e vigor de sementes de milho-pipoca submetidas ao estresse térmico e hídrico. **Biosciência Jornal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 687-695, set./out. 2012.

VIEIRA, R. D. et al. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1333-1338, set. 2002.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1957-1968, 1991.

WANG, X.; VINO CUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 1-14, 2003.

WESTGATE, M. E. Seed formation in maize during drought. In: BOOTE, K. J. et al. (Ed.). **Physiology and determination of crop yield**. Madison: Wisconsin, 1994.

XIAO, Y. N. et al. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for flowering time using SSR marker in maize under water stress. **Korean Journal of Genetics**, Seoul, v. 26, n. 4, p. 405- 413, 2004.

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

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

ZAIDI, P. H. et al. Gains from improvement for mid-season drought tolerance in tropical maize (*Zea mays* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 135-152, Sept. 2004.

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

CAPÍTULO 2

Avaliação de linhagens de milho quanto à tolerância à seca

RESUMO

A seleção de genótipos que apresentam caracteres relacionados à tolerância à seca é importante em programas de melhoramento de plantas. Alta prolificidade, *stay green*, o reduzido intervalo entre florescimento masculino e feminino estão entre os caracteres mais utilizados para seleção indireta para a tolerância à seca. O objetivo nesta pesquisa foi avaliar cinco linhagens de milho do programa de melhoramento da empresa Geneseeds Recursos Genéticos Ltda., quanto à tolerância à seca cultivadas em quatro populações de plantio, 40, 60, 80 e 100 mil plantas ha⁻¹. Nessas condições foram avaliados os seguintes caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca: *stay green*, prolificidade, intervalo entre os florescimentos feminino e masculino. Foi avaliada também a qualidade fisiológica das sementes e a expressão das enzimas alfa amilase, esterase, catalase, superóxido desmutase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase e proteínas resistentes ao calor. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, no esquema de parcelas subdivididas. Houve diferenças entre as linhagens para todos os caracteres analisados. As linhagens 63, 64 e 91 foram as que apresentaram maiores valores de produtividade e prolificidade e nas 63, 64, 54 e 91 foram observados os menores valores de intervalo entre os florescimentos masculino e feminino. Não houve a influência das populações de plantas sobre a qualidade fisiológica de sementes de milho, sendo que os maiores valores de germinação e vigor foram observados em sementes das linhagens 64, 44 e 91. As linhagens 63, 64 e 91 são consideradas promissoras quanto à tolerância à seca.

Palavras-chave: Estresse abiótico. Florescimento. População de plantas. Seleção indireta.

ABSTRACT

Plant breeding programs have been carrying out the selection of genotypes that exhibit traits related to drought tolerance. High prolificacy, stay green, and a reduced interval between male and female flowering are among the traits most used for indirect selection for drought tolerance. The objective of this research was to evaluate five maize lines from the maize breeding program of the company Geneseeds Recursos Genéticos Ltda, as drought tolerance, grown at four plant densities, 40, 60, 80 and 100 thousand plants ha⁻¹. In these conditions, the following characters evaluated indirectly related to drought tolerance: prolificacy, stay green and interval between female and male flowering, as related to drought tolerance. We also evaluated the physiological quality of seeds and expression of the enzymes alpha amylase, esterase, catalase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase, and heat resistant proteins. The experiment was conducted in a randomized block design in a split plot layout. There were differences between the lines for all traits analyzed. Lines 63, 64 and 91 showed the greatest yields and prolificacy, and lines 63, 64, 54 and 91 had the lowest intervals between male and female flowering. There was no influence of planting densities on the physiological quality of maize seeds, and the highest values of germination and seed vigor were observed in lines 64, 44 and 91. Lines 63, 64 and 91 are considered as promising for drought tolerance.

Keywords: Abiotic stress. Flowering. Plant population. Indirect selection.

1 INTRODUÇÃO

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é um dos fatores que mais limitam o desenvolvimento de cultivos agrícolas. Assim, em programas de melhoramento de plantas têm sido selecionadas cultivares com alta produtividade e ao mesmo tempo tolerantes ao estresse hídrico. Para isso, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são fundamentais no desenvolvimento dessas novas cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico (SHAO et al., 2008).

Nesse sentido, o uso de caracteres que se correlacionem indiretamente com a tolerância a estresses hídricos, pode melhorar a eficiência de seleção de cultivares com tolerância à seca. Vários são os caracteres indiretos, fatores fenotípicos e de fácil visualização que se relacionam com essa característica, tais como alta prolificidade, *stay green*, reduzido intervalo entre florescimento masculino e feminino (BÄNZINGER et al., 2000; KAMARA et al., 2003). De acordo com Mugo, Edmeades e Kirubi (2003), o aumento da tolerância à seca ocorre simultaneamente ao aumento da tolerância a altas densidades populacionais, sem que ocorram perdas em produtividade.

Também a caracterização precoce de genótipos, quanto à tolerância à seca, por meio de avaliações da qualidade fisiológica de sementes pode auxiliar na seleção de cultivares com tolerância à seca.

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

processos deteriorativo e, na presença de condições estressantes, a deterioração é um processo inevitável.

A caracterização de genótipos por meio dos caracteres associados à tolerância a estresse abiótico e avaliações da qualidade fisiológica de sementes podem reduzir os custos e tornar prática a seleção, além de fornecer parâmetros que auxiliarão na seleção de novos genótipos.

Nesse sentido, os objetivos neste trabalho foram avaliar o desempenho de linhagens de milho, cultivadas em quatro populações de plantio por meio de caracteres indiretos relacionadas com a tolerância à seca; avaliar a qualidade fisiológica de sementes de cinco linhagens de milho produzidas em quatro populações de plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução dos experimentos

O trabalho foi conduzido na área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), município de Lavras, MG, a 910 m de altitude, latitude de 21°14'S e longitude de 45°00 W.

O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, fase Cerrado e 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 multiplicação e avaliação das sementes de cinco linhagens de milho, 63, 54, 64, 44 e 91, genótipos provenientes do programa de melhoramento de milho da empresa Geneseeds Recursos Genéticos Ltda.

Foram utilizadas quatro populações de plantas, 40, 60, 80 e 100 mil plantas.ha⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento em Blocos Casualizados, com três repetições, no esquema de parcelas subdividas no espaço, sendo as linhagens dispostas nas parcelas principais, sendo cada parcela composta por 4 linhas com 16 metros, no espaçamento de 0,8m entre linhas. Nas subparcelas foram trabalhadas as diferentes populações de plantas, compostas por 4 linhas com 4 metros de comprimento cada. Foi considerada parcela útil as duas linhas de semeadura centrais de cada parcela.

A semeadura foi realizada em 18/11/2011 e após 30 dias foi realizado o desbaste para o ajuste da população de plantas. Todos os tratos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com a necessidade da cultura. Os

dados climáticos de temperatura média e precipitação durante a condução do experimento estão representados no Gráfico 1.

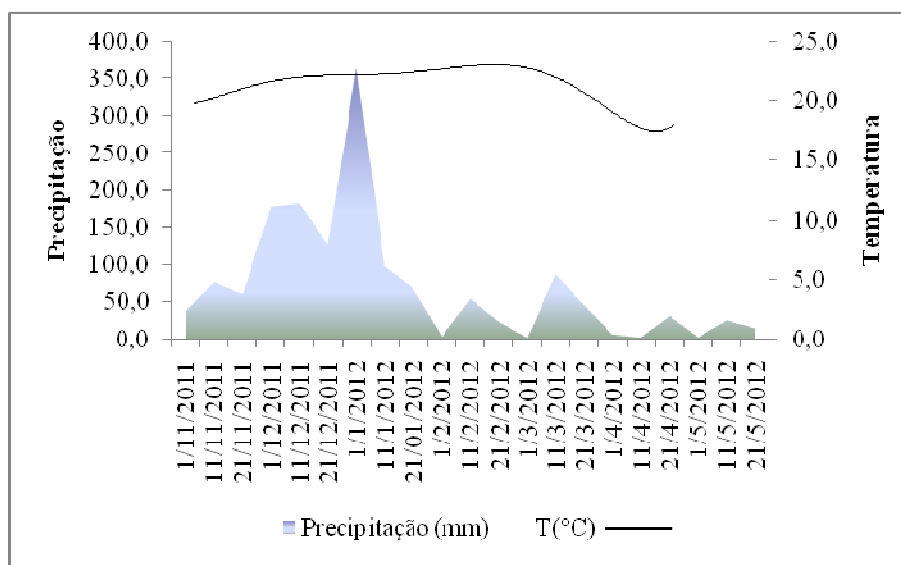


Gráfico 1 Dados climáticos de precipitação (mm) e temperatura média (°C)

Por ocasião do florescimento, as plantas das duas linhas da bordadura foram autofecundadas para multiplicação das sementes e posterior avaliação da qualidade fisiológica das sementes. Para isso, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando havia receptividade dos estilo-estigmas, os pendões da respectiva planta eram cobertos com saco de papel para evitar a contaminação genética, e no dia seguinte as plantas foram autofecundadas manualmente.

A colheita dos grãos foi realizada em 10/05/2012. As espigas das parcelas úteis foram colhidas e despalhadas manualmente quando a umidade dos grãos atingiu aproximadamente 20% e debulhadas em trilhador de espigas e secadas a sombra.

As espigas provenientes de autofecundação foram colhidas manualmente, secadas em secador de espigas a 35°C até as sementes atingirem o teor de água de 13%. A debulha foi realizada manualmente e as sementes foram classificadas em peneiras de crivos circulares. Foram utilizadas as sementes que ficaram retidas nas peneiras 19/64 e 20/64. Posteriormente as sementes foram armazenadas em câmara fria a 10°C até o momento das análises fisiológicas e enzimáticas.

2.2 Avaliação de caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca

Foram avaliados os seguintes caracteres:

- a) **florescimento Masculino e Feminino:** foi determinado pelo número de dias da semeadura até que 50% das plantas de cada parcela tivessem, respectivamente, antese e estilo-estigmas visíveis. Definiu-se o florescimento masculino como a data da liberação do pólen e o florescimento feminino quando os estilo-estigmas atingiram 1 cm de comprimento;
- b) **intervalo entre os florescimentos feminino e masculino em dias (IFMF):** o intervalo entre os florescimentos foi determinado em dias pela diferença da semeadura aos florescimentos feminino e masculino. Para eliminar os possíveis valores negativos, os quais dificultariam a análise de variância, foi adicionada a todos os valores de IFMF uma constante de valor 100;
- c) **stay green:** avaliado a partir da maturidade fisiológica dos grãos, aos 125 dias após o semeadura, por uma escala de notas de 1 a 5, conforme metodologia sugerida por Costa et al. (2008) em que a nota 1 referiu-se às plantas com todas as folhas acima da espiga e

pelo menos duas folhas verdes abaixo da espiga; nota 2, às plantas em que todas as folhas acima da espiga estivessem verdes; nota 3, às plantas em que duas folhas acima da espiga estivessem secas e as demais verdes; nota 4, às plantas em que duas folhas no ápice da planta estivessem verdes; e nota 5, às plantas em que todas as folhas estavam secas. As notas foram atribuídas a todas as plantas da parcela de maneira geral, de 7 em 7 dias, até atingir a nota máxima. Para análise, foi utilizada a média das notas corrigidas pela data do florescimento feminino de cada linhagem;

- d) **prolificidade**: referiu-se ao número médio de espigas por planta em cada parcela;
- e) **produtividade de grãos**: obtida por meio da transformação do peso de grãos obtido na área útil da parcela, expresso em kg ha^{-1} , corrigidos para o grau de umidade de 13%;
- f) **peso de 100 grãos**: foram determinados os pesos de seis amostras de 100 grãos, da produção final de cada parcela, corrigidos para o grau de umidade de 13%.

2.3 Avaliação da qualidade das sementes produzidas sob diferentes populações de plantas

Para a avaliação da qualidade fisiológica, foram utilizadas as sementes produzidas nas três repetições do campo (60 parcelas), separadamente. No laboratório, cada repetição se transformou em duas subamostras, totalizando seis repetições. Após condução dos testes foram consideradas as médias das duas subamostras.

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°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).

As sementes foram tratadas com o fungicida VITAVAX-THIRAM 200 SC, na dosagem de 3 ml/kg de sementes, antes da realização dos testes.

A avaliação da qualidade das sementes foi feita pelos seguintes testes:

- a) **germinação:** foi realizado com seis subamostras de 50 sementes para cada tratamento, em papel toalha, tipo Germitest, na forma de rolo, umedecido com água na quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. A germinação foi realizada à temperatura constante de 25°C e as avaliações foram feitas aos quatro e sete dias após a semeadura, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009);
- b) **índice de velocidade de germinação:** avaliado diariamente a partir do 2º dia, efetuado em conjunto com o teste de germinação. Foi adotado como parâmetro para a avaliação o número de plântulas que atingiram no mínimo 3 cm de parte aérea e 4 cm de raiz, até a estabilização. O índice de velocidade de germinação através da expressão de Maguire (1962);
- c) **envelhecimento acelerado:** o método utilizado foi o de minicâmaras do tipo "gerbox" onde seis subamostras de 50 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 40°C. Após a incubação foi avaliado o teor de água das sementes. Em seguida, foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente. As avaliações foram realizadas aos quarto e sétimo dias após semeadura, contabilizando o porcentual de plântulas normais;

- d) **velocidade de germinação em sementes envelhecidas:** avaliada a partir do 4º dia, efetuado em conjunto com o teste de envelhecimento acelerado. Foi adotado como parâmetro para avaliação, o número de plântulas que atingiram no mínimo 3 cm de parte aérea e 4cm de raiz, até a estabilização. Posteriormente, foi determinado o índice de velocidade de germinação pela da expressão proposta por Maguire (1962);
- e) **teste de frio sem solo:** seis subamostras de cinquenta sementes por repetição foram distribuídas em papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada numa proporção de três vezes o seu peso seco. Os rolos foram confeccionados como no teste de germinação e após a semeadura foram acondicionados no interior de sacos plásticos e mantidos em câmara fria regulada a 10°C durante sete dias. Em seguida foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente. As avaliações foram realizadas aos quarto e sétimo dias após semeadura, contabilizando o percentual de plântulas normais;
- f) **velocidade de germinação em sementes submetidas ao teste de frio:** avaliada a partir do 3º dia, efetuada em conjunto com o teste de frio. Foi adotado como parâmetro na avaliação, o número de plântulas que atingiram no mínimo 3 cm de parte aérea e 4 cm de raiz, até a estabilização. Posteriormente, foi determinado o índice de velocidade de germinação pela da expressão proposta por Maguire (1962).

2.4 Análises isoenzimáticas em sementes produzidas sob diferentes populações de plantas

Para cada população de plantas foram utilizadas duas amostras de 50 sementes de cada linhagem. As amostras foram maceradas manualmente em almofariz, na presença de antioxidante PVP (Polivinilpirrolidona) e em nitrogênio líquido e armazenadas em *deep freezer* a -86°C . Para a extração das isoenzimas esterase (EST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e malato desidrogenase (MDH), foram adicionados 250 μl do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0) e 0,1% de β -mercaptoentanol às subamostras de 100mg do material macerado. O material foi colocado em geladeira por 12 horas e depois centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C . A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontínuo (7,5% gel de separação e 4,5% gel de concentração). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados na canaleta do gel 50 μl de cada sobrenadante e a corrida realizada aos 4°C a 150V, por 4 horas. Ao término da corrida, os géis foram revelados na presença dos substratos específicos para as determinadas enzimas (ALFENAS, 1998).

Para a extração da enzima α -amilase, as sementes foram colocadas para germinar em rolo de papel por um período de 70 horas. Decorrido esse período, os eixos embrionários e escutelos das sementes foram descartados e os endospermas restantes foram triturados a frio, em almofariz, na presença de nitrogênio líquido. Para a extração, 200mg do pó das sementes foram ressuspensos em 600 μl do tampão de extração (Tris-HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,4% PVP). A revelação foi feita aplicando-se 40 μl do extrato proteico em cada canaleta, nos géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador – contendo amido) e 4,5% (gel concentrador).

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, foram adicionados às amostras já maceradas a 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 14000rpm 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 70µL de extrato + 40µL de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50µL do extrato com proteínas resistentes ao calor + 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* 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 1998).

2.5 Análises estatísticas

Para as análises fisiológicas foi feita a média dos dados para as duas subamostras de cada uma das 3 repetições no esquema de parcelas subdividas no espaço. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias dos tratamentos para todos os testes foi feita pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Sisvar® (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracteres indiretos relacionados à tolerância à seca

Pelo resultado da análise de variância (Tabela 1), observa-se diferenças significativas para linhagens em relação a todos os caracteres analisados.

Nas diferentes populações de plantas, houve diferenças significativas para produção, prolificidade, florescimento feminino e intervalo entre florescimento masculino e feminino.

Não houve interação significativa entre linhagens e populações de plantio, ou seja, as linhagens se comportaram de maneira semelhante em todas as populações de plantio analisadas.

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos dados obtidos para os caracteres de produção peso de 100 grãos (P100), prolificidade (Prol.), *stay green* (Stay G.), florescimento masculino (FM), florescimento feminino (FF) e intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF)

Fatores	GL	QM						
		Prod. (kg/ha)	P100 (g)	Prol.	Stay G.	FF	FM	IFMF ¹
Linhagem	4	11878367,6**	152,08**	0,14*	8,13**	231,14**	141,90**	34,15**
Bloco	2	2092424,7	0,25	0,05	0,02	1,55	1,35	0,20
Erro 1	8	792958,1	2,77	0,03	0,01	1,22	0,85	0,51
Pop. de plantas	3	6290913**	3,16	0,26**	0,05	6,64**	0,49	3,93**
Linha*Pop.	12	428992,5	1,85	0,01	0,05	0,49	0,49	0,3
Erro 2	30	333073,8	1,37	0,01	0,03	0,68	0,5	0,40
CV 1(%)		21,61	6,29	17,02	2,78	1,35	1,14	0,71
CV 2 (%)		14,00	4,42	11,60	4,48	1,01	0,88	0,63

*, **Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste F

¹ dados transformados em (x+100) para análise estatística

Em relação à produtividade (kg.ha^{-1}) (Tabela 2) observa-se a superioridade das linhagens 63, 64 e 91 em relação às demais. Nas populações de 100.000 e 80.000 plantas ha^{-1} foram observados maiores produtividades, fato que já era esperado em razão do maior número de plantas.

Para o peso de 100 grãos, nas linhagens 63 e 64 verificou-se as maiores médias, seguidas das linhagens 54 e 44. O menor peso médio de 100 grãos foi observado para a linhagem 91. Não houve diferenças entre as populações de plantas.

Tabela 2 Médias para produção, peso de 100 grãos (P100), prolificidade, *stay green*, dias para o florescimento feminino, dias para o florescimento masculino e intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF)

Linhagem	Produção (kg/ha)	P100 (g)	Prolif.	Stay Gr.	FF	FM	IFMF
63	5212 a	30,66 a	1,05 a	4,44 c	78,0 b	78,7 b	-0,7 a
54	2849 b	25,90 b	0,89 b	5,00 e	76,0 a	76,4 a	-0,4 a
64	4683 a	29,50 a	1,07 a	3,90 b	84,5 d	83,2 c	1,3 b
44	3312 b	23,98 b	0,88 b	2,95 a	86,2 e	83,2 c	3,0 c
91	4547 a	22,29 c	1,12 a	4,81 d	83,4 c	84,4d	-1,0 a
Populações de plantas	Produção	P100	Prolificidade	<i>Stay Green</i>	FF	FM	IFMF
40.000	3376 b	27,11 a	1,19 a	4,19 a	80,9 a	81,1 a	-0,1 a
60.000	3808 b	26,46 a	1,00 b	4,17 a	81,3 a	81,1 a	0,2 a
80.000	4495 a	26,23 a	0,92 c	4,23 a	81,9 b	81,1 a	0,7 b
100.000	4804 a	26,07 a	0,89 c	4,30 a	82,5 b	81,5 a	1,0 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, estatisticamente pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade

Maiores valores de prolificidade (Tabela 2) foram observados para as linhagens 63, 64 e 91, seguido pelas linhagens 54 e 44. Dentre as populações analisadas, a de 40 mil plantas ha^{-1} resultou em maiores valores de prolificidade. Populações de 80 e 100 mil plantas ha^{-1} proporcionaram menores valores de prolificidade. De acordo com Bolaños e Edmeades (1993), cultivares de milho que apresentem prolificidade elevada têm mais condições de se adaptar em ambiente com estresse, tais como altas densidades de semeadura. No entanto, a seleção para esse caráter isoladamente poderia ocasionar efeitos indesejáveis em outras características (JAMPATONG et al., 2000), tornando-se necessária a seleção para tolerância a estresse baseada em um conjunto de características, possibilitando a aplicação dos benefícios da prolificidade.

Menor *stay green* foi encontrado para a linhagem 44, seguida pela 64. Dentre as diferentes populações de plantas não houve diferenças significativas.

Segundo Zaidi et al. (2004), o caráter *stay green* está diretamente relacionado com a tolerância a estresses hídricos após a floração.

Ao comparar os dados de produção e de *stay green* não se observou relação entre os caracteres, uma vez que a maior produtividade foi observada para as linhagens 63, 64 e 91 e as respectivas notas para *stay green* foram 4,44; 3,90 e 4,81, respectivamente. De acordo com Zaidi et al. (2004), maior *stay green* estaria relacionado com um maior número de sementes desenvolvidas por espiga, um maior peso médio e um melhor rendimento, resultado esse que não foi observado nesta pesquisa.

No que se diz respeito ao intervalo entre florescimento feminino e masculino, menores valores foram encontrados para as linhagens 63, 54 e 91, seguidas pelas 44 e 64. Nas populações de 40 e 60 mil plantas ha^{-1} observaram-se os menores valores para esse caráter, ao contrário das populações de 80 e 100 mil ha^{-1} , onde se observou os maiores índices de IFMF. Baixos valores de IFMF retratam um sincronismo no florescimento, o que pode garantir uma adaptação a

determinado estresse e a maior produção de grãos nessas condições (DURÃES et al., 1998).

O maior intervalo de florescimento entre os parentais masculino e feminino pode inviabilizar a produção de sementes híbridas uma vez que o sincronismo de florescimento entre as plantas dos parentais é necessário para garantir o cruzamento.

A viabilidade dos estilo-estigmas da maioria dos genótipos de milho ocorre em torno de 14 dias e a partir de 2 a 3 dias após a liberação dos grãos de pólen com duração entre cinco a oito dias após a antese (VIANA et al., 1999). Assim, valores negativos de IFMF indicam que a emissão dos estilo-estigmas ocorreram antes do início da polinização, garantindo que o processo de fertilização seja otimizado.

Ao analisar os dados de florescimento masculino, não houve diferenças desses entre as diferentes populações de plantas (Tabela 2). No entanto, para o florescimento feminino, o aumento na população teve influência aumentando-se o período para a emissão dos estilo-estigmas. A ocorrência de estresse durante o florescimento pode atrasar a liberação dos estilo-estigmas, entretanto a liberação do pólen pouco é influenciado por esse processo (RIBAUT et al., 1996).

Observa-se nas linhagens com menores valores de IFMF, 63 e 91, também os maiores valores de prolificidade. Segundo Bänziger, Edmeades e Lafitte (2002), reduzido IFMF diminui o abortamento das espigas e apresenta estreita correlação com número de espigas por planta.

3.2 Qualidade fisiológica de sementes produzidas sob diferentes populações de plantas

O grau de umidade médio das sementes no momento da realização dos testes foi de 12,2 com variação máxima de 1%.

Pelo resumo da análise de variância (Tabela 5) para os dados obtidos nos testes para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes observa-se efeito significativo apenas para o fator linhagens, com exceção para o índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes submetidas ao envelhecimento acelerado.

Não houve efeito significativo para a interação entre linhagens e população de plantio, demonstrando que não houve influência da população de plantas na qualidade fisiológica das sementes.

Tabela 3 Resumo da análise de variância dos dados observados nos testes de germinação, envelhecimento acelerado e para o teste frio de sementes das linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91, produzidas sob diferentes populações de plantas

Fatores	GL	QM								
		Germinação			Envelhecimento acelerado			Teste frio		
		4 dias	7 dias	IVG	4 dias	7 dias	IVG	4 dias	7 dias	IVG
Linhagem	4	33,6*	21,3*	66,7*	52,1*	27,4*	50,9	24,0*	17,4*	182,2*
Bloco	2	8,9	2,3	9,9	4,5	1,9	18,7	2,3	2,1	3,4
Erro 1	8	5,9	5,1	3,2	4,7	1,0	22,2	4,4	2,4	7,0
População de plantas	3	1,2	0,3	15,3	8,6	0,7	7,1	0,4	0,5	26,2
Lin.*Pop.	12	4,9	2,9	4,6	8,4	1,3	11,2	2,9	2,4	11,6
Erro 2	30	4,0	3,7	7,0	12,7	3,6	12,2	4,0	3,2	18,7
CV 1 (%)		2,51	2,3	6,7	2,2	1,0	16,7	2,1	1,6	6,0
CV 2 (%)		2,05	2,0	9,9	3,6	1,9	12,3	2,1	1,8	9,9

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

As médias dos dados obtidos nos testes para avaliação da qualidade fisiológica estão representadas na Tabela 4.

Pelos resultados do teste de germinação aos 4 e 7 dias, foi possível diferenciar as linhagens em 2 classes, sendo as linhagens 64, 44 e 91 superiores em relação às linhagens 63 e 54. Maiores valores de IVG foram observados em sementes das linhagens 54 e 91.

Na condução do teste de envelhecimento acelerado, foi avaliado o grau de umidade das sementes antes e após o período de incubação (Tabela 5). Houve uniformidade na embebição das sementes para todos os lotes analisados. De acordo com Marcos Filho (2005), variações entre 3 e 4% entre as amostras são toleráveis para o teste de envelhecimento acelerado.

Pelos resultados desse teste, observa-se maior vigor aos 4 dias em sementes das linhagens 91, 44, 64 e 54 e aos 4 dias para as sementes das linhagens 91, 44 e 64. Quanto ao IVG avaliado em sementes envelhecidas não foi possível diferenciar as linhagens. O envelhecimento acelerado de sementes é um teste de vigor que fornece informações relativamente seguras sobre armazenabilidade dos lotes e do potencial de emergência das plântulas em campo (FRIGERI, 2007).

Pelos resultados do teste frio, verifica-se também a superioridade das linhagens 91, 44 e 64, aos 4 e 7 dias de avaliação. Maiores valores de IVG nessas condições foram observados para a linhagem 91.

Linhagens adaptadas ao clima temperado podem apresentar mais tolerância a baixas temperaturas durante o processo de germinação.

Tabela 4 Resultados médios (%) dos testes de germinação, envelhecimento acelerado e teste frio, de sementes das linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91 produzidas sob diferentes populações de plantas

Linhagem	Germinação			Envelhecimento Acelerado			Teste Frio		
	4 dias	7 dias	IVG	4 dias	7 dias	IVG	4 dias	7 dias	IVG
63	95 b	96 b	23,9 b	94 b	96 c	24,8 a	96 b	96 b	40,6 c
54	96 b	97 b	29,1 a	97 a	97 b	29,5 a	96 b	98 a	45,5 b
64	98 a	99 a	27,5 b	98 a	99 a	29,0 a	97 a	98 a	45,7 b
44	97 a	99 a	24,5 b	99 a	100 a	28,2 a	98 a	99 a	39,1 c
91	99 a	99 a	28,2 a	99 a	99 a	29,9 a	99 a	100 a	48,4 a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade

Tabela 5 Teor de água (% em base úmida) das sementes após o teste de envelhecimento acelerado

Linhagem	População de plantas			
	40.000	60.000	80.000	100.000
63	22,50	22,14	21,72	22,13
54	23,43	22,83	21,81	21,64
64	21,93	22,82	20,60	21,90
44	21,63	22,71	23,25	21,65
91	22,46	22,11	22,53	23,69

De uma maneira geral, foram observados valores altos de germinação e vigor em sementes das linhagens avaliadas. Ressalta-se que essas sementes foram colhidas, secadas e processadas utilizando-se de tecnologias que propiciam a alta qualidade de sementes. No entanto, mesmo nessas condições, considerando-se todos os testes utilizados, foi possível observar os maiores valores de germinação e vigor em sementes das linhagens 64, 44 e 91 em seis dos nove testes utilizados. Nesse mesmo sentido, menores valores de germinação e vigor foram observados em sementes da linhagem 63.

3.3 Expressões de proteínas em sementes produzidas nas diferentes populações de plantas

Na Figura 1, estão representados os padrões isoenzimáticos da enzima α -amilase em sementes das linhagens de milho produzidas em diferentes populações de plantas. De maneira geral, maiores expressões foram observadas para as sementes das linhagens 63, 54 e 64.

Em sementes da linhagem 64 foi observada uma isoforma adicional marcada na Figura 1A com o número 1, em relação aos padrões observados para as demais linhagens. Também em sementes das linhagens 63 e 54 foram observadas maior expressão da enzima quando produzidas na população de 100.000 plantas h⁻¹.

Em milho, a enzima alfa amilase, ao promover a hidrólise do amido, disponibiliza os carboidratos necessários ao desenvolvimento do embrião, possibilitando assim o processo germinativo (FRANCO et al., 2002). No entanto, Oliveira (2013) ressalta que além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar envolvidos no controle do caráter qualidade fisiológica de sementes, como exemplo, os genes relacionados diretamente com a respiração.

Os padrões de expressão da enzima esterase estão representados na Figura 1B. Não foi possível observar diferenças significativas na expressão dessa enzima em sementes produzidas sob diferentes populações de plantas, resultado também observado quando da avaliação da qualidade fisiológica de sementes.

Maior expressão da enzima esterase foi observada em sementes da linhagem 64 e menor expressão na linhagem 91.

Na Figura 1C, está representado o perfil da expressão de proteínas resistentes ao calor. As diferenças observadas na expressão referem-se aos genótipos. Padrões similares foram observados em sementes das linhagens 63, 54 e 91, independentemente das populações de plantio nas quais foram produzidas. Nas sementes da linhagem 44 foi observada menor expressão de proteínas resistentes ao calor.

Essa classe de proteínas é responsável pela proteção e estabilização da membrana celular, retendo água e evitando a cristalização de moléculas durante a desidratação (TAIZ; ZEIGER, 2004). De acordo com Menezes et al. (2008), padrões de proteínas resistentes ao calor apresentam-se polimórficos e estáveis em sementes de milho com diferentes níveis de qualidade, o que faz dessa classe de proteínas um excelente marcador na identificação de cultivares.

Para a enzima MDH (Figura 1D), também não foi possível observar diferenças significativas nas expressões em sementes produzidas sob diferentes populações de plantas. Menor expressão dessa enzima foi observada em sementes da linhagem 54 e maior expressão em sementes da linhagem 63. Essa enzima, relacionada à respiração aeróbica é codificada por cinco locos e é encontrada em grande abundância em diferentes organelas celulares, nas mitocôndrias e no citoplasma (GOODMAN; STUBER, 1987). Devido a isso, a alteração na sua expressão só é observada em processo deteriorativo mais

avançados em sementes, sendo assim considerado um marcador ineficiente da qualidade fisiológica.

Pelo zimograma da enzima SOD (Figura 1E), não foi possível observar diferenças de expressão em sementes produzidas sob diferentes populações de plantas. Menor expressão da enzima SOD foi observado, de maneira geral, em sementes da linhagem 91. Sementes dessa linhagem foram consideradas de maior qualidade fisiológica na maioria dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica. A SOD é considerada uma enzima antioxidante que atua em mecanismos de destoxificação, agindo como a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio, transformando o superóxido em peróxido de hidrogênio (NOCTOR; FOYER, 1998).

Para a enzima ADH (Figura 1F), de maneira geral, foi observada maior expressão em sementes produzidas na população de 100.000 plantas ha⁻¹ (linhagens 64, 44 e 91). A enzima ADH atua no metabolismo anaeróbico, reduzindo acetaldeído a etanol e oxidando NADH a NAD⁺ (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000).

Maior expressão da enzima catalase (Figura 1G) foi observada em sementes da linhagem 44. A atividade dessa enzima está relacionada com a decomposição de peróxido de hidrogênio formado pela SOD nas células, funcionando como uma segunda linha de defesa na célula (MALLICK; MOHN, 2000). A redução na atividade de CAT pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O₂ e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana e a produção de produtos de peroxidação de lipídeos secundários (GOMES et al., 2000).

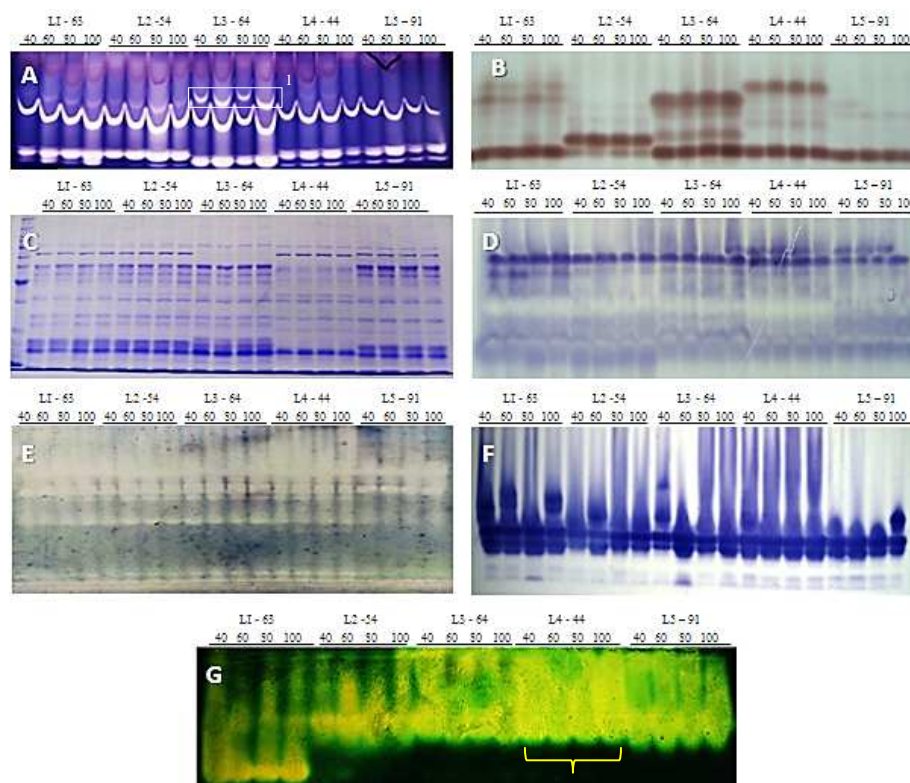


Figura 1 Padrões proteicos para alfa amilase (A), esterase (B), proteínas resistentes ao calor (C), malato desidrogenase (D), superóxido desmutase (E), álcool desidrogenase (F) e catalase (G), em sementes das linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91 produzidas em diferentes populações de plantas (40: 40.000 plantas ha^{-1} ; 60: 60.000 plantas ha^{-1} ; 80: 80.000 plantas ha^{-1} e 100: 100.000 plantas ha^{-1})

Mesmo trabalhando com seis sistemas enzimáticos relacionados aos sistemas antioxidantes, da respiração e com proteínas resistentes ao calor não foi possível associar a expressão de proteínas com os resultados de qualidade fisiológica observados nesta pesquisa. Como já foi mencionado são vários os genes que controlam essa característica de qualidade fisiológica de sementes.

4 CONCLUSÕES

Para as avaliações de produção, prolificidade e intervalos entre florescimentos feminino e masculino, as linhagens 63, 64 e 91 mostram-se as mais promissoras quanto à tolerância à seca.

O aumento da população de plantas não interfere na qualidade fisiológica das sementes.

Melhor qualidade fisiológica é observada em sementes das linhagens 64, 44 e 91.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.

BÄNZIGER, M.; EDMEADES, G. O.; LAFITTE, H. R. Physiological mechanisms contributing to the increased N stress tolerance of tropical maize selected for drought tolerance. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 75, p. 223-233, 2002.

BÄNZINGER, M. et al. **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize**: from theory to practice. Mexico: CIMMYT, 2000. 68 p.

BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize: responses in grain yield, biomass, and radiation utilization. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 31, p. 233-252. 1993.

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

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1158-1203.

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

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

DURÃES, F. O. M. et al. Intervalo entre florescimentos masculino e feminino como parâmetro fenotípico útil ao melhoramento de milho tropical para tolerância à seca. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Resumos...** Recife: IPA, 1998. p. 27.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

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

FRIGERI, T. **Interferência de patógenos nos resultados dos testes de vigor em sementes de feijoeiro**. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

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

GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Mayze. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isoenzymes in plants genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 1-33. Part B.

JAMPATONG, S. et al. Effect of one and two eared selection on stalk strength on other characters in maize. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 605-611, 2000.

KAMARA, A. Y. et al. Reproductive and stay-green trait responses of maize hybrids, improved open-pollinated varieties and farmers' local varieties to terminal drought stress. **Maydica**, Bergamo, v. 48, n. 1, p. 29-37, 2003.

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

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response to alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

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

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**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 111-122, 2008.

MUGO, S. N.; EDMÉADES, G. O.; KIRUBI, D. T. Genetic improvement for drought tolerance increases tolerance to high plant density in tropical maize under low input levels. In: ARNEL R. HALLAUER INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON PLANT BREEDING, 1., 2003, Mexico. **Book of Abstracts...** Mexico: CIMMYT, 2003. p. 50-51.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, Jan./Feb. 2013.

RIBAUT, J. M. et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 7, p. 905-914, 1996.

SHAO, H. et al. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 215-225, 2008.

TAIZ, E.; ZEIGER, L. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VIANA, F. M. S. et al. Híbridaç o em milho. In: BOR M, A. (Ed.). **Híbridaç o artificial de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 401-426.

ZADI, P. H. et al. Gains from improvement for mid-season drought tolerance in tropical maize (*Zea mays* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 135-152, Sept. 2004.

CAPÍTULO 3

Desempenho fisiológico e expressão de isoenzimas em sementes de milho submetidas a diferentes potenciais hídricos

RESUMO

A caracterização precoce de genótipos, por meio de avaliações da qualidade fisiológica de sementes, bem como a análise de sistemas enzimáticos, pode fornecer parâmetros que auxiliarão na seleção de novas cultivares tolerantes à deficiência hídrica. Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica e a expressão de proteínas em sementes de linhagens de milho, submetidas a diferentes potenciais hídricos. Para isso, foram avaliadas a qualidade fisiológica e a expressão das isoenzimas superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH) e proteínas resistentes ao calor em sementes de cinco linhagens de milho, do programa de melhoramento da empresa Geneseeds Recursos Genéticos Ltda., submetidas aos potenciais hídricos de 0.0, -0.3, -0.6 e -0.9 MPa. Maior valor de germinação nos menores potenciais hídricos foi observado em sementes da linhagem 63. No entanto, quanto ao vigor, as sementes das linhagens 91 e 44 foram superiores. Maior expressão das enzimas SOD e CAT, consideradas como enzimas do sistema antioxidante foi observada em sementes das linhagens 44 e 91. Assim, as linhagens 44 e 91 foram consideradas como linhagens promissoras quanto à tolerância ao estresse hídrico.

Palavras-chave: Qualidade fisiológica. Estresse hídrico. Tolerância a seca.

ABSTRACT

Early characterization of genotypes by means of assessments of seed quality, as well as analysis of enzymatic systems, can provide parameters that will assist in the selection of new cultivars tolerant to water stress. Thus, the objective of this study was to evaluate the physiological quality and protein expression in seeds of maize inbred lines under different water potentials. For that reason, we evaluated the physiological quality and expression of the isoenzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH) and alcohol dehydrogenase (ADH), and heat resistant proteins in seeds of five maize inbred lines from the maize breeding program of Geneseds RecursosGenéticos Ltda., subjected to water potentials of 0.0, -0.3, -0.6 and -0.9 MPa. Higher germination value in lower water potentials was observed in seeds from line 63. However, in regard to vigor, the seeds from lines 91 and 44 were superior. Increased expression of the enzymes SOD and CAT, considered as enzymes of the antioxidant system, was observed in seeds of lines 44 and 91. Thus, lines 44 and 91 were considered as promising for tolerance to water stress.

Keywords: Physiological quality. Water stress. Drought tolerance.

1 INTRODUÇÃO

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é um dos fatores que mais limitam o desenvolvimento de cultivos agrícolas. Mais de 90% da área de milho cultivados no mundo é de sequeiro, e as perdas em produtividade anual em decorrência da seca ficam em torno de 15% do potencial de rendimento total. As perdas são mais intensas em países tropicais que dependem de uma temporada de chuvas relativamente imprevisível para o crescimento da cultura, e menos significativas em áreas temperadas, onde a irrigação é mais comum e a precipitação é mais distribuída ao longo da temporada (EDMEADES, 2008).

A tolerância a condições de déficit hídrico é variável dependendo do estágio de desenvolvimento da cultura. No entanto, é importante a identificação precoce de genótipos que apresentem tolerância a estresse hídrico, o que justifica o estudo relacionado a esse estresse durante o processo de germinação (THAKUR; SHARMA, 2005).

A caracterização de genótipos, por meio das avaliações de qualidade fisiológica de sementes, pode fornecer parâmetros que auxiliarão na seleção de novas cultivares mais adaptadas às condições de déficit hídrico.

Déficits hídricos durante o processo de germinação podem impedir a germinação, alterar a velocidade, o tempo e a uniformidade da germinação, comprometendo o estabelecimento da cultura. Entretanto, os níveis de respostas em relação a essas variáveis, dependem tanto do grau de estresse quanto da tolerância da espécie (KRANNER et al., 2010).

A qualidade fisiológica é adquirida durante o desenvolvimento das sementes, podendo ser perdida por processos deteriorativo e, na presença de condições estressantes, a deterioração é um processo inevitável.

A imposição do estresse hídrico em condições de laboratório pode ser feita por meio de soluções osmóticas, tal como soluções de polietilenoglicol

(PEG), o qual se caracteriza como um composto não tóxico e inerte, constituído por macromoléculas, as quais dificultam a absorção de água pelo tegumento (VILLELA; DONI FILHO; SEQUEIRA, 1991), que vêm sendo usualmente utilizados como agente osmótico para simular condições de estresse hídrico.

Dessa forma, os objetivos neste trabalho foram avaliar a qualidade fisiológica e expressão de proteínas em sementes de linhagens de milho, submetidas a diferentes potenciais hídricos visando à seleção de genótipos com tolerância a condições de déficit hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução dos experimentos

O trabalho foi conduzido na área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), município de Lavras, MG, a 910 m de altitude, latitude de 21°14'S e longitude de 45°00 W.

O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, fase Cerrado. 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 multiplicação das sementes de cinco linhagens de milho, 63, 54, 64, 44 e 91, genótipos provenientes do programa de melhoramento de milho da empresa Geneseds Recursos Genéticos Ltda.

A semeadura foi realizada em 18/11/2011. Todos os tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com a necessidade da cultura.

Por ocasião do florescimento as plantas foram autofecundadas. Para isso, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando havia receptividade dos estilo-estigmas, os pendões da respectiva planta eram cobertos com saco de papel para evitar ao máximo a contaminação genética, e no dia seguinte as plantas foram autofecundadas manualmente.

As espigas provenientes da autofecundação foram colhidas manualmente no dia 10/05/2012, secadas em secador de espigas a 35°C até as sementes atingirem o teor de água de 13%. A debulha foi realizada manualmente e as sementes foram classificadas em peneiras de crivos circulares. Foram utilizadas as sementes que ficaram retidas nas peneiras

19/64e 20/64. Posteriormente as sementes foram armazenadas em câmara fria a 10°C até o momento das análises fisiológicas e enzimáticas.

2.2 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas a diferentes potenciais hídricos com forma de imposição do estresse hídrico

Para a simulação do estresse hídrico foram utilizadas soluções de polietileno glicol (PEG 6000), nos potenciais hídricos de 0,0; -0,3; -0,6 e -0,9 Mpa para a condução dos testes de germinação e índice de velocidade de germinação, sendo a solução de 0,0 correspondente ao tratamento com água ou testemunha. Para o cálculo da quantidade de PEG 6000 foi utilizada a equação proposta por Michel e Kaufmann (1973):

$$\psi_{os} = (1,18 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4})CT + (8,39 \times 10^{-7})C^2T;$$

onde: ψ_{os} = potencial osmótico (bar);

C = concentração do agente osmótico (gde PEG 6000/L H₂O);

T = temperatura (°C).

Quadro 1 Concentração de polietilenoglicol (PEG 6000) utilizada para obter os diferentes níveis de potencial osmótico, com temperatura de 25°C

Potencial osmótico (MPa)	Concentração (g PEG 6000/L H ₂ O)
0,0	0,0
-0,3	151,402
-0,6	223,664
-0,9	279,297

As sementes foram tratadas com o fungicida VITAVAX-THIRAM 200, na dosagem de 300 ml por 100 kg de sementes, antes da realização dos testes.

Para a avaliação da qualidade fisiológica, foram realizados os seguintes testes:

- a) **teste de germinação:** foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes para cada tratamento. Foi instalado em papel toalha, tipo Germitest, na forma de rolo, umedecidos com soluções de PEG nos diferentes níveis de potencial osmótico, na proporção equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos foram mantidos em sacos plásticos durante todo o teste, para evitar a evaporação de água e garantir o potencial osmótico desejado. Em seguida as sementes foram colocadas para germinar com temperatura constante de 25°C em câmaras de BOD. Decorridos quatro dias da semeadura, os rolos de papel Germitest foram substituídos por novos rolos umedecidos com as diferentes soluções de PEG, transferindo-se as sementes ou plântulas para os mesmos, garantindo assim, a manutenção do potencial osmótico desejado. A avaliação foi realizada ao sétimo dia após a semeadura, contabilizando o número de sementes germinadas (Figura 2A);
- b) **teste de classificação das plântulas:** realizado em conjunto com o teste de germinação, foram consideradas no sétimo dia após a semeadura, plântulas **normais fortes** (Figura 2B) aquelas que apresentavam no mínimo 2 cm de parte aérea e não menos do que duas raízes secundárias com pelo menos 6 cm de comprimento.

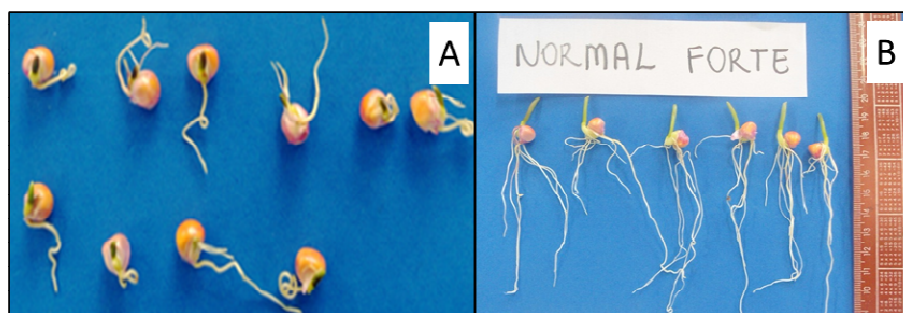


Figura 2 Sementes emergidas (A) e plântulas consideradas normais fortes (B)

- a) **índice de velocidade de germinação:** avaliado em conjunto com o teste de germinação. Após o segundo dia da semeadura, foi avaliado diariamente o número de sementes com protrusão radicular até a estabilização. Posteriormente, foi determinado o índice de velocidade de germinação pela expressão proposta por Maguire (1962);
- b) **T50 (tempo para ocorrência de 50% de germinação)** – Efetuado em conjunto com o teste de germinação, foram realizadas avaliações diárias, contabilizando-se o número de sementes germinadas, até a estabilização. O cálculo foi feito utilizando a fórmula proposta por Guimarães (2000):

$$T50 = [(G - G_1)I/G_2 - G_1] + T,$$

onde:

T50 = Tempo para ocorrência de 50% da germinação;

G = Metade do valor máximo de germinação;

G₁ = Valor de germinação igual ou imediatamente inferior a G;

G₂ = Valor de germinação imediatamente superior a G;

I = Intervalo entre contagens;

T = Tempo para ocorrência de G₁.

2.3 Análises de proteínas em sementes submetidas aos diferentes potenciais hídricos

Para análise das isoenzimas esterase (EST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e glutamato oxalacetato transaminase (GOT), alfa amilase e de proteína resistente ao calor, foram retiradas duas amostra de 10 sementes cada, por tratamento,

quando da protrusão radicular. As amostras das sementes foram armazenadas em *Deep Freezer*. As amostras para alfa amilase tiveram os eixos embrionários extraídos e eliminados. Em seguida, as amostras foram maceradas manualmente em almofariz, na presença de antioxidante PVP (Polivinilpirrolidona) e em nitrogênio líquido e armazenadas em *Deep Freezer* a -86°C . Para a extração das isoenzimas esterase (EST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e glutamato oxalacetato transaminase (GOT), foram adicionados 250 μl do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0) e 0,1% de β -mercaptoetanol as subamostras de 100mg do material macerado, O material foi colocado em geladeira por 12 horas e depois centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C . A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontínuo (7,5% gel de separação e 4,5% gel de concentração). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados na canaleta do gel 50 μl de cada sobrenadante e a corrida realizada aos 4°C a 150V, por 4 horas. Ao término da corrida, os géis foram revelados na presença dos substratos específicos para as determinadas enzimas (ALFENAS, 1998).

Para a extração da enzima α -amilase, 200mg do pó das sementes foram ressuspendidos em 600 μl do tampão de extração (Tris-HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,4% PVP). A revelação foi feita aplicando 40 μl do extrato proteico, em cada canaleta, nos géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador – contendo amido) e 4,5% (gel concentrador).

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, foram adicionados às amostras já maceradas em 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 μL . Os homogeneizados foram centrifugados a 14000rpm 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 70µL de extrato + 40µL de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50µL do extrato com proteínas resistentes ao calor + 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, 1998).

2.4 Análises estatísticas

Os testes realizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas aos diferentes potenciais hídricos seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizados com quatro repetições, no esquema fatorial 5x4 (linhagens de milho x potenciais hídricos). As variáveis plântulas normais fortes e sementes germinadas foram transformadas em $\sqrt{(x + 1)}$ para a análise estatística.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e a comparação das médias dos tratamentos para todos os testes foi feita pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Foi realizada ainda uma análise de regressão polinomial para a interação linhagens x potenciais hídricos, utilizando os desdobramentos dos graus de liberdade do fator quantitativo potencial hídrico. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Sisvar® (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Qualidade Fisiológica das sementes submetidas aos diferentes potenciais hídricos

Pelos resultados da análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação, classificação das plântulas, índice de velocidade de germinação e T50 (Tabela 6), verifica-se que houve efeito altamente significativo para a interação entre os fatores linhagens x potenciais hídricos e para cada fator isolado.

Tabela 6 Resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação

Fatores	GL	QM			
		(%) Plântulas Normais Fortes ¹	(%) Sementes Germinadas ¹	IVG	T(50)
Linhagem	4	6,24*	9,89*	354,11*	0,66*
Pot. hídrico	3	358,78*	92,73*	5326,29*	11,74*
Linhagem*Pot. Hídrico	12	6,10*	5,44*	93,40*	0,21*
Resíduo	24	0,06	0,06	4,17	0,03
CV(%)		6,13	2,83	3,82	6,39

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados transformados em $\sqrt{(x + 1)}$.

Nos Gráficos 1, 2, 3 e 4 estão representadas as análises e as equações de regressão para cada linhagem, realizadas com as médias estimadas nos diferentes potenciais hídricos.

Na avaliação do teste de germinação, foram contabilizadas as sementes germinadas que apresentavam protrusão radicular e emissão de parte aérea. Essa avaliação foi feita no intuito de diferenciar as cultivares em estudos, à medida

que as mesmas, na maioria das vezes, não apresentaram plântulas consideradas normais nos menores potenciais hídricos.

Pela análise de regressão para essa característica (Gráfico 1), pode-se observar uma redução no percentual de sementes germinadas à medida que se aumenta a restrição hídrica, diferenciando-se assim, as linhagens em estudo.

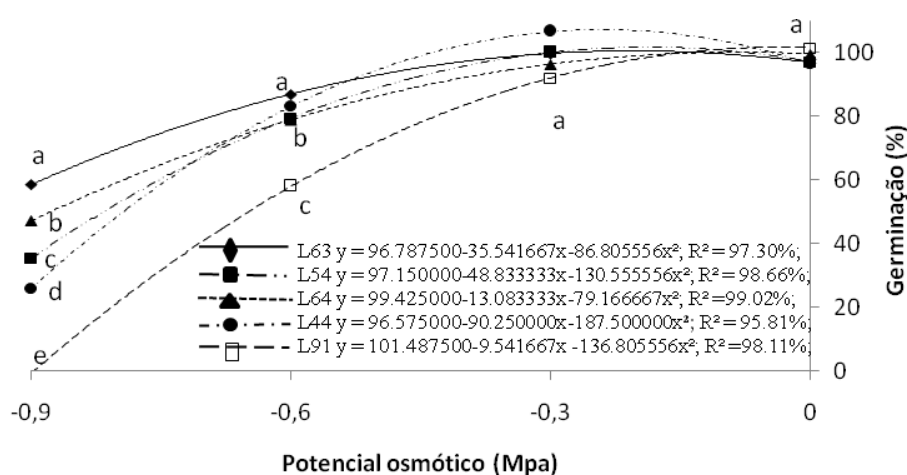


Gráfico 1 Germinação de sementes de linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91, submetidas a diferentes potenciais hídricos

Com esse mesmo princípio, para os níveis controle, 0 Mpa, e de -0,3 Mpa, as sementes de todas as linhagens se comportaram de maneira semelhante, não diferenciando entre si.

No entanto, em solução de PEG a -0,6 Mpa foi possível observar o melhor desempenho das linhagens 63 e 44. Nessa mesma condição, houve bom desempenho da linhagem 54 em relação às demais, seguida pela linhagem 64. A

linhagem 91 apresentou os menores valores de sementes germinadas nessa condição.

No potencial de maior restrição hídrica (-0,9 Mpa), foi possível distinguir todas as linhagens avaliadas. Considerando-se as sementes germinadas nessa condição de restrição hídrica, foi observado o melhor desempenho da linhagem 63. Nessa mesma condição, a linhagem 64 foi superior a 54, apresentando 48% de sementes germinadas em relação a 34% da linhagem 54.

Nesse potencial mais restritivo, piores desempenhos foram observados para as linhagens 44 e 91, tendo as mesmas apresentado valores de 23% e 2%, respectivamente, de sementes germinadas. Queiroz (2010) relatou que a diminuição do potencial hídrico simulado pelo polietilenoglicol (PEG 6000), provocou reduções de até 52% no índice de germinação de sementes de milho.

No Gráfico 2 estão representados os resultados de plântulas normais fortes. Pelos resultados desse teste, também foi possível observar redução acentuada no vigor das sementes à medida que foi aumentada a restrição hídrica. Resultados semelhantes foram encontrados por Moterle et al. (2008), no qual a diminuição do potencial osmótico provocou redução no desempenho de sementes de milho-pipoca.

Para o tratamento controle, 0Mpa, não foi possível diferenciar as sementes das linhagens em estudo quanto ao nível de vigor, obtendo-se altos valores de plântulas normais fortes.

No entanto, no nível de -0,3 Mpa observa-se uma superioridade da linhagem 91 em relação às demais linhagens, apresentando média de 57% de plântulas consideradas normais fortes nessa condição de limitação hídrica. Resultados superiores também foram observados para a linhagem 44, com 26% de plântulas normais fortes.

Para as demais linhagens foram observados valores muito reduzidos de vigor, sendo a linhagem 63 a de pior desempenho. Para os potenciais hídricos de -0,6 e -0,9 não foram observadas a presença de plântulas normais fortes. A redução da germinação quando o potencial hídrico foi diminuído, provavelmente, se deve à menor disponibilidade de água para as sementes (TORRES; VIEIRA; MARCOS FILHO, 1999).

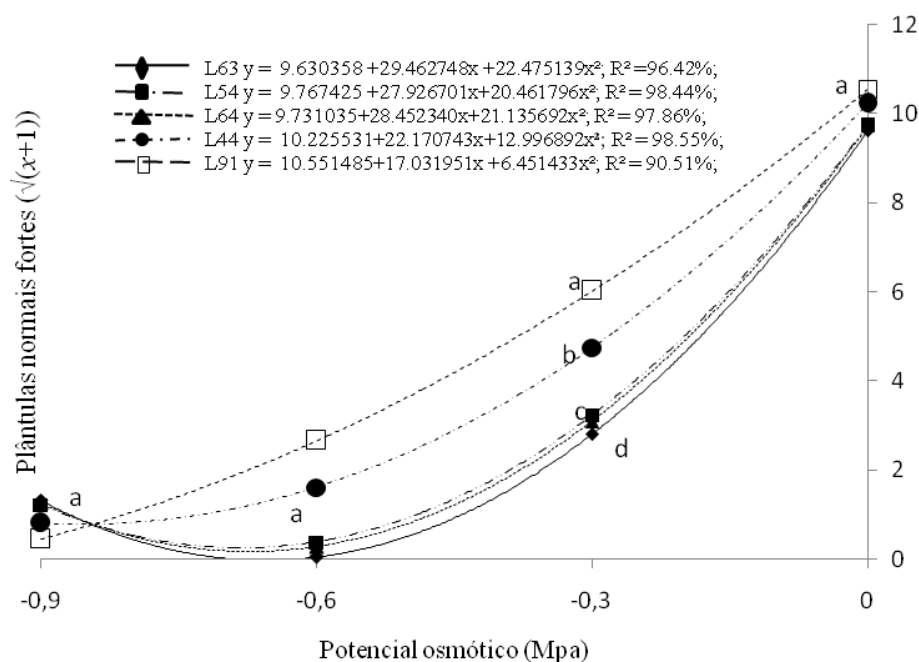


Gráfico 2 Porcentual de plântulas normais fortes provenientes de sementes das linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91, submetidas aos diferentes potenciais hídricos

O índice de velocidade de germinação (IVG) está representado no Gráfico 3 Da mesma forma que as outras características analisadas, o IVG também foi reduzido drasticamente à medida que foi aumentada a restrição

hídrica. Esse resultado também foi observado por Rosseto (1997), ao avaliar o desempenho de sementes de soja em diferentes potenciais hídricos.

No tratamento controle, para a linhagem 91, observa-se maiores valores de IVG. Na sequência, as linhagens 54, 64 e 44 apresentaram resultados semelhantes entre si. O pior desempenho para o nível de 0 Mpa foi observado para a linhagem 63.

Quando o potencial hídrico foi reduzido para -0,3 Mpa e -0,6 Mpa, essa tendência se manteve, com melhor desempenho da linhagem 91, seguida da linhagem 44 e o pior da linhagem 63. No entanto, para o potencial de maior restrição hídrica (-0,9 Mpa), houve uma inversão dos resultados, onde a linhagem 91, a qual vinha apresentando excelentes resultados foi considerada como inferior, juntamente com a linhagem 64. Nesse potencial, a linhagem 54 foi a que teve melhor resultado de IVG.

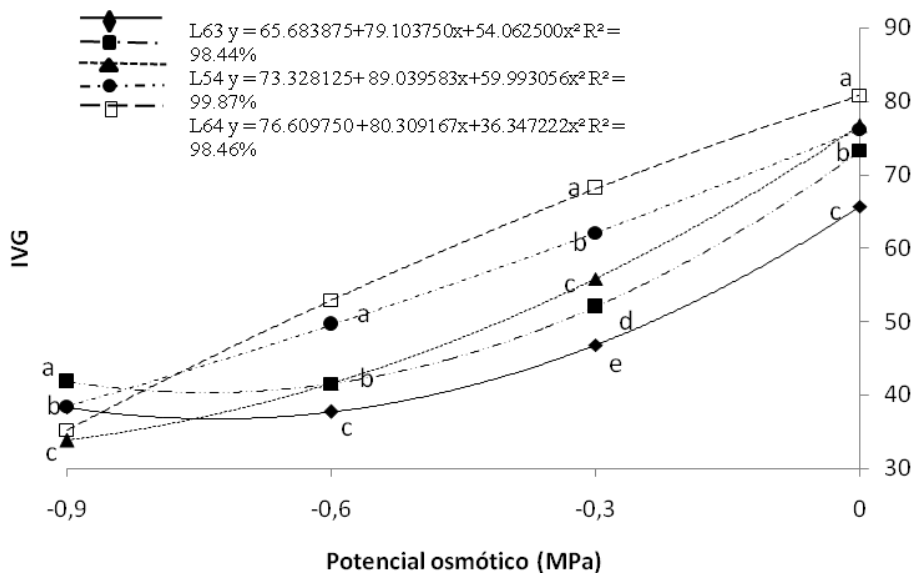


Gráfico 3 Índice de velocidade de germinação de sementes das linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91, submetidas a diferentes potenciais hídricos

Nos resultados do tempo médio para a germinação (T50), representados no Gráfico 4, observou-se um aumento do tempo para germinação de sementes à medida que o potencial hídrico foi reduzido. Na linhagem 91 obteve-se o menor tempo médio de germinação para os potenciais 0, -0.3 e -0.6 MPa. No entanto, a linhagem 44, mostrou ser mais eficiente em relação ao tempo gasto para germinação nos menores potenciais hídricos, -0.6 e -0.9 MPa. Queiroz (2010) concluiu que quanto maior foi a restrição hídrica imposta as sementes de milho, menor foi o índice de velocidade de germinação e maior foi o tempo médio gasto para a germinação.

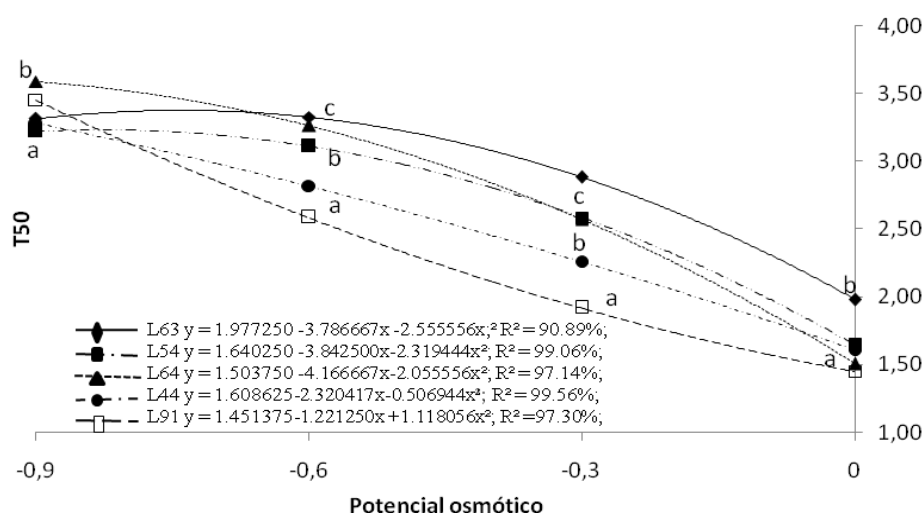


Gráfico 4 T50 para as linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91, submetidas a diferentes potenciais hídricos

3.2 Expressão das isoenzimas

Os padrões isoenzimáticos da α -amilase em sementes de linhagens de milho submetidas a diferentes potenciais hídricos estão representados na Figura

3A. Para o nível controle (0 Mpa), observa-se baixa expressão da enzima alfa amilase para todas as linhagens em estudo.

É válido lembrar que para padronizar todas as amostras, as sementes foram coletadas no momento da protrusão radicular em todos os tratamentos, minimizando o efeito da alteração da expressão de determinadas enzimas em função do estágio de desenvolvimento da plântula.

Nesse caso, a coleta das amostras foi realizada em momentos diferentes para os diversos tratamentos, em função do grau de desenvolvimento diferenciado das plântulas, ocasionado devido aos diferentes níveis de restrição hídrica. No caso do tratamento controle (0 Mpa), a protrusão radicular das sementes e a coleta das amostras ocorreram no 2º dia, com apenas 48 horas de embebição e para o nível de maior restrição hídrica (-0,9 Mpa), a coleta foi possível somente no quarto dia, com 96 horas de embebição. Diante desse fato, é possível entender a menor expressão da enzima alfa amilase no tratamento controle.

Maior expressão dessa enzima foi também observada por Oliveira et al. (2013) em sementes de milho embebidas. É por meio da embebição que as enzimas responsáveis pela degradação do amido em sementes de milho são “sintetizadas de novo”, através da ativação pela giberelina liberada na camada de aleurona, a qual é sintetizada no momento da embebição dessas sementes (XIE et al., 2007).

Na imposição do estresse hídrico, pode-se observar para todos os tratamentos e de maneira mais expressiva ao nível de -0,9 Mpa, menor expressão dessa enzima para as linhagens 44 e 91. Ao se observar os resultados de sementes germinadas (Figura 2), são essas mesmas linhagens que apresentam piores resultados.

Por se tratar de uma enzima responsável pela hidrólise do amido, genótipos que apresentem maiores níveis de expressão dessa enzima têm maior

facilidade em disponibilizar carboidratos para o embrião, justificando assim, o melhor desempenho na germinação (FRANCO et al., 2002).

Entretanto, as linhagens 91 e 44 possuem alto vigor de plântulas. Além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar envolvidos no controle do caráter qualidade fisiológica de sementes, como exemplo, os genes relacionados diretamente com a respiração (OLIVEIRA et al., 2013). Isso explica a baixa atividade dessa enzima em sementes de linhagens consideradas de alta qualidade fisiológica.

No zimograma da enzima esterase (Figura 3B), de maneira geral, observa-se um aumento na intensidade das bandas com a redução do potencial hídrico, principalmente para a linhagem 91. A alta atividade dessa enzima está relacionada com maior eficiência do sistema de membranas.

A enzima glutamato oxalacetato transaminase (GOT) (Figura 3C) também apresentou um aumento na intensidade das bandas à medida que foi reduzido o potencial hídrico, principalmente para as linhagens 64, 44 e 91. Essa enzima participa do metabolismo de aminoácidos e da descarboxilação, via enzima do ácido málico, na transformação de aspartato em ácido oxalacético e malato, durante a fixação do gás carbônico pelas plantas (MENEZES, 2005). Em virtude do envolvimento dessa enzima no metabolismo de N, é possível que ocorram sensíveis diferenças na síntese de aminoácidos, contribuindo para a redução na qualidade fisiológica das sementes. Essa é uma enzima que participa no processo de degradação e síntese de proteínas (CONN; STUMPF, 1980), apresentando um importante papel na germinação de sementes.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) está representada na Figura 3D. Observa-se alta atividade dessa enzima no potencial hídrico controle (0MPa). À medida que se reduz esse potencial hídrico, uma redução na intensidade das bandas é observada para as linhagens 63, 54 e 64, o que não ocorre com as linhagens 91 e 44. Em plantas sob estresse hídrico, observa-se

um aumento na atividade dessas enzimas relacionado ao aumento na tolerância à seca (ZHU, 2002). O mesmo pode ser observado para a enzima catalase (CAT) (Figura 3E), onde se verifica maior atividade dessa enzima para as linhagens 44 e 91 com a redução do potencial hídrico.

As enzimas SOD e CAT constituem um eficiente mecanismo de desintoxicação, atuando na remoção de radicais livres (MC DONALD, 1999).

Com o perfil isoenzimático da enzima álcool desidrogenase (ADH) (Figura 3F), observa-se uma maior expressão dessa enzima para a linhagem 44 no tratamento controle (0 Mpa).

À medida que é reduzido o potencial hídrico, de maneira geral, ocorre um aumento no nível de expressão da ADH para todas as linhagens. No entanto, para as linhagens 54 e 44, esse aumento ocorre substancialmente. Isso pode ser justificado nessa condição, por uma possível redução na disponibilidade de oxigênio, ocasionando assim a ativação da rota anaeróbica de respiração.

Ao se observar resultados do teste de IVG, o qual é um teste de vigor, as sementes dessas mesmas linhagens apresentaram melhores resultados de IVG no potencial hídrico de -0.9 MPa.

Em milho, essa enzima apresenta dois locos fortemente ligados (Adh1 e Adh2) os quais são muito estudados sob o aspecto da regulação da expressão gênica por terem função definida sob condições anaeróbicas (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995).

Para a enzima MDH (Figura 3G), não foi possível observar diferenças significativas nas expressões dessa enzima que se relacione com os diferentes potenciais hídricos. Essa enzima, relacionada à respiração aeróbica, é codificada por cinco locos e é encontrada em grande abundância em diferentes organelas celulares, nas mitocôndrias e no citoplasma (GOODMAN; STUBER, 1987). Devido a isso, a alteração na sua expressão só é observada quando ocorre na semente um processo deteriorativo muito grande, o que faz dessa enzima um

marcador ineficiente da qualidade fisiológica. Brandão Júnior (1999) também não observou correlação entre a atividade dessa enzima e a qualidade fisiológica das sementes.

No zimograma das proteínas resistentes ao calor (Figura 3H), não foram verificados grandes polimorfismos. Para a coleta das amostras para a extração das isoenzimas e dessa proteína utilizou-se como parâmetro a protrusão radicular das sementes, estando todas elas com avançado processo de embebição. Albuquerque (2009) observou uma redução na expressão dessas proteínas em sementes de sucupira preta com o avanço da embebição. Andrade (2012) verificou maior expressão dessa proteína em sementes não embebidas.

Observa-se um aumento na intensidade de algumas bandas de baixo peso molecular para as linhagens 63, 64 e 91. Proteínas do choque térmico (HSPs – *Heat Shock Proteins*) são específicas ao estresse de altas temperaturas, mas a sua síntese também é induzida em condições de déficit hídrico (ARAÚJO; MARGIS-PINHEIRO; RUMJANEK, 1998). Em uma pesquisa realizada com linhagens de milho contrastantes em relação à tolerância a estresse hídrico e térmico, verificaram-se diferenças no padrão de síntese de HSPs. Uma HSP de 45 kDa foi observada apenas nas plantas tolerantes (RISTIC; GIFFORD; CASS, 1991).

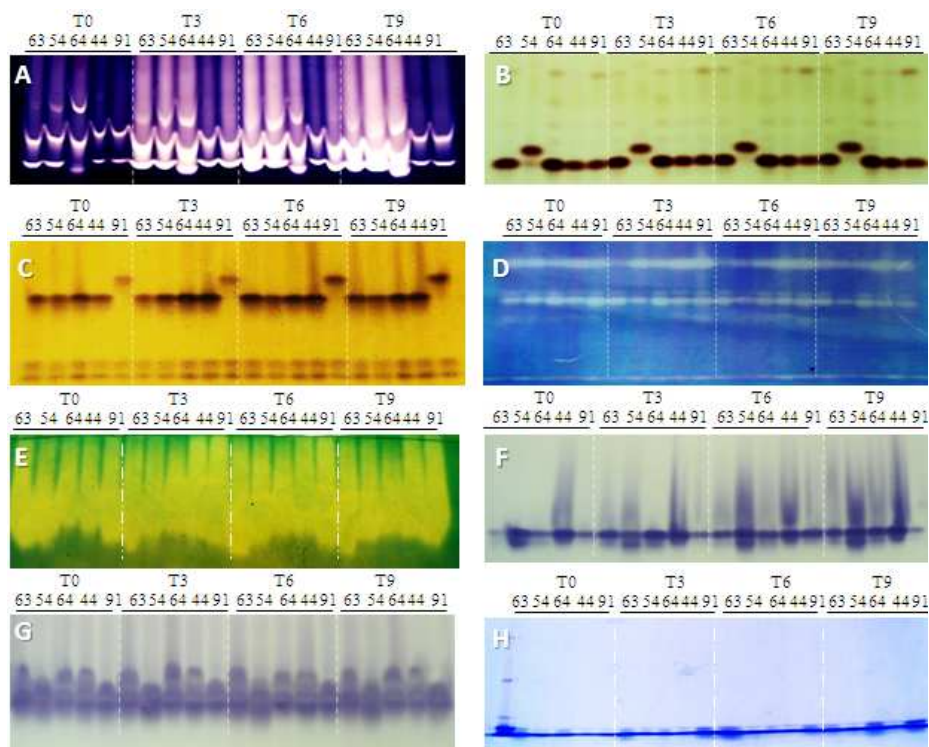


Figura 3 Padrões proteicos de sementes das linhagens de milho 63, 54, 64, 44 e 91 submetidas a diferentes potenciais hídricos durante a germinação. (T0: potencial hídrico de 0Mpa; T3: potencial hídrico de -0,3Mpa; T6: potencial hídrico de -0,6Mpa e T9: potencial hídrico de -0,9Mpa) revelados para alfa amilase (A), esterase (B), glutamato oxalacetato transaminase (C), superóxido desmutase (D), catalase (E), álcool desidrogenase (F), malato desidrogenase (G) e proteínas resistentes ao calor (H)

4 CONCLUSÕES

Para a linhagem 63 houve a maior porcentagem de sementes germinadas no potencial de maior restrição hídrica.

Maior vigor das sementes das linhagens 91 e 44 é observado sob condições de restrição hídrica. Nessas sementes há maior expressão de enzimas do sistema antioxidante.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É indiscutível a importância da seleção de genótipos de milho para a tolerância à seca em programas de melhoramento. A utilização de caracteres indiretos como intervalo entre os florescimentos feminino e masculino, a senescência retardada das folhas e colmo também denominada de *stay green*, a prolificidade, dentre outras, têm sido avaliadas nesses programas visando a tolerância à seca. A possibilidade de caracterizar precocemente genótipos para a tolerância à deficiência hídrica também pode trazer benefícios importantes nos processos de seleção.

Na presente pesquisa, a caracterização precoce dos genótipos para tolerância à seca, por meio da avaliação da qualidade fisiológica de sementes, de maneira geral, foi relacionada com os caracteres indiretos avaliados para tolerância à deficiência hídrica. As sementes das linhagens 64 e 91 com alta qualidade fisiológica também se mostraram prolíficas e com reduzido intervalo entre os florescimentos feminino e masculino.

Também em sementes das linhagens 63 e 91, as quais apresentam boa capacidade de tolerância a condições de restrição hídrica utilizando-se de diferentes potenciais osmóticos, apresentam prolificidade e reduzido intervalo entre os florescimentos feminino e masculino, caracteres de interesse quanto à tolerância à seca.

No entanto, pela complexidade dos aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nos caracteres de tolerância à deficiência hídrica, há a necessidade de estender esta pesquisa utilizando-se de mais genótipos, locais e condições de restrição hídrica.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. S. et al . Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*BowdichiavirgilioidesKunth.*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.

ANDRADE, T. **Qualidade fisiológica e expressão de proteínas resistentes ao calor em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de milho.** 2012. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ARAÚJO, J. L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N. G. **Proteínas de choque térmico e tolerância a altas temperaturas em plantas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 27 p. (Documentos, 80).

BRANDÃO JUNIOR, 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.

CONN, E. C.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica.** São Paulo: E. Blücher, 1980. 451p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computerstatisticalanalysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

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

GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Mayze. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isoenzimes in plants genetics and breeding.** Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 1-33. Part B.

GUIMARÃES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 180 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 655–673, 2010.

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

MC DONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, Jan./Apr. 1999.

MENEZES, M. **Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e de proteínas resistentes ao calor**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 51, n. 6, p. 914-916, 1973.

MOTERLE, L. M. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1810-1817, nov./dez. 2008.

OLIVEIRA, G. E. et al., Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, Jan./Feb. 2013.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica**. 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

RISTIC, Z.; GIFFORD, D. J.; CASS, D. D. Heat shock proteins in two lines of *Zea mays* L. that differ in drought and heat response. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 97, p. 1430-1434, 1991.

THAKUR, M.; SHARMA, A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. **Journal of Arid Environments**, London, v. 62, p. 517-523, 2005.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p.

TORRES, S. B.; VIEIRA, E. L.; MARCOS FILHO, J. Efeitos do estresse hídrico na germinação e no desenvolvimento de plântulas de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, n. 2, p. 59-63, 1999.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1957-1968, 1991.

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

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