



IOLANDA VILELA VON PINHO

**FENOTIPAGEM E EXPRESSÃO GÊNICA PARA
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM MILHO**

**LAVRAS - MG
2021**

IOLANDA VILELA VON PINHO

**FENOTIPAGEM E EXPRESSÃO GÊNICA PARA TOLERÂNCIA
AO DÉFICIT HÍDRICO EM MILHO**

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

Profº. Dr. João Cândido de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2021**

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

Von Pinho, Iolanda Vilela.

Fenotipagem e expressão gênica para tolerância ao déficit
hídrico em milho / Iolanda Vilela Von Pinho. - 2021.

114 p.

Orientador(a): João Cândido de Souza.

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Fenotipagem precoce. 2. Expressão Gênica. 3. Déficit
Hídrico. I. de Souza, João Cândido. II. dos Santos, Heloisa Oliveira.
III. Título.

IOLANDA VILELA VON PINHO

**FENOTIPAGEM E EXPRESSÃO GÊNICA PARA TOLERÂNCIA
AO DÉFICIT HÍDRICO EM MILHO**

**PHENOTYPING AND GENE EXPRESSION TO WATER DEFICIT
TOLERANCE IN CORN**

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

APROVADA em 14 de maio de 2021.

Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho	UFLA
Dra. Heloísa Oliveira dos Santos	UFLA
Dr. José Maria Villela Pádua	UFLA
Dra. Renata Silva Mann	UFS

Profº. Dr. João Cândido de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2021**

A Deus, que guia meus passos.

OFEREÇO

*Aos meus pais, Renzo e Édila,
Ao meu irmão Gabriel,
À minha avó Neuza (in memoriam),
Com todo meu AMOR*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de todo o bem de quem espero fortaleza e discernimento.

Aos meus pais, Renzo e Édila, por me ensinarem a importância de se sonhar, esforçar, persistir e confiar. Sem o amor de vocês, confiança, presença e suporte essa conquista não seria possível. Obrigada por me ensinarem a importância da união. Vocês serão sempre a minha maior fonte de admiração e amor.

Ao meu irmão, Gabriel, por me mostrar o mais puro amor. Por me cuidar, alegrar e mostrar o quanto a vida é leve ao seu lado. Você é meu companheiro de vida e por quem buscarei sempre ser uma pessoa melhor.

À minha tia Maria Ilídia, pelas longas conversas e trocas. O seu amor é essencial.

À minha prima Clara, por sempre me acompanhar nas minhas caminhadas e se fazer presente com todo o seu amor e carinho.

À minha avó Neuza (*in memoriam*), por me ensinar a ver beleza nas dificuldades e fortaleza na fé. Por sempre ter confiado em mim, me ensinado tudo o que sou e me proporcionar o amor mais lindo que já recebi. Minha maior saudade!

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade e pelo incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e pela concessão das bolsas de estudos, respectivamente.

Ao meu orientador, Dr. João Cândido de Souza, por permitir e auxiliar a realização dessa pesquisa. Pelos ensinamentos e por confiar em meu trabalho.

Aos professores da Pós- Graduação, pela contribuição na minha formação técnica e cidadã. Em especial às professoras Édila Vilela de Resende Von Pinho e Heloísa Oliveira dos Santos, pela constante presença, coorientação e pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho, Prof. Dra. Heloísa Oliveira dos Santos, Prof. Dra. Renata Silva Mann e Prof. Dr. José Maria Villela Pádua, pelas valiosas contribuições.

Aos secretários e funcionários do departamento de Biologia e departamento de Sementes, Lilian, Jaqueline e Geraldo, por todo o suporte e atenção.

Às minhas amigas de infância, Alice, Júlia, Laís, Marcella, Marina e Mariane, pela amizade linda e sólida que construímos nesses mais de 20 anos.

Aos meus amigos, Elise, Thamires, Giovana e Giovani, por me acompanharem durante toda essa caminhada e serem meu suporte e carinho em todos os momentos.

Aos amigos do Setor de Sementes pelo trabalho em equipe, auxílio e pela dedicação, além dos incontáveis casos e risadas. Obrigada pelo apoio na condução dos experimentos. Sem vocês essa conquista não seria possível.

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

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa conquista, muito obrigada!

"The important thing is not to stop questioning.
Curiosity has its own reason for existing."

Albert Einstein

RESUMO GERAL

Entender os mecanismos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico é fundamental em programas de melhoramento de milho para a escolha de metodologias seguras para a fenotipagem. A fenotipagem em sementes, plântulas e tecidos de reserva tem a vantagem de ser realizada de forma precoce, com menor demanda de tempo, espaço e mão de obra. Além da fenotipagem, a expressão de genes é importante para a elaboração de estratégias de melhoramento, uma vez que a superexpressão ou repressão desses genes influencia nos mecanismos de defesa das plantas. Assim, objetivou-se comparar dois métodos para simular condições de déficit hídrico. Foram utilizadas duas linhagens contrastantes para tolerância ao déficit hídrico. No primeiro método, sementes foram germinadas e as plântulas desenvolvidas em areia com 10% e 70% de capacidade de retenção de água. Foram avaliadas características relacionadas ao crescimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. No segundo método foi utilizado papel de germinação umedecido com solução de PEG 6000 (-0,6 MPa), e com água, ambiente controle. A partir do terceiro dia após a semeadura foram avaliados caracteres relacionados à germinação de sementes. Ao utilizar o substrato areia foi possível discriminar as linhagens por meio dos caracteres: comprimento de parte aérea, comprimento de raiz principal, número de raízes secundárias e emergência aos 4, 5 e 6 dias e índice de velocidade de emergência. Em solução de PEG 6000 foram observadas interações significativas entre genótipos *versus* ambientes para as variáveis: germinação aos 4 dias, índice de velocidade de emergência, emergência aos 4 e 7 dias, peso verde de raiz, peso verde de parte aérea e peso seco de parte aérea. Para peso seco de raiz foi observada significância para ambiente. Sementes de 203 progênies F_{2:3}, obtidas a partir das linhagens contrastantes, foram fenotipadas para esta característica utilizando-se a solução de PEG 6000. As avaliações foram realizadas aos cinco e sete dias após a semeadura e a partir dos dados obtidos as progênies foram classificadas como tolerantes, intermediárias e intolerantes. Das 203 progênies F_{2:3}, 108 progênies com 7 dias após a semeadura foram fenotipadas também por meio de análise de imagem. Foram avaliados o comprimento da raiz principal e parte aérea e o comprimento total. Foram calculadas as estimativas dos componentes de variância e as correlações entre esses dois métodos e entre as características avaliadas. Foi observada correlação de 74% entre os dados observados aos 5 e 7 dias e os valores da herdabilidade foram de 88,9% e 84,9%, respectivamente. Assim, concluiu-se que a fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico, seja por meio da análise de imagem ou tradicionalmente, pode ser realizada aos cinco dias após a semeadura, considerando o comprimento da raiz principal, e a solução de PEG 6000, com a vantagem de a fenotipagem pela análise de imagem ser mais rápida e apresentar menor demanda de mão de obra. Também foi avaliada a expressão de 14 genes associados à tolerância ao déficit hídrico pela técnica de qRT-PCR. Para isso, foram utilizadas plântulas e tecidos de reserva das progênies F_{2:3} e das linhagens tolerante e intolerante, desenvolvidas em papel de germinação umedecido com PEG 6000 (-0,6MPa). Fatores de transcrição como DREB 2A/2.1S, DREB2.7 e os genes relacionados às enzimas antioxidantes, CAT3, cAPX, LEA14, LEA D34 e ZmDHN1, se expressaram mais em linhagem e progênies classificadas como tolerantes ao déficit hídrico. A expressão de Bzip estiveram associados à intolerância à deficiência hídrica. Conclui-se que esses genes podem ser utilizados como marcadores para a seleção precoce de genótipos de milho para a tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Fenotipagem precoce. Seca. Desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. Germinação de sementes.

GENERAL ABSTRACT

Understanding the mechanisms involved in water deficit tolerance is essential in maize breeding programs for the choice of safe methodologies for phenotyping. Phenotyping to water deficit tolerance in seeds, seedlings and tissues of reserve has the advantage of being performed early, with less demand for time, space and labor. In addition to phenotyping, the expression of genes in seeds and seedlings and remaining tissues of maize reserve material is important for the development of improvement strategies since the overexpression or repression of these genes influences the defense mechanisms of plants. Thus, the objective was to compare two methods to simulate water deficit conditions. Two contrasting lineages were used to water deficit tolerance. In the first method, seeds were germinated and seedlings developed in sand with 10% and 70% of water retention capacity. Characteristics related to the growth of seedlings and tissues of reserve were evaluated. In the second method, germination paper was used moistened with a PEG 6000 solution (-0.6 MPa), and with water as a control. From the third day after sowing, characters related to seed germination were evaluated. When using the sand substrate, it was possible to discriminate the lineages by the characters: shoot length, main root length, number of secondary roots and emergence at 4, 5 and 6 days and emergence speed index. In PEG 6000 solution significant interactions were observed between genotypes versus environments for the variables: germination at 4 days, emergence speed index, emergence at 4 and 7 days, root and shoot green weight, and shoot dry weight. For root dry weight, significance for environment was observed. Seeds of 203 F_{2:3} progenies, obtained from contrasting lineages were phenotyped for this characteristic using the PEG 6000 solution. The evaluations were carried out at five and seven days after sowing and from the data obtained and progenies were classified as tolerant, intermediate and intolerant. Of the 203 F_{2:3} progenies, 108 progenies with 7 days after sowing were also phenotyped by image analysis. The length of the main root and shoot and the total length were evaluated. Estimates of variance components and correlations between these two methods and between the evaluated characteristics were calculated. Correlation of 74% was observed between the data observed at 5 and 7 days and heritability values were 88.9% and 84.9%. It was concluded that phenotyping to water deficit tolerance, either through image analysis or traditionally, it can be performed five days after sowing, considering the length of the main root, and the PEG 6000 solution, to simulate water restriction, with the advantage of phenotyping by image analysis is faster and shows less labor demand. The expression of 14 genes associated with tolerance to water deficit was also evaluated by the qRT-PCR technique. For this, seedlings and remaining tissues from F_{2:3} progenies were used, and from tolerant and intolerant lineages, developed on germination paper moistened with PEG 6000, for 7 days after sowing. Transcription factors such as DREB 2A/2.1S, DREB2.7 and the genes related to antioxidant enzymes, CAT3, cAPX, LEA14, LEA D34 and ZmDHN1, were more expressed in the tolerant lineage and progenies. Bzip expression were associated with non-tolerance to water deficit. It is concluded that these genes can be used as markers for the early selection of maize genotypes for water deficit tolerance.

Keywords: Early phenotyping, drought, development of seedlings and remaining tissues of reserve material, seed germination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho (%) aos 4, 5 e 6 dias após a semeadura e índice de velocidade de emergência (IVE), desenvolvidas em areia a 10 e 70% de capacidade de retenção de água.....	36
Tabela 2	Valores de comprimento de parte aérea e raiz principal e número de raízes seminais em plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho, aos 7 dias, desenvolvidas em areia com 10 e 70% de capacidade de retenção de água.	37
Tabela 3	Valores de germinação aos 4 dias e índice de velocidade de germinação de sementes de linhagens de milho germinadas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.	38
Tabela 4	Valores de emergência I aos 4 e 7 dias de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.	39
Tabela 5	Valores do Índice de velocidade de emergência I aos 4 e 7 dias de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.	39
Tabela 6	Valores de Emergência II aos 4 e 7 dias e índice de velocidade de emergência II (IVE2) de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.....	40
Tabela 7	Valores de pesos secos de parte aérea (PSPA) e pesos verdes de parte aérea e raiz (PVPA, PVR) de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.	40

Tabela 8	Valores do Peso seco de raiz aos 7 dias de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.	41
Tabela 9	Estimativas dos componentes de variâncias obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e correlação para os dados de Emergência I e II.....	45
Tabela 10	Estimativas dos componentes de variâncias obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) para as características avaliadas pela análise de imagem de progênies F _{2:3} e milho.....	45
Tabela 11	Correlações de postos de spearman entre as características avaliadas aos 5 e 7 dias após a semeadura, ambiente sob condição de estresse, e as características avaliadas por meio da análise de imagem.	48
Tabela 12	Correlações de postos de spearman entre as características avaliadas por meio da análise de imagem.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição da população F2 da combinação híbrida 91x57, em 10 classes fenotípicas, a partir dos resultados de germinação sob déficit hídrico, PEG 600, -0,6MPa, das sementes F2:3. UFLA, Lavras, MG, 2021.	42
Figura 2	Distribuição da população F2 da combinação híbrida 91x57, em 10 classes fenotípicas, a partir dos resultados de germinação sob déficit hídrico, PEG 600, -0,6MPa, das sementes F2:3. UFLA, Lavras, MG, 2021.	43

CHAPTER 2

LIST OF TABLES

Table 1	Primers used in the analysis of qRT-PCR	96
---------	---	----

LIST OF FIGURES

Figure 1	Expression of the genes LEA 14 (A), LEA D34 (B), ZmDHN1 (C) and cAPX (D) in maize seedlings of two lines (L91-T e L57-NT) and F _{2:3} progenies, under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.....	99
Figure 2	Expression of the genes CAT3 (A), AOX2 (B), SAD (C) and DREB 2A / 2.1S (D) in maize seedlings, from two lines (L91-T and L57-NT) and F _{2:3} progenies under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.....	101
Figure 3	Expression of the genes DREB 2.7 (A), ZmBZiP72 (B), ZmPP2C (C) and ZmCPKII (D) in maize seedlings, from two lines (L91-T and L57-NT) and F _{2:3} progenies under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.....	102
Figure 4	Expression of the genes Amilase B73 and ABA3 17 in maize seedlings, from two lines (L91-T and L57-NT) and F _{2:3} progenies under water stress conditions.....	104

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
	REFERÊNCIAS.....	18
	CAPÍTULO 1 - FENOTIPAGEM DE GENÓTIPOS DE MILHO PARA TOLERÂNCIA À SECA POR MEIO DO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS E TECIDOS REMANESCENTES DE MATERIAL DE RESERVA E ANÁLISE DE IMAGEM.....	20
	RESUMO.....	24
	ABSTRACT.....	24
1	INTRODUÇÃO.....	24
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICES.....	52
	CHAPTER 2 - GENE EXPRESSION IN MAIZE SEEDLINGS AIMING AT WATER DEFICIT TOLERANCE.....	85
	ABSTRACT.....	85
1	INTRODUCTION.....	87
2	MATERIAL AND METHODS.....	93
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	98
4	CONCLUSIONS.....	107
	REFERENCES.....	108

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o cultivo de milho na segunda safra é muito expressivo e, atualmente, representa cerca de 70% do total da produção brasileira, sendo que o déficit hídrico é o principal fator que limita a produtividade de grãos, também não incomum na primeira safra, o que traz prejuízos aos agricultores (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021).

Assim, o desenvolvimento de cultivares com tolerância ao déficit hídrico tem ganhado cada vez mais importância em programas de melhoramento de plantas, o que tem levado os melhoristas a explorar e avaliar a variabilidade genética para a tolerância ao déficit hídrico. Plantas estão sujeitas ao déficit hídrico em quaisquer estádios de desenvolvimento e respondem por diferentes mecanismos de tolerância, por meio de alterações metabólicas, fisiológicas e crescimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e plantas.

Entender os mecanismos envolvidos nessa característica é importante para a escolha do germoplasma, das metodologias adotadas quando da fenotipagem e da seleção, sendo essas segundo Cooper *et al.* (2014), as principais fases dos programas de melhoramento de milho, visando à tolerância ao déficit hídrico.

Além disso, o entendimento desses mecanismos é importante para a avaliação de transcritos relacionados à tolerância ao déficit hídrico. Vários genes levam às modificações estruturais e funcionais de tecidos e órgãos de plantas, modificações essas que incluem alterações em níveis moleculares, celulares e fenotípicos (PEREZ-ALFOCEA *et al.*, 2011).

Nessa linha, Setter (2012) define a fenotipagem como a avaliação e a mensuração de características que refletem a expressão de genes em um determinado ambiente. Assim é importante, para a fenotipagem segura, a escolha de caracteres que estejam associados à característica de interesse.

Para a tolerância à seca, uma importante estratégia em programas de melhoramento é a seleção precoce de genótipos por meio de características relacionadas à germinação e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva sob condições de déficit hídrico. Como vantagens dessa seleção podem ser citadas menores demandas de tempo e espaço e ainda possibilidade de as avaliações serem repetidas ao longo do ano (PACE *et al.*, 2014). No entanto, é importante que essas características estejam associadas à tolerância de plantas ao déficit hídrico, em condições de campo.

Em algumas pesquisas, metodologias para simular o déficit hídrico durante a germinação e o crescimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, têm sido propostas. Abreu *et al.* (2014), com o objetivo de caracterizar genótipos de milho contrastantes para a tolerância ao déficit hídrico, avaliaram a germinação e o desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva utilizando-se solução de Polietileno Glicol 6000 (PEG 6000), em potenciais osmóticos que variaram de 0 a -9 MPa. Observaram que foi possível discriminar os genótipos em soluções de PEG 6000 a -0,6 MPa. Marques *et al.* (2019), ao estudarem a expressão de genes em sementes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de milho associada ao déficit hídrico, utilizaram o substrato areia com 10% de capacidade de retenção de água. Importante ressaltar que tanto Abreu *et al.* (2014) e Marques *et al.* (2019), além de outros autores, Viçosi (2017), observaram que as variáveis relacionadas ao desenvolvimento, crescimento do sistema radicular e da parte aérea de plântulas são características eficientes para a seleção de genótipos de milho quanto à tolerância ao déficit hídrico.

No entanto, é importante ressaltar que é comum, em programas de melhoramento, a fenotipagem de um número elevado de indivíduos em processos de seleção. Nessas condições a fenotipagem, baseando-se em caracteres relacionados ao desenvolvimento e crescimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, é demorada, demanda muita mão de obra e pode não ser precisa. Nessas condições uma alternativa de fenotipagem de genótipos em escala é a utilização da análise de imagem, utilizando-se de *hardwares* e *softwares* desenvolvidos para esta finalidade.

De acordo com Sousa *et al.* (2015) a utilização desses métodos, em condições controladas, tem propiciado avanços para a identificação e exploração de genótipos tolerantes às características de estresse. Reynalds *et al.* (1988) ao avaliarem a tolerância de genótipos de milho à flutuação de temperatura, observaram em genótipos selecionados, em condições controladas, comportamento similar em condições de campo.

A fenotipagem em larga escala tem sido denominada de fenômica, uma vez que pode ser caracterizado um conjunto de fenótipos em analogia ao sequenciamento de um genoma (SOUSA *et al.*, 2015). Na análise de imagens se faz uso de *hardwares* e *softwares* desenvolvidos para esse fim, de forma não destrutiva, com a possibilidade de geração de muitos dados, em menor tempo, quando comparado aos métodos tradicionais.

Análises de imagens por meio do equipamento GroundEye têm se mostrado promissoras para a avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes (ALVARENGA; MARCOS FILHO; GOMES JÚNIOR, 2012).

Em milho, a análise de imagens relacionadas ao comprimento de coleótilo, raízes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva têm sido avaliadas para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes (MEDEIROS; PEREIRA; SILVA, 2018; PINTO *et al.*, 2015).

Messina *et al.* (2011) relatam que a fenotipagem em larga escala, em complemento ao sequenciamento de genomas, tem sido explorada para a validação de genes para a seleção de genótipos visando à tolerância aos estresses abióticos.

Nessa linha, em condições de deficiência hídrica, têm sido demonstradas, por meio de pesquisas, modificações funcionais e estruturais em raízes (PEREZ-ALFOCEA *et al.*, 2011), uma vez que a sensibilidade da raiz às alterações hídricas parece ser importante para a adaptação da planta ao déficit hídrico (SCHACHTMAN; GOODGER, 2008).

Diante disso, em pesquisas mais avançadas, a expressão de genes em raízes tem sido estudada sob condições de deficiência hídrica. Alguns genes associados à respiração parecem se expressar mais em cultivares de soja, (Mesquita, 2013). A AOX, oxidase alterantiva, enzima que participa de uma via alternativa da respiração parece se expressar mais em raízes de plantas intolerantes ao déficit hídrico.

Além dos genes envolvidos no sistema respiratório, outros expressam mais ou menos sob condições de deficiência hídrica e são importantes para a seleção de genótipos tolerantes à seca.

Yang *et al.* (2012) relataram que vias de regulação e síntese de ácido abscísico, ABA, também estão envolvidas na tolerância ao déficit hídrico e que é necessário suprimento de ABA nas raízes de plantas, para manter os níveis de ABA nas folhas, o qual está associado ao fechamento dos estômatos.

Há consenso entre os pesquisadores sobre a complexidade dos mecanismos de tolerância ao estresse hídrico, os quais envolvem vários genes e que segundo Seki *et al.* (2002) podem ser classificados em dois grupos. Um se refere aos genes que codificam proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais, a exemplo dos fatores de transcrição: DREBs, ZmBZIP72, ZmCPKII e ZmDHN1. O segundo grupo está relacionado à codificação de proteínas que atuam como receptoras de moléculas oxidantes, tais como, Superóxido dismutase, Catalase, Ascorbato peroxidase e aquelas proteínas protetoras de membranas como LEAs proteínas, Deidrinas e ainda as envolvidas na produção de energia, envolvidas principalmente na respiração.

Segundo os mesmos autores, o déficit hídrico é inicialmente percebido por proteínas receptoras, que estariam localizadas na superfície celular e então transduzidas ao núcleo estimulando a expressão de outros genes. A partir daí as plantas desenvolvem mecanismos de respostas adaptativas, para garantir a sobrevivência das plantas.

Nesse contexto, há a necessidade de estudar a expressão dos vários genes que dependem das ações conjuntas e da interação de caracteres morfológicos, sistema radicular eficiente, por exemplo, fisiológicos, como o fechamento de estômatos e ainda bioquímicos, como o acúmulo de solutos, a exemplo de prolina.

Desenvolver plantas tolerantes à seca é um desafio para os melhoristas, uma vez que nessas características há a interação de vários genes e o ambiente de crescimento das plantas.

Assim, objetivou-se em um primeiro experimento, comparar dois métodos de fenotipagem para características relacionadas à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva visando à identificação de genótipos de milho para a tolerância ao déficit hídrico. Em outro experimento foram comparadas as técnicas de análise de imagem e avaliação tradicional para a fenotipagem de progênies F_{2:3} de milho para tolerância ao déficit hídrico. Também, foi avaliada a expressão de 14 genes associados à tolerância ao estresse hídrico, pela técnica de qRT-PCR, em plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens e de progênies F_{2:3} classificadas quanto à tolerância ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V.M. *et al.* Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.
- ALVARENGA, R. O.; MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação do vigor de sementes de milho super doce por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 488-494, set. 2012.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sétimo levantamento: safra 2020/21**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- COOPER, M. *et al.* Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US Corn-belt: Discovery to product. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 6191–6204, 2014.
- MARQUES, T. L. *et al.* Physiological analysis and gene expression analysis of ZmDBP3, ZmALDH9, ZmAN13, and ZmDREB2A in maize lines. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 42, p. e43479, 2019.
- MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D.; SILVA, J. A. Processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 13, n. 3, e5540, 2018.
- MESQUITA, R. O. **Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja**. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- MESSINA, C. D. *et al.* Yield–trait performance landscapes: from theory to application in breeding maize for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 855–868, 2011.
- PACE, J. *et al.* Analysis of Maize (*Zea mays L.*) Seedling Roots with the High-Throughput Image Analysis Tool ARIA (Automatic Root Image Analysis) **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 9, e108255, 2014.
- PEREZ-ALFOCEA, F. *et al.* Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. **OMICS**, New Rochelle, v. 15, n. 12, p. 893-901, Dec. 2011.
- PINTO, C. A. G. *et al.* Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. **Revista de Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2015.
- SCHACHTMAN, D. P.; GOODGER, J. Q. D. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 281-287, 2008.

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. **The Plant Journal**, Rockville, v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.

SETTER, T. L. Analysis of constituents for phenotyping drought tolerance in crop improvement. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 3, p. 1-12, 2012.

SOUSA, C. A. F. *et al.* Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 8, p. 660-672, 2015.

VIÇOSI, K. A. *et al.* Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 4, p. 36-42, dez. 2017. Supl. 1.

YANG, D. *et al.* PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 146, p. 173-183, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01603.x>. Acesso em: 22 abr. 2021.

CAPÍTULO 1

**FENOTIPAGEM DE GENÓTIPOS DE MILHO PARA TOLERÂNCIA À SECA POR
MEIO DO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS E TECIDOS
REMANESCENTES DE MATERIAL DE RESERVA E ANÁLISE DE IMAGEM**

CHAPTER 1

**PHENOTYPING OF MAIZE GENOTYPES FOR DROUGHT TOLERANCE
THROUGH THE DEVELOPMENT OF SEEDLINGS AND REMAINING TISSUES
OF RESERVE MATERIAL AND IMAGE ANALYSIS**

RESUMO

A fenotipagem é uma das principais etapas em programas de melhoramento visando ao desenvolvimento e à comercialização de cultivares de milho com tolerância ao déficit hídrico. A fenotipagem, por meio de características relacionadas à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, sob condições controladas, pode ser realizada em menor tempo e espaço e requer menos mão de obra. Nesta pesquisa, foram comparados dois métodos para simular condições de déficit hídrico, utilizando-se duas linhagens contrastantes para tolerância ao déficit hídrico. No primeiro, sementes foram germinadas e as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em areia com 10% e 70% (controle), de capacidade de retenção de água. Aos 4, 5 e 6 dias após a semeadura foi avaliada a emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e com esses dados foi calculado o índice de velocidade de emergência. Após 7 dias da semeadura as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva foram retiradas do substrato e avaliadas quanto aos seguintes caracteres: comprimentos da parte aérea e comprimento de raiz principal, número de raízes seminais e pesos secos e verdes de partes aéreas e raiz. No segundo método foi utilizado papel de germinação, umedecido com solução de PEG 6000 (-0,6 MPa), e com água (controle). Do terceiro ao nono dia, após a semeadura, foram avaliados caracteres relacionados à germinação de sementes e crescimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. Aos nove dias, após a semeadura, foram avaliados os pesos secos e verdes de raiz e parte aérea. Ao utilizar o substrato areia foi possível discriminar as linhagens por meio dos caracteres: comprimento de parte aérea, comprimento de raiz principal, número de raízes secundárias e emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva aos 4, 5 e 6 dias e índice de velocidade de emergência. Quando foi utilizada a solução de PEG 6000 (-0,6MPa) foram observadas interações significativas entre genótipos x ambientes para as características: germinação aos 4 dias, índice de velocidade de germinação, plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com 0,5cm de parte aérea e 1 cm de raiz e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 2 cm de raiz principal e duas raízes secundárias, aos 4 e 7 dias, índice de velocidade de emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 2 cm de raiz principal e duas raízes secundárias, peso verde de raiz e parte aérea e peso seco de parte aérea. Para a característica de peso seco de raiz foi observada significância para ambiente e para índice de velocidade plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com 0,5cm de parte aérea e 1 cm de raiz houve significância para genótipos e para ambientes. Considerando a eficiência para discriminar os genótipos, a maior acurácia e menores demandas de tempo e mão de obra, as sementes de 203 progênies $F_{2:3}$, obtidas a partir das linhagens contrastantes para tolerância ao déficit hídrico, foram fenotipadas utilizando-se a solução de PEG 6000 (-0,6MPa). As avaliações foram realizadas aos cinco e sete dias após a semeadura e com os dados obtidos as progênies foram classificadas como tolerantes, intermediárias e não tolerante. Das 203 progênies $F_{2:3}$, plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de 108 progênies com 7 dias após a semeadura foram fenotipadas também por meio de análise de imagem. Foram avaliados o comprimento da raiz principal e parte aérea e o comprimento total, sendo que nesse último foi considerado o somatório do comprimento da raiz principal, das raízes secundárias e da parte aérea. Para as progênies $F_{2:3}$, em ambos os métodos de fenotipagem, foram calculadas as estimativas dos componentes de variância e as correlações entre os dois métodos e entre os características avaliadas. Foi observada correlação de 74% entre os dados observados aos 5 e 7 dias e os valores da herdabilidade foram de 88,9% e 84,9%, respectivamente. Maior correlação das variáveis avaliadas por meio da análise de imagem e tradicionalmente foi observada aos cinco

dias. Conclui-se que a fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico, seja por meio da análise de imagem ou tradicionalmente, pode ser realizada aos cinco dias após a semeadura, considerando o comprimento da raiz principal, quando é utilizada a solução de PEG 6000 (-0,6MPa), para simular a restrição hídrica, com a vantagem de a fenotipagem pela análise de imagem ser mais rápida e requerer menos mão de obra.

Palavras-chave: Déficit Hídrico. Polietilenoglicol. Crescimento de plântula.

ABSTRACT

Phenotyping is one of the main stages in breeding programs aimed at the development and commercialization of maize cultivars with water deficit tolerance. Phenotyping, through characteristics related to seed germination and development of seedlings and remaining tissues of reserve material, under controlled conditions, can be performed in less time and space and requires less labor. In this research, two methods were compared to simulate water deficit conditions, using two contrasting lineages to water deficit tolerance. In the first, seeds were germinated, and the seedlings and remaining tissues of reserve material developed in sand with 10% and 70% (control) of water retention capacity. At 4, 5 and 6 days after sowing, the seedlings emergence and remaining tissues of reserve material was evaluated and with these data the emergence speed index was calculated. After 7 days of sowing, the seedlings and remaining tissues of reserve material were removed from the substrate and evaluated for the following characters: shoot length and main root length, number of seminal roots and dry and green weights of shoots and root. In the second method, germination paper was used, moistened with a PEG 6000 solution (-0.6 MPa), and with water (control). From the third to the ninth day, after sowing, characters related to seed germination and seedling growth and remaining tissues of reserve material were evaluated. Nine days after sowing, root and shoot dry and green weights were evaluated. When using the sand substrate, it was possible to discriminate the lineages by the characters: shoot length, main root length, number of secondary roots and seedlings emergence and remaining tissues of reserve material at 4, 5 and 6 days and emergency speed index. When the PEG 6000 solution (-0.6 MPa) was used, significant interactions were observed between genotypes x environments for the characteristics: germination at 4 days, germination speed index, seedlings and remaining tissues of reserve material with 0.5cm of shoot and 1 cm of root and seedlings and remaining tissues of reserve material with at least 2 cm of main root and two secondary roots, at 4 and 7 days, emergence speed index of seedlings and remaining tissues of reserve material with at least 2 cm of main root and two secondary roots, root and shoot green weight and shoot dry weight. For the root dry weight characteristic, significance was observed for environment and for seedling speed index and remaining tissues of reserve material with 0.5 cm of shoot and 1 cm of root there was significance for genotypes and environments. Considering the efficiency to discriminate genotypes, greater accuracy and lesser demands on time and labor, the seeds of 203 F_{2:3} progenies, obtained from contrasting lineages to water deficit tolerance, they were phenotyped using the solution of PEG 6000 (-0.6 MPa). The evaluations were carried out at five and seven days after sowing and with the data obtained, the progenies were classified as tolerant, intermediate and non-tolerant. Of the 203 F_{2:3} progenies, seedlings and remaining tissues of reserve material from 108 progenies 7 days after sowing they were also phenotyped by image analysis. The length of the main root and shoot and the total length were evaluated, and in the latter, the sum of main root length, secondary roots and shoot was considered. For F_{2:3} progenies, in both phenotyping methods, estimates of variance components and correlations between two methods and between the evaluated characteristics were calculated. Correlation of 74% was observed between the data observed at 5 and 7 days and heritability values were 88.9% and 84.9%, respectively. Greater correlation of the variables evaluated through image analysis and traditionally was observed at five days. It is concluded that phenotyping to water deficit tolerance, either through image analysis or traditionally can be performed five days after sowing, considering the main root length, when the PEG 6000 solution (-0,6MPa) is used, to simulate water restriction, with the advantage of the phenotyping by image analysis is faster and requires less labor.

Keywords: Water Deficit. Polyethylene glycol. Seedling growth.

1 INTRODUÇÃO

Em programas de melhoramento de milho, a seleção de cultivares com tolerância à seca tem ganhado cada vez mais importância. No Brasil, tem sido observada expansão significativa de áreas cultivadas na segunda safra ou safrinha, época de semeadura caracterizada pelas condições de deficiência hídrica, considerado o fator mais limitante ao desenvolvimento e reprodução das plantas dessa cultura.

Devido ao aumento da área plantada, maior produtividade de grãos e consequente aumento da produção do milho safrinha, a segunda safra ganhou maior visibilidade e hoje representa mais de 70% de toda a produção brasileira de milho (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021). É importante ressaltar que o melhoramento genético é uma das principais ferramentas que garante o desenvolvimento de novas tecnologias e consequente aumento na produtividade por meio da recomendação de novas cultivares.

Assim, é importante desenvolver genótipos adaptados à essas condições ambientais, e para isso é fundamental entender os mecanismos envolvidos na característica de tolerância à seca. Sabe-se que as plantas estão sujeitas ao estresse hídrico em qualquer estágio do seu desenvolvimento, requerendo diferentes mecanismos de tolerância (BLUM *et al.*, 2011; ROY; TUCKER; TESTER, 2011). Segundo Cooper *et al.* (2014) os mecanismos fisiológicos relacionados à tolerância às condições de estresse devem ser estudados considerando a variação genética existente, visando ao melhoramento das plantas para essa característica. Segundo esses mesmos autores, as principais fases dos programas de melhoramento de milho, visando à tolerância à deficiência hídrica, são a escolha do germoplasma, a fenotipagem e a seleção.

A fenotipagem é a avaliação e a mensuração de características que refletem a expressão de genes em um determinado ambiente. Assim, a identificação de características que estejam relacionadas à tolerância à seca, por exemplo, é fundamental para a fenotipagem segura, (SETTER, 2012).

A fenotipagem realizada por meio de avaliações de características relacionadas à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva sob condições de déficit hídrico é uma estratégia importante em programas de melhoramento visando à seleção precoce de genótipos com tolerância à deficiência hídrica. Essa estratégia tem como vantagem as menores demandas de espaço e tempo. Além disso, as avaliações podem ser repetidas várias vezes ao longo do ano (MEEKS *et al.*, 2013; PACE *et al.*, 2014). A seleção para a tolerância ao déficit hídrico em nível de campo, em estádios

avançados de desenvolvimento das plantas, é complexa principalmente pela dificuldade de controlar as condições ambientais, as quais sejam necessárias para a indução do estresse, sem contudo, provocar a morte das plantas.

Abreu *et al.* (2018) com o objetivo de estudar a capacidade de combinação e a heterose das sementes de genótipos de milho sob condição de estresse hídrico, avaliaram a germinação e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva em substratos de areia ajustados para 70% e 10% de capacidade de retenção de água. Nesse trabalho, foi possível estudar a heterose e o controle genético para tolerância à deficiência hídrica, principalmente por meio das avaliações realizadas em raízes de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva submetidas ao estresse hídrico. Abreu *et al.* (2016) também, avaliaram estratégias para a seleção de genótipos de milho submetidas às condições de deficiência hídrica, nas condições descritas acima, nas fases de germinação de sementes e emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. Os autores observaram que a característica número de raízes seminais foi eficiente para a seleção dos genótipos de milho quanto à tolerância à deficiência hídrica.

Marques *et al.* (2018) estudaram a expressão gênica em sementes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho associada à deficiência hídrica e utilizaram substrato de areia a 10% de capacidade de retenção de água para simular um ambiente de seca. Os autores observaram interação significativa entre os genótipos e os ambientes avaliados, para as variáveis comprimento de raiz e parte aérea das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva.

Além da utilização do substrato areia com diferentes níveis de retenção de água para simular condições de deficiência hídrica visando à fenotipagem e seleção precoce de genótipos com tolerância à seca, em algumas pesquisas têm sido utilizadas substâncias como manitol e o polietilenoglicol (PEG), as quais podem ser utilizadas com diferentes níveis de potencial osmótico. Viçosi *et al.* (2018) simularam a deficiência hídrica por meio do manitol (C₆H₁₂O₆) para a avaliação de genótipos de feijão, milho e soja com tolerância à seca. As sementes das diferentes espécies foram germinadas na presença de solução de manitol em folhas de papel de germinação, com os níveis de potencial osmótico que variaram de 0 a -2,4 MPa. A germinação de sementes de milho foi reduzida significativamente em potenciais abaixo de -1,2MPa. Nesse trabalho o comprimento da radícula das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de milho foi reduzido com o aumento do potencial osmótico.

Em outra pesquisa desenvolvida por Abreu *et al.* (2014) a caracterização de genótipos de milho contrastantes em relação à tolerância à deficiência hídrica foi realizada utilizando-se soluções de PEG 6000. As sementes de milho foram germinadas sob potenciais osmóticos que variaram de 0 a -0,9MPa. Os autores também avaliaram a expressão de enzimas do sistema antioxidante da respiração em sementes submetidas aos diferentes tratamentos. O potencial osmótico que propiciou a melhor discriminação dos genótipos foi o de -0,6MPa.

Considerando que a seleção direta de genótipos com tolerância à deficiência hídrica é dificultada pela complexidade desse caráter (CATTIVELLI *et al.*, 2008), a identificação de caracteres que estejam diretamente relacionados à tolerância à seca é fundamental para a seleção de genótipos em programas de melhoramento. Segundo Guedes *et al.* (2015) para a obtenção de genótipos superiores, a avaliação de diversas características permite a inferência da superioridade desses, com boa precisão.

Nesse sentido, a avaliação de características relacionadas à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de milho sob condições de deficiência hídrica pode ser eficiente para a seleção de cultivares com tolerância à seca. Sabe-se que nessas avaliações é preciso usar metodologias seguras de fenotipagem. Além disso, em função do número elevado de indivíduos nos processos de seleção, as técnicas tradicionais de fenotipagem que se baseiam, por exemplo em caracteres relacionados ao desenvolvimento e crescimento de plantas, dificultam a caracterização das populações a serem analisadas. Essas técnicas demandam muito tempo e mão de obra.

Em função da necessidade de fenotipagem de genótipos em escala, têm-se explorado métodos avançados de análise de plantas, em abordagem denominada fenotipagem de plantas em larga escala e de alta precisão (SOUSA *et al.*, 2015). Segundo esses autores, a utilização desses métodos, em condições controladas tem propiciado avanços quanto à exploração de novas características que possibilitam a identificação de genótipos mais tolerantes a uma característica de interesse.

Existe preocupação dos melhoristas em relação ao comportamento dos genótipos em nível de campo quando a fenotipagem para uma determinada característica é feita em condições controladas. Nessa linha, em algumas pesquisas relacionadas à fenotipagem para a seleção à tolerância ao frio, Fujikawa *et al.* (1999), tolerância à seca em trigo e cevada, Munns *et al.* (2010), tolerância ao calor em trigo, Reynolds *et al.* (1998), tolerância de milho à flutuação de temperatura, Sadok *et al.* (2007), tolerância de cereais à salinidade, Sirault,

James e Furbank (2009), observaram em genótipos selecionados em condições controladas comportamento similar em condições de campo.

Por meio da fenotipagem é possível avaliar o desempenho de genótipos em determinado ambiente, utilizando-se de valores quantitativos ou qualitativos das características estudadas, (DHONDT; WUYTS; INZÉ, 2013).

Fenômica é a denominação dada à fenotipagem em larga-escala e tem por objetivo caracterizar um conjunto de fenótipos de um genoma em analogia ao sequenciamento de um genoma (SOUSA *et al.*, 2015). Essa tem sido associada às análises ópticas de características, principalmente por meio de imagens (WALTER; LIEBISCH; HUND, 2015). Para isso se faz, de forma não destrutiva, o uso de *hardwares* e *softwares* desenvolvidos para esse fim,

Ao utilizar este tipo de fenotipagem, é possível obter muitos dados em menor tempo, quando comparado aos métodos convencionais. Segundo Messina *et al.* (2011), a partir da fenotipagem em larga escala, em complemento ao sequenciamento de genomas, o conceito do mapa genótipo-fenótipo associado às interações genótipos x ambiente, tem sido explorado em várias pesquisas visando à tolerância aos estresses abióticos e validação de genes para a seleção de genótipos com características desejáveis.

A caracterização de genótipos em larga escala tem sido utilizada em plantas modelos e cultivadas, entre as quais podem ser citados o milho (SADOK *et al.*, 2007), trigo (GOLZARIAN *et al.*, 2011), entre outras.

O uso da análise de imagens de alta resolução permite a obtenção de dados relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, a exemplo de comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, número de raízes secundárias, dentre outras, os quais podem ser utilizadas para a tolerância à seca.

As imagens podem ser obtidas em equipamentos que possuem câmaras de captação de imagens e *softwares* desenvolvidos para as análises das imagens (BRANDANI *et al.*, 2017).

Segundo o mesmo autor, por meio deste equipamento é possível analisar imagens de sementes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e obter informações sobre o vigor de sementes, uniformidade e índice de crescimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, sendo que a obtenção desses dados é feita por meio de regressão multivariada. Para isso há a necessidade de calibrações específicas do equipamento.

A análise de imagens por meio do GroundEye tem se mostrado promissora em várias pesquisas para a avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes, com o objetivo de minimizar as limitações dos testes tradicionais. Além disso, há vantagens em relação à

redução do tempo para a obtenção dos resultados e de mão de obra. Também, elimina-se o erro humano, o que aumenta a confiabilidade dos dados, sem considerar que as imagens podem ser arquivadas para análises posteriores (ALVARENGA; MARCOS FILHO; GOMES JÚNIOR, 2012).

Pinto *et al.* (2015) concluíram que a utilização da análise de imagem por meio do GroundEye para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho é promissora. Os autores avaliaram características de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva como o comprimento médio de coleótilo, da raiz e das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva.

Em pesquisa desenvolvida por Medeiros, Pereira e Silva (2018) foram comparadas as determinações do comprimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de milho realizadas por meio de análise de imagem de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e pelos testes de germinação e vigor. Os autores não observaram diferenças entre as medições de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva feitas de maneira manual e automatizada e concluíram pela eficiência da técnica de análise de imagem associada principalmente à economia de tempo. Essa eficiência foi observada também para a avaliação do vigor em sementes de soja (BRANDANI, 2017), milho (LOPES *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2015).

Embora exista aumento do número de pesquisas relacionadas à utilização do GroundEye para a avaliação da qualidade física e fisiológica, poucos estão associados ao uso do mesmo para a fenotipagem de genótipos para características de interesse.

Marques, E. R. *et al.* (2019) avaliaram a eficiência do sistema de análise de imagens, pelo GroundEye, e da citometria de fluxo para a distinção de espécies de *Comanthera* em diferentes estádios de desenvolvimento das inflorescências. Os autores constataram que o sistema de análise de imagens tem potencial para diferenciar tanto as espécies estudadas quanto os estádios de desenvolvimento dessas. No entanto, nessa pesquisa não foi possível a distinção das espécies por meio de citometria de fluxo, por apresentarem tamanhos de genoma muito similares. Esses resultados são importantes porque comprovam a eficiência da análise de imagem, para o objetivo do trabalho, em detrimento de outra técnica.

Santos (2019), avaliou a diversidade genética em *Passiflora sp.*, por meio da fenotipagem digital na qual foi utilizado o equipamento GroundEye System Mini. Essa avaliação foi feita em sementes de diferentes espécies de maracujá, nas quais foram capturadas imagens para as variáveis: cor, geometria e textura. O autor concluiu que o uso de

descritores de sementes obtidos por meio de análise digital, utilizando o GorudEye System Mini, foi eficiente para a quantificação da divergência genética em sementes de *Passiflora*. O autor também enfatizou a importância da quantificação da divergência genética para o emprego em programas de melhoramento vegetal.

Não há dúvidas de que na última década houve avanço substancial quanto ao desenvolvimento de sistemas de capturação com a integração de *softwares* para a coleta e processamento de imagens, os quais permitem a correlação com características importantes. Visando à fenotipagem para características de interesse, Santos (2017) desenvolveu um sistema computacional por meio de análise de imagem para fenotipagem para a cultura do trigo, por meio do qual foi possível correlacionar a variabilidade dos valores de biomassa, em diferentes estádios fenológicos das plantas, com os tratamentos com nitrogênio e a produtividade de grãos. O autor concluiu que por meio desse sistema de análise de imagens, há a possibilidade de elaboração de modelos para a predição de produtividade, desde o início da cultura.

Assim, nesse trabalho objetivou-se num primeiro experimento, avaliar duas metodologias para simular a restrição hídrica durante a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de milho visando à fenotipagem de genótipos para tolerância ao déficit hídrico. Em outro experimento foram comparadas as técnicas de análise de imagem e avaliação tradicional para a fenotipagem de progênies F_{2:3} de milho para tolerância ao déficit hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG. Para a escolha das linhagens, foram considerados os resultados obtidos por Abreu *et al.* (2018), Marques *et al.* (2018) e Santos (2016).

Foram escolhidas duas contrastantes em relação à tolerância à deficiência hídrica, sendo a linhagem 91 classificada como tolerante e a linhagem 57 como não tolerante. As sementes dessas linhagens foram multiplicadas, por meio de autofecundações das plantas na área experimental do Departamento de Agricultura nas mesmas condições edafoclimáticas. Estas foram colhidas em espigas quando se encontravam com teor de água de 35%. Após a colheita, as espigas foram espalhadas à mão e secadas em secadores experimentais de pequena escala, descrito por Navratil e Burris (1982). As sementes foram submetidas à secagem a 45 °C na massa, até atingirem o teor de água de 12%. Em seguida, as sementes foram debulhadas manualmente, para evitar danos mecânicos.

Parte das sementes das linhagens foi utilizada para a instalação dos experimentos com o objetivo de comparar dois métodos de fenotipagem para a tolerância ao déficit hídrico, utilizando-se de caracteres relacionados à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. As sementes foram classificadas em peneiras de crivo oblongo, para a retirada das sementes redondas e em seguida foram classificadas em peneiras de crivo redondo. Foram utilizadas nesse experimento, sementes retidas na peneira 20. Na sequência, as sementes foram tratadas com o fungicida Vitavax/Thiram® 200 SC na dosagem de 300ml.100kg⁻¹ de sementes.

No primeiro método de fenotipagem, sementes das linhagens 57 e 91 foram semeadas em bandejas contendo como substrato a areia. Para simular a deficiência hídrica, a capacidade de retenção de água foi ajustada para 10%. Como testemunha a capacidade de retenção de água do substrato foi ajustada para 70%, segundo Abreu *et al.* (2018).

As bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 30 °C. A reposição de água foi realizada, em ambas as condições, diariamente, com base no peso inicial de cada bandeja. Aos 4, 5 e 6 dias após a semeadura, foi avaliada a Emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva (EMERG), e com esses dados foi calculado o índice de velocidade de emergência (IVE). Após sete dias da semeadura as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva foram retiradas do substrato e lavadas em água corrente

e na sequência, foram avaliados o comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz principal (CR), número de raízes seminais (NR), peso seco da parte aérea (PSPA), peso seco de raiz (PSR), peso verde da parte aérea (PVPA) e peso verde de raiz (PVR), segundo metodologias descritas por Abreu *et al.* (2018). Em ambas as condições, foram utilizadas 9 repetições de 10 sementes para cada genótipo e adotado o delineamento inteiramente casualizados (DIC).

A simulação das condições de deficiência hídrica foi feita por meio da utilização de soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) com potencial osmótico de -0,6Mpa, para umedecer os papéis de germinação, quando da sementeira. Esse potencial osmótico foi definido de acordo com os resultados obtidos por Abreu *et al.* (2014). Para a determinação da quantidade (peso) de PEG 6000 na solução, foi utilizada a metodologia proposta por Villela, Doni Filho e Sequeira (1991). Este experimento foi realizado com 4 repetições de 50 sementes e delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Nos tratamentos testemunha os papéis de germinação foram umedecidos com água. Neste experimento foram utilizadas sementes da linhagem 91, classificadas como tolerante ao déficit hídrico e da linhagem 57 classificada como não tolerante à seca.

As 50 sementes, por repetição, de cada linhagem foram dispostas em três folhas de papel (Germitest[®]), umedecidas com 2,5 vezes seu peso, com solução de polietilenoglicol e água destilada (controle). Após a sementeira, os rolos de papel contendo as sementes, foram acondicionados em sacos plásticos, para evitar a evaporação da água e da solução de PEG e na sequência mantidos em câmara de germinação do tipo BOD sob temperatura constante de 30 °C.

Foi avaliada, a partir do terceiro dia após a sementeira, a germinação das sementes, sendo consideradas como germinadas, as sementes com protrusão radicular. A partir dessas avaliações, também foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação com base na fórmula de Maguire (1962).

Em outra avaliação foram contabilizadas diariamente, as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com 0,5 cm de parte aérea e 1 cm de raiz principal, identificadas como Emergência I. Também, foram contabilizadas, diariamente, as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 2cm de raiz principal e com pelo menos duas raízes seminais, identificada como Emergência II. Essas avaliações foram realizadas a partir do terceiro dia e finalizadas aos nove dias, após a sementeira. A partir dos resultados, foram consideradas para Germinação, Emergência I e Emergência II os dados obtidos aos 4 e 7 dias após a sementeira. Também foi calculado o Índice de Velocidade de

Emergência I e II, considerando as avaliações realizadas diariamente a partir do terceiro dia, com base na fórmula de Maguire (1962).

Aos nove dias, após a semeadura, foram avaliados os pesos verdes e secos da parte aérea e da raiz das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva das linhagens 57 e 91.

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o auxílio do programa R[®] (R DEVELOPMENTE CORE TEAM, 2019).

A partir dos resultados observados nos primeiros e segundos métodos de fenotipagem, utilizou-se a solução de PEG 6000 com potencial osmótico de -0,6 Mpa, para simular as condições de deficiência hídrica, para a fenotipagem das progênes F_{2:3}.

Para a produção das sementes das progênes F_{2:3}, foi implantado um campo para produção de sementes do híbrido simples, produzidas por meio do cruzamento entre as linhagens 91 e 57. Os cruzamentos para obtenção dos híbridos F₁ foram realizados manualmente entre as plantas dos parentais e por ocasião do florescimento das plantas, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando houve receptividade dos estilo-estigmas, os pendões das plantas doadoras de pólen foram cobertos com saco de papel para evitar a contaminação genética, e no dia seguinte foi realizado o cruzamento. Plantas das linhagens 91 e 57 também foram autofecundadas para a produção de sementes. O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química. Foi utilizado o espaçamento de 0,8m entre linhas e 7 plantas por metro linear. A adubação de cobertura, assim como os demais tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com as necessidades da cultura.

Após 60 dias da semeadura, espigas eram amostradas, semanalmente, para a avaliação do teor de água das sementes e a colheita foi realizada quando estas apresentaram 25% de teor de água. As espigas provenientes das autofecundações das linhagens e dos cruzamentos foram colhidas manualmente, secadas em secador de espigas a 35 °C até atingirem o teor de água de 13%. Posteriormente, foram debulhadas manualmente. As sementes foram classificadas quanto ao tamanho em peneiras de crivos circulares e foram utilizadas as sementes que ficaram retidas nas peneiras 20. Em seguida, as sementes foram armazenadas em câmara fria a 10 °C. Essas sementes (tanto das linhagens quanto dos híbridos F₁ e recíprocos) foram obtidas por Abreu *et al.* (2016) e utilizadas nesse trabalho.

Sementes das linhagens e dos híbridos, bem como as das gerações F₂ (safra /2016) e F_{2:3} (Safra 2018/2019) foram produzidas em área experimental do Departamento de Agricultura/UFLA, conforme descrito anteriormente.

Previamente à instalação dos experimentos, sementes das progênes F_{2:3} foram classificadas em peneiras de crivo oblongo e em seguida classificadas em peneiras de crivo redondo. Foram selecionadas sementes de 203 progênes F_{2:3} retidas na peneira 20. As sementes foram tratadas com fungicida Vitavax/Thiram[®] 200SC na dosagem de 300ml.100Kg⁻¹ de sementes.

A partir dos resultados obtidos nos métodos de simulação de restrição hídrica em areia e em papel com PEG -0,6MPa, foi selecionado método de PEG -0,6MPa. Foram utilizadas 30 sementes de cada progênie, em duas repetições de 15 cada.

As avaliações foram realizadas com base em dois critérios. Aos cinco dias após a instalação do experimento, foram contabilizadas as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva que possuíam pelo menos 3cm de raiz principal (Emergência I) e aos sete dias após a instalação do experimento, foram contabilizadas as plântulas e os tecidos remanescentes de material de reserva que possuíam pelo menos 3cm de raiz principal, presença de parte aérea e pelo menos 3 raízes secundárias (Emergência II).

As progênes foram classificadas quanto à tolerância ao déficit hídrico de acordo com os seguintes critérios: Tolerantes (80% a 100%), Intermediárias (79% a 50%) e Intolerantes (abaixo ou igual a 49%), com base nos resultados observados aos 5 e 7 dias conforme critérios descritos acima. Essa classificação foi realizada de acordo com a pesquisa desenvolvida por Salgado *et al.* (2008).

Também foi realizada a fenotipagem das progênes F_{2:3}, por meio da técnica de análise de imagens. Das 203 progênes foi realizada a captura de imagens de 108 plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, após sete dias da semeadura, utilizando o equipamento GroundEye S800[®]. Este equipamento é composto por um módulo de captação que possui uma bandeja de acrílico, uma câmera de alta resolução e um *software* integrado para avaliação. Foram utilizadas duas repetições de 10 plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva por progênie. Na configuração da análise, para a calibração da cor de fundo, foi utilizado o modelo de cor CIELab, com índice de luminosidade de 0 a 100, dimensão “a” - 120,0 a 120,0 e dimensão “b” de -120,0 a -25,5.

Após a análise das imagens capturadas foram extraídos valores médios das características dimensionais das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva,

sendo eles: comprimento da raiz principal e da parte aérea e tamanho total de plântula. Para o tamanho total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva foram considerados os comprimentos das raízes principais e secundárias e da parte área.

Ambos os métodos utilizados para a fenotipagem das progênies $F_{2:3}$ seguiram o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5%, com o auxílio do programa R[®] (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). As análises foram realizadas segundo o modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + p_i + e_{ij}$$

Em que:

y_{ij} : observação da progênie i na repetição j;

μ : constante geral associada a todas as observações;

p_i : efeito fixo da progênie i, $p_i \sim N(0, \sigma_p^2)$;

e_{ij} : erro experimental aleatório associado à observação y_{ij} , $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Para as estimativas dos componentes de variâncias, os dados foram analisados via abordagem de modelos mistos obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML). As significâncias dos componentes foram aferidas por meio do teste da razão de verossimilhança (*Likelihood-ratio test* – LRT).

Para a realização das análises dos dados adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ij} = \mu + p_i + e_{ij}$$

Em que:

y_{ij} : observação da progênie i na repetição j;

μ : constante geral associada a todas as observações;

p_i : efeito aleatório da progênie i, $p_i \sim N(0, \sigma_p^2)$;

e_{ij} : erro experimental aleatório associado à observação y_{ij} , $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

A qualidade experimental foi aferida por meio das estimativas de coeficiente de variação experimental (CV%) e acurácia seletiva proposta, utilizando-se os seguintes estimadores:

$$CV (\%) = \frac{\sqrt{\sigma_e^2}}{\bar{Y}} * 100$$

Em quem:

σ_e^2 : componente de variância residual;

\bar{Y} : média fenotípica geral.

$$r_{gg'} = \sqrt{1 - \left(\frac{PEV}{\sigma_p^2} \right)}$$

Em que:

PEV: variância do erro de predição dos BLUPs

σ_p^2 : componente de variância de progênies.

As estimativas de herdabilidade foram obtidas de acordo com o seguinte estimador:

$$h^2 = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_p^2 + \frac{\sigma_e^2}{r}}$$

Em que:

σ_p^2 : componente de variância de progênies;

σ_e^2 : componente de variância residual;

r: número de repetições.

Foram obtidos ainda os coeficientes de correlação de Spearman entre o ranqueamento das progênies das avaliações realizadas aos 5 e 7 dias (PEG), entre os caracteres avaliados na análise de imagem (comprimento da raiz primária e parte aérea e tamanho total de plântula) e entre ambos os experimentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à fenotipagem realizada por meio da avaliação de características associadas à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva sob condições de deficiência hídrica em areia, foram observadas diferenças significativas entre os genótipos para as variáveis Emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, avaliadas aos 4, 5 e 6 dias, Índice de velocidade de emergência (IVE), Número de raízes seminais, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz principal em plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva após 6 dias de semeadura. Também foi observada diferença significativa entre os ambientes para comprimento de parte aérea e número de raízes seminais.

Aos quatro, cinco e seis dias os valores de emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva foram maiores para a linhagem 91, o que foi observado também para IVE (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho (%) aos 4, 5 e 6 dias após a semeadura e índice de velocidade de emergência (IVE), desenvolvidas em areia a 10 e 70% de capacidade de retenção de água.

	Linhagem 91 (tolerante)	Linhagem 57 (não tolerante)	CV (%)
4 dias	66 a	39 b	50,06
5 dias	98 a	89 b	8,84
6 dias	99 a	94 b	6,17
IVE	5,28	4,32	17,19

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Quanto às variáveis comprimento de parte aérea, comprimento raiz principal e número de raízes seminais (Tabela 2) maiores valores foram observados em plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva da linhagem 57.

Tabela 2 - Valores de comprimento de parte aérea e raiz principal e número de raízes seminais em plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho, aos 7 dias, desenvolvidas em areia com 10 e 70% de capacidade de retenção de água.

Linhagens	Comprimento		N ^o de Raízes Seminais
	Parte Área	Raiz Principal	
91	9,91 B	12,87 B	3,22 B
57	10,82 A	15,205 A	6,0 A
CV (%)	9,91	15,67	6,76

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Santos (2016), ao avaliar diferentes genótipos de milho quanto à tolerância à deficiência hídrica, nas mesmas condições avaliadas nesse experimento, observou diferença dos genótipos 91 e 57 por meio das variáveis emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, comprimento de raiz, sendo os maiores valores observados para a linhagem 91. A mesma autora não observou diferença desses materiais em relação ao comprimento da parte aérea. Marques, T. L. *et al.* (2019) observaram interação significativa entre os genótipos avaliados para a característica de tolerância à deficiência hídrica e os ambientes, areia com 10 e 70% de capacidade de retenção de água para as variáveis comprimento de raiz e parte aérea.

Para verificar a contribuição relativa de genótipos e ambientes, foi efetuada a análise de variância conjunta dos dados referentes à emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e índice de velocidade de emergência (IVE). As análises de emergência foram realizadas separadamente para cada dia de leitura. Foi possível constatar que a contribuição de Genótipos foi maior em todas as avaliações (Tabela 1A).

O mesmo procedimento foi adotado para proceder as análises conjuntas para os dados de comprimento de parte aérea e raiz, número de raízes secundárias, peso seco e verde de parte aérea e raiz (Tabela 1B e 1C). A contribuição de ambientes foi maior para o comprimento de parte aérea ($R^2 = 73,39$) e a contribuição de genótipos foi maior para os dados de comprimento de raiz ($R^2 = 97,21$) e número de raízes secundárias ($R^2 = 100$).

Pelos resultados da análise de variância referente à metodologia na qual foi utilizada a solução de PEG 6000 (-0,6 Mpa), foram observadas interações significativas entre Genótipos *versus* Ambientes (água e solução de PEG 6000) para as variáveis: Germinação aos quatro dias, Índice de velocidade de germinação (IVG), Emergência I e II aos quatro e sete dias,

IVE₂, Peso verde de raízes e parte aérea e Peso seco de parte aérea (PVR, PVPA e PSPA). Para o peso seco de raízes (PSR) foi observada significância para ambientes e para IVE₁ houve significância para genótipo e para ambiente (Tabela 1D e 1E).

Maiores valores de germinação aos quatro dias do índice de velocidade de germinação (IVG), do índice de velocidade de emergência I e II (IVE₁, IVE₂), da emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva II aos quatro e sete dias foram observados em sementes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva da linhagem 91 germinadas e desenvolvidas na presença de solução de PEG 6000 e menores valores para essas variáveis foram observados em sementes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva da linhagem 57, sendo essas classificadas como tolerante e susceptível ao déficit hídrico, respectivamente (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3 - Valores de germinação aos 4 dias e índice de velocidade de germinação de sementes de linhagens de milho germinadas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.

Linhagens	4 dias		IVG	
	Água	PEG	Água	PEG
91	100 Aa	98 Aa	66 Aa	61 Ab
57	98 Aa	57 Bb	64 Aa	42 Bb
CV	5,14		3,20	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Ainda em relação a essas variáveis, não houve diferença significativa entre as linhagens avaliadas, quando a germinação e o desenvolvimento das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva ocorreram na ausência de estresse hídrico, em papel umedecido com água (Tabela 3).

Aos sete dias não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados, embora, em valores absolutos, na presença de solução de PEG tenha havido superioridade da linhagem 91.

Em relação à Emergência I, aos quatro dias, menor valor foi observado para a linhagem 57, quando desenvolvidas, na presença de água. Na presença de solução de PEG, não foram observadas quaisquer plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, independentemente da linhagem. Já aos sete dias, após a semeadura, considerando o critério adotado para avaliar o desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de

reserva não houve diferença significativa entre as linhagens quando foi utilizada a água para o umedecimento do papel (Tabela 4). Menores valores para essa variável foram observados para a linhagem 57. Para a variável IVE_1 a interação entre linhagens x ambientes não foi significativa, no entanto maiores valores foram observados para a linhagem 91 e quando o papel foi umedecido com água (Tabela 5).

Tabela 4 - Valores de emergência I aos 4 e 7 dias de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.

Linhagens	Emergência I			
	4 dias		7 dias	
	Água	PEG	Água	PEG
91	98 Aa	0 b	98,5 Aa	71,5 Ab
57	73 Ba	0 b	96,5 Aa	30,5 Bb
CV	8,21		9,87	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 5 - Valores do Índice de velocidade de emergência I aos 4 e 7 dias de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.

Linhagens	Índice de Velocidade de Emergência (IVE_1)			CV (%)
	Ambientes			
91	31,25 A	Água	45,55 A	8,39
57	25,9 B	PEG	11,6 B	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Aos quatro e sete dias, após a semeadura, os valores de emergência II em papel umedecido com água, não diferenciaram estatisticamente entre as linhagens avaliadas. Na presença de solução PEG 6000, houve superioridade da linhagem 91 (Tabela 6). Isso também foi observado para a variável IVE_2 .

Tabela 6 - Valores de Emergência II aos 4 e 7 dias e índice de velocidade de emergência II (IVE2) de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.

Linhagens	Emergência II				IVE2	
	4 dias		7 dias		Água	PEG
	Água	PEG	Água	PEG		
91	99 Aa	69 Ab	99 Aa	99 Aa	24.88 Aa	22.1 Ab
57	94 Aa	10 Bb	97 Aa	83 Bb	23.99 Aa	18.35 Bb
CV	15,61		3,65		5,86	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Em relação aos resultados observados para as variáveis Peso verde de raízes e peso verde e seco de parte aérea, Tabela 7, não foram observadas diferenças significativas quando as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva das linhagens 91 e 57 foram desenvolvidas na presença de solução de PEG 6000. No entanto, quando as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva foram desenvolvidas em papel umedecido com água, maiores valores foram observados para a linhagem 91.

Tabela 7 - Valores de pesos secos de parte aérea (PSPA) e pesos verdes de parte aérea e raiz (PVPA, PVR) de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.

Linhagens	PSPA		PVR		PVPA	
	Água	PEG	Água	PEG	Água	PEG
91	2,5 Aa	0,12 Ab	12,32 Aa	2,10 Ab	29,81 Aa	0,615 Ab
57	2,0 Ba	0,19 Ab	8,13 Ba	1,84 Ab	18,47 Ba	0,690 Ab
CV (%)	7,72		19,48		5,93	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Quanto à variável Peso seco de raiz, a interação entre os fatores não foi significativa. Maiores valores foram observados para a linhagem 91 e quando o papel foi umedecido com água (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores do Peso seco de raiz aos 7 dias de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva desenvolvidas em papel umedecido com solução de PEG 6000 e água.

Peso seco de raiz (PSR)				
Linhagens	Ambientes		CV (%)	
91	0,76 A	Água	1,09 A	11,62
57	0,69 B	PEG	0,36 B	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

Pelos resultados observados nesse experimento no qual foram avaliadas características relacionadas à germinação e ao desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, pode-se inferir que a restrição hídrica por meio da utilização de solução de PEG 6000 a -0,6 MPa, foi eficiente para a fenotipagem de materiais contrastantes quanto ao déficit hídrico. Setter (2012) relatou que a identificação de características relacionadas à tolerância aos estresses é fundamental para a fenotipagem. Durães *et al.* (2004) citaram que a escolha da fase de desenvolvimento da cultura que expresse tolerância ao estresse hídrico é um dos requisitos mais importantes para a fenotipagem.

Na presente pesquisa foram avaliadas características relacionadas à germinação de sementes e ao desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva sob condições de deficiência hídrica. Sabe-se que durante a germinação das sementes ocorre uma série de reações de hidrólise e síntese de substâncias as quais são dependentes da água (MARCOS FILHO, 2015). Condições de deficiência hídrica, durante os processos podem influenciar no porcentual de germinação, nas velocidades de germinação das sementes e emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, o que pode comprometer o estabelecimento da cultura no campo (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Poucas são as pesquisas nas quais se utilizam sementes e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva para a fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico. Segundo Kranner *et al.* (2010), as sementes são altamente vulneráveis à incidência do estresse durante o desenvolvimento ou germinação, o que resulta na perda do vigor ou viabilidade, fazendo desse órgão um modelo atrativo para o estudo relacionado à tolerância a estresses abióticos, a exemplo de déficit hídrico, o que pode ser confirmado nos resultados dessa pesquisa. Resultados semelhantes aos observados nessa pesquisa também foram observados por Abreu *et al.* (2014, 2018), Baccini e Scapim (2004), Marques, T.L. *et al.* (2019) e Santos (2016).

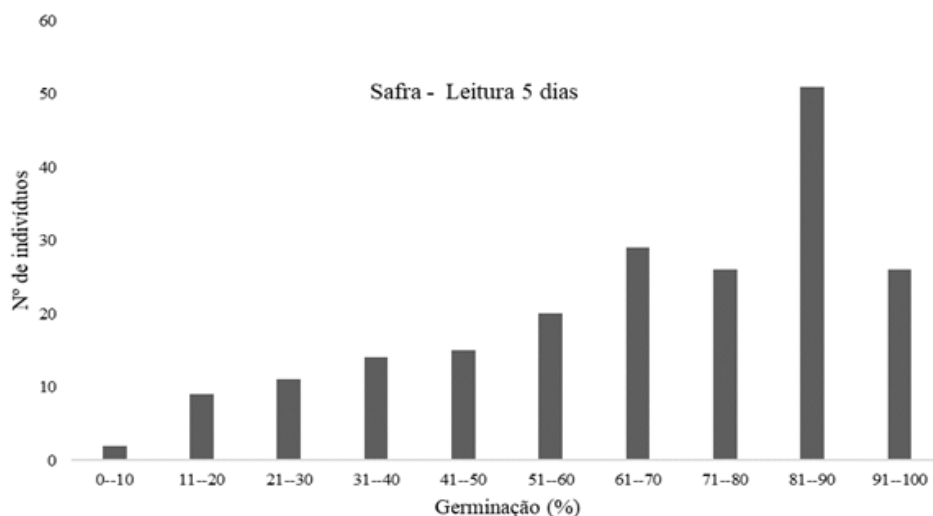
Sabe-se que a fenotipagem é uma fase importante em programas de melhoramento visando à tolerância ao déficit hídrico e que esta deve ser feita por meio de caracteres que devem refletir a expressão de genes para a característica de interesse. Assim, entende-se que os caracteres selecionados para esse fim devam apresentar repetibilidade dos resultados para a seleção segura dos genótipos.

Considerando os resultados obtidos em outras pesquisas, com diferentes objetivos, a linhagem 91 se destacou em relação à tolerância à seca, enquanto a linhagem 57 se comportou como intolerante. Em relação aos resultados obtidos na presente pesquisa, infere-se que a avaliação dos caracteres relacionada à germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva submetidas ao déficit hídrico quando da utilização de solução de PEG 6000 (0,6 MPa) pode ser considerada segura para a fenotipagem de genótipos quanto à tolerância à seca. Nessa condição, o caráter, por meio da qual foram consideradas as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com os maiores comprimentos de raiz principal, mínimo 2 cm, e com mais de duas raízes seminais, pode ser utilizado para a fenotipagem aos 4 dias.

Nas Figuras 1 e 2 encontram-se a distribuição dos indivíduos da população F_2 de acordo com os resultados de germinação sob déficit hídrico, realizada em sementes das 203 progênes $F_{2:3}$ de indivíduos da população F_2 , aos 5 e 7 dias, respectivamente.

Observa-se pela Figura 1, maior número de progênes com germinação das sementes entre 81 e 90%, seguido daquelas com germinação entre 61 e 70%, quando avaliadas no quinto dia após a semeadura.

Figura 1 - Distribuição da população F_2 da combinação híbrida 91x57, em 10 classes fenotípicas, a partir dos resultados de germinação sob déficit hídrico, PEG 600, - 0,6MPa, das sementes $F_{2:3}$. UFLA, Lavras, MG, 2021.

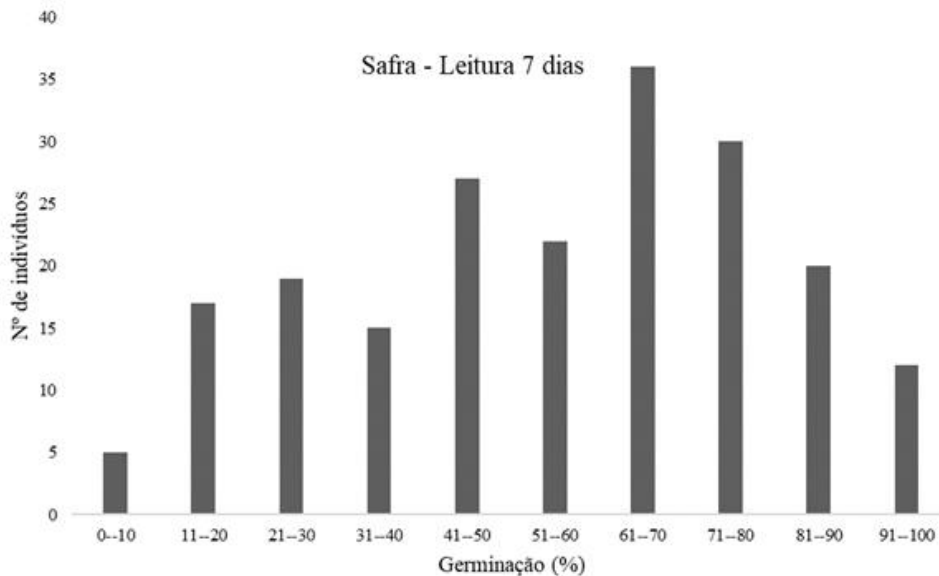


Fonte: Da autora (2021).

Aos 7 dias, Figura 2, foi observado maior número de progênies com germinação entre 61 e 70%, seguido daquelas com germinação entre 71 e 80%. Na avaliação aos 7 dias observa-se menor concentração dos dados de germinação nas classes extremas. Isso não foi observado aos cinco dias.

Ao analisar os dados, deve ser considerado que aos cinco dias foram consideradas emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 3 cm de raiz principal e no sétimo foram computadas as plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 3 cm de raiz principal, 3 raízes seminais e parte aérea presente.

Figura 2 - Distribuição da população F2 da combinação híbrida 91x57, em 10 classes fenotípicas, a partir dos resultados de germinação sob déficit hídrico, PEG 600, - 0,6 MPa, das sementes F2:3. UFLA, Lavras, MG, 2021.



Fonte: Da autora (2021).

Salgado *et al.* (2014) também observaram distribuição não normal nos dados de vigor de sementes, avaliada pelo teste de envelhecimento acelerado quando foi realizada a fenotipagem de progênies F_{2:3} em estudo de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. Os autores relataram que esse comportamento pode ser indicativo de herança oligogênica.

Ao considerar a segregação de um gene maior e assumir que a distribuição fenotípica de cada genótipo do gene maior seja normal, a distribuição resultante é geralmente não normal, o que não implica concluir sobre a presença de um gene maior (RESENDE, 2004).

O componente da variância genética (progênie) foi de grande magnitude e significativo, para todos os caracteres avaliados e em ambos os métodos de fenotipagem, manual e por meio da análise de imagem, evidenciando a existência de variabilidade genética entre as progênes F_{2:3} (Tabelas 9 e 10). A baixa magnitude do componente de variância residual, em ambos os métodos de fenotipagem, constata a pouca variação ambiental quando da utilização de PEG 6000 (-0,6 MPa), assegurando uma montagem precisa dos experimentos para avaliação dos métodos de fenotipagem (Tabelas 9 e 10).

É importante enfatizar que o alto valor do coeficiente de variação (CV) para a característica comprimento de parte aérea, avaliado por meio da análise de imagem, é explicado pelo fato de os dados para essas características serem de pequena magnitude, próximos a 0,00, o que reduz a média do experimento e influência diretamente no aumento do seu valor (Tabela 10).

Os valores estimados para a herdabilidade (Tabela 9) foram altos, considerando as avaliações aos 5 dias e 7 dias, 88,4 % e 84, 9%, respectivamente. Ao comparar estes resultados, infere-se que a fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico, utilizando solução de PEG 6000 (-0,6 Mpa), aos cinco dias, considerando o desenvolvimento da raiz principal, apresenta alta eficiência para a seleção de genótipos para a tolerância ao déficit hídrico.

Ao considerar as herdabilidades referentes aos caracteres avaliados por meio de análise de imagem, comprimento de raiz primária, comprimento de parte aérea e tamanho total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, 97%, 92% e 97%, respectivamente, é possível concluir que mais de 90% da variação total observada em todas as características é de origem genética, o que diminui a probabilidade de erro na seleção.

Dessa forma, ao considerar que a herdabilidade não se refere apenas à característica de tolerância ao déficit hídrico, mas também aos genótipos e às condições ambientais nas quais foram submetidos os indivíduos, conclui-se que houve pouca variação ambiental.

Tabela 9 - Estimativas dos componentes de variâncias obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e correlação para os dados de Emergência I e II de progênies F_{2:3} e milho.

Parâmetro	Emergência I (5 dias)	Emergência II (7 dias)
$\hat{\sigma}_{Prog}^2$	503,94***	470,14***
$\hat{\sigma}_e^2$	130,99	166,78
\hat{H}^2	0,89	0,85
$r_{gg'}$	0,94	0,92
CV (%)	17,02	22,94
Mínimo	13,93	14,43
Máximo	96,23	90,44
Média	67,24	56,29
Amplitude de Variação	82,3	76,01
Correlação de spearman	0,74***	

^{1/} Variância de progênies ($\hat{\sigma}_{Prog}^2$), variância residual ($\hat{\sigma}_e^2$), herdabilidade no sentido (h²) amplo e acurácia seletiva ($\hat{r}_{gg'}$). ^{2/} Magnitudes das médias BLUPs. Significância pelo teste de verossimilhança (Likelihood Ratio Test) - 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**'.

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 10 - Estimativas dos componentes de variâncias obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) para as características avaliadas pela análise de imagem de progênies F_{2:3} e milho.

Parâmetro	Comprimento		
	Raiz primária	Parte aérea	Tamanho total
$\hat{\sigma}_{Prog}^2$	4,10***	0,18***	5,41***
$\hat{\sigma}_e^2$	2,41	0,31	3,31
\hat{H}^2	0,97	0,92	0,97
$r_{gg'}$	0,99	0,96	0,99
CV (%)	20,36	82,50	21,89
Mínimo	4,05	0,06	4,37
Máximo	11,05	2,24	12,29
Média	7,63	0,68	8,30
Amplitude de variação	7,00	2,18	7,92

^{1/} Variância de progênies ($\hat{\sigma}_{Prog}^2$), variância residual ($\hat{\sigma}_e^2$), herdabilidade no sentido amplo (h²) e acurácia seletiva ($\hat{r}_{gg'}$). ^{2/} Magnitudes das médias BLUPs. Significância pelo teste de verossimilhança (Likelihood Ratio Test) - 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**'.

Fonte: Da autora (2021).

Os valores estimados da acurácia, para todos os caracteres avaliados e em ambos os métodos de fenotipagem, manual e por meio da análise de imagem, foram de grande magnitude, acima de 90%, evidenciando a baixa probabilidade de erro na seleção (Tabelas 9 e 10).

Das progênies avaliadas (203), 82 foram classificadas como tolerantes, 75 como intermediárias e 46 como intolerantes, com 80 a 100%, 50 a 79% e abaixo ou igual a 49% de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 3 cm de comprimento de raiz principal, 5 dias, respectivamente (Tabela 2A).

Aos 7 dias de avaliação, quando foram contabilizadas plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 3 cm de raiz principal, 3 raízes secundárias e presença de parte aérea, observaram-se em 38, 92 e 73 progênies, valores de 80 a 100%, tolerantes, 50 a 79%, intermediárias e abaixo ou igual a 49%, intolerantes, respectivamente (Tabela 2B).

Ressalta-se que para as linhagens 91 e 57, nas mesmas condições utilizadas para as progênies, foram observadas 90% e 25% de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva com pelo menos 3cm de raiz principal, 5 dias, respectivamente e 87% e 21% aos 7 dias com padrão estabelecido e já descrito.

Importante considerar que 92,1% das progênies classificadas como tolerantes e avaliadas aos sete dias, também foram classificadas como tolerantes na avaliação realizada no quinto dia, de acordo com os critérios já descritos (Tabelas 2A e 2B).

Assim, se considerarmos a classificação de tolerantes aos cinco dias não há risco de descartar progênies tolerantes uma vez que pelo critério utilizado classificou-se mais progênies tolerantes no quinto dia. Por outro lado, classificou-se um menor número de progênies intolerantes no quinto dia (Tabelas 2A e 2B). Considerando ainda que 86,95% das progênies classificadas como intolerantes no quinto dia de avaliação, também foram classificadas como intolerantes no sétimo dia, reforça a hipótese de no mesmo processo de seleção ter menor probabilidade de descartar genótipos tolerantes ao déficit hídrico junto aos intolerantes, aos cinco dias de avaliação (Tabelas 2A e 2B). Essa afirmação fica mais clara quando se observa a correlação entre os ranqueamentos das progênies aos 5 e 7 dias após a semeadura, 74% (Tabela 9). Ainda, quando da análise desses dados pode ser observado ainda progênies classificadas como tolerante no quinto dia, não foram classificadas como intolerantes no sétimo dia e vice-versa (Tabelas 2A e 2B).

Assim, as progênies não classificadas como tolerantes ou susceptíveis no quinto dia e no sétimo dia de avaliação se comportaram como intermediárias em relação à tolerância ao déficit hídrico.

A implicação prática disso, nos processos de seleção para tolerância ao déficit hídrico utilizando-se caracteres relacionados ao desenvolvimento e crescimento de plântulas e tecidos

remanescentes de material de reserva para fenotipagem é o fato de não correr o risco de selecionar um genótipo como tolerante e o mesmo ser intolerante e vice-versa.

Esses resultados também reforçam o desenvolvimento e crescimento das raízes em resposta ao déficit hídrico, durante a germinação de sementes e emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva.

Mesquita (2013) detectou que a raiz de plantas de soja tem a capacidade de detectar rapidamente as mudanças abióticas que ocorrem no solo, relacionadas ao conteúdo de água, oxigênio e nutrientes, sendo essa sensibilidade importante para a adaptação ao déficit hídrico. Em cultivares de soja, tolerantes à seca, esse mesmo autor observou maiores expressões de proteínas e metabólitos respiratórios em raízes dessas plantas.

Nessa mesma linha Albacete, Martinez-Andujar e Perez-Alfocea (2014) e Yang *et al.* (2012) fizeram referência ao ácido abscísico como um sinalizador de estresse da raiz para a parte aérea das plantas, o que induz o fechamento de estômatos e conseqüentemente a transpiração. Hu e Xiong (2014) relataram que plantas têm a capacidade de aumentar o crescimento das raízes, com o objetivo de aumentar a absorção de água em solos profundos. Eles mencionam a capacidade de modificação da arquitetura do sistema radicular em relação ao comprimento, peso, volume e densidade.

Os resultados observados nessa pesquisa, quando a fenotipagem foi realizada por meio da análise de imagens, também expressam a resposta de vegetais ao déficit hídrico por meio do crescimento e do desenvolvimento de raízes. Uma das variáveis avaliadas na fenotipagem por meio da análise de imagem foi o tamanho total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, considerando-se o comprimento da parte aérea, raiz principal e de todas as raízes secundárias (Tabelas 10, 2C, 2D e 2E).

Das 108 progênies utilizadas na análise de imagem, 36 progênies foram classificadas como tolerantes na avaliação aos cinco dias (medições manuais), considerando-se o critério de pelo menos 3cm de raiz principal e das 36 progênies classificadas como tolerantes, em 33 destas progênies (91,6%) foram observados os maiores tamanhos totais de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. As outras três (570, 546 e 568), foram classificadas como intermediárias (Tabelas 2A e 2E).

Quando se compara os dados de tamanho total, pela análise de imagem, com a classificação das progênies tolerantes e não tolerantes aos sete dias (Tabelas 2B e 2E) em 63,6% foram observados os maiores valores de tamanho total das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e em 80,8% os menores valores.

Comparando-se ainda os dados de tamanho total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva obtidos pela análise de imagem e as progênies consideradas intolerantes na avaliação realizada no quinto, em 84,1% foram observados os menores tamanhos totais de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva.

Além da variável tamanho total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva, também foram avaliadas pela análise de imagem o comprimento das raízes principais e o comprimento da parte aérea, após sete dias da semeadura. Em 36 e 22 progênies classificadas como tolerantes no quinto e sétimo dia de avaliação, em 91,7% e 40,9% dessas, respectivamente, foram observados maiores valores de comprimentos das raízes principais. Ao considerar as progênies intolerantes aos 5 e 7 dias, em 86,1% e 78,8%, respectivamente, foram verificadas os menores valores de comprimento total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva (Tabelas 2A, 2B, 2C e 2E).

Quando foram avaliados os comprimentos de parte aérea, em 72,2% e 59% das progênies classificadas como tolerantes aos cinco e sete dias, respectivamente, observaram-se maiores valores. Para essa mesma característica, em 66,7% e 84,6% das progênies classificadas como intolerantes aos cinco e sete dias, respectivamente foram observados os menores valores de comprimento de parte aérea (Tabelas 2A, 2B e 2D).

Para os caracteres avaliados por meio da análise de imagem também se observa, de forma geral, que a avaliação do comprimento da raiz principal das plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva após os cinco dias da instalação do teste, considerando as condições de restrição hídrica por meio do PEG, é uma metodologia que pode ser adotada para a seleção de genótipos para a tolerância ao déficit hídrico.

Essa afirmação fica mais clara quando se compara a correlação dos resultados observados aos 5 e 7 dias após a semeadura e os resultados dos comprimentos das raízes primárias, 89%, tamanho total, 89%, e da parte aérea, 69%, de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva avaliadas pela análise de imagem (Tabela 11).

Tabela 11 - Correlações de postos de spearman entre as características avaliadas aos 5 e 7 dias após a semeadura, ambiente sob condição de estresse, e as características avaliadas por meio da análise de imagem.

Características	Comprimentos		
	Raiz Primária	Parte Aérea	Tamanho Total
PEG - 5 dias	0,89***	0,70***	0,90***
PEG - 7 dias	0,70***	0,56***	0,64***

Significância pelo teste de verossimilhança (Likelihood Ratio Test) - 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**'.

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 12 - Correlações de postos de spearman entre as características avaliadas por meio da análise de imagem.

Caracteres	Comprimentos	
	Parte Aérea	Tamanho Total
Raiz Primária	0,69***	0,99***
Parte Aérea		0,78***

Significância pelo teste de verossimilhança (Likelihood Ratio Test) - 0 '***' 0.001 '***' 0.01 '**'.

Fonte: Da autora (2021).

Importante considerar que a fenotipagem utilizando-se a análise de imagens traz vantagens em relação à análise por meio de medições manuais, principalmente em relação à menor demanda de mão de obra e tempo.

Meirelles (2013) realizou a fenotipagem por meio da análise de imagens de raízes e parte aérea de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens e híbridos de milho em uma pesquisa por meio da qual estudou o controle genético para a eficiência e aproveitamento do fósforo. O autor observou importante diversidade fenotípica para as variáveis comprimento, volume total e volume de raízes finas. Observou ainda maiores valores para essas variáveis em plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva submetidas aos baixos níveis de fósforo.

Sousa *et al.* (2015) enfatizaram que a fenotipagem, por meio de análise de imagem, tem vantagens em relação aos métodos tradicionais em função principalmente da automação do processo, o que traz economia no tempo e na mão de obra, além de mais precisão. Os mesmos autores reforçaram que isto tem sido possível principalmente em condições controladas, em fenotipagens voltadas à prospecção, descoberta e validação de genes, tanto em plantas modelo como em plantas cultivadas.

Na análise de imagens, quando foram considerados os tamanhos das raízes principais, raízes secundárias e comprimento de parte aérea (Tamanho total), foi observada alta correlação entre os maiores valores para essa variável e os dados por meio dos quais as progênies foram classificadas como tolerantes, ou seja, aos cinco e sete dias após a semeadura. Segundo Basu *et al.* (2016) a presença de raízes secundárias está associada à estratégia adaptativa de plantas para aumentar a absorção de água.

Zhang *et al.* (2009) observaram maior crescimento radicular em plantas transgênicas de tabaco tolerantes ao déficit hídrico, associado à superexpressão do gene APX, ascorbato peroxidase. Sabe-se que essa enzima é uma das principais do Sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em plantas. Com base nesses resultados é possível

inferir que o desenvolvimento inicial das raízes de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva é uma característica importante para a seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, conclui-se que a fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico, seja por meio da análise de imagem ou manualmente, pode ser realizada aos cinco dias após a semeadura, considerando o comprimento da raiz principal, em condições de déficit hídrico simulado com a solução de PEG 6000 (-0,6 MPa), com a vantagem de a fenotipagem pela análise de imagem ser mais rápida e apresentar menor demanda de mão de obra.

4 CONCLUSÕES

A utilização de solução de PEG 6000 (-0,6 MPa), para simular a restrição hídrica, durante os processos de germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva é indicada para a fenotipagem de genótipos de milho para a tolerância ao déficit hídrico.

Para a fenotipagem de genótipos de milho para tolerância ao déficit hídrico, a avaliação do comprimento da raiz principal de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva aos cinco dias após a semeadura é uma característica recomendada, tanto pela técnica de análise de imagem como pela tradicional. No entanto, a técnica de análise de imagem demanda menos tempo e mão de obra.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. **Análise dialélica e estratégias para a seleção de genótipos de milho submetidos ao estresse hídrico nas fases de germinação e emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva.** 2016. 138 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ABREU, V. M. *et al.* Combining ability and heterosis of maize genotypes under water stress during seed germination and seedling emergence. **Crop Science**, Madison, v. 59, p. 33-43, 2018.
- ABREU, V. M. *et al.* Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.
- ALBACETE, A. A.; MARTINEZ-ANDUJAR, C.; PEREZ-ALFOCEA, F. Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: from plant survival to crop yield stability. **Biotechnology Advances**, New York, v. 32, n. 1, p. 12-30, 2014.
- ALVARENGA, R. O.; MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação do vigor de sementes de milho super doce por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 488-494, set. 2012.
- BRACCINI, A. de L. *et al.* Características agrônômicas e rendimento de sementes de soja na semeadura realizada no período de safrinha. **Bragantia**, Campinas, v. 63, p. 81-92, 2004.
- BASU, S. *et al.* Plant adaptation to drought stress. **F1000 Research**, London, v. 5, 2016.
- BLUM, A. *et al.* The effect of a drying top soil and a possible non-hydraulic root signal on wheat growth and yield. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 1225-1231, 1991.
- BLUM, A. **Plant breeding for water-limited environment.** New York: Springer, 2011. 216 p.
- BRANDANI, E. B. **Análise de imagens na avaliação do vigor de sementes de soja.** 2017. 54 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- CATTIVELLI, L. *et al.* Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, Amsterdam v. 105, n. 1, p. 1-14, 2008.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sétimo levantamento: safra 2020/21.** Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- COOPER, M. *et al.* Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US Corn-belt: discovery to product. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 6191–6204, 2014.
- DHONDT, S.; WUYTS, N.; INZÉ, D. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, p. 428-439, 2013.

- DURÃES, F. O. M. *et al.* 2004. **Fenotipagem associada a tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores**. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 17 p. (Circular Técnica, n. 39).
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Piracicaba: Esalq/USP/LPV, 2000. p. 208.
- FUJIKAWA, S.; JITSUYAMA, Y.; KURODA, K. Determination of the role of cold acclimation-induced diverse changes in plant cells from the viewpoint of avoidance of freezing injury. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 112, p. 237-244, 1999.
- GOLZARIAN, M. R. *et al.* Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. **Plant Methods**, Melbourne, v. 7, p. 1, 2011.
- GUEDES, F. L. *et al.* The behavior of maize hybrids generated from contrasting progenies regarding the use of nitrogen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 37, n, p. 45-50, 2015.
- HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 715-741, 2014.
- KRANNER, I. *et al.* What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 655-673, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>. Acesso em: 23 fev. 2021.
- LOPES, C. A. *et al.* Primary leaf growth and coleoptile length in maize seedlings. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 40, e35366, July 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.35366>. Acesso em: 21 fev. 2021.
- 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.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.
- MARQUES, E. R. *et al.* Distinction of species and maturation stages of *Comanthera* spp. by image analysis and flow cytometry. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)**, Lisboa, v. 42, n. 1, p. 13-21, 2019.
- MARQUES, T. L. **Expressão gênica em sementes, espigas e plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de linhagens de milho associada à tolerância ao déficit hídrico**. 2018. 62 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- MARQUES, T. L. *et al.* Physiological analysis and gene expression analysis of ZmDBP3, ZmALDH9, ZmAN13, and ZmDREB2A in maize lines. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 42, p. e43479, 2019.

MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D.; SILVA, J. A. Processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 13, n. 3, e5540, 2018.

MEEKS, M. *et al.* Measuring maize seedling drought response in search of tolerant germplasm. **Agronomy**, Basel, v. 3, p. 135-147, 2013.

MEIRELLES, W. F. **Análise dialética de linhagens de milho em diferentes níveis de fósforo**. 2013. 95 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

MESQUITA, R. O. **Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja**. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

MESSINA, C. D. *et al.* Yield–trait performance landscapes: from theory to application in breeding maize for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 855–868, 2011.

MUNNS, R. *et al.* New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 3499–3507, 2010.

NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 159-161, 1982.

PACE, J. *et al.* Analysis of Maize (*Zea mays L.*) Seedling Roots with the High-Throughput Image Analysis Tool ARIA (Automatic Root Image Analysis). **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 9, e108255, 2014.

PINTO, C. A. G. *et al.* Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. **Revista de Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2015.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2019). **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 21 fev. 2021.

RESENDE, V. F. Análise genética da resitência à antracnose folias em milho. 2004. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

REYNOLDS, M. P. *et al.* Evaluating physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments. **Euphytica**, Wageningen, v. 100, p. 84-95, 1998.

ROY, S. J.; TUCKER, E. T.; TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, Glen Osmond, v. 14, p. 232-239, 2011.

SADOK, W. *et al.* Leaf growth rate per unit thermal time follows QTLdependent daily patterns in hundreds of maize lines under naturally fluctuating conditions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 30, p. 135-146, 2007.

SANTOS, M. R. **Desenvolvimento de um sistema de visão computacional para fenotipagem de alta precisão**. 2017. 89 p. Dissertação (Mestrado em Computação Aplicada) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

SANTOS, R. C. **Fenotipagem digital, germinação de sementes e morfogênese in vitro de Passiflora spp.** 2019. 128 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2019.

SETTER, T. L. Analysis of constituents for phenotyping drought tolerance in crop improvement. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 3, p. 1-12, 2012.

SIRAULT, X. R. R.; JAMES, R. A.; FURBANK, R. T. A new screening method for osmotic component of salinity tolerance in cereals using infrared thermography. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 36, p. 970-977, 2009.

SOUSA, C. A. F. *et al.* Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 8, p. 660-672, 2015.

VIÇOSI, K. A. *et al.* Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 4, p. 36-42, dez. 2017. Supl. 1.

WALTER, A.; LIEBISCH, F.; HUND, A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant Methods**, Meubourne, v. 11, p. 14, 2015.

YANG, D. *et al.* PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 146, p. 173-183, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01603.x>. Acesso em: 21 fev. 2021.

ZHANG, G. *et al.* Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 13, p. 3781-3796, Sept. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp214>. Acesso em: 22 fev. 2021.

APÊNDICES

Tabela 1A - Resumo das análises de variância conjuntas dos dois ambientes, 10 e 70% de capacidade de retenção de água, para os dados de emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e índice de velocidade de emergência (IVE) de linhagens de milho aos 4,5 e 6 dias após a semeadura.

	FV	GL	QM	R2 (%) ¹	Pr (>F)
4 dias	Genótipos (L)	1	64,0	73,09	0,00445
	Ambientes (A)	1	21,8	24,89	0,08371
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	1,78	2,03	0,61351
	Erro	32	6,83	-	-
	<hr/>				
5 dias	Genótipos (L)	1	7,11	86,49	0,00284
	Ambientes (A)	1	0,11	1,34	0,68886
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	1,0	12,16	0,23432
	Erro	32	0,68	-	-
<hr/>					
6 dias	Genótipos (L)	1	2,25	45,25	0,016901
	Ambientes (A)	1	1,36	27,35	0,058705
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	1,36	27,35	0,058705
	Erro	32	0,35	-	-
<hr/>					
IVE	Genótipos (L)	1	8,39	82,89	0,00135
	Ambientes (A)	1	1,02	10,08	0,22836
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	0,70	6,97	0,31629
	Erro	32	0,68	-	-

$$^1 R^2 = \left[\frac{\sum SQ_{FVX}}{\sum SQ_{FV(Exceto\ o\ erro)}} \right] \times 100$$

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 1B – Resumo das análises de variância conjuntas dos dois ambientes, 10 e 70% de capacidade de retenção de água, para os dados de comprimento de parte aérea e raiz e número de raízes seminais, de linhagens de milho aos 7 dias após a semeadura.

	FV	GL	QM	R ² (%) ¹	Pr (>F)
Comprimento de Parte Aérea	Genótipos (L)	1	9,19	24,68	0,00566
	Ambientes (A)	1	27,34	73,39	0,00001
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	0,72	1,93	0,41272
	Erro	32	1,05	-	-
Comprimento de Raiz	Genótipos (L)	1	49,21	97,21	0,00318
	Ambientes (A)	1	0,087	0,17	0,89415
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	1,33	6,71	0,60416
	Erro	32	4,838	-	-
Número de Raízes Seminais	Genótipos (L)	1	69,44	100	0
	Ambientes (A)	1	0,00	-	1
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	0,00	-	1
	Erro	32	0,097	-	-

$$^1 R^2 = \left[\frac{\sum SQ_{FVX}}{\sum SQ_{FV(Exceto\ Erro)}} \right] \times 100$$

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 1C – Resumo das análises de variância conjuntas dos dois ambientes, 10 e 70% de capacidade de retenção de água, para os dados de peso seco e peso verde de parte aérea e raiz de linhagens de milho.

		FV	GL	QM	R ² (%) ¹	Pr (>F)
Peso Seco de Raiz	Genótipos (L)		1	0,007	8,68	0,67766
	Ambientes (A)		1	0,067	78,16	0,21733
	Genótipos x Ambientes (LxA)		1	0,011	13,16	0,60920
	Erro		32	0,042	-	-
Peso Seco de Parte Aérea	Genótipos (L)		1	0,016	12,00	0,31202
	Ambientes (A)		1	0,120	87,97	0,00835
	Genótipos x Ambientes (LxA)		1	0,000	0,29	0,87217
	Erro		32	0,015	-	-
Peso Verde de Raiz	Genótipos (L)		1	5,336	73,72	0,16780
	Ambientes (A)		1	1,53	21,12	0,45544
	Genótipos x Ambientes (LxA)		1	0,372	5,14	0,71184
	Erro		32	2,678	-	-
Peso Verde de Parte Aérea	Genótipos (L)		1	0,0552	1,29	0,75476
	Ambientes (A)		1	4,1957	98,43	0,00981
	Genótipos x Ambientes (LxA)		1	0,0117	0,27	0,88543
	Erro		32	0,5563	-	-

$$^1 R^2 = \left[\frac{\sum SQ_{FVX}}{\sum SQ_{FV(Exceto\ o\ erro)}} \right] \times 100$$

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 1D - Resumo das análises de variância conjuntas dos dois ambientes, PEG e Água, para os dados de germinação de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva e índice de velocidade de germinação (IVE), Emergência I e II e índice de velocidade de emergência I e II de linhagens de milho aos 4, 7 dias após a montagem do experimento.

		FV	GL	QM	R ² (%) ¹	Pr (>F)
Germinação	4 dias	Genótipos (L)	1	1806,25	34,45	0,00
		Ambientes (A)	1	1806,25	35,45	0,00
		Genótipos x Ambientes (LxA)	1	1482,25	29,09	0,00
		Erro	12	20,42		
	7 dias	Genótipos (L)	1	42,250	63,30	0,063209
		Ambientes (A)	1	12,250	18,35	0,291984
		Genótipos x Ambientes (LxA)	1	12,250	18,35	0,291984
		Erro	12	10,083		
(IVG)	Genótipos (L)	1	447,43	30,13	0,00	
	Ambientes (A)	1	736,17	49,57	0,00	
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	301,46	20,30	0,00	
	Erro	12	3,95			
Emergência I	4 dias	Genótipos (L)	1	156,2	2,05	0,00
		Ambientes (A)	1	7320,2	95,90	0,00
		Genótipos x Ambientes (LxA)	1	156,2	2,05	0,00
		Erro	12	3,1		
	7 dias	Genótipos (L)	1	462,25	15,39	0,00
		Ambientes (A)	1	2162,25	71,96	0,00
		Genótipos x Ambientes (LxA)	1	380,25	12,65	0,00
		Erro	12	13,42		
(IVE ₁)	Genótipos (L)	1	114,5	2,42	0,00	
	Ambientes (A)	1	4610,4	97,26	0,00	
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	15,2	0,32	0,13	
	Erro	12	5,8			
Emergência II	4 dias	Genótipos (L)	1	1024,00	20,47	0,00
		Ambientes (A)	1	3249,00	65,95	0,00
		Genótipos x Ambientes (LxA)	1	729,00	13,65	0,00
		Erro	12	28,20		
	7 dias	Genótipos (L)	1	85,56	46,58	0,00017
		Ambientes (A)	1	52,56	28,61	0,00123
		Genótipos x Ambientes (LxA)	1	45,56	24,80	0,0021
		Erro	12	2,98		
(IVE ₂)	Genótipos (L)	1	70,560	70,34	0	
	Ambientes (A)	1	1,62	1,62	0,3494	
	Genótipos x Ambientes (LxA)	1	28,125	28,04	0,0016	
	Erro	12	1,708			

$${}^1 R^2 = \left[\frac{\sum SQ_{FVX}}{\sum SQ_{FV(Exceto\ o\ erro)}} \right] \times 100$$

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 1E - Resumo das análises de variância conjuntas dos dois ambientes, PEG e Água, para peso seco de fresco de parte aérea e raízes de linhagens de milho aos 4, 7 dias após a montagem do experimento.

FV		GL	QM	R ² (%) ¹	Pr (>F)
Peso Seco de Parte Aérea	Genotipos (L)	1	0,2280	1,34	0,00
	Ambientes (A)	1	16,4228	95,84	0,00
	Genotipos x Ambientes (LxA)	1	0,3875	2,27	0,00
	Erro	12	0,0081		
Peso Seco de Raiz	Genotipos (L)	1	0,02102	0,94	0,1125
	Ambientes (A)	1	2,19040	97,77	0,00
	Genotipos x Ambientes (LxA)	1	0,02890	1,29	0,067
	Erro	12	0,00717		
Peso Fresco de Parte Aérea	Genotipos (L)	1	127,01	5,15	0,00
	Ambientes (A)	1	2206,18	89,55	0,00
	Genotipos x Ambientes (LxA)	1	130,42	5,29	0,00
	Erro	12	0,54		
Peso Fresco de Raiz	Genotipos (L)	1	19,914	6,46	0,00
	Ambientes (A)	1	272,83	88,53	0,00
	Genotipos x Ambientes (LxA)	1	15,425	5,00	0,00
	Erro	12	1,412		

$${}^1 R^2 = \left[\frac{\sum SQ_{FVx}}{\sum SQ_{FV(\text{Exceto o erro})}} \right] \times 100$$

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2A – Resultados médios (%) de Emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva das progênies F_{2,3}, avaliadas aos 5 dias após a semeadura – Emergência I.

Emergência I (5 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
453	100,00	96.23	A
515	100,00	96.23	A
533	100,00	96.23	A
538	100,00	96.23	A
561	100,00	96.23	A
583	100,00	96.23	A
487	96,50	93.14	A
491	96,50	93.14	A
516	96,50	93.14	A
564	96,50	93.14	A
585	96,50	93.14	A
617	96,50	93.14	A
670	96,50	93.14	A
387	93,50	90.48	A
512	93,50	90.48	A
570	93,50	90.48	A
638	93,50	90.48	A
641	93,50	90.48	A
643	93,50	90.48	A
665	93,50	90.48	A
486	93,00	90.04	A
504	93,00	90.04	A
553	93,00	90.04	A
560	93,00	90.04	A
636	93,00	90.04	A
669	93,00	90.04	A
359	90,00	87.38	A
369	90,00	87.38	A
377	90,00	87.38	A
415	90,00	87.38	A
438	90,00	87.38	A
454	90,00	87.38	A
455	90,00	87.38	A
478	90,00	87.38	A
479	90,00	87.38	A

Tabela 2A, continuação...

Emergência I (5 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
492	90,00	87.38	a
535	90,00	87.38	a
540	90,00	87.38	a
546	90,00	87.38	a
562	90,00	87.38	a
568	90,00	87.38	a
610	90,00	87.38	a
616	90,00	87.38	a
620	90,00	87.38	a
667	90,00	87.38	a
399	87,00	84.73	a
537	87,00	84.73	a
625	87,00	84.73	a
351	86,50	84.29	a
354	86,50	84.29	a
362	86,50	84.29	a
368	86,50	84.29	a
372	86,50	84.29	a
400	86,50	84.29	a
433	86,50	84.29	a
435	86,50	84.29	a
447	86,50	84.29	a
461	86,50	84.29	a
473	86,50	84.29	a
476	86,50	84.29	a
477	86,50	84.29	a
484	86,50	84.29	a
523	86,50	84.29	a
542	86,50	84.29	a
548	86,50	84.29	a
555	86,50	84.29	a
574	86,50	84.29	a
652	86,50	84.29	a
416	83,50	81.63	a
471	83,50	81.63	a

Tabela 2A, continuação...

Emergência I (5 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
559	83,50	81.63	a
569	83,50	81.63	a
581	83,50	81.63	a
396	83,00	81.19	a
521	83,00	81.19	a
567	83,00	81.19	a
626	83,00	81.19	a
370	80,00	78.53	b
407	80,00	78.53	b
445	80,00	78.53	b
556	80,00	78.53	b
659	80,00	78.53	b
444	77,00	75.88	b
469	77,00	75.88	b
509	77,00	75.88	b
571	77,00	75.88	b
406	76,50	75.44	b
672	76,50	75.44	b
404	75,00	74.11	b
379	73,50	72.78	b
408	73,50	72.78	b
440	73,50	72.78	b
458	73,50	72.78	b
488	73,50	72.78	b
506	73,50	72.78	b
541	73,50	72.78	b
547	73,50	72.78	b
634	73,50	72.78	b
391	73,00	72.34	b
443	73,00	72.34	b
474	73,00	72.34	b
532	73,00	72.34	b
660	73,00	72.34	b
367	70,00	69.68	b
401	70,00	69.68	b

Tabela 2A, continuação...

Emergência I (5 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
420	70,00	69.68	b
424	70,00	69.68	b
437	70,00	69.68	b
457	70,00	69.68	b
464	70,00	69.68	b
499	70,00	69.68	b
500	70,00	69.68	b
578	70,00	69.68	b
632	70,00	69.68	b
429	68,00	67.91	b
436	67,00	67.03	b
439	67,00	67.03	b
584	67,00	67.03	b
397	66,50	66.59	b
426	66,50	66.59	b
502	66,50	66.59	b
525	66,50	66.59	b
618	66,50	66.59	b
635	66,50	66.59	b
644	66,50	66.59	b
480	63,50	63.93	b
611	63,50	63.93	b
612	63,50	63.93	b
629	63,50	63.93	b
430	63,00	63.49	b
498	63,00	63.49	b
700	61,50	62.16	b
373	60,00	60.83	c
410	60,00	60.83	c
414	60,00	60.83	c
434	60,00	60.83	c
466	60,00	60.83	c
558	60,00	60.83	c
575	60,00	60.83	c
352	57,00	58.18	c

Tabela 2A, continuação...

Emergência I (5 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
432	57,00	58.18	c
522	57,00	58.18	c
557	57,00	58.18	c
363	56,50	57.74	c
389	56,50	57.74	c
428	56,50	57.74	c
520	56,50	57.74	c
576	56,50	57.74	c
449	53,50	55.08	c
602	53,50	55.08	c
621	53,50	55.08	c
628	53,00	54.64	c
460	50,00	51.98	c
481	50,00	51.98	c
552	50,00	51.98	c
565	50,00	51.98	c
614	50,00	51.98	c
543	47,00	49.33	c
421	46,50	48.89	c
545	46,50	48.89	c
580	46,50	48.89	c
627	46,50	48.89	c
645	46,50	48.89	c
381	43,50	46.23	c
613	43,50	46.23	c
371	43,00	45.79	c
475	43,00	45.79	c
452	40,00	43.13	c
364	36,50	40.04	d
366	36,50	40.04	d
427	36,50	40.04	d
472	36,50	40.04	d
490	36,50	40.04	d
566	36,50	40.04	d
573	36,50	40.04	d

Tabela 2A, final...

Emergência I (5 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
601	36,50	40.04	d
375	33,50	37.38	d
418	33,50	37.38	d
450	33,50	37.38	d
485	33,50	37.38	d
661	33,50	37.38	d
356	30,00	34.28	d
383	30,00	34.28	d
395	30,00	34.28	d
668	30,00	34.28	d
405	26,50	31.19	d
448	23,50	28.53	d
456	23,50	28.53	d
463	23,50	28.53	d
482	23,50	28.53	d
513	23,50	28.53	d
639	23,50	28.53	d
534	20,00	25.43	d
563	20,00	25.43	d
642	20,00	25.43	d
385	17,00	22.78	d
431	16,50	22.34	d
465	16,50	22.34	d
470	16,50	22.34	d
663	16,50	22.34	d
355	13,00	19.24	d
468	7,00	13.93	d
631	7,00	13.93	d

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2B – Resultados médios de Emergência de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva das progênes F_{2:3}, avaliadas aos 7 dias após a semeadura – Emergência II.

Emergência II (7 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
491	96,50	90.44	a
610	96,50	90.44	a
665	96,50	90.44	a
354	93,50	87.89	a
533	93,50	87.89	a
553	93,50	87.89	a
564	93,50	87.89	a
570	93,50	87.89	a
486	93,00	87.47	a
516	93,00	87.47	a
559	93,00	87.47	a
672	93,00	87.47	a
377	90,00	84.92	a
447	90,00	84.92	a
484	90,00	84.92	a
562	90,00	84.92	a
479	87,00	82.37	a
515	87,00	82.37	a
387	86,50	81.95	a
397	86,50	81.95	a
583	86,50	81.95	a
638	86,50	81.95	a
669	86,50	81.95	a
487	83,50	79.40	a
617	83,50	79.40	a
625	83,50	79.40	a
652	83,50	79.40	a
359	83,00	78.98	a
396	83,00	78.98	a
416	83,00	78.98	a
420	83,00	78.98	a
643	83,00	78.98	a
400	80,00	76.43	a
471	80,00	76.43	a
512	80,00	76.43	a

Tabela 2B, continuação...

Emergência II (7 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
521	80,00	76.43	a
574	80,00	76.43	a
620	80,00	76.43	a
351	77,00	73.88	a
433	77,00	73.88	a
504	77,00	73.88	a
578	77,00	73.88	a
581	77,00	73.88	a
659	77,00	73.88	a
352	76,50	73.46	a
379	76,50	73.46	a
437	76,50	73.46	a
439	76,50	73.46	a
537	76,50	73.46	a
542	75,00	72.18	b
372	73,50	70.91	b
391	73,50	70.91	b
406	73,50	70.91	b
473	73,50	70.91	b
476	73,50	70.91	b
478	73,50	70.91	b
568	73,50	70.91	b
585	73,50	70.91	b
636	73,50	70.91	b
667	73,50	70.91	b
443	73,00	70.48	b
560	73,00	70.48	b
370	70,00	67.93	b
399	70,00	67.93	b
407	70,00	67.93	b
430	70,00	67.93	b
438	70,00	67.93	b
445	70,00	67.93	b
455	70,00	67.93	b
466	70,00	67.93	b

Tabela 2B, continuação...

Emergência II (7 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
477	70,00	67.93	b
520	70,00	67.93	b
626	70,00	67.93	b
641	70,00	67.93	b
474	67,00	65.39	b
613	67,00	65.39	b
618	67,00	65.39	b
367	66,50	64.96	b
383	66,50	64.96	b
429	66,50	64.96	b
454	66,50	64.96	b
509	66,50	64.96	b
571	66,50	64.96	b
602	66,50	64.96	b
611	66,50	64.96	b
368	63,50	62.41	b
404	63,50	62.41	b
408	63,50	62.41	b
546	63,50	62.41	b
561	63,50	62.41	b
575	63,50	62.41	b
635	63,50	62.41	b
670	63,50	62.41	b
457	63,00	61.99	b
481	63,00	61.99	b
541	63,00	61.99	b
548	63,00	61.99	b
584	63,00	61.99	b
444	60,00	59.44	b
522	60,00	59.44	b
424	57,00	56.89	b
458	57,00	56.89	b
540	57,00	56.89	b
414	56,50	56.47	b
435	56,50	56.47	b

Tabela 2B, continuação...

Emergência II (7 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
456	56,50	56.47	b
480	56,50	56.47	b
488	56,50	56.47	b
523	56,50	56.47	b
612	56,50	56.47	b
362	53,50	53.92	c
415	53,50	53.92	c
421	53,50	53.92	c
461	53,50	53.92	c
469	53,50	53.92	c
492	53,50	53.92	c
499	53,50	53.92	c
557	53,50	53.92	c
642	53,50	53.92	c
644	53,50	53.92	c
369	50,00	50.95	c
371	50,00	50.95	c
431	50,00	50.95	c
436	50,00	50.95	c
453	50,00	50.95	c
532	50,00	50.95	c
547	50,00	50.95	c
576	50,00	50.95	c
621	50,00	50.95	c
632	50,00	50.95	c
373	47,00	48.40	c
616	47,00	48.40	c
634	47,00	48.40	c
485	46,50	47.97	c
498	46,50	47.97	c
552	46,50	47.97	c
558	46,50	47.97	c
660	46,50	47.97	c
410	43,50	45.43	c
428	43,50	45.43	c

Tabela 2B, continuação...

Emergência II (7 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
563	43,50	45.43	c
389	43,00	45.00	c
401	43,00	45.00	c
500	43,00	45.00	c
506	43,00	45.00	c
543	43,00	45.00	c
565	43,00	45.00	c
363	40,00	42.45	c
440	40,00	42.45	c
449	40,00	42.45	c
452	40,00	42.45	c
535	40,00	42.45	c
555	40,00	42.45	c
601	40,00	42.45	c
381	36,50	39.48	c
427	36,50	39.48	c
450	36,50	39.48	c
627	36,50	39.48	c
432	33,50	36.93	d
463	33,50	36.93	d
475	33,50	36.93	d
569	33,00	36.51	d
395	30,00	33.96	d
470	30,00	33.96	d
545	30,00	33.96	d
573	30,00	33.96	d
614	30,00	33.96	d
629	30,00	33.96	d
645	30,00	33.96	d
405	27,00	31.41	d
628	27,00	31.41	d
375	26,50	30.99	d
460	26,50	30.99	d
490	26,50	30.99	d
534	26,50	30.99	d

Tabela 2B, final...

Emergência II (7 dias)			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
567	26,50	30.99	d
418	23,50	28.44	d
525	23,50	28.44	d
426	23,00	28.02	d
448	23,00	28.02	d
566	23,00	28.02	d
356	20,00	25.47	d
364	20,00	25.47	d
366	20,00	25.47	d
434	20,00	25.47	d
464	20,00	25.47	d
502	20,00	25.47	d
538	20,00	25.47	d
580	20,00	25.47	d
639	20,00	25.47	d
661	20,00	25.47	d
668	20,00	25.47	d
700	20,00	25.47	d
355	16,50	22.49	d
556	16,50	22.49	d
482	13,50	19.95	d
385	13,00	19.52	d
663	13,00	19.52	d
465	10,00	16.97	d
468	7,00	14.43	d
472	7,00	14.43	d
513	7,00	14.43	d
631	7,00	14.43	d

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2C – Resultados médios (%) de comprimento de raiz primária de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de progênies F_{2:3} de milho, avaliadas aos 7 dias após a semeadura, por meio análise de imagem.

Raiz Primária			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
538	11,158	11.05	a
670	10,8235	10.72	a
387	10,766	10.67	a
561	10,7095	10.61	a
516	10,5795	10.49	a
617	10,528	10.44	a
583	10,4315	10.34	a
665	10,4135	10.32	a
610	10,363	10.28	a
515	10,352	10.26	a
512	10,347	10.26	a
492	10,079	10.00	b
616	10,0695	9.99	b
533	10,0515	9.97	b
504	10,05	9.97	b
480	10,025	9.95	b
479	9,9765	9.90	b
562	9,9705	9.89	b
491	9,9605	9.88	b
553	9,953	9.88	b
638	9,945	9.87	b
560	9,916	9.84	b
453	9,9135	9.84	b
667	9,8885	9.81	b
486	9,8595	9.79	b
564	9,7995	9.73	b
540	9,798	9.73	b
535	9,7635	9.69	b
487	9,76	9.69	b
585	9,645	9.58	b
643	9,596	9.53	b
363	9,4405	9.38	b
618	9,235	9.18	b
546	9,187	9.13	b
641	8,973	8.93	c

Tabela 2C, continuação...

Raiz Primária			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
669	8,954	8.88	c
568	8,923	8.87	c
620	8,8245	8.78	c
575	8,6875	8.65	c
644	8,626	8.59	c
570	8,608	8.57	c
584	8,494	8.44	c
621	8,393	8.36	c
612	8,3775	8.35	c
602	8,2115	8.19	d
565	8,1115	8.09	d
352	8,0325	8.01	d
389	8,0225	8.00	d
522	7,9545	7.94	d
432	7,931	7.91	d
611	7,931	7.91	d
700	7,8305	7.82	d
614	7,807	7.79	d
629	7,795	7.78	d
430	7,658	7.65	d
576	7,6125	7.60	d
426	7,609	7.60	d
552	7,523	7.52	e
498	7,405	7.40	e
397	7,342	7.34	e
460	7,3105	7.31	e
434	7,267	7.27	e
356	7,25	7.25	e
364	7,2265	7.23	e
449	7,2245	7.23	e
355	6,9795	6.99	e
628	6,9135	6.92	e
373	6,8535	6.87	e
601	6,8445	6.86	e
566	6,768	6.78	e

Tabela 2C, continuação...

Raiz Primária			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
428	6,7415	6.76	e
395	6,687	6.70	e
520	6,473	6.50	f
427	6,443	6.47	f
490	6,356	6.38	f
410	6,3305	6.36	f
472	6,0675	6.10	f
482	6,041	6.08	f
366	6,0365	6.07	f
436	5,9705	6.01	f
371	5,8705	5.91	f
485	5,8655	5.91	f
558	5,853	5.89	f
481	5,774	5.82	f
452	5,7195	5.76	g
466	5,694	5.74	g
513	5,4465	5.50	g
405	5,4205	5.47	g
383	5,338	5.39	g
573	5,3375	5.39	g
414	5,3095	5.37	g
563	5,2775	5.34	g
470	5,122	5.18	g
463	4,933	5.00	h
450	4,908	4.98	h

Tabela 2C, final...

Raiz Primária			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
375	4,9025	4.97	h
631	4,8385	4.91	h
642	4,803	4.87	h
448	4,788	4.86	h
418	4,709	4.78	h
534	4,66	4.74	h
385	4,596	4.67	h
663	4,4925	4.57	h
661	4,4845	4.57	h
668	4,3565	4.44	h
465	4,0905	4.18	h
639	4,0665	4.16	h
456	4,0545	4.15	h
431	3,957	4.05	h

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2D – Resultados médios (%) de comprimento de parte aérea de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva das progêneses F_{2:3} de milho, avaliadas aos 7 dias após a semeadura, por meio análise de imagem.

Parte Aérea			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
667	2,373	2.24	a
516	1,84	1.75	b
616	1,605	1.53	b
515	1,54	1.47	b
430	1,525	1.46	b
487	1,517	1.45	b
583	1,494	1.43	b
610	1,456	1.39	b
561	1,436	1.38	b
486	1,399	1.34	b
618	1,3	1.25	c
553	1,288	1.24	c
491	1,28	1.23	c
504	1,25	1.20	c
620	1,25	1.20	c
617	1,19	1.15	c
540	1,181	1.14	c
665	1,12	1.08	c
466	1,071	1.04	d
584	1,064	1.03	d
560	1,057	1.03	d
512	1,056	1.01	d
533	1,043	1.01	d
562	1,034	1.00	d
397	1,001	0.97	d
576	0,993	0.97	d
522	0,982	0.96	d
383	0,94	0.92	d
363	0,915	0.90	d
564	0,91	0.89	d
387	0,9	0.88	d
456	0,886	0.87	d
638	0,88	0.86	d
643	0,861	0.85	d
670	0,842	0.83	d

Tabela 2D, continuação...

Genótipos	Parte Aérea		Grupos
	Médias	Médias BLUP	
355	0,82	0.81	d
570	0,802	0.79	e
520	0,784	0.77	e
585	0,756	0.75	e
611	0,75	0.74	e
602	0,723	0.72	e
575	0,721	0.72	e
432	0,713	0.71	e
373	0,713	0.71	e
479	0,68	0.68	e
546	0,674	0.67	e
426	0,66	0.66	e
481	0,651	0.65	e
431	0,63	0.63	e
492	0,624	0.63	e
669	0,623	0.63	e
558	0,617	0.62	e
405	0,599	0.60	e
612	0,596	0.60	e
621	0,592	0.60	e
641	0,592	0.60	e
352	0,589	0.59	e
644	0,587	0.59	e
601	0,58	0.59	e
629	0,57	0.58	e
498	0,568	0.58	e
480	0,553	0.56	e
371	0,532	0.54	e
389	0,529	0.54	e
434	0,518	0.53	e
452	0,486	0.50	e
427	0,469	0.48	e
395	0,465	0.48	e
453	0,457	0.47	e
356	0,44	0.46	e

Tabela 2D, continuação...

Genótipos	Parte Aérea		Grupos
	Médias	Médias BLUP	
642	0,436	0.45	e
568	0,43	0.45	e
538	0,409	0.43	f
552	0,401	0.42	f
535	0,392	0.41	f
485	0,385	0.41	f
700	0,381	0.40	f
450	0,354	0.38	f
436	0,348	0.37	f
414	0,342	0.37	f
364	0,327	0.35	f
428	0,326	0.35	f
375	0,318	0.34	f
614	0,318	0.34	f
385	0,317	0.34	f
418	0,284	0.31	f
449	0,279	0.31	f
534	0,275	0.30	f
639	0,273	0.30	f
566	0,272	0.30	f
565	0,26	0.29	f
668	0,245	0.28	f
448	0,229	0.26	f
470	0,228	0.26	f
366	0,216	0.25	f

Tabela 2D, final...

Parte Aérea			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
482	0,211	0.25	f
563	0,205	0.24	f
628	0,201	0.24	f
490	0,199	0.24	f
661	0,188	0.22	f
410	0,174	0.21	f
465	0,169	0.21	f
460	0,158	0.20	f
472	0,113	0.16	f
573	0,112	0.16	f
513	0,06	0.11	f
631	0,052	0.10	f
463	0,025	0.07	f
663	0,014	0.06	f

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2E – Resultados médios (%) de tamanho total de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva das progênie F_{2:3} de milho, avaliadas aos 7 dias após a semeadura, por meio análise de imagem.

Tamanho Total			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
516	12,4185	12.29	a
667	12,2595	12.13	a
561	12,1435	12.02	a
583	11,9255	11.81	a
515	11,8935	11.78	a
610	11,8205	11.71	a
617	11,717	11.61	a
616	11,675	11.57	a
670	11,665	11.56	a
387	11,664	11.55	a
538	11,567	11.46	a
665	11,5335	11.43	a
512	11,403	11.30	a
504	11,3015	11.20	a
487	11,2775	11.18	a
486	11,259	11.16	a
491	11,2405	11.14	a
553	11,2405	11.14	a
533	11,0965	11.00	b
562	11,0055	10.92	b
540	10,98	10.89	b
560	10,972	10.88	b
638	10,8235	10.74	b
564	10,7105	10.63	b
492	10,7025	10.62	b
479	10,6545	10.58	b
480	10,579	10.50	b
618	10,5335	10.46	b
643	10,457	10.38	b
585	10,401	10.33	b
453	10,3715	10.30	b
363	10,355	10.28	b
535	10,1545	10.09	b
620	10,075	10.01	c
546	9,86	9.80	c

Tabela 2E, continuação...

Genótipos	Tamanho Total		Grupos
	Médias	Médias BLUP	
669	9,576	9.52	c
641	9,5645	9.49	c
584	9,557	9.48	c
570	9,4095	9.37	c
575	9,4095	9.37	c
568	9,352	9.31	c
644	9,213	9.18	c
430	9,1815	9.15	c
621	8,985	8.95	d
612	8,973	8.94	d
522	8,9365	8.91	d
602	8,9335	8.90	d
611	8,6805	8.66	d
432	8,6435	8.62	d
352	8,622	8.60	d
576	8,606	8.59	d
389	8,551	8.53	d
565	8,3705	8.36	d
629	8,3645	8.35	d
397	8,343	8.33	d
426	8,2685	8.26	e
700	8,212	8.20	e
614	8,1255	8.12	e
498	7,972	7.97	e
552	7,925	7.93	e
355	7,8005	7.80	e
434	7,784	7.79	e
356	7,6895	7.70	e
373	7,566	7.58	e
364	7,5535	7.56	e
449	7,504	7.52	e
460	7,469	7.48	e
601	7,424	7.44	e
520	7,255	7.28	e
395	7,1515	7.17	e

Tabela 2E, continuação...

Tamanho Total			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
628	7,1135	7.14	e
428	7,068	7.09	e
566	7,0395	7.07	e
427	6,911	6.94	f
466	6,763	6.80	f
490	6,555	6.60	f
410	6,504	6.55	f
558	6,4695	6.51	f
481	6,424	6.47	f
371	6,4015	6.45	f
436	6,319	6.37	f
383	6,2775	6.33	f
366	6,252	6.30	f
485	6,2515	6.30	f
482	6,251	6.30	f
452	6,205	6.26	f
472	6,1795	6.23	f
405	6,0195	6.08	g
414	5,651	5.72	g
513	5,5065	5.58	g
563	5,4825	5.55	g
573	5,4495	5.52	g
470	5,3515	5.43	g
450	5,262	5.34	g
642	5,237	5.32	g

Tabela 2E, final...

Tamanho Total			
Genótipos	Médias	Médias BLUP	Grupos
375	5,221	5.30	g
448	5,017	5.10	g
418	4,9935	5.08	g
463	4,958	5.05	g
456	4,9385	5.03	g
534	4,935	5.02	g
385	4,9135	5.00	g
631	4,8905	4.98	g
661	4,673	4.77	g
668	4,601	4.70	g
431	4,5865	4.68	g
663	4,5065	4.61	g
639	4,34	4.45	g
465	4,2595	4.37	g

Fonte: Da autora (2021).

CHAPTER 2

GENE EXPRESSION IN MAIZE SEEDLINGS AIMING AT WATER DEFICIT TOLERANCE

ABSTRACT

Understanding the mechanisms involved in drought tolerance is fundamental for the selection of cultivars in plant breeding programs. In Brazil, this case is even more important for maize crops due to their advance in the second crop and the incidence of water deficit in the summer, being increasingly important to develop drought-tolerant crops. Thus, the aim of this work was to evaluate the expression of genes related to water deficit tolerance in tissues of seedlings of lines and F_{2:3} progenies, coming from the breeding of these two contrasting lines (L91-T and L57-NT). F_{2:3} progenies and lines seeds were germinated under water restriction using PEG 6000 solution (-0.6 MPa) to moisten the germination paper. After evaluating seedling development and growth, progeny seedlings were classified into tolerant, intermediate and non-tolerant to water deficit. Seven days after the installation of the germination test under water stress, seedlings of these progenies and lines were used to evaluate the expression of 14 genes associated with water stress tolerance: AOX2, LEA14, DREB2.7, ZmPP2C, SAD, LEA D34, ABA3 17, ZmBZIP72, cAPX, ZmCPKII, ZmDHN1, DREB2A/2.1S, AmylaseB73 and CAT3 by the qRT-PCR technique. Different expressions of the genes were observed in maize seedlings. Transcription factors such as DREB 2A/2.1S, DREB2.7 were more expressed in tolerant seedlings of progenies and lines. The expression of Bzip (basic Leucine Zipper proteins, transcription factor and ZmPP2C) was associated with intolerance to water stress. Genes related to antioxidant enzymes, CAT3, cAPX and those encoding heat-resistant proteins, LEA14, LEA D34 and ZmDHN1 were more expressed in seedlings of the lines and progenies classified as tolerant to water deficit. We concluded that these genes can be used as markers for the early selection of maize genotypes for drought tolerance.

Keywords: qRT-PCR. Transcription factors. Antioxidant System.

1 INTRODUCTION

The demand for maize cultivars with genetic traits that provide greater adaptation to different climatic conditions has been significantly important. Maize cultivation has been carried out in two sowing times in large part of the national territory and at different levels of technology and investment (PEREIRA FILHO; CRUZ, 2010).

In the second harvest, the lower potential for productivity is often associated with the lower rainfall as it has been observed in the Midwest region of the country, with water deficit being the most limiting factor for the development and reproduction of the crop.

Water stress can damage the cell (LANGRIDGE; NICK; GEOFF, 2006; ZHU, 2002) and can cause a series of morphological, physiological, biochemical and molecular changes, which can restrict plant development and final productivity (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003). Responding to the incidence of a particular stress, a series of events takes place in plants, beginning with the perception of that stress and ending with the expression of a set of target genes through common routes and components, conferring to these plants an adaptation to that particular adverse condition (PASTORI; FOYER, 2002).

Several genes related to adaptation to drought are repressed or activated, and it affects metabolic functions, culminating in physiological changes and in the development of plants. The expression of these genes depends on the severity and duration of the stress, the genotype, and the stage of development of the plants. Studies on the genes that respond to these stresses have been carried out (PARKER; BACK, 2012; SEKI *et al.*, 2002; ZHU, 2002)

Understanding the function of these genes has allowed us to understand the defense mechanisms that plants use for surviving under water deficit. In this context, *Arabidopsis thaliana* has been used as a model plant for studies of the expression of several genes related to biotic and abiotic stresses. In studies with this species, it was observed that the initial response to stress due to water stress is mediated by the transmembrane Histidine Kinase (ATHK1), and this gene presents a high expression in roots (RIERA *et al.*, 2005). According to Chaves *et al.* (2002), AtHK regulates changes in the osmotic potential of the crop and induces the expression of genes related to water stress. Researchers have also observed that there is an involvement of ABA-dependent and ABA-independent regulatory systems in the gene expression responsive to water deficit (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2005; ZHU, 2002).

Some of these genes encode enzymes involved in the biosynthesis of various osmoprotectors, such as *LEA* (Late Embryogenesis Abundant proteins); proline; glycine-

betaine; raffinase; trehalose. The expression of genes that encode detoxifying enzymes such as superoxide dismutase, SOD, ascorbate peroxidase, APx; catalases, CAT; glutathione reductase, GR, peroxiredoxins, among others has also been observed. These enzymes are associated with the removal of reactive oxygen species, ROS.

LEA proteins are expressed in the later stages of seed development. They are often found in seeds of higher plants, but according to Chen *et al.* (2002), they are also expressed in seedlings, roots, and shoots.

LEA proteins are divided into 6 subgroups. LEA 14 is one of the best-known belonging to subgroup 4 and has the function of protecting cell membranes and promoting their stability and integrity during the dehydration process (SOUZA, 2012). According to Souza *et al.* (2014), in the cytoplasm these proteins bind to sugar molecules, form crystals which protect cellular components and cause the stabilization of membranes. This author observed the presence of LEA proteins in plants of cotton genotypes in the initial phase of growth, in a condition of water stress and when they were rehydrated.

LEA proteins, known as dehydrins, are accumulated under stress. They have been associated with seed maturation and desiccation (SALGADO *et al.*, 2008). Koag *et al.* (2003) verified that ZmDHN1 in maize binds to lipid vesicles that contain phospholipids. These authors also observed that DHN5, dehydrin, can change the conformations related to the function at the water/membrane interface, which leads to the stabilization of membranes under stress conditions.

According to Bakhsh e Hussain (2015), the literature on the use of LEA proteins associated with drought tolerance seems quite promising. Transgenic rice plants that expressed for LEA protein, gene *OsLEA 3-1*, were more tolerant under water deficit conditions (XIAO *et al.*, 2007).

Besides LEA proteins, detoxification enzymes also protect cells from dehydration and these have been linked to water stress tolerance. These enzymes are a defense system to decrease or suppress the harmful effects of reactive oxygen species (ROS). ROS are produced in living organisms since oxygen has two unpaired electrons, so it is able to accept electrons, which leads to the formation of ROS (GILL; TUTEJA, 2010). Initially considered only toxic, ROS are also signaling molecules and control processes related to responses to abiotic stress, such as water deficit. Under water deficit conditions, superoxides (O_2^-), singlet oxygen (1O_2), hydrogen peroxides (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH^-) can be produced. These can cause oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids (AZEVEDO NETO *et al.*, 2006). In

addition to being involved in stress signaling, superoxide radicals and H₂O₂ are involved in the processes of cell extension, division, and differentiation.

The main enzymes involved in the defense system relating to ROS are: Superoxide dismutase (SOD) that acts on O₂⁻ and results in the formation of H₂O₂ and O₂. Following, Catalase (CAT) converts H₂O₂ to H₂O and H₂O. The latter uses ascorbate as an electron donor and is considered the most important plant peroxidase for H₂O₂ detoxification (NOCTOR; FOYER, 2005).

To study the mechanisms associated with tolerance to water deficit in roots of soybean cultivars, Fraiz (2015) observed, in the tolerant cultivar, higher root respiration and higher expression of catalases, SOD, GR (Glutamate Reductase) and APx.

Another important enzyme in the antioxidant defense system is Catalase. This acts directly on the degradation of H₂O₂ into H₂O and O₂. It has fast action and degrades millions of H₂O₂ molecules in seconds (NELSON; COX, 2005). Under water-deficient conditions, Catalase expression increases substantially (ZLATEV *et al.*, 2006). Catalases are found in peroxisomes, glyoxysomes and mitochondria, without using reducing agents, which is advantageous from an energetic point of view (BARBOSA *et al.*, 2014). Catalase has been reported to be preferentially found in peroxisomes (MITTLER, 2002).

Dall Asta (2013) evaluated the expression of genes involved in the antioxidant system responding to ABA of a variety of maize with low flavonoid production, using the qRT.PCR technique. There was a change in the expression of the *CAT1*, *APX1*, *SOD2* genes when the seedlings were treated with 100 µL of ABA. The author reported the induction of H₂O₂ production in the presence of ABA, with ABA activating the antioxidant system. It has also been reported that APX seems to be more associated with ROS modulation and Catalase more associated with the removal of H₂O₂ during stress.

Besides the expression of APx and Catalase, another form of defense against oxidative stress through the detoxification of ROS and the repair of damage caused by ROS, are the alternative breathing pathways such as the alternative oxidase (AOX) (VAN AKEN *et al.*, 2009). According to Vanlerberghe *et al.* (2013) inhibition of AOX expression is associated with increased sensitivity to abiotic stresses. According to Vanlerberghe, Cvetkovska e Wang (2009), AOX-dependent respiration is not associated with energy conservation, which provides flexibility for the electron transport chain. ABA, which is associated with the adaptation of plants under environmental stress, is also associated with the regulation of AO (MILLAR *et al.*, 2011).

As already discussed, plant responses to water stress involve several genes and have been divided into two categories. Those described so far in this review are directly involved in the protection of membranes and proteins, such as LEA, and those from the antioxidant system, free radical scavengers. These are genes that code for functional and structural proteins.

Another category corresponds to the genes that are involved in the signaling cascade and transcriptional control, such as kinases, phospholipases and transcriptional factors. Related to transcriptional factors, DREB (Dehydration responsive element binding proteins), (Basic leucine proteins), among others, have been studied. These genes encode regulatory proteins that are activated after stress. These proteins induce cascade signals involving the functional and structural proteins (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011).

Transcription factors regulate the expression of genes encoding proteins that contain a DNA binding domain (DBD) that recognizes a specific DNA sequence (WANG *et al.*, 2010).

DREBs have been studied for more than a decade due to their importance regarding tolerance to water deficiency, being explored through genetic engineering for the development of transgenic plants with drought tolerance.

Transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* that overexpress the DREB gene survived in dry environments. These genes encode the DREB protein, which acts on other molecular events associated with the defense against dehydration (MARUYAMA *et al.*, 2009). The association of DREBs with drought tolerance has also been observed in species of economic importance such as rice (CHEN *et al.*, 2008), canola, barley, wheat, and maize (MARUYAMA *et al.*, 2009).

It should be noted that the expression of DREB2 genes is associated with saline stress and water deficiency, independently of ABA (ZHAO *et al.*, 2010). AtDREB2A expressed in roots, leaves, and stems of *A. thaliana* under water deficiency conditions (AGARWAL *et al.*, 2006).

According to Nepomuceno *et al.* (2000), genes that encode transcription factors, are involved in the initial stages of gene expression and regulation and in signal transduction in response to stress. According to these same authors, this is interesting in works of Genetic Engineering, in which polygenic characteristics such as drought tolerance are sought. DREB proteins, for example, act at the top of the cascade of molecular events and induce defense responses against cellular dehydration. DREB1A and DREB2A proteins have the ERF/AP2 domain (Ethylene Responsive Factor), APETALA, which interacts specifically with the conserved DRE region, a CIS element in the promoter region of many genes activated under water deficiency conditions (MARUYAMA *et al.*, 2009).

According to Sakuma *et al.* (2002), DREB1A and DREB2A recognize a central sequence of DRE, G/ACCGAC, present in their promoting regions. Sakuma *et al.* (2006), when studying the functional analysis of DREB2A, involved in gene expression responsive to drought, found 14 candidate genes for direct targets of DREB2A, nine identified LEA proteins, which protect macromolecules as enzymes and lipids dehydration.

Another transcription factor is the basic leucine Zipper proteins (bZIP) which are involved in the signaling cascade and in the transcriptional control of other genes. They regulate the maturation process in seeds and regulate the expression of several stress-related genes such as bZIP72. Transcription factors, bZIP domain, have approximately 60-80 aa and are related to water deficiency.

Through the microarray technology, *ZmbZIP* genes were studied in contrasting maize lineages in terms of drought tolerance, with the greatest expression of *Zmb ZIP74* being observed in a drought-sensitive lineage under severe drought conditions (KAIFA *et al.*, 2012).

The PP2C gene, protein phosphatase of type 2C, is also related to the perception and signaling of ABA. This seems to be associated with the production of ROS. According to MURATA *et al.* 2001, the production of ROS activates Ca^{2+} channels, which increases Ca^{2+} in the cytosol of the guard cells and reduces stomatal opening. It has been shown that orthologs of this gene have hypersensitivity to ABA, which prevents stomatal closure and increases intolerance to water deficit (SAEZ *et al.*, 2006). He *et al.* (2019) suggested, after evaluating the PP2C phosphatase functions in maize seedlings in response to abiotic stresses, that ZmPP2CA2 and ZmPP2C_A6 play negative roles in the stress responses to drought.

As already mentioned, the abscisic acid hormone (ABA) triggers defense mechanisms against abiotic stresses such as water deficiency. This is responsible for closing the stoma in response to dehydration (HORTA, 2013). Several genes participate in ABA biosynthesis and responses (FUJITA *et al.*, 2011).

ABA3-deficient mutants in maize, tomato, tobacco and *Arabidopsis thaliana* did not survive under water deficient conditions due to the non-closure of stomata (LIOTENBERG *et al.*, 1999). According to Xiong *et al.* (2021), ABA3 encodes a sulfurylase that generates the molybdenum cofactor required by ABA-aldehyde oxidase (AAO).

As well as the transcription factors already described, protein kinases and phosphatases are classified into regulatory proteins and under conditions of water deficiency, are related to the protection of macromolecules. These proteins promote a signaling cascade that activate transcription

factors under water deficient conditions (ROSADO *et al.*, 2018). Kinases transfer ATP phosphate groups, for example, to specific target molecules.

It has been reported in the literature that there are also changes in qualitative and quantitative levels of carbohydrates in plant cells under conditions of abiotic stress. As a consequence, there are changes in the expression of many genes (BIAZUZO, 2013). This same author, when studying gene expression in bean genotypes through transcripts, observed more promising transcripts for drought tolerance and among them glycoside hydrolase.

According to Stewart (1971), in beans under water deficiency there is an increase in sucrose in leaves. Sucrose is known to be the primary substrate for the synthesis of starch. Thus, there is an increase in the amount of starch with an increase in sucrose, when plants are exposed to drought (NAKAMURA *et al.*, 1991).

As observed in this review, the response of plants to water stress is complex and involves the expression of several genes and pathways for different mechanisms and interactions with the environment. Guimarães *et al.* (2011) described that drought tolerance is a characteristic influenced by a series of genetic and environmental interactions. They also reported that the selection for the production of grains under water stress is complex due to the high proportion of environmental variance in relation to genetics, which reduces the character heritability and makes it difficult to select superior genotypes.

Thus, the identification and understanding of drought tolerance mechanisms through transcript evaluations can be useful to assist breeding programs aiming at the development of more tolerant cultivars to water stress. Therefore, genotypes that differ in terms of tolerance to water stress should present quantitative differences in the expression of genes associated with this characteristic.

It is noteworthy that several studies have been carried out with the objective of elucidating the genetic control related to drought tolerance in maize crops (ABREU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2010; ZHOU; HU; DENG, 2012). In others, the expression of certain genes to this abiotic stress condition has been studied through transcripts and proteins in seeds and seedlings (MARQUES *et al.*, 2019; SANTOS, 2016).

The main advantage of identifying functional markers expressed in seeds and seedlings is to assist the early selection of genotypes adapted to low water availability in breeding programs.

Given the above, the present study was carried out using an F_{2:3} population of maize from the breeding of two contrasting parents in terms of drought tolerance, aiming at evaluating the expression of genes associated with water stress in seeds and tissues of seedlings submitted to water stress, through the transcriptomic analysis.

2 MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted at the experimental Campus and at the Seed Central Laboratory, both at the Department of Agriculture, School of Agricultural Sciences of Lavras, at the Federal University of Lavras.

In a first stage, we used two contrasting parental lines in relation to water deficit tolerance. The choice of contrasting lines in terms of water stress tolerance was made based on the analysis of the results obtained by Abreu *et al.* (2018) e Marques *et al.* (2019). We selected two contrasting lines, being a tolerant (T) 91-T and a susceptible (NT) 57-NT.

In a second stage, the multiplication of seeds of the selected lines was carried out, and we obtained the F₂ generation. For that, a seed production field was installed during the 2016/2017 harvest.

The soil was prepared conventionally, and fertilizations were performed according to its chemical analysis. We adopted a spacing regime of 0.8 m between rows and 7 plants per linear meter. Cover fertilization and other agricultural phytosanitary treatments were carried out according to the needs of the crop.

Part of the F₁ seeds stored and produced by Abreu *et al.* (2016) during the 2013/2014 harvest was used to obtain F₂ generation seeds. The targeting for male (57-NT) and female (91-T) parental lines was made based on the results of the diallel analysis performed by Abreu *et al.* (2016). The authors observed a significant effect of the reciprocal characterizing the maternal effect for most of the traits studied.

Due to the flowering of the plants, the ears were protected with plastic bags, before silk emergence. When the silk receptivity was present, the tassels of pollen donor plants were covered with a paper bag to avoid genetic contamination, and the breedings were performed in the following day.

After the physiological maturity of the seeds, they were sampled to determine the water content and the harvest was carried out when water content reached 25%. Self-fertilization and breeding ears were harvested manually, dried in an ear dryer at 35 °C until reaching a water content of 13%. Then, they were purged and threshed manually. The seeds retained in the sieve 16 of a circular sieve were treated with the fungicide Vitavax-Thiram® 200 (300 ml per 100 kg of seeds) and were stored in a cold chamber at 10 °C and 50% relative humidity.

In a third stage, a field was installed in the 2017/2018 harvest for the production of F_{2:3} generation seeds. We used F₂ generation seeds produced in the 2016/2017 harvest. The

experimental plot consisted of eight rows of 5 m with 5 plants per linear meter. We had two replicates, totaling 400 F₂ plants. The plants were self-fertilized, producing F_{2:3} generation seeds. The seeds were harvested with a water content of 25% and the processing of the seeds and post harvest were the same as described previously.

Subsequently, the genotypes of the F_{2:3} generation were phenotypically evaluated for water deficit tolerance, aiming to compose the segregating groups for further analysis of the expression of transcripts. For this, 15 seeds of each of the 203 genotypes previously selected were sown in two replicates using “germitest” paper substrate. They were moistened with polyethylene glycol solution (PEG 6000) with 0.6 MPa osmotic potential in the proportion of 3x the dry paper weight, to simulate water deficit conditions. The osmotic potential was defined based on the results obtained by Abreu *et al.* (2014) and by the author herself (unpublished data). The methodology proposed by Villela, Doni Filho e Sequeira (1991) for the determination of the amount (weight) of PEG 6000 in the solution was followed. After sowing, the paper rolls containing the seeds were packed in plastic bags to avoid evaporation of the PEG 6000 solution and subsequently kept in a BOD germination chamber under a constant temperature of 30 °C.

The evaluations were carried out on the fifth and seventh days after sowing. On the fifth day, seedlings with the presence of a main root of at least three centimeters were computed. After seven days of germination, seedlings with the following characteristics were counted: Main root with at least 3 cm; presence of shoot and at least three secondary roots. At the end of the phenotypic evaluation, the 203 genotypes evaluated were separated into three groups regarding tolerance to water restriction (Tolerant, Intermediate and Non-tolerant). The seedlings were stored at -80 °C for further processing to conduct the transcriptomic analyzes.

The experiment was conducted in a completely randomized design with two replicates of 15 seeds. Statistical analyzes were performed using the software R, and comparisons of means using the Tukey test at 5% probability.

From the results obtained in the phenotyping evaluations, 36 F_{2:3} genotypes were selected from each of the three groups regarding the tolerance to low water availability (Tolerant; Intermediate and Non-tolerant), for the transcripts expression. analysis through the qRT-PC technique. Seedlings of each of the genotypes collected seven days after sowing were used, submitted to water stress through the use of PEG 6000 (-0.6 Mpa).

The expression analysis of the transcripts involved in the water stress tolerance process using the qRT-PCR technique was divided into four stages: RNA extraction and purification, reverse transcription for cDNA synthesis, real-time PCR and analysis of the results.

For the RNA extraction, the seeds, and seedlings belonging to each tolerance group were macerated in bulk, by tolerance level, with liquid nitrogen, with the addition of PVP (1% p/v), to reduce the oxidation rate in the samples. Subsequently, the reagent Pure Link RNA Plant® (Invitrogen) was added, following the specifications of the manufacturer's manual.

RNA integrity and purity were evaluated at all stages using 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with GelRed™ Nucleic Acid Stain, 10,000X in Water (Biotium) and spectrophotometer (BioTek™ Eon™ Microplate Spectrophotometer).

After nucleic acid extractions, the samples were treated with DNase-Free to avoid any contamination with DNA. So, the KitDNase Turbo Free® AMBIOM was used according to the protocol recommended by the manufacturer.

To prove the efficiency of the DNase treatment, a conventional PCR reaction was performed with all samples, proving the non-amplification of the DNA. In this reaction, we used a sample of maize genomic DNA and the primers of the endogenous controls ubiquitin (UBI) and beta-actin (bACT) as a positive control. The amplifications were evaluated on a 1.5% agarose gel stained with GelRed™ Nucleic Acid Stain, 10,000X in Water (Biotium). The samples treated with DNase were again quantified in a spectrophotometer.

After the extraction and purification process, mRNAs were used as a template for cDNA synthesis. The kit High Capacity DNA Reverse to Transcription cDNA® (Applied Biosystems) was used following the protocol recommended by the manufacturer. The efficiency of cDNA synthesis was confirmed through conventional PCR, as previously described.

For the analysis of gene expression using the qRT-PCR technique, the selection of target genes was made based on the previous bibliographic review, considering the importance of studies about the tolerance to water stress of cultivated plants. The sequences of the selected primers were found in the Maize Genetics and Genomics Database, GenBank. Based on these sequences, primers were designed using the software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). The sequences of the primers used are shown in Table 1. Ubiquitin (UBI) and beta-actin (bACT) genes were used as endogenous controls (HU *et al.*, 2011; MANOLI *et al.*, 2012).

Table 1 - Primers used in the analysis of qRT-PCR.

Gene	Function	Sequence 5'-----3'
<i>Ubiquitina (UBI)</i>	Endogenous control	F AAGGCCAAGATCCAGGACAA R TTGCTTTCCAGCGAAGATGA
<i>beta-actina (bACT)</i>	Endogenous control	F TGTCCATCACTTGTGAAGCCTCCT R ACGACCTTAGCCAATATCGCACCA
<i>Capx</i>	Ascorbate Peroxidase / Antioxidant	F TGAGCGACCAGGACATTG R GAGGGCTTTGTCA CTTGGT
<i>SAD</i>	Putative stearyl- ACP desaturase	F GGA TTT CCT CCC TGA CCC A R GTC CAT GCC CTC GTC CAA A
<i>LEA 14</i>	Osmoprotectors biosynthesis	F TGCAGCTCCTAGTGCTTGTAC R TGGAAGAGGACCTGGGATTG
<i>LEA D34</i>	Heat-resistant proteins	F CCGGCTCCACGCAGAAC R TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
<i>ZmDNH1</i>	Dehydrin	F GACGACGACACGAAGACTCAGA R CGTCTTCCGGCTTCTTGTG
<i>CAT3</i>	Removal of H ₂ O ₂ produced during fatty acid degradation	F CTGCTGGAAACTATCCTGAGTG R ATTGACCTCTTCATCCCTGTG
<i>AOX2</i>	Alternative respiratory pathway / antioxidant	F CCAAGACGCTGATGGATAAAGG R AGCCATACCGCCTCTGGAA
<i>DREB 2A/2.1S</i>	Binding-element protein that respond to dehydration	F GCAGCCCGBAAGGAAGAA R GATGACAGCTGCCACTGACGTA
<i>DREB 2.7</i>	Binding-element protein that respond to dehydration	F GCTGTTGCCAAGTCGAGTT R GCTGGGTCCGGCAACAT
<i>ZmBZIP72</i>	ABA-dependent response pathway	F ACTGATGGACCGCAAACC R GGGTGACG AGGAAGTTGG
<i>ZmPP2C</i>	Regulatory function in response to abiotic stress	F GGAAGCTCCGATAACATCACAGT R TCTTTGTGTCGTCGCTGATTC
<i>ZmCPKII</i>	Expression and activities of antioxidant enzymes	F CCTCCACGACCCCGACAATG R ACCTCTCCGAG CACCCAAC
<i>Amilase B73</i>	Amylase synthesis	F CCGGCTCCACGCAGAAC R TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
<i>ABA3 17</i>	ABA Biosynthesis	F GGAGCACTAGCGGTGAAATC R CAGCCTTGAAATCCTGTTCC

(F) forward primer sequence e (R) reverse primer sequence.

Source: Author (2021).

For the expression analysis of the selected genes, the ABI PRISM 7500 Real-Time PCR device (Applied Biosystems) was used, with a detection method via SYBR Green. We used cDNA samples obtained from seedlings of each group of genotypes collected seven days after sowing, submitted to water stress through the use of PEG 6000 (-0.6 MPa), in biological triplicates. The efficiency of the designed primers was determined through a dilution curve by absolute quantification.

In the expression assay, each reaction used 1 μ L of cDNA (diluted 1: 5), 0.4 μ L of forward/reverse primer (10 μ M) and 5 μ L of Master MixSYBR green (Applied Biosystems) totaling a final volume of 10 μ L. The samples were pipetted in technical triplicates, and a control without cDNA (NTC) was included for each pair of primers. The results were normalized using CTs (cycle threshold) obtained by the expression of the reference gene Ubiquitin (UBI). The CT was determined by the number of cycles in which the fluorescence generated within a reaction crosses the baseline (cycle threshold, CT). The relative expression was analyzed using the Pfaffl method (PFAFFL, 2001).

The thermal conditions of the reaction were: 2 minutes at 50 °C and 10 minutes at 95 °C for initiation, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95 °C and 1 minute at 60 °C, and ending with 15 minutes at 95 °C. At the end of the cycling, we evaluated the specificity of the PCR reaction using the 60-95 °C denaturation curve. The data were collected, exported by the program 7500 Fast Software (Version 2.1) and analyzed in an Excel spreadsheet (Microsoft).

3 RESULTS AND DISCUSSION

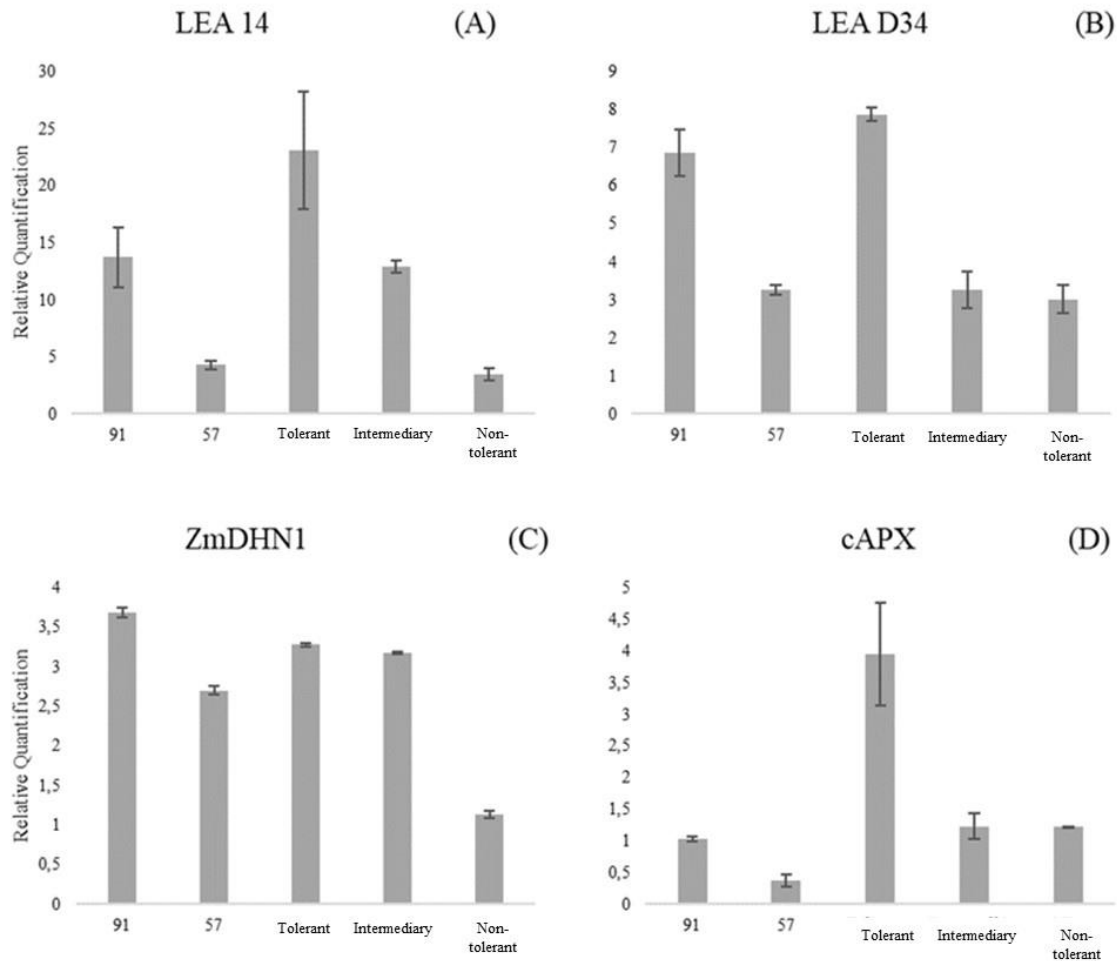
Through Figure 1, there is a greater expression of the genes LEA 14 (A) and LEA D34 (B) in tolerant seedlings, line 91 and in seedlings of F_{2:3} progenies classified as tolerant. Through these two genes, it was possible to discriminate lines 91 and 57 regarding drought tolerance, with the lowest expression of these being found in line 57. A difference in the expression of the gene LEA 14 was observed between the materials classified as tolerant, intolerant and intermediate. Regarding the expression of the gene LEA D34, no significant difference was observed between the F_{2:3} progenies classified as intermediate and non-tolerant regarding water deficit.

In works developed by Bray (1993) and Moons *et al.* (1995), higher expression of LEA was registered in plants submitted to water stress or treatments with exogenous ABA. The authors concluded that plants are more tolerant to water stress due to their ability to synthesize and accumulate LEA.

LEA proteins have low molecular weight, 10 to 30KDa, and they bind to sugar molecules culminating in the formation of crystals that promote the stabilization of plasma membranes (SHIH; HOEKSTRA; HSING, 2008). According to Close (1996), LEA proteins are highly hydrophilic and act in the protection of membranes and proteins, participating in the folding of chaperones and in the capture of water, which is related to water stress tolerance. These proteins respond to treatment with ABA (RAMANJULU; BARTELS, 2002). The overexpression of genes that encode these proteins in cotton provide greater survival in conditions of water stress (MAGWANGA; LU; KIRUNGU, 2018; ZHU; HASEGAWA; BRESSAN, 1997).

In several studies, the expression of LEA proteins has been observed in seeds. In the present research, LEA 14 and LEA D34 were expressed in maize seedling tissues. Porcel, Azcón e Ruiz-Lozano (2005) and Wang *et al.* (2004), also reported the accumulation of these in vegetative tissues during periods of drought. These authors also reported the involvement of these proteins in the sequestration of ions, such as calcium, in water retention, in addition to the function of chaperones.

Figure 1 - Expression of the genes LEA 14 (A), LEA D34 (B), ZmDHN1 (C) and cAPX (D) in maize seedlings of two lines (L91-T e L57-NT) and F_{2:3} progenies, under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.



Source: Author (2021).

Regarding ZmDHN1, higher expression was observed in seedlings of line 91 and those of the F_{2:3} population classified as non-tolerant. There was also a difference in the expression of ZmDHN1 between seedlings of lines 91 and 57 (Figure 1C). DHN's have been associated with drought tolerance, they are highly hydrophilic and act as intracellular sponges that help retain water at low osmotic potential (CLOSE, 1996; GARAY-ARROYO *et al.*, 2000). Salgado *et al.* (2008), mapped using microsatellite markers QTLs for tolerance of maize seeds to high drying temperatures on chromosome 6 near the loci that code for ZmDHN1.

As for the expression of Ascorbate Peroxidase, higher values were observed in seedlings of the materials classified as tolerant (Figure 1D). In these seedlings, greater root development was observed during phenotyping. According to Fraiz (2015), the maintenance

of root respiration seems to be associated with the survival of plants subjected to stress, as it helps in the activation of stress response mechanisms.

It is known that oxidative stress occurs in an unbalance between the production of ROS and oxidizing agents, such as scavengers enzymes. ROS are produced in mitochondria, chloroplasts, and other cell compartments. In several studies, mitochondria have been targeted because they are associated with the induction of antioxidants and tolerance to stresses, being compared to sensors (LEHMANN *et al.*, 2012).

Ascorbate Peroxidase and Catalase, also present in the mitochondria, appear to be involved in the detoxification of ROS as well as in the repair of losses generated by them (PAVENTI *et al.*, 2006).

Li *et al.* (2009), observed in transgenic tobacco plants, under water deficit conditions, that the gene PpAPX (*Populus peroxisomal ascorbate peroxidase*) improves oxidative damage and promotes root development. However, it does not play a significant role in favorable conditions for plant growth. Due to the high affinity for H₂O₂, it plays a central role in the control of intracellular H₂O₂ levels, which allows its elimination even when it is in low concentrations, (MITTLER *et al.*, 2002).

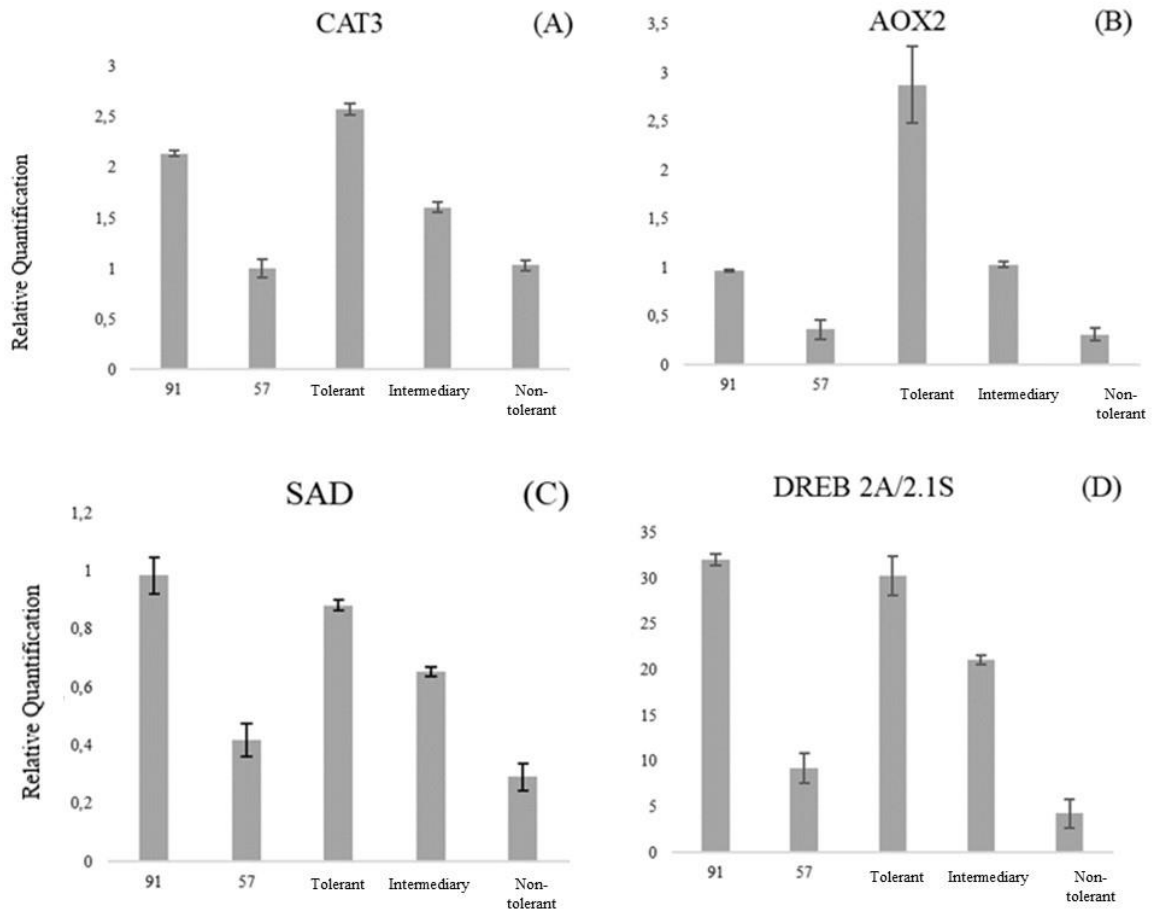
Caverzan (2008) functionally characterized the genes APX in rice with the objective of evaluating the control of ROS levels in the plant, under abiotic stress conditions, including drought. A differential pattern was observed in the tested conditions, concluding with a complex mode of regulation of the evaluated genes.

Ascorbate peroxidase, cytosol APX, studied in this research has a physiological function of protecting plants under stress conditions (TEIXEIRA *et al.*, 2004). Carvezan (2008) e Carvezan *et al.* (2012), observed that cytosolic and mitochondrial isoforms were significantly induced in rice plants under water deficit conditions.

In Figure 2A, greater expression of Catalase can also be observed in seedlings of lines and F_{2:3} progenies classified as tolerant to water stress.

Souza *et al.* (2012), evaluated the activity of the enzymes SOD, Catalase, and Ascorbate Peroxidase in plants of *Ricinus communis* L, contrasting in relation to tolerance to water stress, in the presence of ABA. The authors observed that the application of ABA is related to the greater tolerance to drought of materials classified as tolerant, with an increase in the activities of the enzymes studied in these conditions, especially Catalase.

Figure 2 - Expression of the genes CAT3 (A), AOX2 (B), SAD (C) and DREB 2A / 2.1S (D) in maize seedlings, from two lines (L91-T and L57-NT) and F_{2:3} progenies under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.



Source: Author (2021).

Another plant defense system for the detoxification of Reactive Oxygen Species is through Alternative Oxidase (AOX). In the present study, there was a greater expression of AOX2 in seedlings of F_{2:3} progenies classified as tolerant to water deficit and lower in seedlings of line 57 and F_{2:3} progenies classified as intolerant (Figure 2B).

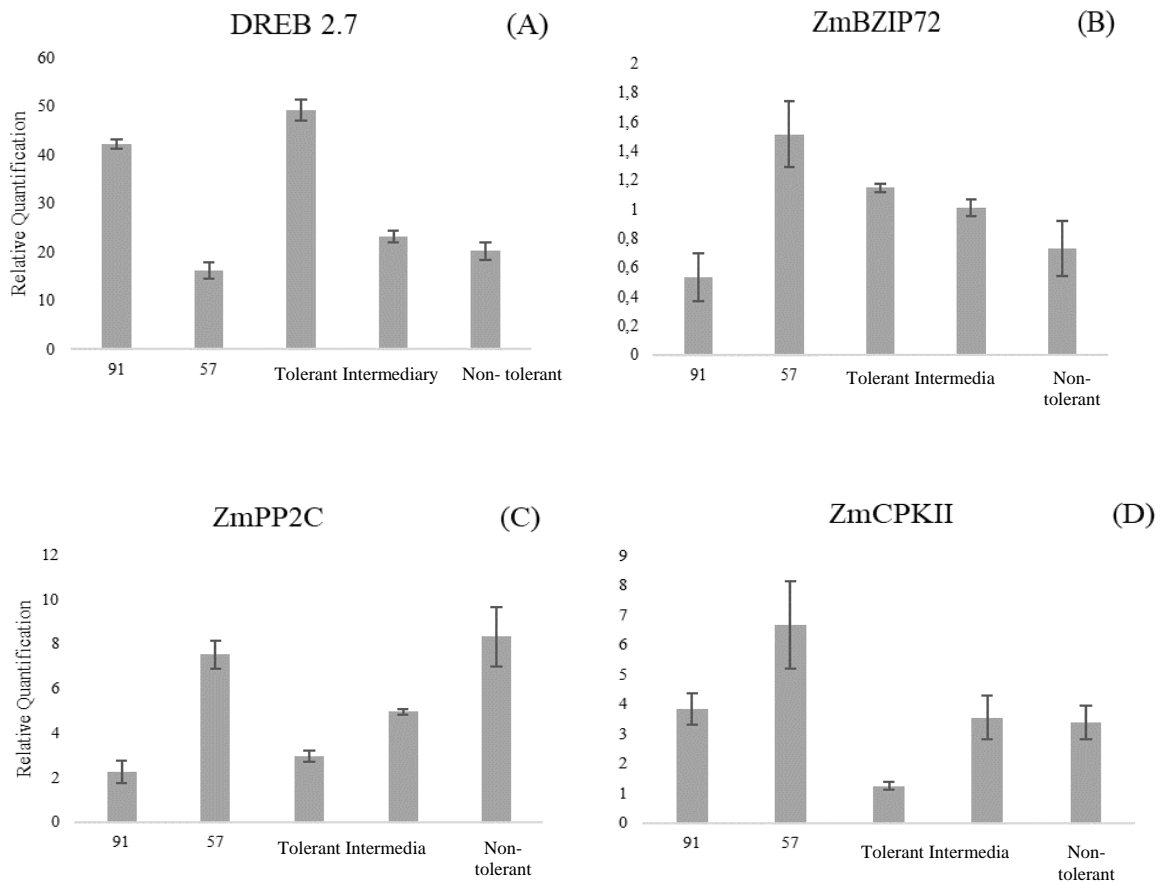
Through this marker, it was possible to separate lines 91 and 57 regarding tolerance to water stress and seedlings of F_{2:3} progenies classified as tolerant, intermediate and non-tolerant. As described by Tudella *et al.* (2004), AOX is associated with the adaptation of plants to changes in the environment, including oxidative stress, cold, among others. Besides this function, AOX2 is also associated with resistance to toxins, reprogramming of cellular metabolism, control of the cell redox balance, sequestration of excess O₂ (CLIFTON *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2001).

In Figure 2C, greater expression of SAD (Synaplyic Alcohol Dehydrogenase) was also observed in seedlings of line 91 and F_{2:3} progenies classified as tolerant to water deficit and

lower in seedlings of line 57 and F_{2:3} population classified as non-tolerant. Also, through this marker, there was a significant difference in expression among the materials classified as tolerant, non-tolerant and intermediate. SAD is involved in plant lignification, which in turn has an influence on tolerance to water deficit and also to cold (SOBCZAK *et al.*, 2013).

Figures 2D and 3A show the results of expression of the DREB 2A/2.1S and DREB 2.7 genes, respectively. Higher values of expression were observed in seedlings of line 91 and in those of F_{2:3} progenies classified as tolerant to water deficit and lower values in seedlings of F_{2:3} lines and progenies classified as non-tolerant. A smaller difference in the expression of the gene DREB 2.7 was observed among seedlings classified as intermediate and non-tolerant. Regarding the gene DREB 2A/2.1S, it was also possible to differentiate the expression in seedlings of F_{2:3} progenies classified as tolerant, intermediate and non-tolerant.

Figure 3 - Expression of the genes DREB 2.7 (A), ZmBZIP72 (B), ZmPP2C (C) and ZmCPKII (D) in maize seedlings, from two lines (L91-T and L57-NT) and F_{2:3} progenies under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.



Source: Author (2021).

In research developed by Alves *et al.* (2014), transgenic maize plants, transformed with the gene DREB 2A, presented more stability and higher grain production under conditions of water stress in a greenhouse. These authors also observed that the expression of this gene was associated with greater stomatal conditions and concluded that this gene can bring benefits to plants under water stress. Qin *et al.* (2007) also reported that overexpression of ZmDREB2A in maize induced tolerance to water deficit.

Bakhsh e Hussain (2015) reported that regulatory proteins of stress-induced genes, such as DREBs, are preferentially introduced into plants. According to these authors, these proteins encode stress-inducible transcription factors that regulate many genes involved simultaneously in responses to plant stresses.

In Figure 3B, it is observed that there was a greater expression of the gene ZmBZI72 in seedlings of maize lines classified as non-tolerant and lower in those of line 91. However, in seedlings of F_{2:3} progenies, lower expression of this gene was observed in seedlings classified as non-tolerant. According to Nepomuceno *et al.* (2000), the bZiP-type transcription factor, participates in the ABA-dependent response pathway. In conditions of water deficit, ABA promotes stomatal closure of guard cells and regulates the expression of more induced ABA genes. These genes have the conserved sequence (C / T ACGTGGC) ABRE (ABA Responsive Element), in their promoter regions in which the FT ARAB (ABA Response Element Binding Protein) binds by activating the transcription of genes related to dehydration of vegetative tissues and seeds (YOSHIDA *et al.*, 2010).

Regarding the gene ZmPP2C (Figure 3C), greater expression was observed in seedlings of line 57, and of F_{2:3} progenies, also classified as non-tolerant to water deficit. Through the expression of this gene, it was possible to separate all the treatments evaluated. In some research it has been shown that the overexpression of this gene increases the sensitivity of plants to water stress (LIU *et al.*, 2013). Marques *et al.* (2019), also observed greater expression of this gene in plants of ears of lines non-tolerant to water deficit and lower in ears of tolerant line.

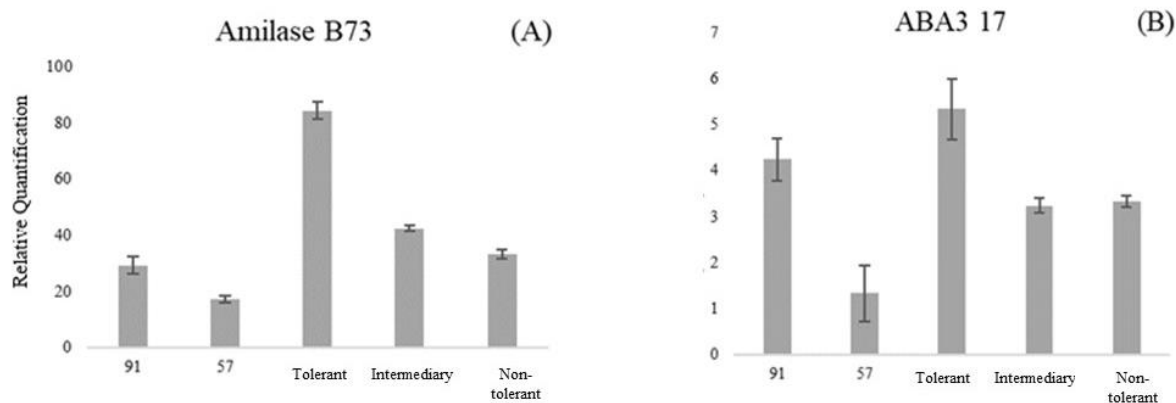
Saez *et al.* (2006) found that silencing genes PP2C in plants of agronomic interest may be an alternative to increase drought tolerance. He *et al.* (2019) associated the overexpression of the genes ZmPP2C-A2 and ZmPP2C-A6 in maize plants with lower survival rates, greater loss of water in the leaves and less accumulation of proline. The authors concluded that these genes have the potential to be used as molecular markers in genetic improvement for drought

tolerance. The same authors also observed that most of the genes ZmPP2C-A were expressed in maize plant stems and roots.

In relation to pyruvate kinase (Figure 3D), greater expression was observed in seedlings of line 57 and lower in those of line 91 and seedlings of F_{2:3} progenies classified as tolerant. This enzyme converts phosphoenolpyruvate into pyruvate with ATP release, in glycolysis, and has a high potassium requirement. Glycolysis is one of the stages of respiration important in the early stages of seed germination. However, in the present study, the function of this enzyme was not associated with greater tolerance to water deficiency.

Santos (2016) observed greater expression of the ZmCPKII gene in genotypes classified as tolerant and responsive to drought. According to the authors, the gene is involved in the induction of antioxidant defense.

Figure 4 - Expression of the genes Amilase B73 and ABA3 17 in maize seedlings, from two lines (L91-T and L57-NT) and F_{2:3} progenies under water stress conditions. UFLA, Lavras 2021.



Source: Author (2021).

Greater expression of the gene Amylase B73 (Figure 4) was observed in seedlings of F_{2:3} progenies classified as intermediate and tolerant. It was also possible through this gene to separate lines 91 and 57 in terms of tolerance to water deficit, with the highest value observed in seedlings of line 91. Increased sucrose was observed in bean leaves under water deficit. There appears to be an increase in the amount of starch with an increase in sucrose in plants exposed to drought (NAKAMURA *et al.*, 1991).

Amylase is an important enzyme involved in the germination process of maize seeds, and has the function of hydrolyzing starch, the main carbohydrate stored in these seeds.

Jacobsen, Hanson and Chandler (1986), observed that the enzyme α amylase was induced by water deficit in barley leaves. Jose *et al.* (2004), when studying the genetic control of tolerance to high drying temperatures in maize genotypes, observed a correlation between this trait and the expression of the enzyme α amylase.

Regarding the expression of the gene ABA3 17 (Figure 4B), it was possible to differentiate the materials classified as tolerant from the non-tolerant ones. There was no statistical difference in expression values in seedlings of F_{2:3} progenies classified as intermediate and non-tolerant. He *et al.* (2020), when evaluating genes that respond early to drought observed that the ABA biosynthesis genes were co-regulated to increase the production of ABA under water deficit. The expression of these genes was evaluated in maize seedlings submitted to drought. Part of the plants after being subjected to stress were irrigated. In this work, ABA-related genes responsive to drought were expressed in the early stages, that is, in maize seedlings.

With a general analysis of the genes evaluated in this research, a greater expression of those related to the elimination of ROS is observed: AOX, cAPX and Catalase, in seedlings of lineages and F_{2:3} progenies classified as tolerant. ROS are potentially toxic to cells and may be involved in stress signaling, and in seedling and plant development processes such as cell elongation, division, and differentiation (COLVILLE; KRANNER, 2010).

It should be noted that in this research we used maize seedlings, whose seeds were germinated, and seedlings developed under water deficit conditions. In the works developed by this author and other researchers, we observed the promotion of root growth and development in seedlings classified as drought tolerant. Ascorbate Peroxidase, for example, promotes the development and growth of roots in tolerant plants, which allows associating the phenotyping of genotypes tolerant to water deficit, through this variable and the expression of the gene APX.

As well as the enzymes of the antioxidant system studied in this research, LEA 14, LEA D34 and ZmDHN1 also expressed more in maize seedlings classified as tolerant to water deficit. Although these proteins are more expressed at the end of seed development, it has also been observed that they are expressed in vegetative tissues under water stress conditions (PORCEL; AZCÓN; RUIZ-LOZANO, 2005). They are highly hydrophilic and are involved in the structural maintenance of other endomembrane proteins and also in the sequestration of calcium and water retention. In maize, ZmDHN1 can bind to lipid vesicles that contain acidic phospholipids with increased membrane stability.

It is also important to highlight the expression of DREB-type transcription factors, which induce the expression of other genes. The expression of DREB 2A / 2.1S and DREB 2.7 was higher in seedlings classified as tolerant to water stress. In other research, these genes have been linked to drought tolerance. It has been reported that proteins that encode stress-inducible transcription factors regulate genes involved simultaneously in responses to plant stresses. In this line of reasoning, regulatory proteins from stress-induced genes have been preferentially selected to be introduced or overexpressed in plants aiming at tolerating abiotic factors such as water stress.

Still regarding the transcription factors, basic Leucine Zipper proteins (bZip) are also involved in the transcriptional control of other genes. In the present research, as in others, the greater expression of this gene is associated with intolerance to water stress. The same could be observed for the gene ZmPP2C, type 2C phosphatase proteins, which is related to the perception and signaling of ABA. The latter is also expressed in maize seedlings and plays negative roles in relation to stress responses to drought. It seems to be associated with hypersensitivity to ABA in relation to stomatal closure. In some research, these have been indicated as potential markers in genetic improvement programs for drought tolerance. In addition, ZmPP2C in other research was expressed in roots of maize seedlings, which goes against the early selection for this trait. On the other hand, genes related to ABA biosynthesis are more expressed in drought-tolerant genotypes. This was observed in the present research through the expression of the gene ABA3 17. It has also been reported that the expression of this gene happens in early stages, that is, in maize seedlings.

Finally, it is known that the reactions of plants to water stress conditions are complex and involve various genes with additive effects. In this work it was possible to evaluate the expression of some genes related to water deficit tolerance in early stages of growth.

4 CONCLUSIONS

The highest expressions of the DREB2A/2.1S, DREB.2.7, CAT, cAPX, LEA 14, LEA D34, ZmDHN1, AOX2, SAD, Amylase B73 and ABA3 17 are associated with the higher tolerance of maize seedlings to water stress.

The highest expressions of the ZmBZIP72, ZmPP2C and ZmCPKII are associated with the lower tolerance of maize seedlings to water stress.

The genes studied are expressed in maize seedlings developed in the presence of PEG 6000 saturation (-0.6 Mpa) and are potential markers for the early selection of maize genotypes for water deficit tolerance.

REFERENCES

- ABREU, V. M. *et al.* Combining ability and heterosis of maize genotypes under water stress during seed germination and seedling emergence. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 276-289, 2018.
- ABREU, V. M. *et al.* Heat-resistant protein expression during germination of maize seeds under water stress. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 1, 2016.
- ABREU, V. M. *et al.* Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 40-47, 2014.
- AGARWAL, P. K. *et al.* Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 1263-1274, 2006.
- ALVES, P. A. *et al.* Transformação genética de milho utilizando o gene AtDREB2A visando tolerância à seca. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30.; SIMPÓSIO SOBRE LEPDÓPTEROS COMUNS A MILHO, SOJA E ALGODÃO, 1., 2014, Salvador. Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global: resumos expandidos. **Anais [...]**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/992774/1/Transformacaoenetica.pdf>. Acesso em: 22 maio 2021.
- AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 56, p. 87-94, 2006.
- BAKHSH, A.; HUSSAIN, T. Engineering crop plants against abiotic stress: Current achievements and prospects. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Abu Dhabi, v. 27, n. 1, p. 24-39, 2015.
- BENKO-ISEPPON, A. M. *et al.* Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 6, p. 1112-1134, 2011.
- BIAZUZO, M. M. A. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum**. 2013. 177 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BRAY, E. A. *et al.* Regulation of gene expression by endogenous abscisic acid during drought stress. *In*: CLOSE, T. J.; BRAY, E. A. (ed.). “**Plant responses to cellular dehydration during environmental stress**”. Rockeville: American Society of Plant Physiologists, 1993. p. 167-176.
- CAVERZAN, A. **Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos**. 2008.91 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

- CAVERZAN, A. *et al.* Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 1011-1019, 2012. supl. 1. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572012000600016&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 24 mar. 2021.
- CHAVES, M. M. *et al.* How plants Cope with Water Stress in the Field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 907-916, 2002.
- CHEN, J. Q. *et al.* Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 12, p. 2191-2198, 2008.
- CHEN, W. *et al.* Expression profile matrix *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative function in response to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 559-574, 2002.
- CLIFTON, R. *et al.* Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, n. 2, p. 193-212, May 2005.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 795–803, 1996.
- COLVILLE, L.; KRANNER, I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.62, n. 3, p. 241-255, 2010.
- DALL'ASTA, P. **Expressão de genes do sistema antioxidante mediada por ácido abscísico em folhas de milho (*Zea mays* L.)**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos e Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- FRAIZ, A. C. R. **Importância da respiração radicular na tolerância ao déficit hídrico em soja**. 2015. 63 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.
- FUJITA, Y. *et al.* ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 124, p. 509–525, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- GARAY-ARROYO A. *et al.* Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 5668–5674, 2000.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GOMES, C. M. *et al.* Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? **ChemBiochem**, Weinheim, v. 3, n. 2, p. 583-587, Aug. 2001.

GUIMARÃES, C. R. W. *et al.* Compreendendo o impacto da conformação P-loop na seletividade da quinase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 51, p. 1199–1204, 2011.

HE, C. *et al.* Early drought-responsive genes are variable and relevant to drought tolerance. **G3**, Bethesda, v. 10, n. 5, p. 1657-1670, 2020.

HE, Z. *et al.* The maize clade A PP2C phosphatases play critical roles in multiple abiotic stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 14, p. 3573, 2019.

HORTA, C. G. L. **Identificação de genes e promotores relacionados ao estresse de seca em cana-de-açúcar e obtenção de plantas transgênicas**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: www.teses.usp.br. Acesso em: 22 mar. 2021.

HU, Y. *et al.* Trichostatin A Selectively Suppresses the Cold-Induced Transcription of the ZmDREB1 Gene in Maize. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. 1-13, 2011.

JACOBSEN, J. V.; HANSON, A. D.; CHANDLER, P. C. Water stress enhances expression of an alpha-amylase gene in barley leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 80, n. 2, p. 350-359, Feb. 1986.

JOSE, S. C. B. R. *et al.* Padres eletroforéticos da enzima amilase em sementes de milho submetidas a alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 77-83, 2004.

KAIFA, W. *et al.* Genome-Wide analysis of bZIP-Encoding genes in maize. **DNA Research**, Chiba, v. 19, n. 6, p. 463-476, Dec. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/dnares/dss026>. Acesso em 21 mar. 2021.

KOAG, M. C. *et al.* The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 131, n. 1, p. 309-316, 2003.

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.

LEHMANN, M. *et al.* Metabolic recovery of Arabidopsis thaliana roots following cessation of oxidative stress. **Metabolomics**, Heidelberg, v. 8, n. 1, p. 143-153, 2012.

LIOTENBERG, S.; NORTH, H., MARION-POLL, A. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 37, p. 341-50, 1999.

LIU, S. *et al.* Genome-wide analysis of ZmDREB genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of Zea mays L. **PLOS Genetics**, Cambridge, v. 9, e1003790, 2013.

LI, Y. J. *et al.* Over-expression of a *Populus* peroxisomal ascorbate peroxidase (PpAPX) gene in tobacco plants enhances stress tolerance. **Plant Breeding**, Westport, v. 128, n. 4, p. 404-410, 2009.

MAGWANGA, R. O.; LU, P.; KIRUNGU, J. N. *et al.* Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II 139 tolerance in upland cotton. **BMC genetics**, v. 19, n. 1, p. 6, 2018.

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

MARQUES, T. L. *et al.* Physiological analysis and gene expression analysis of ZmDBP3, ZmALDH9, ZmAN13, and ZmDREB2A in maize lines. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 42, p. e43479, 2019.

MARUYAMA, K. *et al.* Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, n. 4, p. 1972-1980, 2009.

MILLAR, A. H. *et al.* Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 79-104, 2011.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 405-410, 2002.

MOONS, A. *et al.* Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 107, p. 177-186, 1995.

MURATA, Y. *et al.* Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 2513-2523, 2001.

NAKUMURA, K. *et al.* Sucrose-induced accumulation of β -amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 3, p. 902-909, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: WH Freeman and Company, 2005.

NEPOMUCENO, A. L. *et al.* Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v. 35, n. 7, p. 1407-1416, 2000.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

PARK, S.; BACK, K. Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 53, n. 4, p. 385-389, 2012.

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**, Bethesda, v. 129, p. 460-468, 2002.

PAVENTI, G. *et al.* Plant uncoupling protein in mitochondria from aged-dehydrated slices of Jerusalem artichoke tubers becomes sensitive to superoxide and to hydrogen peroxide without increase in protein level. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 2, p. 179-88, Feb. 2006.

PEREIRA FILHO, I.; CRUZ, J.C. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/ CNPS, 2010. (Sistemas de Produção 1). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/plantespaca.htm>. Acesso em: 22 nov. 2020.

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

PORCEL, R.; AZCÓN, R.; RUIZ-LOZANO, J. D. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1933–1942, 2005.

QIN, F. *et al.* Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. **The Plant Journal**, Rockeville, v. 50, p. 54-69, 2007.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell and Environment**, Weinheim, v. 25, n. 2, p. 141-151, Feb. 2002.

RIERA, M. *et al.* The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signaling components, **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 123, p. 111-119, 2005.

ROSADO, C. *et al.* Genes candidatos e mecanismos fisiológicos relacionados ao estresse hídrico em plantas. In: MIRANDA, F. *et al.* **Tópicos especiais em genética e melhoramento II**. 2. ed. Alegre: Caufes, 2018. p. 115 -143. Disponível em: [Filogeografia-molecular-e-o-melhoramento-genetico-de-plantas.pdf](#) (researchgate.net). Acesso em: 21 jan. 2021

SAEZ, A. *et al.* Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, p. 1389-1399, 2006.

SAKUMA, Y. *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 290, p. 998–1009, 2002.

SAKUMA, Y. *et al.* Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water- stress-responsive and heat-stress - responsive gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 49, p. 18822-18827, 2006.

SALGADO, K. C. C. *et al.* Mapping of quantitative trait locus associated with maize tolerance to high seed drying temperature. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, p. 1319-1326, 2008.

SANTOS, M. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico em sementes e em tecidos de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva de milho.** 2016. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

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. **The Plant Journal**, Rockville, v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.

SHIH, M. D.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y. I. Late Embryogenesis abundant proteins. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 48, p. 212-255, 2008.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 221-227, 2007.

SOBCZA, K, J. C. M. S. M. **Lignificação em eucaliptos submetidos aos estresses de frio e seca: aspectos bioquímicos e moleculares.** 2013. 131 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/315470>. Acesso em: 22 ago. 2020.

SOUZA, A. M. S. **Estresse hídrico e expressão de genes no início de crescimento de algodoeiro naturalmente coloridos.** 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SOUZA, F. V. **Expressão de genes em resposta a estresse por restrição hídrica em sementes de *Ricinus communis* L. (EUPHORBIACEAE).** 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

STEWART, C. R. Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 48, p. 792-794, 1971.

TEIXEIRA, F. K. *et al.* Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 59, p. 761-770, 2004.

TUDELLA, V. G. *et al.* Uyemura SA. In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, London, v. 36, n. 1, p. 162-72, Jan. 2004

VAN AKEN, O. *et al.* Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. **Physiology Plant**, Berne, v. 137, n. 4, p. 354-361, Dec 2009.

VANLERBERGHE, G. C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 4, p. 6805-47, 2013.

VANLERBERGHE, G. C.; CVETKOVSKA, M.; WANG, J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? **Physiology Plant**, Berne, v. 137, n. 4, p. 392-406, Dec. 2009.

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. Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pub/article/view/3549/882>. Acesso em: 21 abr. 2021.

WANG, W. *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Oxford, n. 5, p. 244-253, 2004.

WANG, X.; VINOCUR, 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.

WANG, Z. *et al.* SoyDB: a knowledge database of soybean transcription factors. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 14-25, 2010.

XIAO, B. *et al.* Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. TAG. Theoretical and applied genetics. **Theoretische und Angewandte Genetik**, Berlin, v. 115, p. 35-46, 2007.

YOSHIDA, T. *et al.* AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, Rockeville, v. 61, p. 672-685, 2010.

ZHAO, L. *et al.* ARAG1, an ABA-responsive DREB gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. **Annals of Botany**, London, v. 105, p. 401-209, 2010.

ZHENG, J. *et al.* Análise do transcriptoma de todo o genoma de duas linhagens consanguíneas de milho sob estresse de seca. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 72, p. 407- 421, 2010.

ZHOU, S. *et al.* Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e52439, 2012.

ZHU, J. K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress. in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Berlin, v. 16, p. 253-277, 1997.

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

ZLATEV, Z. *et al.* Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, p. 389-394, 2006.