



**EDLÂNIA MARIA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO QUANTO A  
TOLERÂNCIA À ALTA TEMPERATURA DURANTE A  
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO  
INICIAL DE PLÂNTULAS**

**LAVRAS - MG  
2022**

**EDLÂNIA MARIA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO QUANTO A TOLERÂNCIA À ALTA  
TEMPERATURA DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES E  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS**

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

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2022**

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

Souza, Edlânia Maria de.

Avaliação de genótipos de milho quanto a tolerância à alta temperatura durante a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas / Edlânia Maria de Souza. - 2022.

93 p. : il.

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

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Estresse abiótico. 3. Proteômica. I. Von Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Santos, Heloisa Oliveira dos. III. Título.

**EDLÂNIA MARIA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO QUANTO A TOLERÂNCIA À ALTA  
TEMPERATURA DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES E  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS**

**EVALUATION OF CORN GENOTYPES TOLERANT TO HIGH TEMPERATURE  
DURING SEED GERMINATION AND INITIAL DEVELOPMENT OF SEEDLINGS**

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

APROVADA em 08 de abril de 2022.

|  |       |
|--|-------|
| Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho | UFLA  |
| Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires    | UFLA  |
| Dr. Everson Reis Carvalho              | UFLA  |
| Dr. Anderson Cleiton José              | UFLA  |
| Dr. Evaldo Aparecido Amaral da Silva   | UNESP |

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2022**

*A Deus.*

*Aos meus pais, Espedito (in memoriam) e Maria José, por todo o carinho, apoio e incentivo  
em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado em todas as etapas.*

*Com todo carinho e amor.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Toda honra e glória seja dada a Deus por mais uma realização em minha vida. Por abençoar e conduzir toda a minha trajetória, por me dar forças quando eu não tinha. Não foi fácil chegar até aqui, mas sem Sua preciosa ajuda, nada seria possível. À Nossa Senhora das Graças, por estar sempre intercedendo por mim e permanecer ao meu lado em todas as circunstâncias da minha vida.

Aos meus pais, Espedito Bertoldo de Souza (*in memoriam*) e Maria José de Souza, que são as pessoas mais importantes da minha vida. À minha MÃE que nunca mediu esforços para a realização dos meus sonhos e sempre apoiou todas as minhas decisões. Ao meu PAI, grande exemplo, sem os seus ensinamentos de vida eu não seria a pessoa que sou hoje, e mesmo não estando presente fisicamente, sei o quanto ELE está feliz por essa conquista.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado dando todo o apoio necessário, por todo o cuidado, carinho, amor, e por sempre estarem presentes na minha vida.

Aos meus sobrinhos, por sempre acreditarem em mim, por todo o incentivo e companheirismo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, por ter me proporcionado uma formação profissional.

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 da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento - 001.

À Marli, secretária da Pós-Graduação, pela ajuda, paciência e colaboração.

À minha orientadora Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por ter me orientado durante o meu doutorado, por me acolher tão bem na minha chegada à Lavras. Um exemplo de profissional, pessoa, mãe, amiga, que sempre me inspirou com suas ações e dedicações. Sou grata por todos os conselhos, palavras de incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, paciência, pelas orações todos os dias pela manhã e por confiar no meu trabalho. Obrigada por toda contribuição na minha vida pessoal e profissional. A senhora faz parte de toda minha evolução durante essa minha trajetória.

À minha coorientadora Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos, por todo o acolhimento, ajuda, contribuição e ensinamentos durante a minha trajetória no doutorado.

A todos os professores do Setor de Sementes, por toda a contribuição, ensinamentos e auxílio.

Aos doutores Dr. Renato Coelho de C. Vasconcellos, Dra. Elise de Matos Pereira, Dr. Vander Fillipe de Souza e à Prof. Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires, por toda ajuda, ensinamentos,

contribuição e disposição sempre que precisei, sendo essenciais na condução e realização do meu trabalho.

A todos os estagiários, bolsistas dos grupos de pesquisa das professoras Édila, Heloisa e Raquel, por toda a ajuda e contribuição na realização dos experimentos e por todos os momentos vividos.

Às minhas amigas Danielle Rezende e Nathália Bragança, que foram fundamentais nessa minha trajetória, tanto na minha vida profissional como na pessoal. Sou grata pela amizade, companheirismo, pelos incentivos, palavras de apoio, pelas longas conversas, pelas boas risadas e por sempre se fazerem presentes. Ao Setor de Sementes, que me apresentou essas pessoas que vou levar comigo carinhosamente.

Aos meus amigos do Setor de Sementes e aos de Lavras, que fizeram parte de todos os meus momentos durante essa trajetória, em especial à Antônia, Waltemberg, Joyelem, Elton, Juara, Thaisa, Thamires, Giovana, Giovani, Ana Reale, Humberto, Rafaela, Marina e Gabrielle. Grata pelos bons momentos, companheirismo, pela amizade e paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Jaqueline, Geraldo, Rafaela, Roseane e Ademar pela disponibilidade, boa vontade e auxílio durante esse período.

Ao NEsem, por todos os conhecimentos compartilhados, por todo o aprendizado, toda a experiência e amizade.

Aos meus amigos de longa data, que mesmo com a distância se fizeram presentes durante essa trajetória e estiveram ao meu lado na realização desta conquista, Mayara, Maria Lúcia, Conceição, Natan, David, Maria do Socorro, Taiza, Marlani, Rafael, João Pedro, Kerol, Vinícius, Gabriela, Thamara, Carol e Michelle.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista.

Muito obrigada!

*“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”*

*(Josué 1:9)*

## RESUMO

O processo de germinação de sementes de milho é influenciado pela temperatura. Sob temperaturas adversas o estabelecimento da população de plantas pode ser comprometido, assim como a produtividade de grãos. Com o avanço do cultivo de milho em regiões mais quentes, é importante entender os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, relacionados a tolerância às altas temperaturas durante a germinação, visando assessorar os programas de melhoramento em processo de seleção para o desenvolvimento de híbridos adaptados às regiões nas quais as temperaturas são altas durante a germinação das sementes. Dessa forma, objetivou-se avaliar os aspectos fisiológicos e moleculares envolvidos na tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e emergência de plântulas de diferentes genótipos de milho. Foram utilizadas sementes de quatro linhagens de milho, duas classificadas como tolerantes (91 e 54) à alta temperatura durante a germinação de sementes e duas intolerantes (44 e 64), também foram utilizadas sementes híbridas, dos recíprocos, as quais foram produzidas a partir das linhagens classificadas como tolerantes e intolerantes e as da população F<sub>2</sub>. Assim, sementes de 20 genótipos de milho foram submetidas às temperaturas de 25 e 35 °C durante o processo de germinação. Foi avaliada a germinação aos seis dias, e o vigor pelos testes de primeira contagem de germinação (4 dias), velocidade de germinação, comprimento de raiz primária e da parte aérea de plântula e número de raízes seminais. Após a análise dos resultados, foram selecionadas duas linhagens mais discrepantes quanto a tolerância à alta temperatura, 35 °C, L91 (tolerante) e L44 (intolerante) e seus respectivos híbridos e recíprocos, cujas sementes submetidas à embebição para a construção da curva de embebição. As sementes submetidas ao processo de embebição foram utilizadas para a análise da expressão das enzimas piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, alfa-amilase, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase e proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de eletroforese em gel. Foram realizadas a quantificação do peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e a atividade das enzimas SOD, CAT e ascorbato peroxidase, e da proteína total, por meio da técnica de espectrofotometria de microplacas. Há efeito do genótipo sobre a característica de tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho. Há maior velocidade de embebição em sementes de genótipos classificados como tolerantes à alta temperatura durante a germinação das sementes. Há variações das expressões de enzimas associadas à respiração e ao sistema antioxidante em sementes secas e embebidas à 25 e 35 °C, de genótipos classificados quanto a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas. As enzimas da respiração piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase e as do sistema antioxidantes superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase foram identificadas como bons marcadores para avaliar os genótipos de milho tolerantes à alta temperatura durante a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas. Há maior expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase e esterase em genótipos tolerantes à alta temperatura.

Palavras-chave: *Zea mays*. Estresse abiótico. Qualidade fisiológica. Padrão de absorção. Enzimas. Sistema Antioxidante.

## ABSTRACT

The germination process of corn seeds is influenced by temperature. Under adverse temperatures the establishment of the plant population can be compromised, as well as the grain yield. With the advancement of corn growth in warmer regions, it is important to understand the physiological, biochemical and molecular mechanisms related to the tolerance to high temperatures during germination, aiming to help breeding programs in the selection stages to develop hybrids adapted to the regions where temperatures are high during seed germination. Thus, the objective was to evaluate the physiological and molecular aspects involved in high temperature tolerance during the process of seed germination and seedling emergence of different corn genotypes. Seeds of four corn inbred were used, two classified as tolerant (91 and 54) to high temperature during seed germination and two intolerant (44 and 64), hybrid seeds of the reciprocals were also used, which were produced from of the lines classified as tolerant and intolerant and the F<sub>2</sub> population. Seeds of 20 maize genotypes were subjected to temperatures of 25 and 35 °C during the germination process. Germination was evaluated at six days, and vigor by the first germination count (4 days), germination speed index, primary root and shoot length and number of seminal roots. After analyzing the results, two lines, the more discrepant ones, were selected in terms of tolerance to high temperature, 35 °C, L91 (tolerant) and L44 (intolerant) and their respective hybrids and reciprocals, whose seeds were subjected to imbibition for the construction of the imbibition curve. The seeds submitted to the imbibition process were used to analyze the expression of the enzymes pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, esterase, glutamate oxaloacetate transaminase, alpha-amylase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase and proteins resistant to heat using, through the gel electrophoresis technique. The quantification of hydrogen peroxide, lipid peroxidation and the activity of SOD, CAT and ascorbate peroxidase enzymes, and total protein, were performed using the microplate spectrophotometry technique. There is effect of the genotype on high temperature tolerance during the process of seed germination and initial development of corn seedlings. There is a higher imbibition speed in seeds of genotypes classified as tolerant to high temperature during seed germination. There are variations in the expression of enzymes associated with respiration and the antioxidant system in dry and soaked seeds at 25 and 35 °C, from genotypes classified as high temperature tolerance during the process of seed germination and initial development of seedlings. The enzymes from respiration: pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase and the antioxidant system superoxide dismutase, catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase were identified as good markers to evaluate high temperature tolerant corn genotypes during seed germination and early seedling development. There is greater expression of  $\alpha$ -amylase and esterase enzymes in genotypes tolerant to high temperature.

Keywords: *Zea mays*. Abiotic stress. Physiological quality. Absorption pattern. Enzymes. Antioxidant System.

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
|              | <b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>12</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>15</b> |
|              | <b>CAPÍTULO 2 CURVA DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO SUBMETIDAS À ALTA TEMPERATURA.....</b> | <b>17</b> |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Local de realização dos experimentos .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>Seleção dos genótipos .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.3</b>   | <b>Multiplicação das linhagens, obtenção dos cruzamentos e da população F<sub>2</sub> .....</b>                             | <b>22</b> |
| <b>2.4</b>   | <b>Dados climáticos durante a condução do experimento.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.5</b>   | <b>Avaliação da qualidade fisiológica e determinação do teor de água .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.6</b>   | <b>Delineamento experimental e análise estatística.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.7</b>   | <b>Curva de embebição das sementes.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>3</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>4</b>     | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>44</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>45</b> |
|              | <b>CAPÍTULO 3 ANÁLISE PROTEÔMICA EM SEMENTES DE MILHO SUBMETIDAS À ALTA TEMPERATURA DURANTE A GERMINAÇÃO...49</b>           |           |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>2</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Local de realização dos experimentos .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>Análises proteômicas pela técnica de eletroforese.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>2.2.1</b> | <b>Expressão das enzimas.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>2.2.2</b> | <b>Proteínas resistentes ao calor .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>2.2.3</b> | <b>Enzima alfa amilase.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>2.3</b>   | <b>Análises pela técnica do espectrofotômetro de microplacas.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>2.3.1</b> | <b>Quantificação do peróxido de hidrogênio .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>2.3.2</b> | <b>Quantificação da peroxidação lipídica .....</b>  | <b>56</b> |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.3.3 | Atividade das enzimas do sistema antioxidante avaliada pela técnica de espectrofotometria..... | 56 |
| 2.3.4 | Quantificação da proteína total.....   | 57 |
| 2.4   | Delineamento experimental e análise estatística.....   | 58 |
| 3     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 59 |
| 4     | CONCLUSÃO .....  | 87 |
|       | REFERÊNCIAS .....  | 88 |

## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

O milho é uma das principais culturas cultivadas no Brasil e no mundo. Sua utilização é bastante vasta, desde o consumo *in natura* até os produtos industrializados. Assim, com o aumento da demanda, cultivos de milho têm sido realizados em diferentes regiões, sendo que em algumas dessas ocorrem altas temperaturas durante a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas.

No ano safra 2020/21 a produção mundial de milho chegou a 1,197 bilhão de toneladas, destinada à alimentação animal, consumo direto, em biocombustíveis e na indústria de alimentos (USDA, 2021). O Brasil se destaca como um dos maiores produtores e exportadores mundiais, ocupando a terceira posição na produção mundial, com uma produção de 85,75 milhões de toneladas no ano safra 2020/21, com volume 16,4% menor em relação à safra anterior, devido as condições climáticas que afetaram diretamente na produtividade (CONAB, 2021).

Sabe-se que a temperatura é um dos fatores ambientais mais críticos que controlam e regulam o crescimento e desenvolvimento de plantas e que estas podem ter diferentes respostas de acordo com a espécie (YOUSAF *et al.*, 2021), e com genótipo dentro da mesma espécie. O estresse causado por altas temperaturas induz mudanças bioquímicas, moleculares e fisiológicas, que influenciam vários processos celulares da planta (SHRESTHA; GURUNG; DHITAL, 2018) e na de germinação das sementes.

Com as mudanças climáticas e com o grande avanço da produção de milho em regiões mais quentes, há necessidade de desenvolver genótipos que sejam tolerantes às altas temperaturas, durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas. Sabe-se que o estabelecimento do estande recomendado para cada cultivar é fundamental para a obtenção de altas produtividades.

As altas temperaturas induzem vários eventos metabólicos nas células, levando à superprodução das espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo, que danificam os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, e pode ocasionar a morte da célula (TIWARI; YADAV, 2019). Assim, o estresse oxidativo é caracterizado pelo estágio metabólico em que a produção das EROs passa a ser maior do que sua neutralização.

As EROs são produzidas em quase todas as células, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, membranas celulares e subcelulares, e são reconhecidas como importantes sinalizadoras e mensageiros secundários envolvidos na resposta ao estresse, vias de defesa e morte celular programada (MITTLER, 2017; TIWARI; YADAV, 2019).

As plantas desenvolveram um mecanismo de defesa conhecido como sistema antioxidante para protegê-las dos danos das EROs, que inclui os sistemas enzimático e não enzimático (APEL; HIRT, 2004; KAUR; SHARMA; DAS, 2020). O sistema enzimático inclui algumas enzimas como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona peroxidase (GPX) (FOYER; NOCTOR, 2005; CHOUDHURY *et al.*, 2017). Já o sistema não enzimático é composto principalmente de tocoferóis,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico, glutatona e polifenóis (TIWARI; YADAV, 2019).

Além das enzimas antioxidantes, o aumento da temperatura ocasiona alteração nas enzimas envolvidas na atividade respiratória, como a piruvato descarboxilase (PVD), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), dentre outras. Também pode alterar composição e estrutura de membranas celulares e a síntese de proteínas, a exemplo proteínas resistentes ao calor (MANI *et al.*, 2016). Essas proteínas estão relacionadas aos mecanismos de proteção contra danos (TUNNACLIFFE *et al.*, 2010) e podem estar associadas a estabilidade da membrana em ambientes sob estresse (WAHID *et al.*, 2007).

Para a semente germinar ela depende das mesmas condições ambientais que são requeridas para o crescimento vegetativo. Água e oxigênio devem estar disponíveis e a temperatura e demais condições climáticas devem ser adequadas. Germinação então, pode ser definida como o retorno do crescimento do embrião da semente madura ou ainda, consiste na reativação do crescimento do embrião, por meio de uma sequência ordenada de eventos metabólicos, resulta na ruptura do tegumento ou do endosperma pela radícula (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

A absorção de água pelas sementes ortodoxas (tolerantes à dessecação) geralmente é dividida em três fases: fase I, caracterizada pela rápida absorção de água (BEWLEY *et al.*, 2013); fase II, onde há redução da velocidade de hidratação das sementes e intensidade da respiração, sendo considerada uma fase mais longa (MARCOS FILHO, 2015) e; fase III, considerada resultado da expansão celular, em que a zona de transição entre a radícula e hipocótilo se alongam (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009).

A temperatura é um dos fatores mais importantes no processo de germinação e influencia na absorção de água pelas sementes (BEWLEY *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2016), na redução da porcentagem de germinação das sementes, na velocidade e uniformidade da germinação (SANTOS *et al.*, 2019), além de afetar o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas (KHALID *et al.*, 2021). Portanto, o processo de germinação das sementes e desenvolvimento inicial de plântulas é altamente afetado pelas condições de temperatura (PÊGO; GROSSI; BARBOSA, 2012).

As análises proteômicas é uma ferramenta, que juntamente com os testes de germinação e vigor podem auxiliar os programas de melhoramento na seleção de genótipos de interesse durante o desenvolvimento inicial da cultura. Marques *et al.* (2019) evidenciam a necessidade de estudos sobre atividade enzimática que é uma ferramenta que permite aceleração da característica de interesse, além de servir como marcadores funcionais na seleção de genótipos.

Diante do exposto, objetivou-se estudar os aspectos fisiológicos e moleculares, envolvidos na tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e emergência de plântulas de diferentes genótipos de milho.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. S. *et al.* Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.
- APEL K.; HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: Physiology of Development and Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 329 p.
- CHOUDHURY, F. K. *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 856-867, 2017.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, 2020/21 – décimo segundo levantamento v. 12 - SAFRA 2020/21- n. 8, maio de 2021.** Disponível em: CONAB - MILHO - SETEMBRO 2021.pdf. Acesso em: 22 fev. 2022.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA.gov** - United States Department of Agriculture. Disponível em: <https://www.usda.gov/>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.
- KAUR, G.; SHARMA, S.; DAS, N. Comparison of catalase activity in different organs of the potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars grown under field condition and purification by three-phase partitioning. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 10, p. 1-10, 2020.
- KHALID, N. *et al.* Viability of maize (*Zea mays* L) seeds influenced by water, temperature, and salinity stress. **Acta Hydrologica Slovaca**, v. 22, n. 1, p. 113-117, 2021.
- MANI, V. P. *et al.* Breeding hybrids and inbreds for temperature tolerance in maize. **Journal of Biotechnology & Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 32-40, 2016.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 660 p.
- MARQUES, T. L. *et al.* Expression of ZmLEA3, AOX2 and ZmPP2C genes in maize lines associated with tolerance to water deficit. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2019.
- MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.
- NASCIMENTO, W. M. *et al.* Germinação de sementes de tomateiro em diferentes temperaturas: variabilidade fenotípica e heterose. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 216-222, 2016.

PÊGO, R. G.; GROSSI, J. A. S.; BARBOSA J. G. Soaking curve and effect of temperature on the germination of daisy seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 312-316, 2012.

SANTOS, H. O. *et al.* Effect of soil temperature in the emergence of maize seeds. **Journal of Agricultural Science**. v. 11, n. 1, p. 479-484, 2019.

SHRESTHA, J.; GURUNG, D. B.; DHITAL, K.P. Agronomic performance of maize genotypes under high temperature condition. **Farming and Management**, v. 3, n. 1, p. 23-29, 2018.

SLIWINSKA, E.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3587-3594, 2009.

TIWARI, Y. K.; YADAV, S. K. High temperature stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): physiological and molecular mechanisms. **Journal of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 93-102, 2019.

TUNNACLIFFE, A. *et al.* LEA proteins: versatility of form and function. In: LUBZENS, E.; CERDA, J.; CLARK, M. **Dormancy and resistance in harsh environments**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 91-108.

WAHID A. *et al.* Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

YOUSAF, M. I. *et al.* Variations among maize (*Zea mays* L.) Hybrids in response to heat stress: hybrids selection criteria. **Turkish Journal of Field Crops**, v. 26, n. 1, p. 8-17, 2021.

## CAPÍTULO 2 CURVA DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO SUBMETIDAS À ALTA TEMPERATURA

### RESUMO

A germinação é uma das fases mais importantes para o estabelecimento de uma cultura. O aumento da temperatura pode afetar negativamente a porcentagem, velocidade e uniformidade da germinação das sementes, assim como a emergência, o que pode comprometer o estabelecimento das plantas, o estande final e, conseqüentemente, a produtividade de grãos. Assim, o desenvolvimento de cultivares tolerantes às altas temperaturas durante a germinação de sementes e estabelecimento de plantas é fundamental em programas de melhoramento. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar a qualidade fisiológica e o padrão de absorção de água em sementes de milho, submetidas à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas. Foram utilizadas sementes de quatro linhagens de milho do programa de melhoramento da Universidade Federal de Lavras (UFLA), duas classificadas como tolerantes (91 e 54), e duas não tolerantes (44 e 64) à alta temperatura no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas, além dos seus respectivos híbridos e recíprocos resultantes do cruzamento dessas quatro linhagens, e das sementes população F<sub>2</sub>. As sementes foram submetidas a determinação do teor de água, aos testes de germinação e a testes de vigor (primeira contagem de germinação, velocidade de germinação, comprimento de raiz primária e da parte aérea de plântula e o número de raízes seminais) nas temperaturas de 25 °C (controle) e 35 °C (alta temperatura). Para a curva de absorção de sementes foram selecionadas as duas linhagens mais contrastantes, L91 como tolerante e L44 como não tolerante, além do híbrido, recíproco desenvolvido a partir destas linhagens e F<sub>2</sub>. Para cada teste foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes e o delineamento experimental utilizado, foi o inteiramente ao acaso, com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 20x2 (genótipos e temperaturas). Para a curva de embebição foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para ambas as temperaturas (25 e 35 °C). A linhagem L91 foi a mais tolerante à temperatura de 35 °C durante o processo germinativo, enquanto a linhagem L44 foi a menos tolerante nesta condição. Em sementes dos cruzamentos nos quais a L91 foi utilizada como parental feminino ou masculino observou-se maiores valores de germinação e vigor, principalmente quando a L91 foi utilizada como parental feminino. Houve maior desenvolvimento do sistema radicular de plântulas quando a linhagem L91 foi utilizada como parental feminino na combinação dos híbridos. Houve maior variação da qualidade fisiológica em sementes da população F<sub>2</sub>. Há efeito do genótipo sobre a característica de tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho. Há maior velocidade de embebição em sementes de genótipos classificados como tolerantes à alta temperatura durante a germinação das sementes.

Palavras-chave: *Zea mays*. Estresse térmico. Germinação. Estresse abiótico.

## ABSTRACT

Germination is one of the most important stages for the establishment of a crop. The increase in temperature can negatively affect the percentage, speed and uniformity of seed germination, as well as emergence, which can compromise plant establishment, the final stand and consequently the grain yield. Thus, the development of cultivars tolerant to high temperatures during seed germination and plant establishment is fundamental in breeding programs. The objective of this work was to evaluate the physiological quality and the pattern of water absorption in corn seeds, submitted to high temperature during the process of seed germination and initial development of seedlings. Seeds of four maize inbreds from the corn breeding program of the Universidade Federal de Lavras (UFLA) were used, two classified as tolerant (91 and 54), and two non-tolerant (44 and 64) to high temperature in the germination process and initial seedling development, in addition to their respective hybrids and reciprocals resulting from the crossing of these four lines, and the F<sub>2</sub> population seeds. The seeds were submitted to water content determination, germination tests and vigor tests (first germination count, germination speed index, length of the primary root and of the aerial part of the seedling and the number of seminal roots) at temperatures of 25 °C (control) and 35 °C (high temperature). For the seed water absorption curve, the two most contrasting lines were selected, L91 as tolerant and L44 as non-tolerant, in addition to the reciprocal hybrid resulted from these lines and the F<sub>2</sub>. For each test, four replications of 50 seeds were used in a completely randomized design, with treatments in a 20x2 factorial scheme (genotypes and temperatures). For the imbibition curve, four replications of 25 seeds were used for both temperatures (25 and 35 °C). The L91 line was the most tolerant at 35 °C during the germination process, while the L44 line was the least tolerant in this condition. The seeds from crosses in which L91 was used as a female or male parent, higher values of germination and vigor were observed, especially when L91 was used as a female parent. There was greater development of the root system of seedlings when the L91 line was used as a female parent in the combination of the hybrids. There was greater variation in physiological quality in seeds from the F<sub>2</sub> population. There is effect of the genotype on temperature tolerance during the process of seed germination and initial development of corn seedlings. There is a higher imbibition speed in seeds of genotypes classified as tolerant to high temperature during seed germination.

Keywords: *Zea mays*. Heat stress. Germination. Abiotic stress

## 1 INTRODUÇÃO

A germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas são as fases mais importantes para o estabelecimento de plantas no campo. Podem ser afetadas negativamente com o aumento temperatura que pode levar à redução da porcentagem de germinação das sementes, à viabilidade (FAHAD *et al.*, 2017), à velocidade e à uniformidade da germinação (MARCOS FILHO, 2015), além de afetar o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas (KHALID *et al.*, 2021)

A germinação consiste na retomada da atividade metabólica do eixo embrionário, que tem início com a absorção de água e encerra com o alongamento do eixo embrionário, culminando na emergência da radícula (MARCOS FILHO, 2015; SOUTO *et al.*, 2017), resultado dos diferentes processos bioquímicos, fisiológicos e moleculares (MANGRAUTHIA *et al.*, 2016).

O padrão de absorção de água pelas sementes geralmente é dividido em três fases: a fase I, caracterizada pela rápida absorção de água (BEWLEY *et al.*, 2013); fase II, onde há redução da velocidade de hidratação das sementes e intensidade da respiração, sendo uma fase mais longa (MARCOS FILHO, 2015) e; fase III, considerada resultado da expansão celular, em que a zona de transição entre a radícula e hipocótilo se alongam (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009). Dentre os principais fatores que afetam a absorção de água pelas sementes e as reações bioquímicas e fisiológicas que regulam todo o processo de germinação das sementes está a temperatura (BEWLEY *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2016).

A faixa ideal de temperatura no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas varia com cada espécie, além de variar com cada genótipo dentro da mesma espécie, sendo que respondem de forma diferente sob condições de elevadas temperaturas nestas fases (MAGRAUTHIA *et al.*, 2016).

Em milho, todos os estágios de crescimento e desenvolvimento das plantas são influenciados pelas variações da temperatura, que podem causar redução significativa na produtividade. Uma das alternativas utilizadas para minimizar o efeito de altas temperaturas é o uso de genótipos tolerantes a essa condição de estresse (YOUSAF *et al.*, 2021), principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento da planta.

Com o aumento da área plantada de milho em regiões mais quentes e com as diversas oscilações de temperatura durante o desenvolvimento da cultura é necessário a seleção de

linhagens tolerantes para compor os híbridos, cujas sementes tolerem altas temperaturas durante a germinação, uma vez que essa característica pode ser herdada dos seus progenitores (ANDRADE *et al.*, 2001; PRAZERES; COELHO; SOUZA, 2021).

A seleção de genótipos por meio de características morfológicas para a tolerância a diferentes estresses abióticos durante a germinação e desenvolvimento inicial da cultura do milho tem sido estudada nos últimos anos, a exemplo de altas temperaturas durante a germinação de sementes (DUTRA *et al.*, 2015), baixa temperatura durante a germinação de sementes (SILVA NETA *et al.*, 2020) e estresse hídrico durante a germinação e emergência de plântulas (ABREU *et al.*, 2018), o que comprovam que essa abordagem é eficiente na seleção de genótipos.

Assim, a seleção dos genótipos com tolerância à alta temperatura nas fases de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas torna-se cada vez mais importante em programas de melhoramento de milho. Para isso, testes de germinação, vigor e curva de absorção de água podem ser utilizados como ferramenta em processos de seleção em programas de melhoramento, visando a tolerância à alta temperatura nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica e o padrão de absorção de água em sementes de diferentes genótipos de milho, visando a seleção de genótipos tolerantes à alta temperatura durante o processo germinativo e desenvolvimento inicial de plântulas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório Central de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura (DAG), Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m.

### 2.2 Seleção dos genótipos

Na primeira etapa do experimento foi realizada a seleção dos genótipos de milho contrastantes quanto a tolerância à alta temperatura durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas. Os materiais genéticos foram provenientes do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Lavras e a seleção destes foi realizada a partir do trabalho e resultados de Dutra *et al.* (2015). Foram selecionadas duas linhagens tolerantes (L91 e L54) e duas linhagens não tolerantes (L44 e L64) à alta temperatura durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas. Foram utilizados ainda, os híbridos e recíprocos resultantes do cruzamento dessas quatro linhagens, e também população F<sub>2</sub> derivada deste (TABELA 1).

Tabela 1 - Genótipos de milho selecionados quanto a tolerância à alta temperatura.

| Linhagens | Híbridos | Recíprocos | População F <sub>2</sub> | População F <sub>2</sub> |
|-----------|----------|------------|--------------------------|--------------------------|
| L91       | 91x44    | 44x91      | F <sub>2</sub> 91x44     | F <sub>2</sub> 44x91     |
| L54       | 91x64    | 44x54      | F <sub>2</sub> 91x64     | F <sub>2</sub> 44x54     |
| L64       | 54x44    | 64x91      | F <sub>2</sub> 54x44     | F <sub>2</sub> 64x91     |
| L44       | 54x64    | 64x54      | F <sub>2</sub> 54x64     | F <sub>2</sub> 64x54     |

Fonte: Da autora (2022).

Após a seleção dos genótipos contrastantes quanto a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação e emergência de plântulas, foi implantado um experimento durante a safra 2018/2019 para a multiplicação das linhagens e obtenção das sementes híbridas.

### 2.3 Multiplicação das linhagens, obtenção dos cruzamentos e da população F<sub>2</sub>

A semeadura para a multiplicação das sementes das linhagens e obtenção das sementes híbridas foi realizada em parcelas de 10 linhas de 10 m. Para a obtenção de sementes da população F<sub>2</sub>, sementes dos híbridos e de seus recíprocos foram semeadas entre linhas de 0,6 m e 5 plantas por metro. Foram realizados três *splits* para garantir a coincidência do florescimento entre as linhagens envolvidas, assim, foram semeadas 3 linhas de cada genótipo, a cada seis dias após o plantio. O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química do mesmo. A adubação de cobertura, assim como os demais tratamentos culturais, foi realizada de acordo com as recomendações para a cultura.

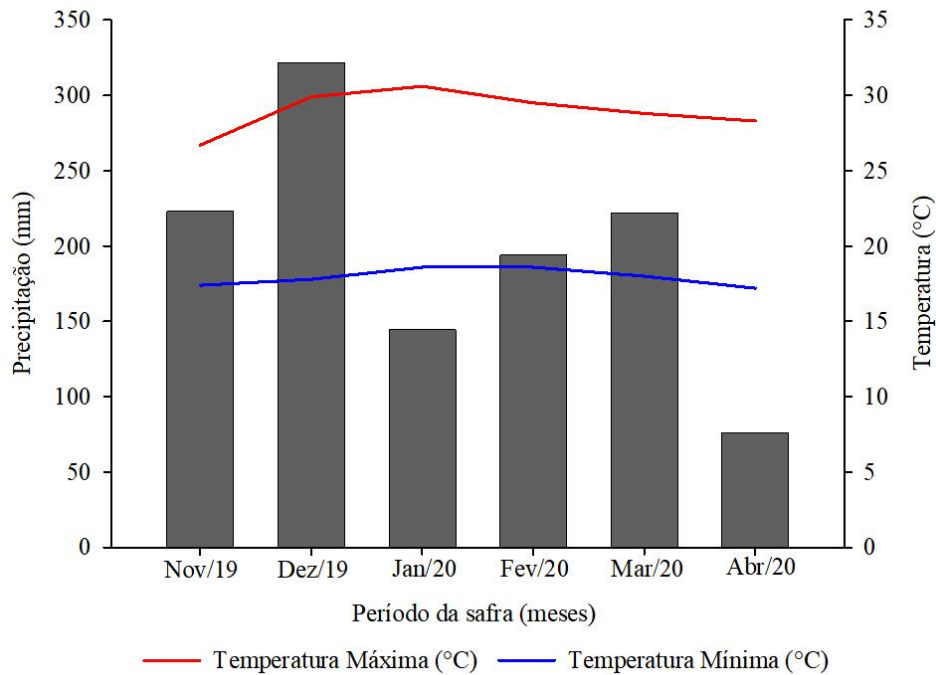
Ao longo do florescimento as inflorescências femininas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando os estilo-estigmas estavam receptivos, foram realizados os cruzamentos manualmente, sendo as linhagens utilizadas ora como parental feminino, ora como parental masculino, conforme Tabela 1. Com isso, foram obtidos 4 híbridos e 4 recíprocos. Paralelamente, foram realizadas as autofecundações das quatro linhagens e dos híbridos para a obtenção da população F<sub>2</sub>. Dessa forma, as sementes foram produzidas todas nas mesmas condições edafoclimáticas e na mesma safra agrícola.

As espigas oriundas das autofecundações das linhagens, dos híbridos e dos cruzamentos foram colhidas com teor de água de 35%. Após a colheita, as espigas foram despalhadas manualmente e distribuídas em secadores de madeira, de acordo com Navratil e Burris (1984). As espigas despalhadas, inicialmente foram pré-condicionadas durante o processo de secagem à 35 °C até as sementes atingirem 20% do teor de água. Posteriormente, houve o aumento da temperatura para 42 °C até as sementes alcançarem o teor de água de 13%. As sementes foram classificadas em peneiras de crivos circulares, e as retidas nas peneiras 20 – 18 foram utilizadas para a realização dos testes. Estas foram armazenadas em câmara fria a 10 °C e umidade relativa de 50%, até o momento de realização das análises.

### 2.4 Dados climáticos durante a condução do experimento

O experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2018 a abril de 2019. Os dados de temperatura máxima, mínima e precipitação, durante a condução do experimento em campo, estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Dados climáticos de Temperatura Máxima (°C), Mínima (°C) e Precipitação (mm).



Fonte: Da autora (2022).

## 2.5 Avaliação da qualidade fisiológica e determinação do teor de água

As sementes das quatro linhagens, dos 4 híbridos e dos seus recíprocos, da população F<sub>2</sub>, foram avaliadas quanto a tolerância à alta temperatura durante a germinação e emergência de plântulas. Foram realizados os seguintes testes e determinações:

- a) Teor de água - determinado pelo método da estufa a  $105 \pm 3$  °C por 24 horas, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), utilizando-se quatro repetições de 10 sementes inteiras.
- b) Teste de germinação - as sementes foram previamente tratadas com o fungicida VITAVAX®-THIRAM 200, na dosagem de 250 ml por 100 kg<sup>-1</sup> de sementes. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel *germitest*, cobertas com uma terceira e organizadas em forma de rolo e o papel *germitest* foi previamente umedecido com água destilada e deionizada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco.
- c) Os rolos foram colocados em sacos plásticos transparentes, fechados com atilhos de borracha, a fim de evitar a perda de água por evaporação, e acondicionados em

- germinadores tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) regulados para as temperaturas constantes de 25 (controle, recomendado RAS – Brasil, 2009) e 35 °C (alta temperatura) ( $\pm 2$  °C), utilizando-se lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (4 x 20 W).
- d) As avaliações da porcentagem de germinação de sementes foram realizadas diariamente, do quarto ao sexto dia após a instalação do teste, quando o experimento foi encerrado. Computou-se as plântulas que apresentassem 3,0 cm de raiz primária e de parte aérea, além de 3 ou mais raízes seminais, padrão este que diferenciava fenotipicamente os tratamentos avaliados.
- e) Primeira contagem de germinação - determinada juntamente com o teste de germinação, mediante contagem do número de plântulas no quarto dia após a instalação do teste, e os resultados foram expressos em porcentagem.
- f) Velocidade de germinação (VG) - as contagens do número de sementes germinadas foram realizadas diariamente, no mesmo horário, do quarto ao sexto dia após a instalação do teste, sendo velocidade de germinação (VG) calculada pela fórmula proposta por Edmond e Drapala (1958). Computou-se as plântulas que apresentassem 3,0 cm de raiz primária e de parte aérea, além de 3 ou mais raízes seminais, padrão este que diferenciava fenotipicamente os tratamentos avaliados.
- g) Comprimento de raízes e parte aérea de plântulas – para avaliação do comprimento da raiz primária e da parte aérea, foi realizado um teste com quatro repetições de 10 sementes, distribuídas sobre duas folhas de papel *germitest*, cobertas com uma terceira e organizadas na forma de rolos, os quais foram acondicionados em sacos de polietileno. Antes da distribuição das sementes, o papel *germitest* foi umedecido com água destilada e deionizada, equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco. O teste foi conduzido em câmara tipo B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) regulada nas temperaturas de 25 (controle) e 35 °C (alta temperatura) ( $\pm 2$  °C) por 7 dias. Os comprimentos da raiz primária e da parte aérea foram medidos com o auxílio de uma régua graduada em centímetros, e os resultados expressos em cm.plântula<sup>-1</sup>, em uma única avaliação no sétimo dia, após a semeadura.
- h) Número de raízes seminais (NRS) - número total de raízes seminais das plântulas foi determinado simultaneamente com o comprimento de raízes e parte aérea, mediante a contagem número de raízes seminais e os resultados expressos em número médio de raízes seminais por plântula.

## 2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 20 x 2 (genótipos x temperaturas), com os tratamentos distribuídos em quatro repetições de 50 sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico R (R Development Core Team, 2020).

## 2.7 Curva de embebição das sementes

Para a determinação do padrão de absorção de água pelas sementes, foram selecionadas duas linhagens contrastantes quanto a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação e emergência de plântulas, L91 como tolerante e L44 como não tolerante, seguidos de seu híbrido (91x44), recíproco (44x91) e da sua população F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub> 91x44 e F<sub>2</sub> 44x91).

A curva de embebição foi realizada com quatro repetições de 25 sementes. As sementes foram embebidas em papel *germitest*, sendo distribuídas sobre duas folhas e cobertas com uma terceira e organizadas em forma de rolo, assim como para o teste de germinação. As folhas de papel *germitest* foram umedecidas com 3,0 vezes o seu peso seco e os rolos, acondicionados em sacos de polietileno, fechados com atilhos de borrachas, a fim de evitar a perda de água por evaporação. Estes foram colocados em câmara de germinação do tipo B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) nas temperaturas de 25 °C (controle) e 35 °C (alta temperatura) (+ ou - 2 °C).

As sementes foram retiradas dos rolos de papel cuidadosamente, e pesadas em balança digital com precisão de 0,0001g. Durante as primeiras seis horas, as sementes foram pesadas de hora em hora e após esse período as pesagens foram realizadas a cada 3 horas, até que ocorresse a protrusão das radículas de 50% +1 das sementes de cada genótipo, que caracterizou o final da fase II e o início da fase III. Posteriormente, as sementes submetidas a embebição foram armazenadas a -86 °C.

Para monitorar a absorção de água, as sementes foram pesadas antes do início das embebições. A representação gráfica da curva de embebição foi ajustada ao modelo polinomial de terceiro grau sigmóide em função dos períodos de avaliação.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de milho dos diferentes genótipos no momento da realização do experimento, encontravam-se com o teor de água de 11,2% com variação de  $\pm 1\%$ . Para todas as variáveis analisadas observou-se interação significativa entre as linhagens e as temperaturas.

Em relação à primeira contagem de germinação, observa-se na temperatura de 25 °C maiores porcentagens de germinação em sementes do híbrido 54x64 (61%) e nas do recíproco 64x91 (63%), não diferindo entre si, enquanto os menores valores foram observados nas das linhagens L91, L54 e L44, seguidos dos recíprocos R44x91 e R64x54, e nas de todos das populações F<sub>2</sub>, com um percentual inferior a 14% de germinação (TABELA 2). Já na temperatura de 35 °C verificou-se maiores porcentagens de germinação em sementes da linhagem L91 (90%) e nas dos híbridos H91x44 (84%), H91x64 (93%) e H54x64 (87%), diferenciando-se estatisticamente dos demais materiais genéticos. A menor porcentagem de germinação foi observada na linhagem L44 (10%), estatisticamente inferiores à observada nos demais genótipos.

De maneira geral, as maiores porcentagens de germinação das sementes na primeira contagem foram observadas na temperatura de 35 °C. Isso provavelmente ocorreu porque em temperaturas mais altas, a embebição acontece de forma mais rápida e acelera a velocidade das reações (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Assim, o padrão adotado foi alcançado mais rápido, ressaltando-se que neste trabalho foram consideradas como plântulas normais aquelas com três centímetros de raiz primária e de parte aérea, e com três ou mais raízes seminais.

Sabe-se que a temperatura tem grande influência sobre a porcentagem e a velocidade de germinação das sementes devido a maior velocidade de absorção de água e reações bioquímicas envolvidas no processo. Assim, quanto maior a temperatura, até certo limite, mais rápida será a germinação e mais eficiente o processo germinativo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Em relação ao comportamento das sementes das linhagens consideradas como tolerantes L91 e L54 na temperatura de 25 °C, obteve-se uma porcentagem de germinação muito baixa. Isto pode ser explicado pelo fato de as plântulas destas linhagens não terem atingido o tamanho da parte aérea estabelecido. Para a L91 esse comportamento já era esperado, porque tem sido observado que ela atrasa o desenvolvimento da parte aérea, embora apresente maior desenvolvimento das raízes (ABREU *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2021).

Em sementes dos híbridos e recíprocos da população  $F_2$ , tanto na temperatura de 25 °C como na temperatura de 35 °C, houve uma maior variação das porcentagens de germinação quando da primeira contagem. Isto está associado ao maior nível de segregação, característica em população  $F_2$  (RAMALHO *et al.*, 2012; BORÉM; MIRANDA; FRITSCHÉ-NETO, 2021).

Referente à germinação, verificou-se na temperatura de 25 °C, diferenças significativas entre os genótipos avaliados (TABELA 2). Em sementes das linhagens L54 e L44, e das do recíproco  $F_2$  44x91, foram observadas as menores porcentagens de germinação 86, 87 e 86%, respectivamente. Para os demais genótipos verificou-se as maiores porcentagens de germinação, 93 a 100%, não havendo diferença significativa entre si. Isso evidencia o potencial germinativo dos genótipos quando expostos em temperatura favorável para a germinação das sementes.

Quando as sementes foram germinadas à 35 °C (TABELA 2), as maiores porcentagens de germinação foram observadas em sementes da linhagem L91 (93%), seguidos das híbridas H91x44 (100%), H91x64 (99%), H54x44 (90%), H54x64 (91%) e  $F_2$  64x54 (91%) e dos recíprocos R44x91 (92%), R64x91 (95%), R64x54 (93%),  $F_2$  44x91 (91%),  $F_2$  44x54 (91%) e  $F_2$  64x54 (87%), sem diferenças estatísticas entre estas. As menores porcentagens de germinação foram constatadas em sementes das linhagens L44 (23%), L64 (55%), e nas do recíproco R44x54 (53%) e híbrido  $F_2$  91x64 (47%).

Tabela 2 - Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G) e velocidade de germinação (VG) de sementes de linhagens, híbridos, recíprocos e população F<sub>2</sub> de milho submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C durante a germinação.

| Genótipos            | Temperatura |        |           |         |        |           |
|----------------------|-------------|--------|-----------|---------|--------|-----------|
|                      | 25 °C       |        |           | 35 °C   |        |           |
|                      | PCG (%)     | G (%)  | VG (dias) | PCG (%) | G (%)  | VG (dias) |
| L91                  | 2 Eb        | 99 Aa  | 5,25 Ca   | 90 Aa   | 93 Aa  | 4,05 Db   |
| L54                  | 14 Eb       | 86 Ba  | 5,02 Da   | 72 Ba   | 77 Bb  | 4,05 Db   |
| L44                  | 9 Ea        | 87 Ba  | 5,10 Ca   | 10 Fa   | 23 Eb  | 4,57 Bb   |
| L64                  | 45 Cb       | 99 Aa  | 4,57 Fa   | 74 Ba   | 55 Db  | 3,22 Eb   |
| H91x44               | 49 Bb       | 100 Aa | 4,55 Fa   | 84 Aa   | 100 Aa | 4,20 Db   |
| H91x64               | 31 Db       | 99 Aa  | 4,72 Ea   | 93 Aa   | 99 Aa  | 4,05 Db   |
| H54x44               | 40 Cb       | 99 Aa  | 4,67 Ea   | 78 Ba   | 90 Aa  | 4,15 Db   |
| H54x64               | 61 Ab       | 99 Aa  | 4,42 Fa   | 87 Aa   | 91 Aa  | 4,02 Db   |
| R44x91               | 3 Eb        | 96 Aa  | 5,20 Ca   | 81 Ba   | 92 Aa  | 4,07 Db   |
| R44x54               | 28 Db       | 96 Aa  | 4,75 Ea   | 41 Da   | 53 Db  | 4,22 Db   |
| R64x91               | 63 Ab       | 100 Aa | 4,37 Fa   | 81 Ba   | 95 Aa  | 4,17 Db   |
| R64x54               | 0 Eb        | 94 Aa  | 5,90 Aa   | 82 Ba   | 93 Aa  | 4,20 Db   |
| F <sub>2</sub> 91x44 | 2 Eb        | 93 Aa  | 5,60 Aa   | 56 Ca   | 74 Bb  | 4,32 Cb   |
| F <sub>2</sub> 91x64 | 2 Eb        | 95 Aa  | 5,50 Ba   | 20 Ea   | 47 Db  | 4,92 Ab   |
| F <sub>2</sub> 54x44 | 0 Eb        | 95 Aa  | 5,72 Aa   | 25 Ea   | 65 Cb  | 5,05 Ab   |
| F <sub>2</sub> 54x64 | 2 Eb        | 97 Aa  | 5,45 Ba   | 64 Ca   | 91 Aa  | 4,42 Cb   |
| F <sub>2</sub> 44x91 | 0 Eb        | 86 Ba  | 5,82 Aa   | 65 Ca   | 91 Aa  | 4,35 Cb   |
| F <sub>2</sub> 44x54 | 7 Eb        | 94 Aa  | 5,37 Ba   | 75 Ba   | 91 Aa  | 4,17 Db   |
| F <sub>2</sub> 64x91 | 0 Eb        | 97 Aa  | 5,47 Ba   | 43 Da   | 84 Bb  | 4,55 Bb   |
| F <sub>2</sub> 64x54 | 6 Eb        | 93 Aa  | 5,22 Ca   | 57 Ca   | 87 Aa  | 4,35 Cb   |
| CV (%)               | 18,87       | 7,15   | 3,39      | 18,87   | 7,15   | 3,39      |

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

Fonte: Da autora (2022).

A linhagem L91 destacou-se com maior porcentagem de germinação na temperatura de 35 °C, com relação as demais linhagens. Além disso, nos cruzamentos nas quais a linhagem estava envolvida como parental feminino ou masculino, também se observou as maiores porcentagens de germinação, exceto em sementes dos híbridos da população F<sub>2</sub>, quando houve variação da germinação, isso está relacionado a segregação, assim como observado na primeira contagem de germinação.

O resultado obtido para a linhagem L91 já vem sendo observado em diversos trabalhos, nos quais a linhagem L91 tem sido tolerante a diferentes tipos de estresses abióticos, como tolerância a baixa temperatura durante a germinação (SILVA NETA *et al.*, 2020; SILVA NETA

2020 *et al.*, 2015), estresse térmico (SANTOS *et al.*, 2019), deficiência hídrica (VILELA, 2019); (ABREU *et al.*, 2018) e tolerância às altas temperaturas na germinação (DUTRA *et al.*, 2015).

À 35 °C, para a linhagem L64, obteve-se uma porcentagem de germinação inferior ao da primeira contagem, ao que tudo indica, na primeira contagem esta temperatura ainda não tinha afetado o desenvolvimento das plântulas, mas no sexto dia essa porcentagem foi reduzida. Durante a avaliação verificou-se que, embora algumas plântulas tivessem alcançado o padrão proposto, em várias plântulas houve morte da raiz principal, os tecidos condutores foram atingidos em razão de terem sido consideradas plântulas anormais.

Os dados assemelham-se aos observados por Santos *et al.* (2019), os quais observou-se para essa mesma linhagem, porcentagem de germinação 23%, à 35 °C e de 94% à temperatura de 25 °C, sendo que esta última está na faixa de temperatura considerada ideal para a germinação de sementes de milho. Isso evidencia que a linhagem L64 não tolera a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas à 35 °C.

Em relação à linhagem L44, considerada como não tolerante, quando as sementes foram expostas à temperatura de 35 °C, foi observada a menor porcentagem de germinação, em relação às observadas nos demais genótipos. A temperatura afetou tanto o desenvolvimento das raízes, como da parte aérea, o que resultou em maior número de plântulas anormais.

Em um estudo no qual foi avaliada a germinação de cultivares de milho em diferentes temperaturas (16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40° C), Borges *et al.* (2020) adotaram um padrão para considerar como sementes germinadas, as que emitiram 0,5 cm de raiz primária. Os autores observaram que nas temperaturas de 16 e 40 °C, as sementes atingiram o padrão e foram consideradas como germinadas, mas não houve desenvolvimento de plântulas normais, ou seja, houve protrusão das raízes primárias, no entanto, essas temperaturas acarretaram danos irreversíveis ao desenvolvimento das plântulas. Nas temperaturas de 20 e 36 °C, foi possível observar o maior número de plântulas anormais.

Na presente pesquisa de modo geral, a germinação das sementes de milho foi afetada pelo aumento da temperatura. As linhagens consideradas como tolerantes sobressaíram em relação às demais linhagens. Em sementes da linhagem L54 foi observada maior porcentagem de germinação em relação às das linhagens L44 e L64. No entanto, menor em relação a da linhagem L91. As porcentagens de germinação das sementes dos híbridos e recíprocos, exceto R44x54, foram superiores aos das linhagens, exceto linhagem L91 (TABELA 1). Esses

resultados estão de acordo com diversos trabalhos, nos quais foi verificado o efeito da heterose sobre a qualidade fisiológica de sementes (SILVA NETA *et al.*, 2020; ROSADO *et al.*, 2020; ABREU *et al.*, 2018; PRAZERES; COELHO, 2016; ANDRADE, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; NERLING; COELHO; NODARI *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2000).

Cabral *et al.* (2013), observaram a existência do efeito recíproco para a qualidade fisiológica de sementes de milho de pipoca e sugeriram que os genitores feminino e masculino sejam determinados antes dos cruzamentos. Da mesma forma, Nascimento *et al.* (2016) verificaram em sementes de tomates, ao considerar o caráter de resistência à temperatura, efeito dos pais sobre esse caráter. Para Costa *et al.* (2021) a combinação das linhagens afetou a tolerância das sementes de milho ao retardamento na secagem, e relataram que linhagens que não toleram essa condição, não devem ser utilizadas como parentais femininos.

A velocidade de germinação pode ser avaliada por meio do número médio de dias para a germinação, portanto, quanto maior a velocidade de germinação, menor será o número de dias. Dessa forma, na temperatura de 25 °C (TABELA 2), foi observada germinação mais rápida em sementes da linhagem L64, em todos os híbridos e nos recíprocos R44x54 e R64x91, em média 4,57 dias. Em sementes dos híbridos e recíprocos da população F<sub>2</sub>, constatou-se maior número de dias para que ocorresse a germinação, em média de 5,51 dias.

Sob a temperatura de 35 °C, obteve-se o menor número de dias (3,22 dias) para que ocorresse a germinação das sementes da linhagem L64, em relação dos demais genótipos. Sementes das linhagens L91 e L54, seguidos de todos os híbridos e recíprocos, atingiram a germinação em média com 4,11 dias. Com relação aos híbridos e recíprocos da população F<sub>2</sub>, foi possível verificar uma variação média de 4,17 a 5,05 dias, para a germinação das sementes.

De maneira geral, a velocidade de germinação foi mais rápida na temperatura de 35 °C. Assim como aconteceu para a primeira contagem de germinação, a alta temperatura proporcionou a embebição mais rápida das sementes. Assim, em sementes expostas a altas temperaturas dentro de certos limites durante o processo de germinação ocorre a germinação mais rápida (SBRUSSI; ZUCARELI, 2014).

A germinação e/ou emergência de plântulas mais rápidas, em um período de tempo mais curto, é importante para a uniformidade e estabelecimento das plantas no campo (ROSADO *et al.*, 2020), uma vez que sementes que germinam mais lentamente ficam expostas às condições adversas, o que pode interferir no seu estabelecimento (FERREIRA *et al.*, 2013).

A velocidade de germinação aconteceu de forma mais rápida na linhagem L64, tanto na temperatura de 25 °C, como na de 35 °C, comparada às demais linhagens. Em temperatura favorável para a germinação, foi observado que sementes desta linhagem tem uma velocidade de absorção de água muito rápida (TABELA 2). Já na temperatura de 35 °C, no quarto e no quinto dia, a temperatura ainda não tinha afetado o desenvolvimento das plântulas. Assim, essa absorção de água com o aumento da temperatura aconteceu de forma ainda mais rápida, mas no sexto dia a temperatura ocasionou a morte das raízes principais o que pode ser observado no teste de germinação. Por isso, sementes da linhagem L64, por mais que tenham uma velocidade de germinação mais rápida sob alta temperatura, não resultam em plântulas normais ao final do processo de germinação.

O comprimento da raiz primária das plântulas de milho dos diferentes genótipos encontra-se na Tabela 3. Houve diferença significativa na temperatura de 25 °C, entre os genótipos avaliados. O maior comprimento da raiz primária foi verificado nas linhagens L54 (16,92 cm) e L64 (18,25 cm), seguido da combinação H54x64 (19,82 cm) e dos recíprocos R64x91 (19,45 cm) e R64x54 (17,07 cm). Os menores comprimentos foram observados na linhagem L44 (11,20 cm), no híbrido F<sub>2</sub> 91x44 (10,77 cm) nos recíprocos R44x54 (12,52 cm), F<sub>2</sub> 44x91 (7,30 cm), F<sub>2</sub> 64x91 (10,17 cm).

Na temperatura de 35 °C, os maiores resultados para o comprimento de raiz primária foram observados nos híbridos H91x44 (18,07 cm), H91x64 (17,02 cm), seguido dos recíprocos R44x91 (18,77 cm), R44x54 (17,27 cm) e R64x91 (17,62 cm), diferindo estatisticamente com relação aos demais genótipos. Na linhagem não tolerante L44, obteve-se o menor comprimento de raiz primária com 1,27 cm, em relação a todos os genótipos.

Tabela 3 - Comprimento de raiz primária (CR) e parte aérea (CPA) e número de raízes seminais (NRS) de plântulas de linhagens, híbridos, recíprocos e população F<sub>2</sub> de milho submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C durante a germinação.

| Genótipos            | Temperatura |          |         |          |          |         |
|----------------------|-------------|----------|---------|----------|----------|---------|
|                      | 25 °C       |          |         | 35 °C    |          |         |
|                      | CR (cm)     | CPA (cm) | NRS     | CR (cm)  | CPA (cm) | NRS     |
| L91                  | 14,10 Ba    | 11,65 Ba | 6,37 Ba | 3,85 Db  | 7,37 Eb  | 5,20 Cb |
| L54                  | 16,92 Aa    | 10,57 Ca | 3,52 Ea | 7,07 Cb  | 7,82 Eb  | 1,55 Gb |
| L44                  | 11,20 Ca    | 9,32 Ca  | 3,00 Fa | 1,27 Db  | 5,10 Fb  | 0,45 Hb |
| L64                  | 18,25 Aa    | 14,12 Aa | 4,82 Da | 5,40 Cb  | 5,17 Fb  | 3,02 Eb |
| H91x44               | 14,12 Bb    | 11,67 Bb | 5,65 Ca | 18,07 Aa | 14,60 Ba | 4,47 Db |
| H91x64               | 14,15 Bb    | 10,97 Cb | 4,82 Db | 17,02 Aa | 15,65 Ba | 6,90 Aa |
| H54x44               | 15,75 Ba    | 14,45 Aa | 3,45 Ea | 15,00 Ba | 13,80 Ba | 2,95 Ea |
| H54x64               | 19,82 Aa    | 14,80 Aa | 4,45 Da | 12,82 Bb | 11,20 Cb | 3,02 Eb |
| R44x91               | 12,52 Cb    | 12,67 Bb | 4,35 Da | 18,77 Aa | 16,35 Aa | 4,57 Da |
| R44x54               | 14,72 Ba    | 10,10 Cb | 2,75 Fa | 17,27 Aa | 17,25 Aa | 3,07 Ea |
| R64x91               | 19,45 Aa    | 15,70 Aa | 7,12 Aa | 17,62 Aa | 15,17 Ba | 5,62 Bb |
| R64x54               | 17,07 Aa    | 12,75 Ba | 4,00 Ea | 8,35 Cb  | 10,50 Cb | 2,65 Fb |
| F <sub>2</sub> 91x44 | 10,77 Ca    | 10,40 Ca | 5,07 Da | 5,92 Cb  | 9,27 Da  | 3,57 Eb |
| F <sub>2</sub> 91x64 | 15,42 Ba    | 11,00 Ca | 2,50 Fa | 4,22 Db  | 6,32 Fb  | 1,57 Gb |
| F <sub>2</sub> 54x44 | 16,20 Ba    | 13,52 Aa | 4,37 Da | 7,15 Cb  | 8,05 Eb  | 2,90 Eb |
| F <sub>2</sub> 54x64 | 15,12 Ba    | 13,00 Ba | 4,45 Da | 11,92 Bb | 10,22 Cb | 4,00 Da |
| F <sub>2</sub> 44x91 | 7,30 Db     | 6,77 Db  | 5,12 Db | 13,80 Ba | 14,87 Ba | 6,07 Ba |
| F <sub>2</sub> 44x54 | 14,42 Ba    | 12,27 Ba | 4,67 Da | 3,27 Db  | 7,60 Eb  | 2,55 Fb |
| F <sub>2</sub> 64x91 | 10,17 Ca    | 7,75 Da  | 3,22 Ea | 8,92 Ca  | 6,85 Ea  | 2,25 Fb |
| F <sub>2</sub> 64x54 | 16,12 Ba    | 11,87 Ba | 4,20 Da | 5,40 Cb  | 8,92 Db  | 2,45 Fb |
| CV (%)               | 15,59       | 10,25    | 12,81   | 15,59    | 10,25    | 12,81   |

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

Fonte: Da autora (2022).

A temperatura é fundamental para o desenvolvimento das estruturas iniciais das plântulas, a exemplo da raiz primária, que durante o processo germinativo para a maioria das espécies é a primeira estrutura a surgir e tem grande importância no estabelecimento das plântulas no ambiente (OLIVEIRA; PEREIRA, 2014). O sistema radicular está em rápido processo de divisão celular e fatores ambientais adversos podem reduzir o seu desenvolvimento. Assim, temperaturas desfavoráveis para desenvolvimento de plântulas e plantas afetam diretamente essa estrutura (MARCOS FILHO, 2015), contudo, parece existir variabilidade genética para a tolerância à alta temperatura durante o desenvolvimento inicial de plântulas.

Em plântulas das linhagens L54 e L64, foram observados os maiores comprimentos de raiz primária, com relação às demais linhagens, na temperatura de 25 °C. Assim, quando

envolvidas em cruzamentos como parental feminino, o comprimento de raiz primária foi superior, em relação aos observados nas dos demais híbridos, o que se pode inferir o efeito materno para esta característica.

Já em plântulas da linhagem L44, observou-se o menor comprimento de raiz primária, comparando aos das demais linhagens, na temperatura de 25 °C. Quando esta linhagem foi utilizada como parental feminino ou masculino nas combinações dos híbridos, o comprimento foi menor, o que pode ser explicado pelo efeito de genes aditivos para esta característica.

Em plântulas da população F<sub>2</sub>, foi observado o mesmo comportamento das variáveis anteriores. Houve variações nos comprimentos de raiz primária, tanto na temperatura de 25 °C, como na de 35 °C.

De forma geral, na temperatura de 35 °C, os resultados de comprimento de raiz de primária de plântulas dos híbridos foram superiores aos observados nas das linhagens, exceto para o cruzamento R64x54, diferentemente do que foi observado para esse genótipo sob temperatura de 25 °C.

Os híbridos que resultaram nos maiores comprimentos de raiz primária, na temperatura de 25 °C, não foram os mesmos à temperatura de 35 °C. É importante destacar o maior desenvolvimento da raiz primária nos genótipos em que a L91 está envolvida, tanto como parental feminino quanto masculino (TABELA 3).

Quando da avaliação de um híbrido ou recíproco, é necessário ver a combinação das duas linhagens, sempre olhando o potencial da linhagem tolerante, pois nos cruzamentos estão envolvidos tanto os efeitos aditivos, por meio das estimativas da capacidade geral de combinação, que têm sido úteis na recomendação de genitores superiores, como os efeitos não aditivos, que estão associados a capacidade específica de combinação, que refere-se ao desempenho de genitores em combinações híbridas (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012), pois existem vários genes envolvidos para essa característica.

Segundo Rosado *et al.* (2020) o efeito do recíproco é importante para demonstrar qual o genótipo é o mais promissor quando usado como progenitor feminino ou masculino. Além disso, os mesmos autores inferem que há efeito materno para a qualidade fisiológica de sementes. Costa *et al.* (2021), observaram que as combinações dos parentais afetou a tolerância das sementes de milho ao retardamento na secagem e afirmam que linhagens não tolerantes a essa característica não podem ser utilizadas como parental feminino, pois há efeito materno para o atraso na secagem.

Dados semelhantes foram mencionados por Silva Neta *et al.* (2020), quando estudaram o controle genético para tolerância a baixa temperatura durante a germinação de sementes de milho. Foram cruzadas linhagens contrastantes e observaram que existe efeito de heterose e efeito do recíproco para a característica de tolerância ao frio durante o processo germinativo, mas não foi observada correlação direta entre maior tolerância ao frio e a utilização da linhagem mais tolerante como parental feminino, reforçando a importância de analisar as melhores combinações híbridas, não só visando a produtividade final, mas também a alta qualidade fisiológica das sementes. Abreu *et al.* (2018) relataram que há efeito recíproco para a qualidade fisiológica de sementes, quando avaliada em condições de estresse hídrico, os quais evidenciam a importância da escolha dos genitores femininos para compor os cruzamentos.

Na Tabela 3, encontra-se o comprimento da parte aérea das plântulas de milho oriundas de sementes submetidas à temperatura de 25 °C. Os menores comprimentos entre todos os genótipos, foram observados nos recíprocos F<sub>2</sub> 44x91 (6,77 cm) e F<sub>2</sub> 64x91 (7,75 cm). Os maiores comprimentos foram observados na linhagem L64 (14,12 cm), nos híbridos 54x44 (14,45 cm), 54x64 (14,80 cm) e F<sub>2</sub> 54x44 (13,52 cm) e no recíproco R64x54 (15,70 cm), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Quanto ao desenvolvimento da parte aérea na temperatura de 35 °C, foram constatados os maiores valores em linhagens tolerantes L91 (7,37 cm) e L54 (7,82 cm), quando comparados ao das linhagens não tolerantes.

As melhores combinações dos cruzamentos para essa característica foram verificadas quando as linhagens tolerantes foram como parental masculino e a linhagem L44 como parental feminino, 16,35 cm, para o R44x91 e 17,25 para o R44x54. Assim, como observado para o comprimento da raiz primária, o menor comprimento da parte aérea das plântulas dos híbridos ocorre no R64x54, 10,50 cm.

Foi verificado efeito da heterose para a qualidade fisiológica de sementes sob condições de estresse por alta temperatura, principalmente para as características de comprimento de parte aérea e raiz primária. Nascimento *et al.* (2016), observaram o efeito da heterose em condições de estresse por alta temperatura para qualidade fisiológica, para a característica de germinação.

Abreu *et al.* (2018) constataram o efeito da heterose em sementes de milho submetidas ao estresse hídrico, principalmente para características de raiz. Gomes *et al.* (2000), constataram efeito da heterose para a qualidade fisiológica de sementes de milho, para as características de comprimento de parte aérea e radícula.

Ao avaliar a qualidade fisiológica de três lotes de sementes de milho submetidas a diferentes temperaturas (15, 25, 35 e 40 °C) por 24 horas, Marini *et al.* (2013), observaram maior comprimento de raiz e parte área das plântulas nas temperaturas extremas de 15 e 40 °C. Os autores observaram que essas temperaturas estimularam o crescimento inicial das plântulas, o rápido consumo de reserva o que constituiu uma estratégia de defesa das sementes, mas essa resposta não significa que estas plântulas se estabeleceriam de forma eficiente no campo.

Na presente pesquisa o maior número de raízes seminais (TABELA 3), à 25 °C, foi observado para o recíproco R64x91 (7,12), diferindo estatisticamente dos demais genótipos. Entre as linhagens o maior número de raízes seminais (6,37), foi observado para a linhagem L91, seguido da linhagem L64 (4,82). Em plântulas da linhagem L44, do híbrido F<sub>2</sub> H91x64 e do recíproco R44x54, foram verificadas as menores médias, 3,00, 2,50 e 2,75, respectivamente, em relação aos demais genótipos.

Para a temperatura de 35 °C, em plântulas da linhagem L44 obteve-se o menor número de raízes seminais (0,45), com relação às de todos os outros genótipos. Na linhagem L91, foi verificado o maior número de raízes seminais (5,20), em relação as demais linhagens. Nas plântulas que foram originadas do híbrido H91x64, verificou-se o maior número, com 6,90, com diferença estatística significativa em relação ao demais genótipos.

Vale ressaltar que, em plântulas que foram originadas da linhagem tolerante L91, expostas às temperaturas de 25 e 35 °C observou-se elevado número de raízes seminais. Nos cruzamentos em que a mesma está envolvida como parental feminino ou masculino, verificou-se plântulas com o maior número de raízes seminais, em relação aos demais genótipos, para ambas temperaturas.

Quando se compara a linhagem L64, não tolerante com a linhagem L91, houve mais raízes seminais em plântulas da linhagem L91 à temperatura de 25 °C e sob condições de estresse, à temperatura de 35 °C. Quando da análise dos resultados nas combinações híbridas envolvendo estas duas linhagens, mais raízes foram observadas quando da utilização da linhagem L91 como parental feminino. Assim, pode-se inferir o efeito materno para esta característica, o que evidencia a importância da escolha do progenitor feminino quando das escolhas das combinações dos híbridos.

Também foi observado que em plântulas da linhagem L44, na temperatura de 35 °C havia um menor número de raízes seminais, mas em plântulas derivadas dos cruzamentos H91x44 e R44x91, foi observado aumento expressivo do número dessas raízes, 4,47 e 4,57,

respectivamente. Assim, infere-se que a linhagem L91 contém maior expressão dos alelos favoráveis para tolerância à altas temperaturas durante o processo de germinação e emergência de plântulas.

Quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, foi possível observar que em plântulas do genótipo tolerante L91 houve mais desenvolvimento da raiz primária, como também do número de raízes seminais, o que não foi observado em plântulas do genótipo não tolerante L44. Nestas, quando expostas à alta temperatura durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas, o sistema radicular foi prejudicado.

Magrauthia *et al.*, (2016), observaram redução significativa do comprimento da parte aérea (55,50%), raiz primária (59,50%) e do número de raízes seminais (66,70%) de plântulas de arroz submetidas a alta temperatura (42 °C) durante a germinação, quando comparadas com às plântulas desenvolvidas sob 30 °C.

Sabe-se que as raízes seminais são responsáveis pela absorção de água e nutrientes nas primeiras semanas de desenvolvimento da plântula (ABREU *et al.*, 2016). Assim, os genótipos não tolerantes à alta temperatura durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas têm menor desenvolvimento de raízes.

As plântulas da linhagem tolerante L54 apresentavam raiz primária e parte aérea bem desenvolvidas, em ambas as temperaturas testadas. No entanto, existiam poucas raízes seminais, inclusive em plântulas dos cruzamentos nas quais esta faz parte como parental feminino ou masculino.

Vale salientar que à 25 °C, em plântulas da linhagem L64, e nas do cruzamento R64x54, foi observado maior comprimento de raízes, e nas dos cruzamentos R64x91, maior número de raízes seminais em relação aos demais genótipos. Mas quando as sementes foram germinadas e plântulas desenvolvidas à temperatura de 35 °C houve redução do comprimento de raiz primária e diminuição do número de raízes seminais.

De modo geral, na população F<sub>2</sub> de híbridos e recíprocos, para todas as variáveis analisadas, observou-se variações dos resultados, em ambas as temperaturas de 25 e 35 °C, o que pode ser explicado pela segregação.

De maneira geral, na linhagem L91 e nas combinações em que a mesma fez parte, foi verificado melhor desempenho sob condições de alta temperatura durante o processo germinativo e emergência de plântulas, em todas as variáveis analisadas. Assim, infere-se que

essa linhagem pode ser explorada em programas de melhoramento visando a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas.

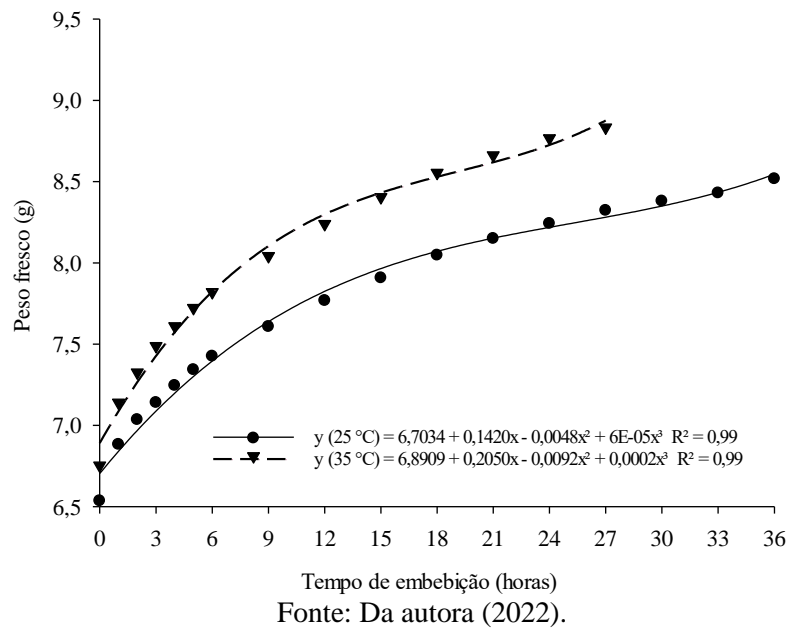
Com bases nestes resultados, foram selecionadas as duas linhagens discrepantes quanto a tolerância à alta temperatura durante o processo germinativo, a linhagem L91 como tolerante e a linhagem L44 como não tolerante, assim como de seu híbrido, recíproco e população F<sub>2</sub> para realização da curva de absorção de água.

Em relação às curvas de embebição, para os genótipos avaliados foram observados o padrão trifásico de absorção descrito por Bewley e Black (1994). Além disso, foi possível verificar que as sementes expostas à temperatura de 35 °C atingiram a fase III de forma mais rápida, em virtude de que, quanto maior a temperatura, maior a velocidade das reações envolvidas no processo de germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; FLORES *et al.*, 2014).

O aumento da temperatura ocasiona embebição mais rápida, por haver redução da viscosidade e aumento da energia cinética da água, que favorecem o processo de embebição. Além disso, temperaturas mais altas favorecem a velocidade das atividades metabólicas que ocorrem em sementes (MARCOS FILHO, 2015).

Na Figura 1, observa-se a curva de absorção de água das sementes da linhagem L91, nas temperaturas de 25 e 35 °C. A fase I foi caracterizada por um aumento significativo do peso fresco das sementes, principalmente nas primeiras 6 horas de embebição, em ambas as temperaturas. Na fase II, à 25 °C a absorção de água aconteceu de forma mais lenta, 27 horas, aproximadamente e à 35 °C, 18 horas, aproximadamente. A protrusão da radícula ocorreu com 36 horas de embebição na temperatura de 25 °C e com 27 horas de embebição, à 35 °C, quando foram observadas 50% das sementes +1 protrusão radicular, o que indica o início da fase III.

Figura 1 - Curva de absorção de água em sementes de milho da linhagem L91 submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C, até a protrusão radicular.



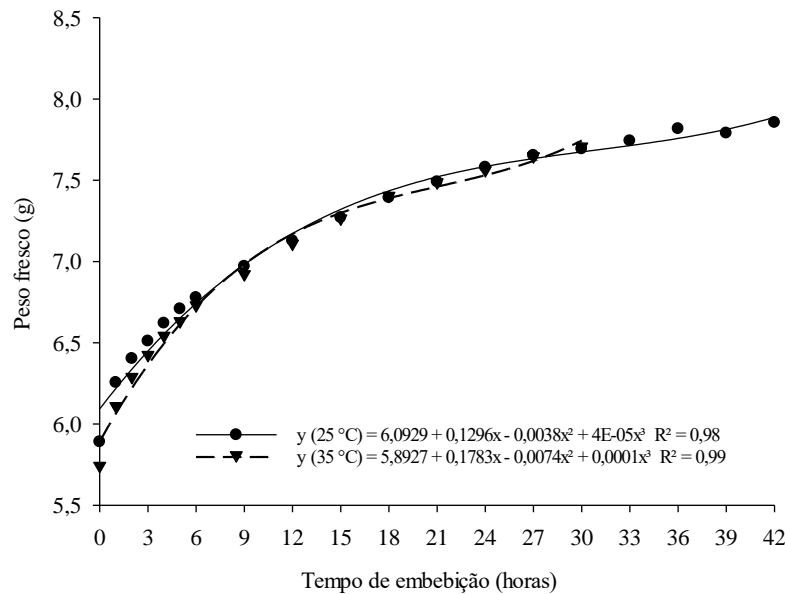
O padrão trifásico de absorção é caracterizado por uma fase inicial, a fase I, com rápida absorção de água, podendo ocorrer em sementes viáveis ou não viáveis, pois essa fase é definida pelo processo físico que independe da atividade metabólica das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994). Na fase II, há redução da velocidade de hidratação e da intensidade de respiração, quando ocorre a degradação das substâncias de reservas para o preparo do alongamento celular. Por fim, na fase III, há visível retomada do crescimento do eixo embrionário e evidente protrusão da radícula (MARCOS FILHO, 2015).

De modo geral, constatou-se prolongamento da fase II sob temperatura de 25 °C, com uma diferença de 9 horas em relação ao observado sob temperatura de 35 °C, até que ocorresse a protrusão radicular. Além disso, observou-se maior velocidade de embebição à 35 °C, quando comparada com a observada à 25 °C. O que pode estar associado a tolerância da linhagem L91 à altas temperaturas, no processo de germinação de sementes.

Na curva de absorção de água de sementes da linhagem L44 (FIGURA 2), foi possível observar rápida embebição durante as 6 primeiras horas, definido como a fase I, sob temperaturas de 25 e 35 °C. Em seguida, houve um prolongamento da fase II, de 6 a 33 horas, aproximadamente sob a temperatura de 25 °C e de 6 a 21 horas, aproximadamente para a temperatura de 35 °C. A fase III, caracterizada pela protrusão da radícula aconteceu com cerca

de 42 horas de hidratação para a temperatura de 25 °C e 30 horas sob temperatura de 35 °C, quando foram observadas 50% sementes +1 com protrusão radicular.

Figura 2 - Curva de absorção de água em sementes de milho da linhagem L44 submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C, até a protrusão radicular.



Fonte: Da autora (2022).

É importante destacar pelas curvas de embebição das sementes das linhagens L44 e L91, que tanto à 25 °C como à 35 °C, a velocidade de embebição é maior em sementes da linhagem L91 e à 35 °C esta velocidade ainda é maior em sementes da linhagem L91. Infere-se que este comportamento pode estar associado à maior tolerância da linhagem L91 às altas temperaturas durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas.

Sabe-se que, em sementes com baixa qualidade fisiológica, o reparo e/ou proteção do sistema de membranas é mais deficiente e lento, antes do início do crescimento do eixo embrionário (EHRHARDT-BROCARD; COELHO, 2016), o que poderia estar associado às diferenças dos padrões de absorção de água em sementes, observados na presente pesquisa.

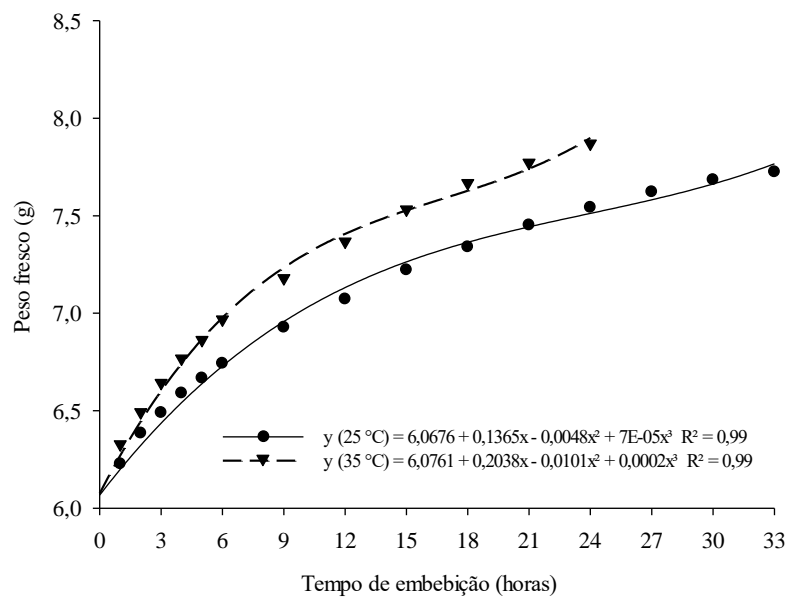
Os resultados observados na curva de absorção de água estão diretamente relacionados com os resultados obtidos na qualidade fisiológica das sementes de milho, demonstrando que as sementes da linhagem L44 quando expostas a temperatura 35 °C, possui uma baixa qualidade fisiológica e uma protrusão radicular mais lenta durante a curva de absorção de água.

Prazeres e Coelho (2017), avaliaram a curva de hidratação e a qualidade fisiológica das sementes de milho sob condição de estresse hídrico, observaram que os genótipos quando

tinham baixa qualidade fisiológica, exibiram protrusão mais lenta durante a curva de hidratação das sementes. Ainda segundo os mesmos autores, os testes de germinação e vigor estão associados ao padrão de hidratação das sementes.

O padrão de absorção de água das sementes do híbrido H91x44 encontra-se na Figura 3. Houve um aumento significativo no peso fresco das sementes nas primeiras 6 horas sob as temperaturas de 25 °C e 35 °C, sendo caracterizado pela da fase I. Na fase II, a absorção de água ocorre de forma mais lenta, na temperatura de 25 °C durou de 6 a 24 horas, aproximadamente e na temperatura de 35 °C de 6 a 15 horas, aproximadamente. A protrusão radicular, que é caracterizada pelo fim da fase II e o início da fase III, aconteceu com cerca de 33 horas de hidratação das sementes para a temperatura de 25 °C e 24 horas sob temperatura de 35 °C, quando atingiram 50% sementes +1 de protrusão radicular.

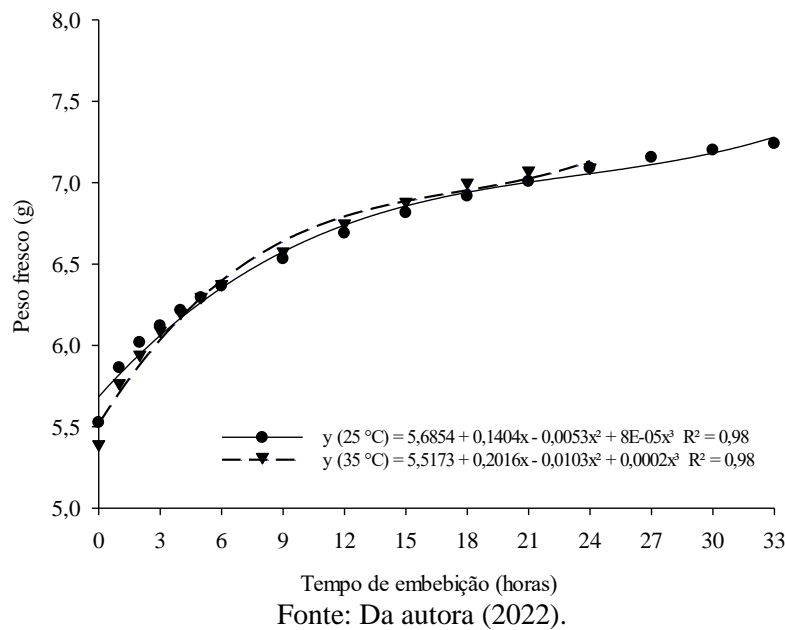
Figura 3 - Curva de absorção de água em sementes de milho do híbrido H91x44 submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C, até a protrusão radicular.



É possível observar que em sementes do híbrido H91x44 houve comportamento próximo do parental feminino, destacando-se a maior velocidade de absorção de água, na temperatura de 35 °C, em relação à observada a 25 °C. Parece haver o efeito materno para esta característica, o que implica na importância da escolha do parental feminino quando das escolhas das combinações híbridas. Na temperatura de 35 °C, a protrusão radicular ocorreu com cerca de 24 horas.

Para a curva de absorção de água das sementes do recíproco R44x91 (FIGURA 4), assim como para os genótipos anteriores, a fase I ocorreu nas 6 primeiras horas de hidratação das sementes, em ambas as temperaturas. Na sequência houve redução da absorção de água de 6 a 24 horas, aproximadamente para a temperatura de 25 °C e de 6 a 15 horas, aproximadamente sob a temperatura de 35 °C, assim, caracterizando a fase II, como mais longa. O início da fase III aconteceu quando as sementes foram embebidas por 33 e 24 horas, nas temperaturas de 25 e 35 °C, respectivamente.

Figura 4 - Curva de absorção de água em sementes de milho do recíproco R44x91 submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C, até a protrusão radicular.



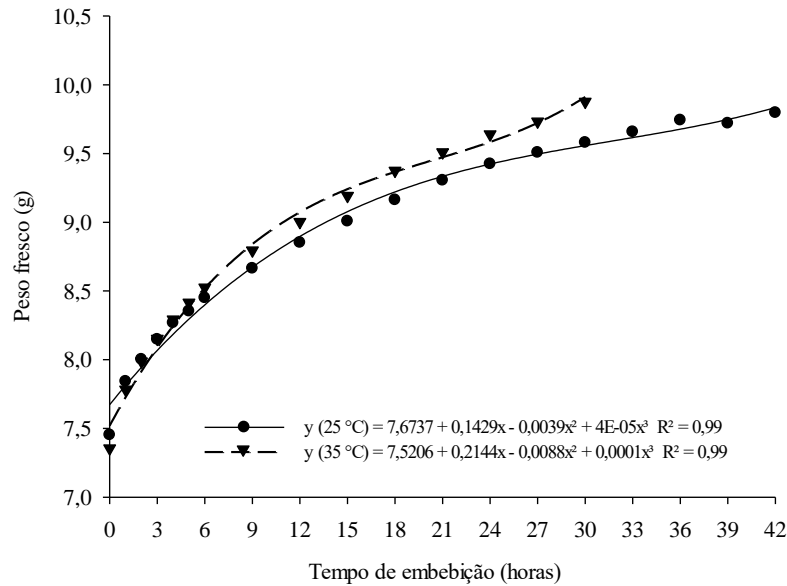
O comportamento das curvas de absorção de água em sementes do recíproco R44x91 foi semelhante ao observado na linhagem L44, em que as velocidades de embebição nas temperaturas de 25 e 35 °C são semelhantes. Neste caso, o parental feminino é a linhagem intolerante e o masculino tolerante, o que reforça o efeito materno para a característica de tolerância à alta temperatura, discutido anteriormente.

O comportamento da absorção de água e a duração das fases podem diferir entre espécies, cultivares, lotes, devido a diferenças genéticas, à qualidade fisiológica das sementes (RODRIGUES *et al.*, 2008) e a tolerância a estresses.

Quanto ao padrão de absorção de água das sementes de milho da população F<sub>2</sub> 91x44 (FIGURA 5), verificou-se protrusão radicular cerca de 42 e 30 horas de hidratação, nas

temperaturas de 25 e 35 °C, respectivamente. A fase I ocorreu no intervalo das primeiras 6 horas de embebição em ambas as temperaturas. A fase II foi atingida entre 6 e 33 horas de embebição para a temperatura de 25 °C e entre 6 e 21 horas de hidratação para 35 °C.

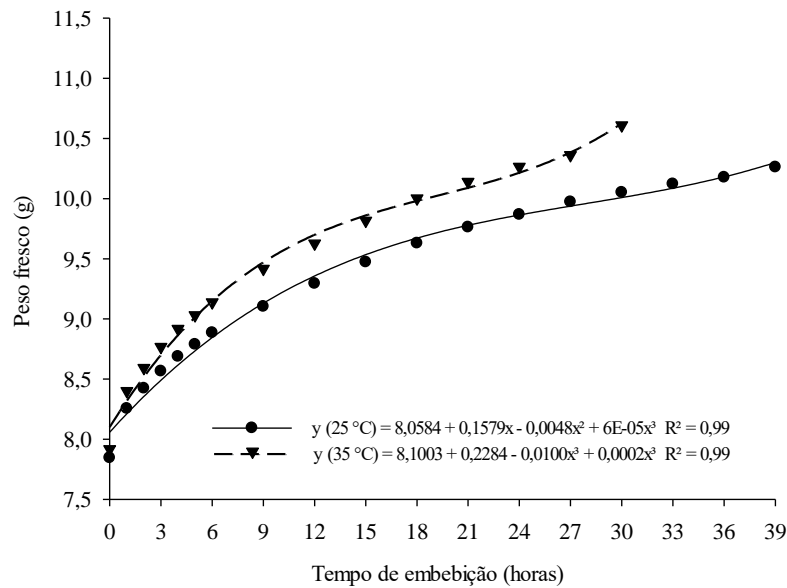
Figura 5 - Curva de absorção de água em sementes de milho da população F<sub>2</sub> 91x44 submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C, até a protrusão radicular.



Na curva de absorção de água em sementes da população F<sub>2</sub> 91x44, nota-se maior velocidade de embebição à 35 °C em relação a de 25°C. O período de hidratação das sementes foi mais longo, para que ocorresse a protrusão radicular, quando comparado aos observados em sementes das linhagens, híbrido e recíproco.

As sementes de milho do recíproco da população F<sub>2</sub> 44x91 (FIGURA 6), atingiram a fase I, também nas primeiras 6 horas de hidratação das sementes, nas temperaturas de 25 e 35 °C. Na sequência houve redução da velocidade de embebição, 6 a 21 horas, aproximadamente à 35 °C de 6 a 30 horas, aproximadamente à 25 °C, o que caracteriza a fase II. Já a fase III ocorreu cerca 30 e 39 horas de embebição, respectivamente, quando foram observadas protrusões radiculares de 50% +1 das sementes de milho.

Figura 6 - Curva de absorção de água em sementes de milho da população F<sub>2</sub> 44x91 submetidas às temperaturas de 25 °C e 35 °C, até a protrusão radicular.



O padrão de embebição das sementes da população F<sub>2</sub> não seguiu o comportamento observado do parental feminino do híbrido e recíproco à 25 e 35 °C. Assim, como observado em sementes do híbrido da população F<sub>2</sub>, também ocorreu no seu recíproco, o que pode ser explicado pela segregação existente na população F<sub>2</sub>.

De maneira geral, em sementes dos genótipos classificados como tolerantes foram observados maiores valores de germinação e vigor sob temperatura de 35 °C. Também, como observado em outras pesquisas, há efeito materno e heterose para a característica de tolerância à alta temperatura durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas. Em plântulas destes genótipos foi observado mais número de raízes seminais, principalmente quando germinadas à 35 °C.

Por meio da revisão realizada, pode-se inferir que a tolerância à altas temperaturas durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas também está associada à tolerância ao déficit hídrico nestas fases (SILVA NETA *et al.*, 2020).

A velocidade de embebição das sementes também foi maior em genótipos classificados como tolerantes e sob temperatura de 35 °C e parece estar associado ao efeito materno.

#### **4 CONCLUSÕES**

Há efeito do genótipo sobre a característica de tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho.

Há maior velocidade de embebição em sementes de genótipos classificados como tolerantes à alta temperatura durante a germinação das sementes.

## 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.** 2016. 138 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.
- ABREU, V. M. *et al.* Combining ability and heterosis of maize genotypes under water stress during seed germination and seedling emergence. **Crop Science**, v. 59, n.1, p. 33-43, 2018.
- ANDRADE, R. V. *et al.* Qualidade fisiológica das sementes do milho híbrido simples HS 200 em relação ao tamanho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 576-582, 2001.
- ANDRADE, T. **Controle genético e expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho.** 2015. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2015.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: Physiology of Development and Germination and Dormancy**, 3. ed. New York: Springer, 2013. 329 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas.** 8.ed. São Paulo: Oficina de textos, 2021. 384 p.
- BORGES, A. M. *et al.* Germinação de cultivares de milho em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 58993-59002, 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- CABRAL, P. D. S. *et al.* Genetic effects on seed quality in diallel crosses of popcorn. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 6, p. 502-511, 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.
- COSTA, J. C. *et al.* Tolerance to delay in drying of hybrid maize seeds related to parental line and temperature. **Journal of Seed Science**, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2021.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 4. ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. v. 1, 514 p.
- DUTRA, S. M. F. *et al.* Genes related to high temperature tolerance during maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18047-18058, 2015.

- EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, v. 71, n. 2, p. 428-434, 1958.
- EHRHARDT-BROCARDO, N. C. M.; COELHO, C. M. M. Hydration patterns and physiologic quality of common bean seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1791-1800, 2016.
- FAHAD, S. *et al.* Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2017.
- FERREIRA, E. G. B. S. *et al.* Processo germinativo e vigor de sementes de *Cedrela odorata* L. sob estresse salino. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 99-105, 2013.
- FLORES, A. V. Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* schott em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1147-1154, 2014.
- GOMES, M. S. *et al.* Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.
- KHALID, N. *et al.* Viability of maize (*Zea mays* L.) seeds influenced by water, temperature, and salinity stress. **Acta Hydrologica Slovaca**, v. 22, n. 1, p. 113-117, 2021.
- MANGRAUTHIA, S. K. *et al.* Transcriptome analysis of *oryza sativa* (rice) seed germination at high temperature shows dynamics of genome expression associated with hormones signalling and abiotic stress pathways. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 215-228, 2016.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 660 p.
- MARINI, P. *et al.* Antioxidant activity of corn seeds after thermal stress. **Ciência Rural**, v. 43, n. 6, p. 951-956, 2013.
- NASCIMENTO, W. M. *et al.* Germinação de sementes de tomateiro em diferentes temperaturas: variabilidade fenotípica e heterose. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 216-222, 2016.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. The effect of drying temperature on corn seed quality. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 64, n. 1, p. 487-496, 1984.
- NERLING, D.; COELHO, C.M.M.; NODARI, R.O. Genetic diversity for physiological quality of seeds from corn (*Zea mays* L.) intervarietal crossbreeds. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 4, p. 449-456, 2013.
- OLIVEIRA, A. K. M.; PEREIRA, K. C. L. Efeito de diferentes temperaturas na germinação e crescimento radicular de sementes de jatobá-mirim (*Guibourtia hymenaefolia* (Moric.) J. Léonard). **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 111-116, 2014.

- OLIVEIRA, G. E. *et al.* Relationship among physiological quality, heterosis, and amylase gene expression in maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8623-8633, 2015.
- PRAZERES, C. S.; COELHO, C. M. M. Divergência genética e heterose relacionada à qualidade fisiológica em sementes de milho. **Bragantia**, v. 75, n. 4, p. 411-417, 2016.
- PRAZERES, C. S.; COELHO, C. M. M. Hydration curve and physiological quality of maize seeds subjected to water deficit. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1179-1186, 2017.
- PRAZERES, C. S.; COELHO, C. M. M.; SOUZA, C. A. Biochemical compounds and enzymatic systems related to tolerance to water deficit of maize seedlings. **Plant Physiology Reports**, v. 6, n. 1, p. 402-411, 2021.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020.
- RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Genética na agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012.
- RODRIGUES A.P.D.C. Absorção de água por semente de salsa, em duas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 49-54, 2008.
- ROSADO, L. D. S. *et al.* Evidence of maternal effect on germination and vigor of sour passion fruit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 4, p. 1-9, 2020.
- SANTOS, H. O. *et al.* Effect of soil temperature in the emergence of maize seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 1, p. 479-484, 2019.
- SANTOS, M. C. *et al.* Enzymatic activity and gene expression related to drought stress tolerance in maize seeds and seedlings. **Bioscience Journal**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2021.
- SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELI, C. Germinação de sementes de milho com diferentes níveis de vigor em resposta à diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 35, n. 1, p. 215-226, 2014.
- SILVA NETA, I. C. *et al.* Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.
- SILVA NETA, I. C. *et al.* Gene expression and genetic control to cold tolerance during maize seed germination. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 188, p. 1-14, 2020.
- SLIWINSKA, E.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, D. Germination of Arabidopsis thaliana seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3587-3594, 2009.
- SOUTO, A. G. L. *et al.* Effect of temperature on passion fruit emergence and seedling vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 1, p. 50-57, 2017.

VILELA, D. R. **Características agronômicas e expressão de enzimas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em linhagens de milho.** 2019. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019.

YOUSAF, M. I. *et al.* Variations among maize (*Zea mays* L.) hybrids in response to heat stress: hybrids selection criteria. **Turkish Journal of Field Crops**, v. 26, n. 1, p. 8-17, 2021.

### CAPÍTULO 3 ANÁLISE PROTEÔMICA EM SEMENTES DE MILHO SUBMETIDAS À ALTA TEMPERATURA DURANTE A GERMINAÇÃO

#### RESUMO

Altas temperaturas influenciam vários processos celulares e induzem mudanças em níveis bioquímicos, moleculares e fisiológicos. A tolerância à altas temperaturas durante a germinação de sementes e emergência de plântulas de milho é fundamental para o estabelecimento das plantas no campo. Diante disso, objetivou-se avaliar a expressão das proteínas que possam estar relacionadas a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho. Foram utilizadas duas linhagens de milho, classificadas como tolerantes (L91), e não tolerante (L44) à alta temperatura durante a germinação e emergência de plântulas, além de seus respectivos híbridos e recíprocos resultantes dos cruzamentos dessas duas linhagens, e a população F<sub>2</sub>. As análises proteômicas foram realizadas em sementes embebidas até a fase III da curva de embebição de água, sob temperaturas de 25 (controle) e 35 °C (alta temperatura). As expressões das enzimas piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), alfa-amilase ( $\alpha$ -amilase), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e proteínas resistentes ao calor, foram avaliadas por meio da técnica de eletroforese em gel. Também quantificados o peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, e da proteína total, por meio da técnica espectrofotometria de microplacas. Maior expressão das enzimas ADH, GOT, EST,  $\alpha$ -amilase e SOD, avaliadas pela técnica de eletroforese e de proteína total e MDA, avaliadas por meio de espectrofotometria de microplacas foram observadas em sementes da linhagem L91 e naquelas de genótipos em que esta linhagem foi utilizada como parental feminino, quando submetidas a germinação à 35 °C. Para estes mesmos genótipos e sob as mesmas condições de germinação, à 35 °C, menor expressão foi verificada para as enzimas PDC, MDH, CAT e POX, avaliadas pela técnica de eletroforese e de CAT, APX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e SOD, avaliadas por meio de espectrofotometria de microplacas. Assim, há variações das expressões de enzimas associadas à respiração e ao sistema antioxidante em sementes secas e embebidas à 25 e 35 °C, de genótipos classificados quanto a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e emergência de plântulas. As enzimas da respiração piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase e as do sistema antioxidantes superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase foram identificadas como bons marcadores para avaliar os genótipos de milho tolerantes à alta temperatura durante a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas. Há maior expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase e esterase em genótipos tolerantes à alta temperatura.

Palavras-chave: *Zea mays*. Estresse térmico. EROs. Sistema antioxidante.

## ABSTRACT

High temperatures influence many cellular processes and induce changes at biochemical, molecular and physiological levels. Tolerance to high temperatures during seed germination and emergence of corn seedlings is essential for the establishment of plants in the field. Therefore, the objective was to evaluate the expression of proteins that may be related to high temperature tolerance during the germination process and initial development of corn seedlings. Two maize inbreds were used, classified as tolerant (L91) and non-tolerant (L44) to high temperature during germination and seedling emergence, in addition to their respective hybrids and reciprocals resulting from the crossings of these two lines, and the F<sub>2</sub> population. Proteomic analyzes were performed on seeds soaked up to phase III of the imbibition curve, under temperatures of 25 (control) and 35 °C (high temperature). Expressions of the enzymes pyruvate decarboxylase (PDC), alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH), esterase (EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), alpha-amylase ( $\alpha$ -amylase), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and heat-resistant proteins were evaluated by the gel electrophoresis technique. Hydrogen peroxide, lipid peroxidation and the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, and total protein were also quantified using the microplate spectrophotometry technique. Higher expression of ADH, GOT, EST,  $\alpha$ -amylase and SOD enzymes, evaluated by electrophoresis technique, and total protein and MDA, evaluated by microplate spectrophotometry, were observed in seeds of the L91 line and in those of genotypes in which this line was used as a female parental, when submitted to germination at 35°C. For these same genotypes and under the same germination conditions, at 35 °C, lower expression was verified for the enzymes PDC, MDH, CAT and POX, evaluated by the electrophoresis technique and CAT, APX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SOD, evaluated by microplate spectrophotometry. Thus, there are variations in the expression of enzymes associated with respiration and the antioxidant system in dry and soaked seeds at 25 and 35 °C, of genotypes classified as high temperature tolerant during the process of seed germination and seedling emergence. The enzymes related to respiration such as pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase and the antioxidant system superoxide dismutase, catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase were identified as good markers to evaluate high temperature tolerant corn genotypes during seed germination and early seedling development. There is greater expression of  $\alpha$ -amylase and esterase enzymes in high temperature tolerant genotypes.

Keywords: *Zea mays*. Heat stress. ROS. Antioxidant system.

## 1 INTRODUÇÃO

A temperatura influencia em vários processos bioquímicos, moleculares e fisiológicos nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas (TIWARI; YADAV, 2019; SHRESTHA; GURUNG; DHITAL, 2018). Na cultura do milho, Li *et al.* (2015) consideram o processo de germinação de sementes e a emergência de plântulas como os mais sensíveis ao estresse de alta temperatura, em função da influência destes sobre a população de plantas e rendimento da cultura (SABAGH *et al.*, 2020).

Assim, elucidar os eventos que acontecem durante o processo de germinação de sementes expostas às altas temperaturas, por meio de análises bioquímicas e moleculares é importante em programas de melhoramento visando a seleção de genótipos com tolerância à altas temperaturas nos processos de germinação e emergência de plântulas.

A alta temperatura aumenta a produção e o acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem afetar os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (TIWARI; YADAV, 2019; SANTOS *et al.*, 2017), além de alterar a expressão de enzimas antioxidantes, aumentar a peroxidação lipídica que avança para a degradação de membranas e pode levar à morte celular (MARINI *et al.*, 2013; GILL; TUTEJA, 2010).

No entanto, as células vegetais possuem um mecanismo de defesa eficiente para a remoção das EROs que é amplamente conhecido, o sistema antioxidante (SANTOS *et al.*, 2017). Enzimas que fazem parte do complexo antioxidante são: superóxido (SOD), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (CHOUDHURY *et al.*, 2017; MITTLER, 2017), dentre outras. Essas enzimas são os principais agentes responsáveis na eliminação das espécies reativas de oxigênio em células e são utilizadas como marcadores em condições de estresse abióticos (MARQUES *et al.*, 2019).

O equilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de ativação do sistema de defesa antioxidante reflete resposta da planta ao estresse e, conseqüentemente, a tolerância às condições adversas a que as plantas estão submetidas (MITTLER, 2002; MATOS; BORGES; SILVA, 2015; MITTLER, 2017). Plantas estão sujeitas aos estresses durante todo o ciclo. Altas temperaturas durante os processos de germinação e emergência de plantas podem induzir a expressão de enzimas que ativam em diferentes rotas.

Além das enzimas antioxidantes, o estresse térmico pode causar alterações em enzimas envolvidas na respiração, como a piruvato descarboxilase (PVD) e álcool desidrogenase (ADH)

que atuam na rota anaeróbica, e a malato desidrogenase (MDH) que atua na rota aeróbica. Essas enzimas também vêm sendo utilizadas como marcadores moleculares para elucidar eventos que ocorrem durante o processo de germinação, como também para condições de estresse ao longo do armazenamento (CARVALHO *et al.*, 2014). Outras enzimas como a esterase (EST) pode estar associada à integridade do sistema de membrana (PIRES *et al.*, 2017), uma vez que atua em ésteres de membrana.

Com o aumento da temperatura no desenvolvimento de plantas, tem sido observado o aumento da expressão de proteínas resistentes ao calor (SCHULZE *et al.*, 2005; MANI, 2016). Também tem sido observado o acúmulo de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Accumulated*), às quais tem sido associada tolerância às condições de estresse (ANDRADE, 2015), particularmente sob estresse de temperatura (ZARF *et al.*, 2016). Proteínas LEA parecem estar envolvidas na manutenção da função de proteínas e na integridade de membranas celulares (FRAGKOSTEFANAKIS *et al.*, 2016 ; OHAMA *et al.*, 2016 ).

Maior conhecimento dos mecanismos envolvidos nos processos de germinação de sementes e emergência de plântulas em nível molecular ajudará na definição de estratégias apropriadas em processo de seleção para o desenvolvimento de genótipos de milho com tolerância à alta temperatura.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a expressão das proteínas relacionadas a tolerância à alta temperatura em sementes de milho, durante o processo de germinação e emergência de plântulas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização dos experimentos**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Sementes, Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Para a realização do trabalho, foram utilizadas sementes das linhagens classificadas como tolerante (L91) e não tolerante (L44) do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Lavras (UFLA), assim como sementes híbridas derivadas de cruzamentos entre estas linhagens e de seus recíprocos, além da população F<sub>2</sub> produzidas a partir das sementes híbridas.

### **2.2 Análises proteômicas pela técnica de eletroforese**

#### **2.2.1 Expressão das enzimas**

Foram utilizadas sementes de milho secas e as submetidas ao processo de embebição até a fase III, quando foi observada a protrusão radicular, nas temperaturas de 25 e 35 °C.

As análises das enzimas piruvato descarboxilase (PDC, EC 4.1.1.1), álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1), malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), esterase (EST, EC 3.1.1.1), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, EC 2.6.1.1), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX, EC 1.11.1.7), foram realizadas por meio da técnica de eletroforese (ALFENAS, 2006). As sementes foram maceradas na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido e posteriormente as amostras foram armazenadas em temperatura de -86 °C.

Para a extração de todas as enzimas utilizou-se o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + 0,1% de β-mercaptoetanol, exceto para a enzima POX, cuja o tampão foi o fosfato de potássio, todos na proporção de 300µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas na geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em um sistema descontínuo, géis de poliacrilamida, modalidade NATIVA-PAGE, a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador).

O tampão de corrida utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi realizada a 150 V por seis horas sob refrigeração. Ao final das corridas, os géis foram revelados conforme metodologias descritas por Alfenas (2006), com modificações. Os géis foram fotografados sobre transluminador.

Para cada enzima foram utilizadas três repetições biológicas. Para a quantificação das enzimas utilizou-se o software ImageJ® (SCHNEIDER *et al.*, 2012) e os resultados expressos em mm<sup>2</sup>. As avaliações foram feitas em função da intensidade e pela presença ou ausência das isoformas obtidas.

## 2.2.2 Proteínas resistentes ao calor

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, foram utilizadas sementes secas e as submetidas a cinco horas de embebição nas temperaturas de 25 e 35 °C. As sementes foram maceradas na presença de nitrogênio e PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas a -86 °C, até a realização da análise.

No processo de extração foram utilizados 100 mg de cada amostra, macerada. Acrescentou-se solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), seguido de homogeneização das amostras em vórtex. Em seguida, foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C, e posteriormente os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e incubados em banho-maria a 85 °C por 15 minutos.

As amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Em outro microtubo, foram adicionados 70 µL do extrato + 40 µL de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5), seguido de imersão em água fervente em banho-maria por 5 minutos (BLACKMAN *et al.*, 1991). Posteriormente, 50 µL de cada amostra foram aplicadas no gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Na primeira canaleta, foram aplicados 10 µL da amostra padrão da proteína. A corrida eletroforética foi realizada a 130 v por seis horas e a coloração do gel foi realizada em solução Coomassie Blue a 0,05%, durante 8 horas e descorados em solução de ácido acético 10% por 4 horas, de acordo com Alfenas (2006). O gel foi fotografado sobre o transluminador.

### 2.2.3 Enzima alfa amilase

Para a extração da enzima alfa amilase ( $\alpha$ -amilase, EC 3.2.1.1), as sementes foram germinadas em rolo de papel, nas temperaturas de 25 e 35 °C, por um período de 72 horas. Posteriormente, os eixos embrionários e escutelos das sementes foram descartados e os endospermas foram macerados, em moinho refrigerado, na presença de nitrogênio líquido e PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas a -86 °C, até a realização das análises. A enzima alfa amilase também foi extraída de sementes secas de milho.

Para a extração foram utilizados 100 mg de cada amostra macerada, logo após, aplicaram-se 300  $\mu$ L do tampão de extração (Tris-HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol). Os materiais foram homogeneizados em agitador vórtex e mantidos em geladeira por período de 12 horas, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C (ALFENAS, 2006).

Em cada canaleta foram aplicados 50  $\mu$ L do extrato, em gel de poliacrilamida a 7,5% (gel separador – contendo amido solúvel 1%) e 4,5% (gel concentrador). Ao término da corrida, o gel foi revelado de acordo Alfenas (2006). Após a revelação, o gel foi fotografado sobre um transluminador. A imagem do gel, foi avaliada utilizando-se do software ImageJ® (SCHNEIDER *et al.*, 2012), os resultados foram expressos em  $\text{mm}^2$ .

## 2.3 Análises pela técnica do espectrofotômetro de microplacas

### 2.3.1 Quantificação do peróxido de hidrogênio

A quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi realizada em 200 mg de sementes, que foram maceradas em nitrogênio líquido e PVP (polivinilpirrolidona). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Foram retirados 90  $\mu$ L dos sobrenadantes de cada amostra e adicionados ao tampão fosfato de potássio e iodeto de potássio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi posteriormente calculado a partir da curva padrão (VELIKOVA *et al.*, 2000). Em cada tratamento foram utilizadas duas amostras das sementes, que constituíram duas repetições biológicas e as análises foram realizadas em duplicatas.

### **2.3.2 Quantificação da peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi medida pela quantidade de Malonaldeído (MDA) nas amostras, determinada pelo método ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrito por Buege e Aust (1978). Amostras de 200 mg de sementes foram maceradas, em moinho refrigerado, na presença de nitrogênio líquido com PVP (polivinilpirrolidona) e homogeneizadas em 1500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Foram retiradas alíquotas de 125 µL do sobrenadante e adicionadas 250 µL de solução, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% de ácido tricloroacético (TCA). De cada tratamento foram utilizadas duas amostras e as análises realizadas em duplicada, as quais foram incubadas em banho-maria a 95 °C por 30 minutos, e resfriadas em gelo durante 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm.

### **2.3.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante avaliada pela técnica de espectrofotometria**

Para a extração das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), foram utilizadas 0,2 g de sementes, maceradas em moinho refrigerado, na presença de nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP), às quais foram homogeneizadas com 1,5 de solução, contendo: 375 µl de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15 µL de EDTA 10 mM (pH 7,0), 75 µl ácido ascórbico 200 mM e 1035 µl de água destilada (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998), em cada microtúbulo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para um novo microtúbulo. Em todos os tratamentos foram utilizadas duas amostras, que constituíram duas repetições biológicas sendo que todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada pela capacidade de a enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT), conforme descrito por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Adicionou-se uma alíquota de 10 µL do extrato enzimático a 190 µL da solução de incubação contendo: 100 µL de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 40 µL de metionina 70mM, 3µL de EDTA 10µM, 30 µL de água destilada, 15 µL de NBT 1 mM e 2 µL de riboflavina 0,2 mM. A placa de acrílico visível, contendo o meio de incubação e a

amostra, foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos antes da leitura. A leitura foi realizada a 560 nm no espectrofotômetro de microplacas.

A atividade da enzima catalase foi realizada de acordo com Havir e McHale (1987). Foi utilizada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e adicionados 190  $\mu\text{L}$  do meio de incubação contendo 100  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 80  $\mu\text{L}$  de água destilada, seguida de incubação a 28 °C e por último foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  peróxido de hidrogênio 250 mM, na placa ultravioleta. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, durante 3 minutos monitorado, medida pelo consumo de peróxido de hidrogênio por meio do espectrofotômetro de microplacas. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36  $\text{Mm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  corrigido para 18  $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , devido ao comprimento de 0,5 cm dos poços da placa UV (REIS, 2013).

Para a atividade da enzima ascorbato peroxidase foi utilizada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, na qual foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  do meio de incubação contendo: 100  $\mu\text{L}$  fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 70  $\mu\text{L}$  de água destilada, seguido de incubação à 28 °C em banho-maria, antes da aplicação nas amostras e por último a aplicação de 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). A microplaca utilizada foi a ultravioleta. A leitura foi realizada a 290 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8  $\text{Mm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  corrigido para 1,4  $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , devido ao comprimento 0,5 cm dos poços da placa UV.

#### **2.3.4 Quantificação da proteína total**

Para determinar a concentração da proteína total, foi utilizado o método Bradford (1976) por meio de espectrofotometria. A extração para a quantificação das proteínas totais foi realizada com o mesmo tampão de extração das enzimas antioxidantes, conforme descrito por Biemelt; Keetman e Albrecht (1998). A placa utilizada para a realização da leitura foi a microplaca visível, na qual foram utilizadas alíquotas de 6  $\mu\text{L}$  e 294  $\mu\text{L}$  de Bradford, para cada amostra. A leitura foi realizada em uma leitura única a 595 nm no espectrofotômetro BioTek Eon™. Neste processo, ocorre uma reação do Bradford com as amostras em diferentes tons de azul escuro.

## **2.4 Delineamento experimental e análise estatística**

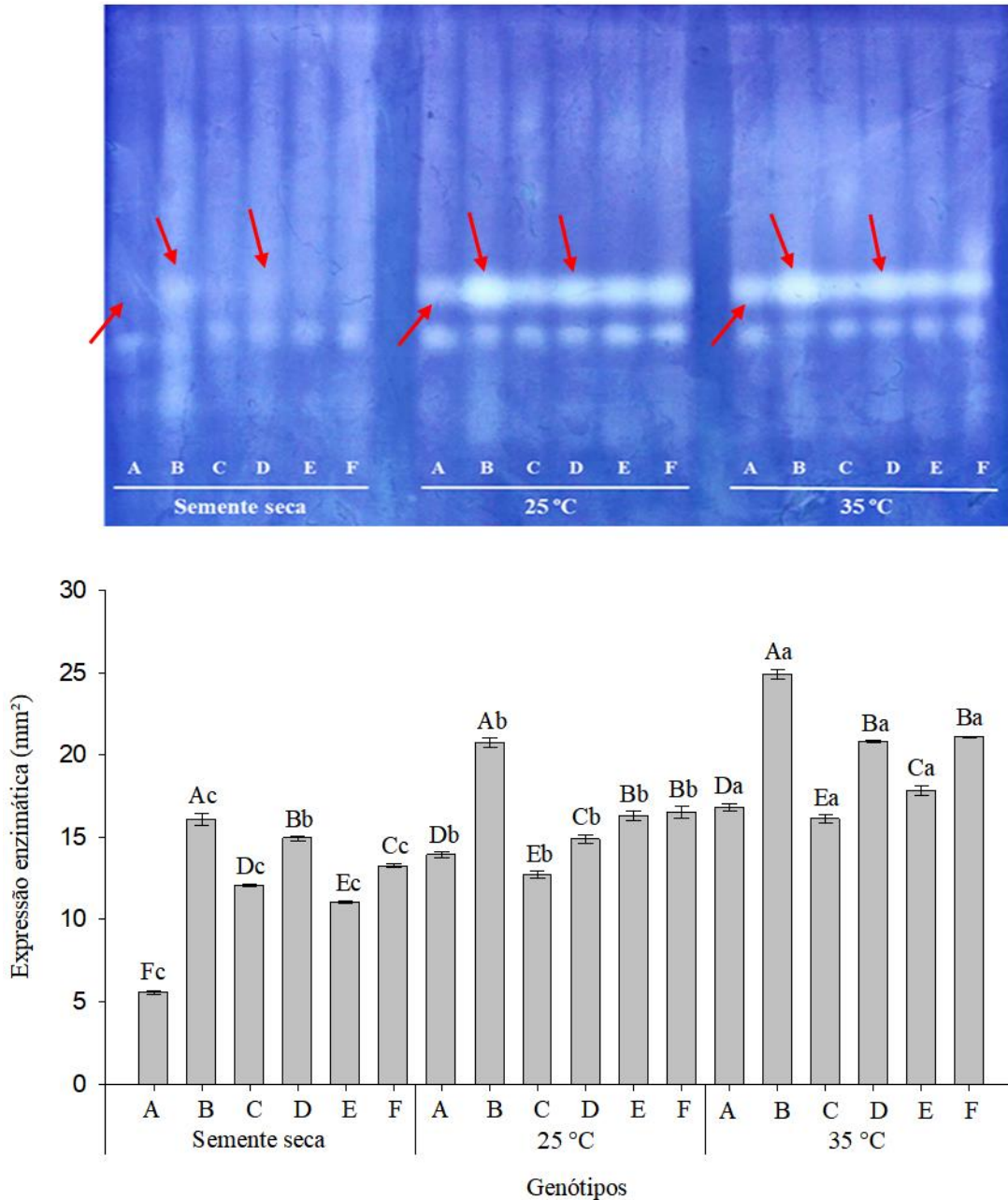
O esquema fatorial utilizado foi de 6 x 2 (genótipos x temperaturas), com os tratamentos distribuídos em três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

Já para a quantificação das proteínas por meio de espectrofotometria de microplacas foi utilizado o esquema fatorial 6 x 2 (genótipos x temperaturas), com os tratamentos distribuídos em duas repetições biológicas. Os dados obtidos foram analisados em planilha Excel (Microsoft), por meio do erro padrão da média.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Quanto ao padrão eletroforético da enzima piruvato descarboxilase (PDC) (FIGURA 1), na qual foi observada menor expressão em sementes secas da linhagem L91 e nas híbridas e da população F<sub>2</sub>, nas quais a linhagem L91 foi utilizada como parental feminino.

Figura 1 - Expressão da enzima piruvato descarboxilase (PDC) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F). A isoforma indicada pelas setas.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

A menor expressão da enzima piruvato descarboxilase também foi observada em sementes destes genótipos, as quais foram germinadas à 25 e 35 °C, com exceção das expressões observadas em sementes das populações F<sub>2</sub> 91x44 e F<sub>2</sub> 44x91 germinadas à 25 °C, que foram estatisticamente iguais (FIGURA 1). Por meio desta mesma figura pode ser observada maior expressão desta enzima em sementes da linhagem L44 e naquelas híbridas e da população F<sub>2</sub> cuja linhagem, (L44), foi utilizada como parental feminino, com exceção das expressões observadas em sementes das populações F<sub>2</sub> 91x44 e 44x91 germinadas à 25 °C, que não diferiram entre si.

Menores expressões da enzima piruvato descarboxilase foram observadas em sementes secas. As expressões foram aumentadas quando as sementes foram germinadas à 25 e 35 °C, foi observada maior expressão quando foram germinadas à 35 °C, independentemente do genótipo avaliado. Foi observada expressão semelhante em sementes secas e germinadas à 25 °C, apenas em sementes híbridas, combinação 44x91, na qual a linhagem foi utilizada como parental feminino.

A piruvato descarboxilase atua no metabolismo anaeróbio da respiração (ALMEIDA *et al.*, 2019). É uma enzima fermentativa, que é responsável pela conversão irreversível do piruvato em acetaldeído e dióxido de carbono, catalisada no citoplasma (LONG *et al.*, 2015).

Como já abordado, a maior expressão desta enzima foi observada em sementes da linhagem L44 germinadas à temperatura de 35 °C, esse genótipo classificado como não tolerante à altas temperaturas. Infere-se assim, que sob altas temperaturas a rota anaeróbica é aumentada com o subsequente aumento da expressão desta enzima e acúmulo de acetaldeído o qual é tóxico às células. Infere-se ainda que a toxicidade do acetaldeído pode ter aumentado o processo deteriorativo das sementes dos genótipos nos quais estava envolvida a linhagem L44.

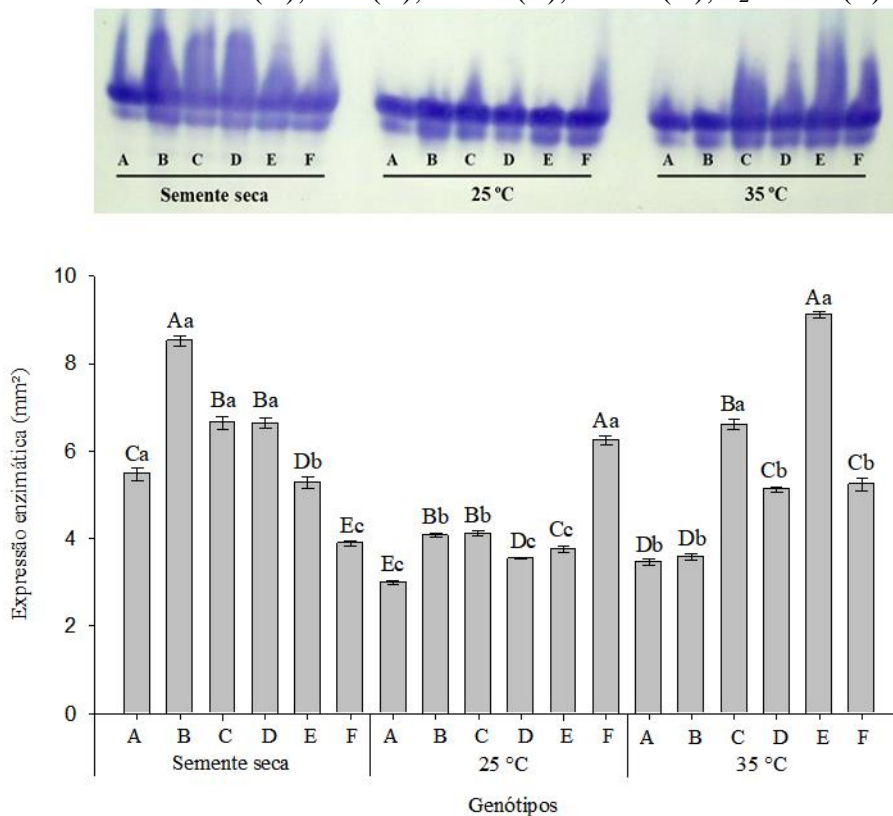
A consequência final pode ser observada por meio do comprometimento da qualidade fisiológica destas sementes. Importante ressaltar que em todas as sementes dos genótipos envolvendo a linhagem L44, como parental feminino a expressão da enzima piruvato descarboxilase foi maior, o que foi observado também em sementes da linhagem L44.

Por outro lado, em sementes da linhagem L91, classificada como tolerante, e naquelas dos genótipos envolvendo esta linhagem como parental feminino 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44 a expressão desta enzima foi menor, o que está associado à menor produção de acetaldeído o que pode explicar a maior tolerância das sementes à altas temperaturas durante o processo de germinação. Isto fica ainda mais evidente quando se compara a expressão desta enzima em sementes da

linhagem L91 e nas híbridas 91x44, quando não foi observada diferença da atividade da enzima quando sementes foram germinadas à 25 e 35 °C.

Na Figura 2, observa-se a expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH). Essa enzima atua em seguida da enzima piruvato descarboxilase na respiração anaeróbica, pois converte o acetaldeído produzido a partir da piruvato descarboxilase, em etanol, um composto com menor toxicidade (LEMES *et al.*, 2018; CHAENGSAKUL *et al.*, 2019). Assim, quanto maior expressão da enzima álcool desidrogenase, as sementes ficam menos suscetíveis à ação deletéria do acetaldeído (VEIGA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2017).

Figura 2 - Expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

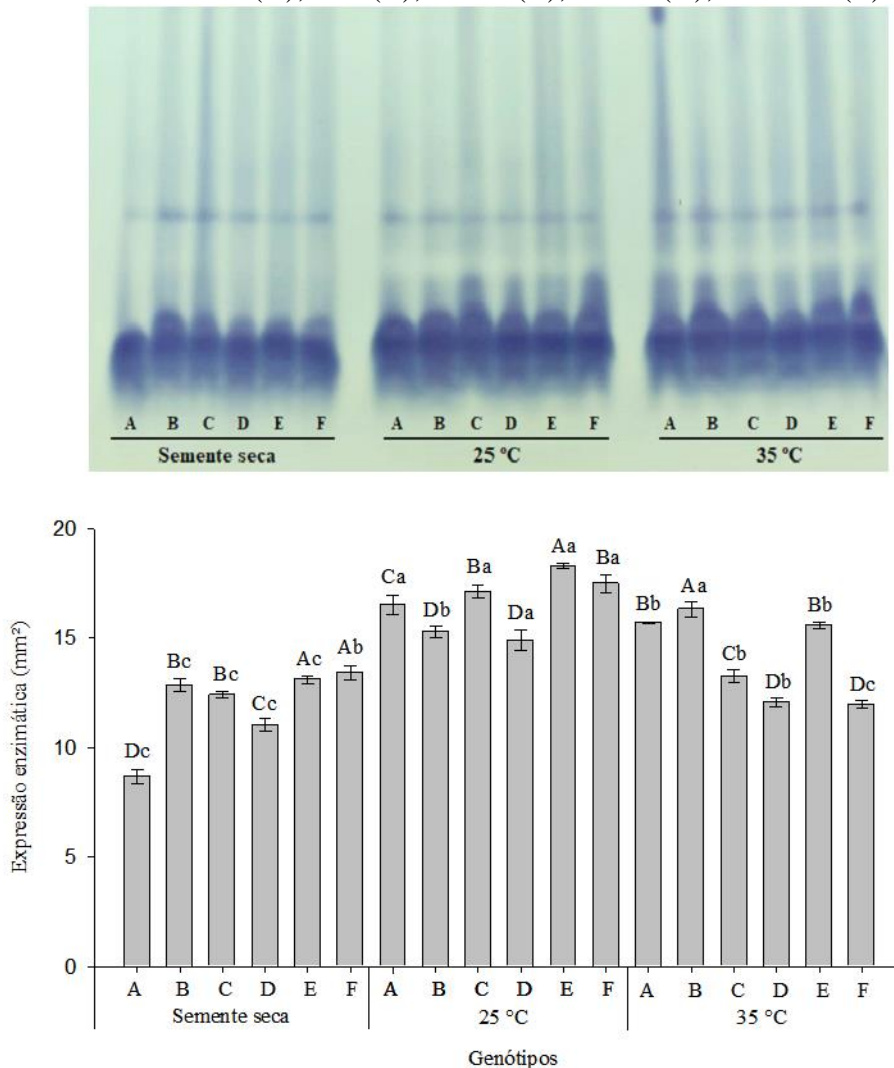
Maior expressão desta enzima foi observada em sementes secas, das linhagens L91 e L44 e dos respectivos híbridos quando comparada à observada em sementes germinadas à 25 e 35 °C.

Sabe-se que esta enzima está envolvida na rota anaeróbica e participa de reações nas quais a partir do acetaldeído é produzido o etanol. Em sementes da linhagem L91 e L44 germinadas à 35 °C, não houve diferença significativa em relação a expressão da ADH. No entanto, nesta mesma condição maior expressão da enzima foi observada em sementes que a linhagem L91 foi utilizada como parental feminino, híbrido 91x41 e F<sub>2</sub> 91x44.

Assim, infere-se que nestas sementes o acetaldeído tenha sido transformado em etanol o que estaria relacionado à menor toxicidade, menor deterioração e melhor qualidade fisiológica, o que poderia ser explicado pela maior tolerância destes genótipos para característica de germinação de sementes sob alta temperatura. Carvalho *et al.* (2014) observaram ao longo do armazenamento, maior expressão da ADH nas sementes com maior qualidade fisiológica.

Quanto à expressão da enzima malato desidrogenase (MDH) (FIGURA 3), menor expressão foi observada em sementes secas quando comparadas à observada em sementes submetidas à germinação à 25 e 35 °C, com exceção daquela observada em sementes da população F<sub>2</sub> 44x91, quando menor expressão foi observada em sementes germinadas à 35 °C. A menor expressão em sementes secas pode ser explicada pelo fato de a respiração em sementes secas ser intensificada quando da embebição de sementes.

Figura 3 - Expressão da enzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

Quando as sementes foram germinadas sob alta temperatura, 35 °C, foi observada menor atividade em sementes da linhagem L91 em relação à observada na linhagem L44 (FIGURA 3). No entanto, nesta mesma condição, em sementes nas quais estão envolvidas esta mesma linhagem, como parental feminino híbrido 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44, foi observada maior expressão desta enzima em relação à observada em sementes dos genótipos 44x91 e F<sub>2</sub> 44x91.

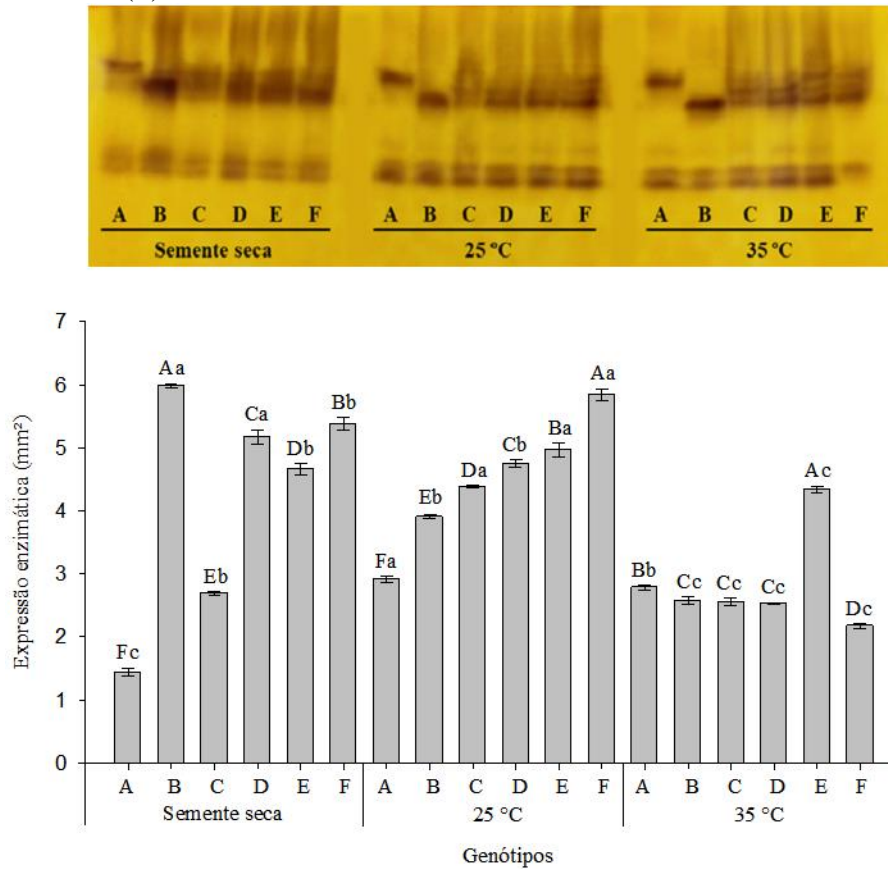
Por meio de pesquisas tem sido observada maior respiração em sementes menos deterioradas. Santos *et al.* (2016), observaram que em sementes de milho com alto vigor, as

sementes respiram mais, comparando com as sementes menos vigorosas. Além disso, os autores verificaram maior expressão da enzima MDH, nos lotes de sementes de milho com maior vigor.

A respiração é mediada por várias enzimas é fundamental para que ocorra a retomada do crescimento do eixo embrionário das sementes. Pires *et al.* (2017), ao avaliarem em sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) embebidas em água e em soluções de PEG 6000, durante o processo de germinação, observaram diferenças significativas na expressão da MDH, assim como observado na presente pesquisa.

Quanto à enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) (FIGURA 4), menor expressão ocorreu quando as sementes dos genótipos L44, 91x44, 44x91, F<sub>2</sub> 91x44 foram expostas a temperatura de 35 °C, quando comparada à expressão observada em sementes secas. Já quando se compara a expressão desta enzima em sementes germinadas à 25 e 35 °C houve redução da expressão em sementes de todos os genótipos com o aumento da temperatura (35 °C).

Figura 4 - Expressão da enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

Tanto em sementes secas quanto naquelas germinadas à 25 °C, menor expressão desta enzima foi observada em sementes da linhagem L91 e dos genótipos nas quais esta linhagem foi utilizada como parental feminino 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44, quando comparada às observadas em sementes da linhagem L44 e 44x91 e F<sub>2</sub> 44x91.

Nas sementes secas da linhagem L91, a expressão dessa enzima é baixa, mas quando as sementes foram submetidas às temperaturas de 25 e 35 °C, houve aumento da atividade desta, diferentemente do que ocorreu em sementes da linhagem L44.

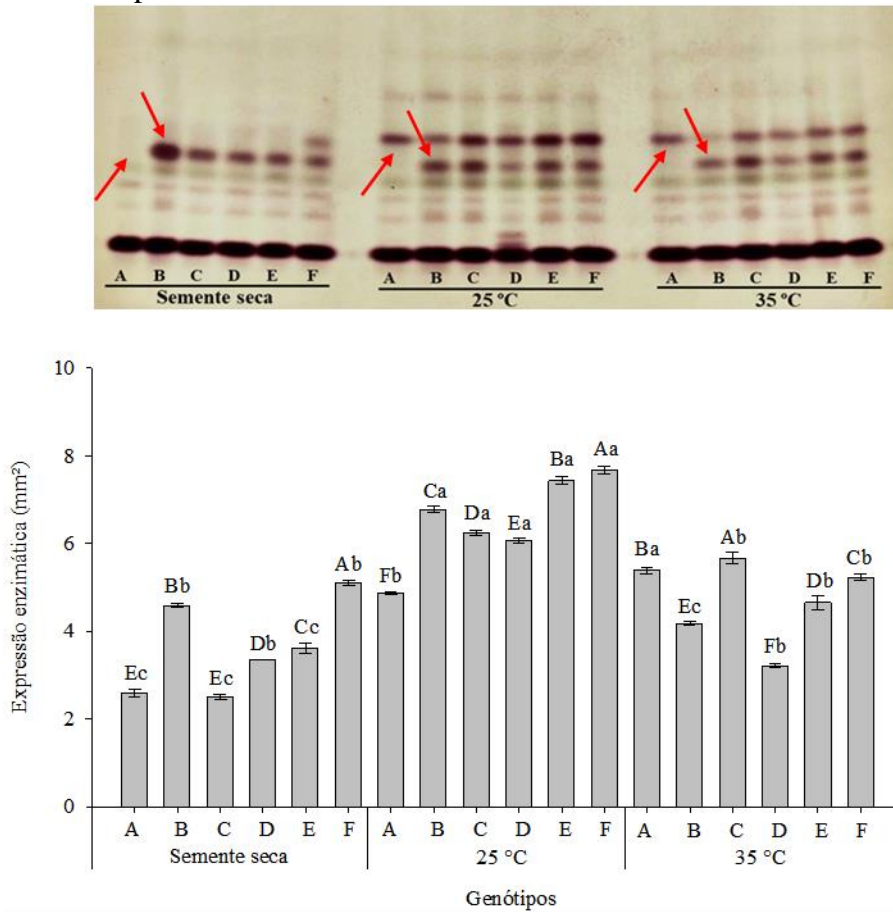
A enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs ou para redução do  $\alpha$ -cetoglutarato para a síntese de novos aminoácidos destinados ao desenvolvimento do embrião (VIEIRA *et al.*,

2009; ALMEIDA *et al.*, 2019). Além de participar do metabolismo de aminoácidos, esta enzima também está envolvida no metabolismo do nitrogênio participando de reações de transaminação durante a eliminação de nitrogênio dos ácidos (WREGGE *et al.*, 2011; PEDÓ *et al.*, 2015).

O aumento da atividade desta enzima para a linhagem L91, que ocorreu principalmente na temperatura de 25 °C, pode estar relacionado com a síntese de aminoácidos na via metabólica durante a germinação (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Nas sementes submetidas à temperatura de 25 °C, foram observadas novas isoformas da enzima esterase em sementes de todos os genótipos (FIGURA 5). Em sementes da linhagem L91 e das derivadas 91x44 F<sub>2</sub> 91x44, secas e germinadas à 25 °C foram observadas menores expressões da enzima esterase, quando comparadas às observadas em sementes da linhagem L44 e das derivadas 44x91 e F<sub>2</sub> 44x91. No entanto, quando germinadas à 35 °C houve aumento da expressão desta enzima em sementes dos genótipos L91 e 91x44 em relação a observada em sementes dos genótipos L44 e 44x91.

Figura 5 - Expressão da enzima esterase (EST) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F). A isoforma indicada pelas setas.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

Maior expressão desta enzima foi observada em sementes de todos os genótipos, germinadas à 25°C em relação à observada em sementes secas e também quando comparada à observada em sementes germinadas à 35 °C com exceção da observada na linhagem L91, quando houve maior expressão à 35 °C.

Ao analisar o zimograma observa-se diferenças quantitativas (intensidade de bandas) e qualitativas (presença e ausência de bandas) entre os genótipos, entre sementes secas, germinadas à 25 e 35 °C, o que refletem na expressão final observada no gráfico em barras (FIGURA 5).

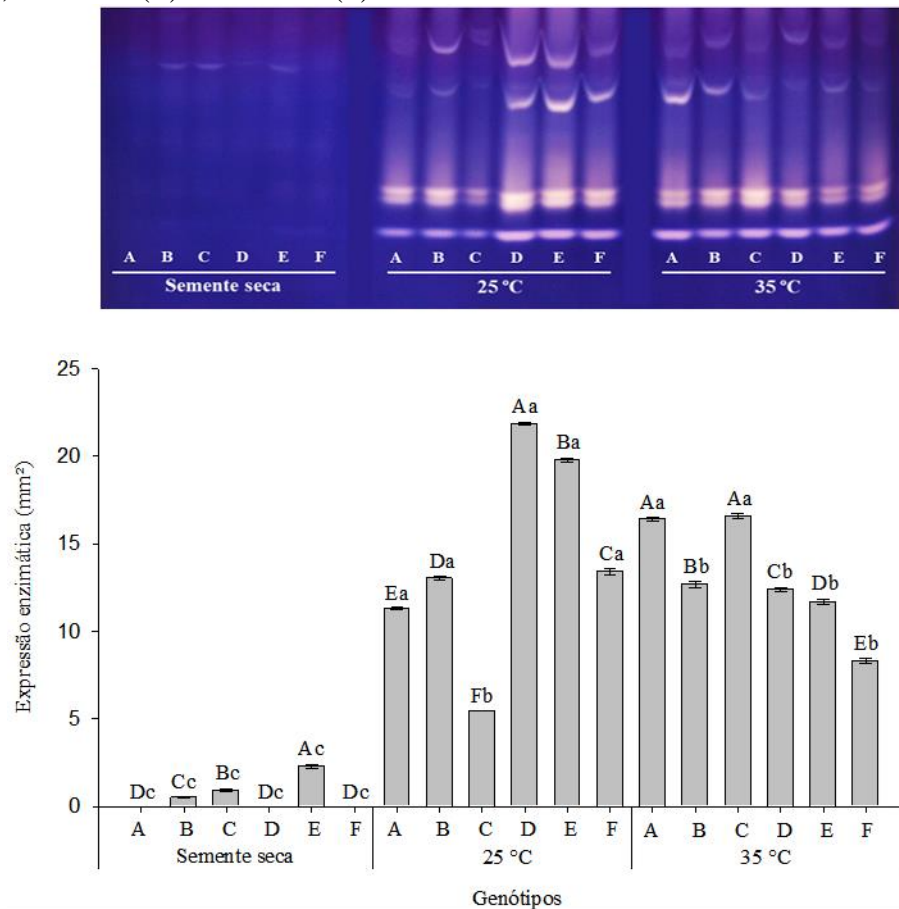
Silva Neta *et al.* (2015), ao estudarem a composição química das sementes destas linhagens, observaram maior porcentagem de ácidos graxos saturados na linhagem L44 quando comparada à linhagem L91. Assim, quanto maior a saturação lipídica, mais densa e rígida é a membrana, o que pode estar associado à baixa tolerância da linhagem L44 à alta temperatura durante a germinação.

Pelo fato de as sementes da linhagem L91 ter maior porcentagem de ácidos graxos insaturados e maior a saturação lipídica da membrana, a probabilidade de se manter fluida, e manter as atividades mesmo em condições de alta temperatura sem afetar a qualidade fisiológica das sementes é maior. Isso pode estar associado à maior expressão desta enzima em sementes da linhagem L91 e do híbrido 91x44 germinadas à 35 °C.

A menor expressão dessa enzima em sementes secas da linhagem L91 também foi observada por Dutra *et al.* (2015) e Silva Neta *et al.* (2015). Os autores associaram a menor expressão desta à alta qualidade fisiológica das sementes, quando submetidas à condição de estresse.

Quanto enzima alfa amilase (FIGURA 6), a expressão em sementes secas foi nula ou muito baixa. Segundo Kigel e Galili (1995), em sementes secas não há atividade da  $\alpha$ -amilase, pois ela é uma enzima hidrolítica e precisa ser sintetizada 'de novo'. Essa enzima é secretada pela camada de aleurona em resposta à ação das giberelinas liberadas pelo embrião, após o início da embebição (MARCOS FILHO, 2015).

Figura 6 - Expressão da enzima  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -A) em sementes de milho seca e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C por 72h. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

Houve menor expressão da  $\alpha$ -amilase em sementes da linhagem L91 e nas híbridas cujo parental feminino foi a L91. A maior expressão foi observada nas sementes dos genótipos 44x91, F<sub>2</sub> 91x44 e na linhagem L44. Silva Neta *et al.* (2015), também observaram menor expressão da enzima alfa amilase em sementes submetidas temperatura de 25 °C e nas da linhagem L91 durante o processo de germinação e ainda maior expressão nas sementes da linhagem L44, quando comparadas com a das sementes da linhagem L91.

Já quando as sementes foram submetidas à temperatura de 35 °C, a maior expressão dessa enzima foi observada em sementes da linhagem L91 e nas do híbrido 91x44 e menor expressão em sementes da L44 e nos dos genótipos 44x91, F<sub>2</sub> 91x44 e F<sub>2</sub> 44x91. Vale destacar que em sementes da linhagem L91 germinadas à 35 °C foi observada uma nova isoforma a qual

estava ausente na temperatura de 25 °C. Para as populações F<sub>2</sub> em ambas temperaturas, a maior expressão foi observada no genótipo F<sub>2</sub> 91x44.

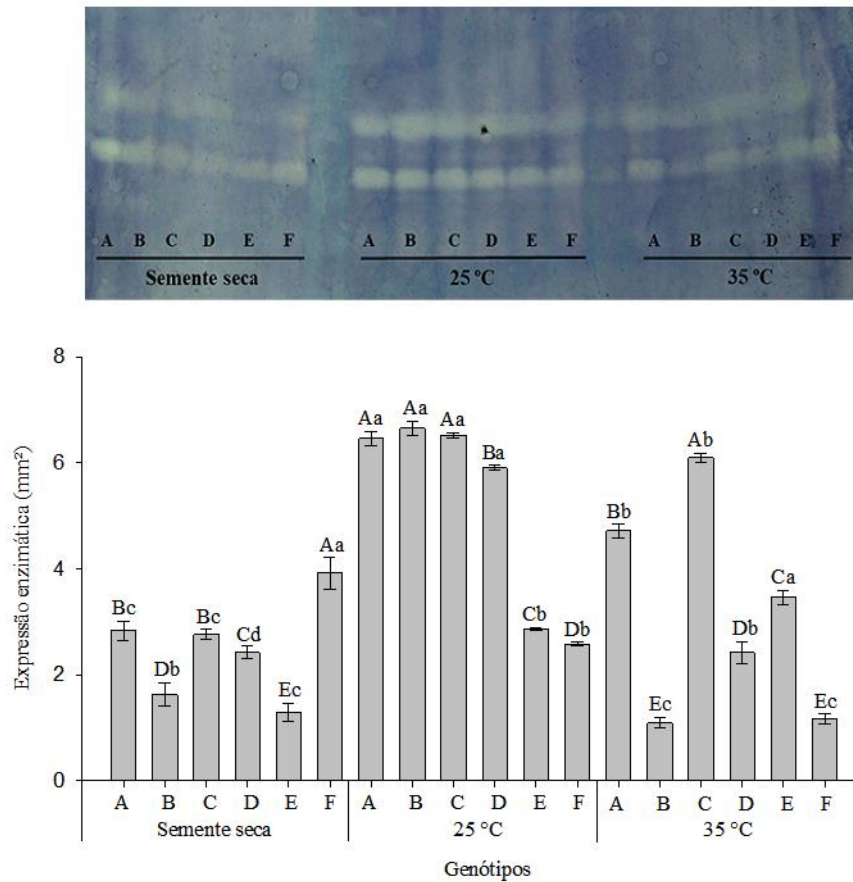
A alfa amilase é a principal enzima relacionada à hidrólise do amido presente no endosperma, importante como fonte de energia para o crescimento do eixo embrionário (DINIZ *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018). Em sementes de milho é uma das principais enzimas envolvidas no processo de germinação.

É importante ressaltar que à 35 °C, sob estresse, a expressão desta enzima aumentou quando comparada à observada à 25 °C. Isso pode estar associado a maior tolerância desta linhagem à altas temperaturas durante o processo de germinação das sementes, porque há manutenção da atividade dessa enzima à alta temperatura.

Dutra *et al.* (2015) não verificaram relação entre a expressão da  $\alpha$ -amilase e a qualidade fisiológica das sementes das linhagens de milho, submetidas a deterioração controlada. Oliveira *et al.* (2013) relatam que além dos genes das amilases, diversos outros genes que podem estar envolvidos na qualidade fisiológica, como os da respiração.

Para a enzima superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 7), maior expressão foi observada em sementes da linhagem L91, nas dos híbridos 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44 em comparação com a observada em sementes da linhagem L44, 44x91 e F<sub>2</sub> 44x91, resultado este que pode estar associado a tolerância da linhagem L91 à alta temperatura. Ressalta-se que, de uma maneira geral, maior atividade desta enzima foi observada em sementes germinadas à 25 °C. A expressão da SOD reduz quando as sementes são germinadas à 35 °C, com exceção do observado para o genótipo F<sub>2</sub> 91x44.

Figura 7 - Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



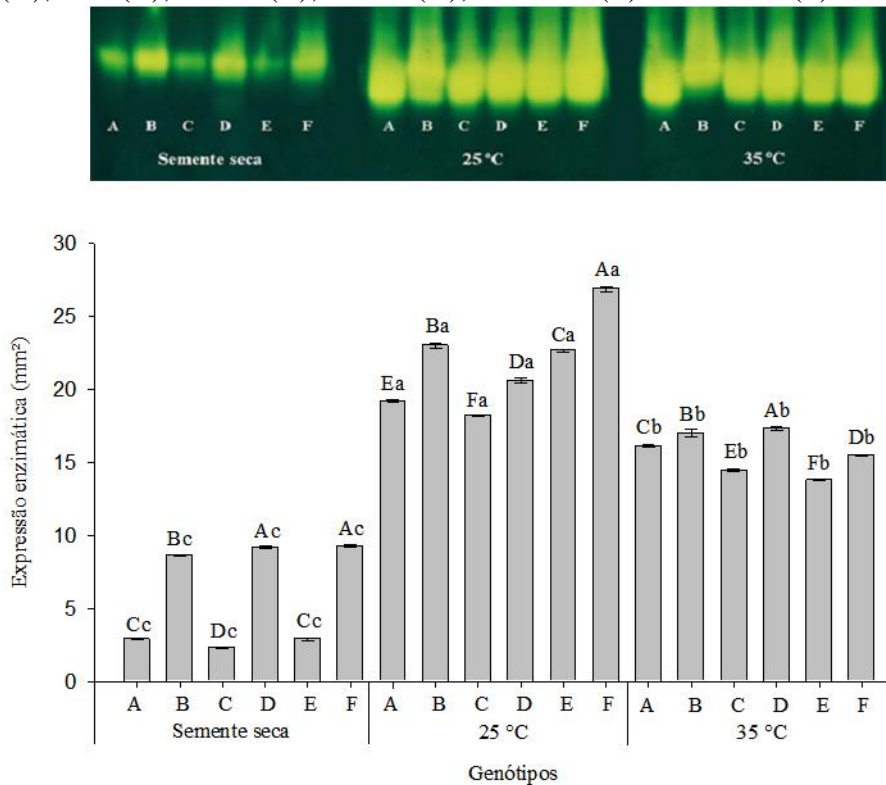
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

A SOD é a primeira enzima do sistema antioxidante que atua para reduzir os efeitos de EROs, por meio da dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (PAUL; ROYCHOUDHURY, 2017; SHARMA *et al.*, 2012; GILL; TUTEJA, 2010). Assim, sob altas temperaturas durante o processo de germinação, a maior atividade desta em genótipos tolerantes pode estar associada à maior proteção das células nestas condições.

Como observado para a enzima SOD, maior atividade da enzima catalase (CAT) foi observada em sementes germinadas à 25 °C, a menor atividade foi observada em sementes secas em todos os genótipos avaliados (FIGURA 8).

Figura 8 - Expressão da enzima catalase (CAT) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

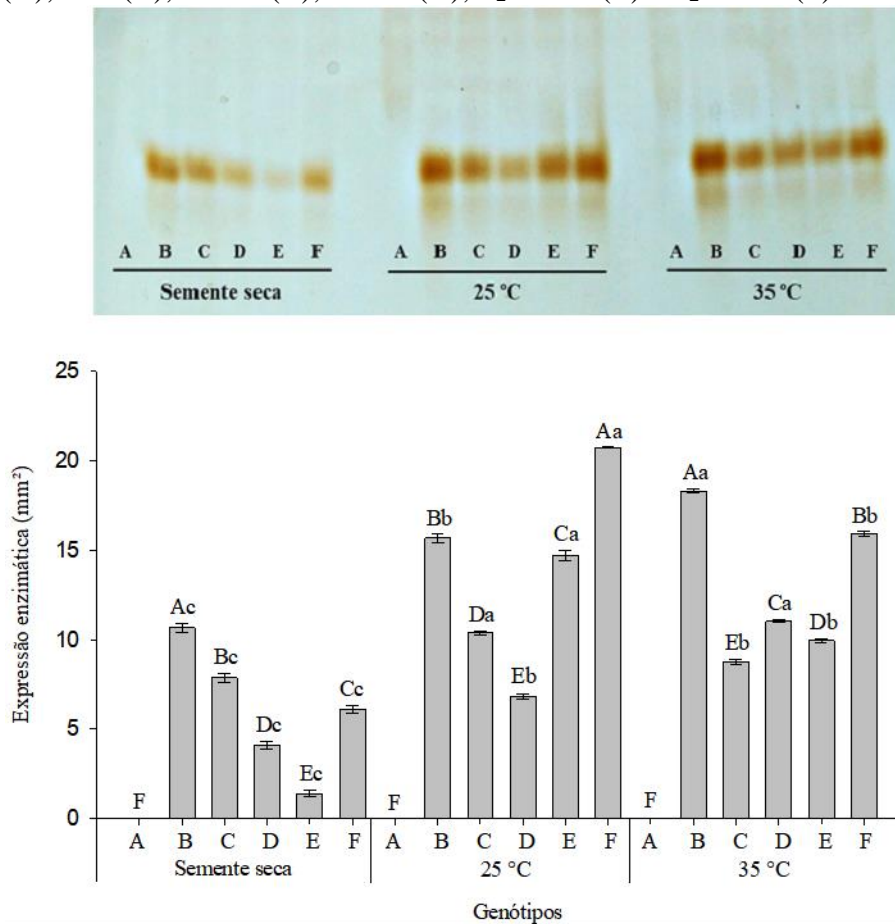
Quando a expressão desta enzima é avaliada em sementes secas, germinadas à 25 e 35 °C comparando-se os genótipos, pode ser observada menor atividade em sementes da linhagem L91 e também em sementes cujas combinações envolvem esta linhagem como parental feminino 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44, quando comparadas às observadas em sementes dos genótipos da linhagem L44, 44x91 e F<sub>2</sub> 44x91.

A catalase está envolvida na desintoxicação das células, por meio da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em moléculas menores, como a água e oxigênio (CHELIKANI; RAMANA; RADHAKRISHNAN, 2005; PAUL; ROYCHOUDHURY 2017; MARQUES *et al.*, 2019).

Assim, a menor atividade em sementes da L91, H91x44 e F<sub>2</sub> 91x44, genótipos de alguma forma considerados mais tolerantes à altas temperaturas durante o processo de germinação, podem ser atribuídos à menor necessidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das células ou pela baixa concentração nas células ou pela capacidade de tolerância a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem danos.

Na Figura 9, referente ao zimograma da enzima peroxidase (POX), em sementes secas da linhagem L91, nas submetidas à germinação à 25 e 35 °C não houve expressão dessa enzima. Menor atividade foi observada em sementes secas quando comparadas às germinadas à 25 e 35 °C.

Figura 9 - Expressão da enzima peroxidase (POX) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos, e minúscula, entre as sementes secas e as temperaturas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott*, à 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2022).

A 35 °C maior expressão da enzima foi observada em sementes da linhagem L44 e do genótipo F<sub>2</sub> 44x91. Vale destacar, que embora não tenha ocorrido expressão da enzima nas sementes da linhagem L91, na maioria das combinações nas quais a linhagem L91 foi utilizada como parental feminino houve expressão desta em sementes secas, germinadas à 25 e 35 °C. À

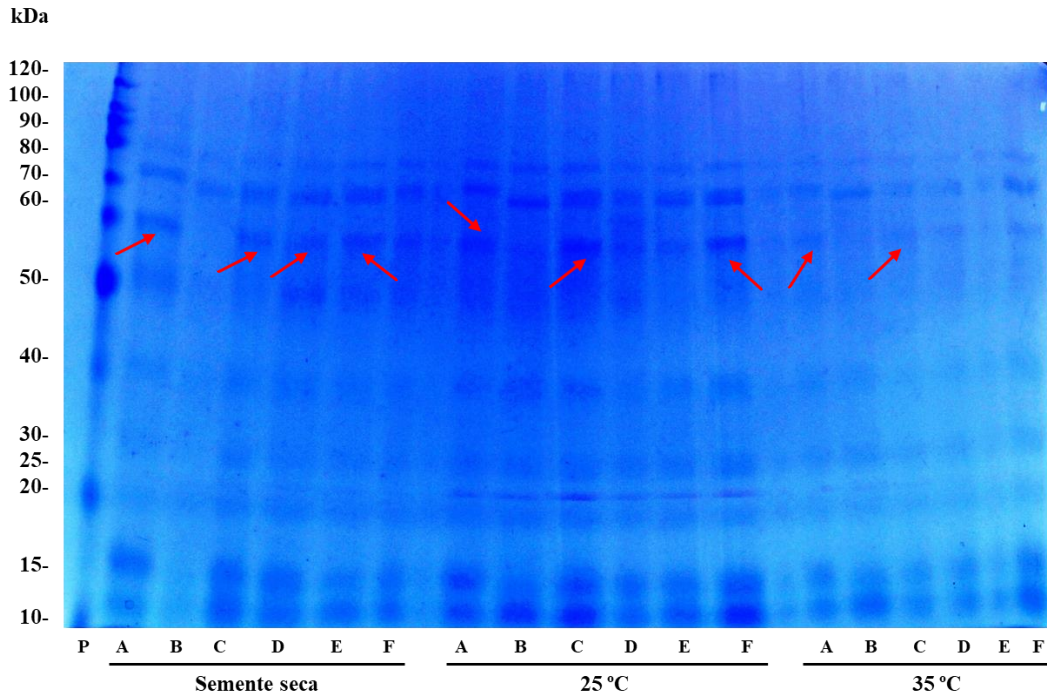
35 °C, sob alta temperatura, maior expressão foi observada em sementes nas quais a linhagem L44 estava envolvida como parental feminino.

Quando se compara a expressão da POX entre as sementes dos genótipos avaliados, menor expressão foi observada em sementes da linhagem L91 e nas dos genótipos envolvendo esta linhagem como parental feminino, com exceção da observada em sementes do híbrido 91x44. Já nas sementes da linhagem L44, 44x91 e F2 44x91 verificou-se maior atividade.

Assim como a catalase, a peroxidase está envolvida na remoção dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta atua diretamente na remoção deste composto nos cloroplastos e citosol, enquanto a catalase atua principalmente nos peroxissomos (LIU; SOUNDARARAJAN; MANIVANNAN, 2019; MARQUES *et al.*, 2019). Em condições de estresse térmico, Santos *et al.* (2017), observaram aumento na atividade da CAT e POX, quando as sementes de brauna (*Melanoxylon brauna*), foram submetidas a temperatura de 35 °C.

Na Figura 10, encontra-se o zimograma da expressão de proteínas resistentes ao calor (PRC). Em sementes secas, verificou-se menor expressão da linhagem L44 em relação aos demais genótipos. Nos híbridos, recíprocos e a população F<sub>2</sub>, observou-se polimorfismo semelhante com pesos moleculares diferentes. É importante ressaltar que, em peso 10 e 15 kDa, não há o aparecimento de proteínas na linhagem L44, no entanto, houve o aparecimento de proteínas em sementes dos híbridos e recíprocos, quando comparados com a população F<sub>2</sub>. E em peso de 60 kDa verificou-se proteínas na linhagem L91 que não apareceu na linhagem L44, essa proteína apareceu também nos híbridos e recíprocos e na população F<sub>2</sub>.

Figura 10 - Expressão das proteínas resistentes ao calor em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F).



Fonte: Da autora (2022).

Em sementes germinadas a 25 °C, foi observada maior expressão PRC em relação à observada em sementes secas e naquelas germinadas à 35 °C. Sob temperatura de 25 e 35 °C foi observada isoforma de 10 kDa em sementes da linhagem L44 que não estava presente em sementes secas. Maior intensidade de isoformas com 10, 15 e 16 kDa foi observada em sementes dos genótipos L91, 91x44 e F<sub>2</sub> 44x91. Em sementes da L44 foi observada nas proteínas de peso de 70 kDa, a qual não foi observada em sementes secas.

A redução de PRC em sementes germinadas à 35 °C pode ser atribuída à maior velocidade de embebição das sementes, consequentemente estas sementes se encontravam em estágios mais avançados de metabolismo celular que as dos demais tratamentos. Sabe-se que, com o avanço do processo de germinação, a expressão destas proteínas reduz e aumenta a intolerância à dessecação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

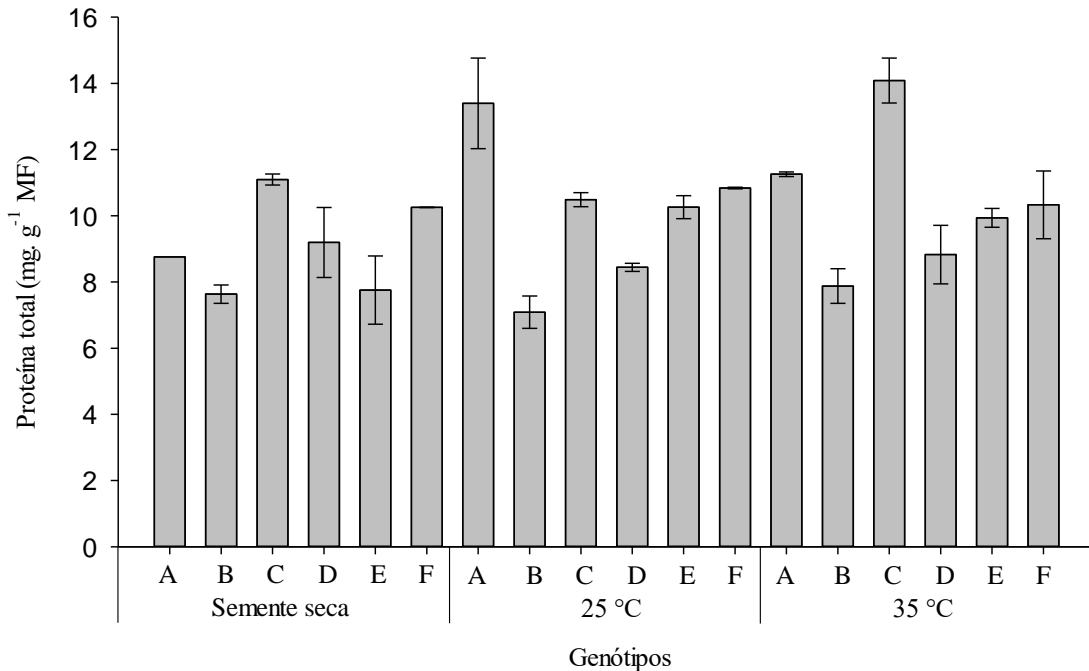
De maneira geral, a maior expressão de proteínas resistentes ao calor foi observada em sementes da linhagem L91 e naquelas em que esta linhagem foi utilizada como parental feminino 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44.

Andrade (2015), ao avaliar a expressão de proteínas resistentes ao calor, associada à qualidade fisiológica de sementes de milho, observou maior expressão desta em sementes da linhagem L91 com peso molecular de até 40 kDa. Na presente pesquisa, foram observadas proteínas com até 80 kDa, com maior expressão em sementes do genótipo tolerante (L91), quando comparada à observada em sementes da linhagem de menos tolerância (L44). Também foi possível associar à melhor qualidade fisiológica das sementes, da linhagem L91 sob condições de alta temperatura, em detrimento da observada em sementes da linhagem L44.

Além de Andrade (2015), outros autores também observaram correlação da expressão da PRC e qualidade fisiológica de sementes (AMARA *et al.*, 2013; SILVA NETA *et al.*, 2015; SILVA NETA *et al.*, 2020). A maior porcentagem de germinação de sementes de diversas culturas em situações de estresse tem sido associada à maior expressão de PRC (LIU *et al.*, 2013), pois essas proteínas estão envolvidas no mecanismo de defesa contra danos (TUNNACLIFFE *et al.*, 2010; SABAGH *et al.*, 2020) e associadas à estabilidade da membrana em ambientes sob estresse (WAHID *et al.*, 2007).

Em relação à proteína total (FIGURA 11), de maneira geral, maiores valores foram observados em sementes da linhagem 91 e naquelas em que a linhagem foi utilizada como parental feminino, quando comparadas a valores observados em sementes da linhagem L44 e nas dos genótipos cuja parental feminino foi esta linhagem, exceções ocorreram nos valores observados em sementes das populações F<sub>2</sub>. Nestas populações há segregação, o que pode explicar estas variações para a característica avaliada.

Figura 11 - Quantificação da proteína total em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F). Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da autora (2022).

À 35 °C, maiores valores de proteína total foram observados em sementes dos genótipos L91, 91x44, quando comparados aos genótipos L44 e 44x91. Entre as populações F<sub>2</sub> não houve diferença significativa. Nesta temperatura, houve aumento no teor de proteína total em sementes do híbrido 91x44 (3,60 mg/g), quando comparado ao observado em sementes submetidas à temperatura de 25 °C. Já em sementes da linhagem L44 foram observados os menores valores de proteína total em sementes secas e germinadas à 25 e 35 °C.

As proteínas são os componentes básicos de toda a célula viva e são convertidas em aminoácidos, pela atividade das proteases (MARCOS FILHO, 2015). Segundo o autor, em sementes essas proteínas são hidrolisadas e translocadas para os pontos de crescimento do eixo embrionário, para a formação de tecidos ou participam de reações durante o processo de respiração.

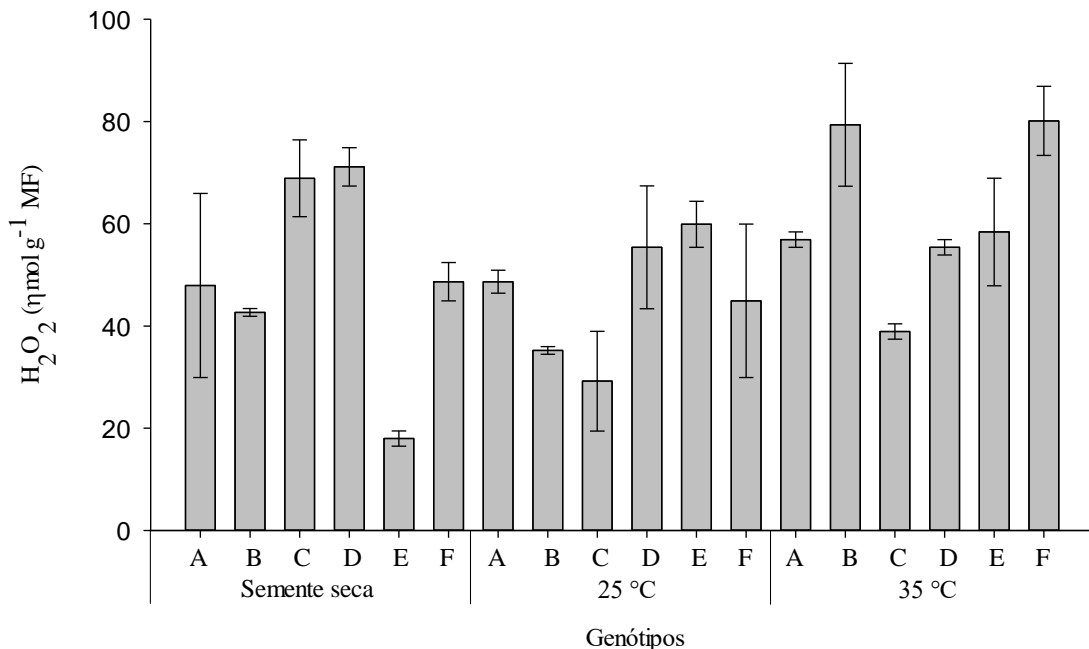
Nesta pesquisa, quando as sementes foram expostas à temperatura 25 °C independentemente do genótipo, foi possível observar maior emergência de plântulas, em razão da temperatura ser favorável para a germinação das sementes de milho.

De acordo com Prazeres, Coelho e Souza (2021), houve aumento de proteína solúvel total em sementes de híbridos de milho com melhor qualidade fisiológica, após 20 dias de semeadura, em condições de estresse hídrico. Eles inferiram que este aumento pode estar associado à tolerância a estresses.

Ehrhardt-Brocardo e Coelho (2022), relataram que sementes com alto vigor possuem maior teor de proteínas durante o processo germinativo, no momento específico da protrusão da radícula, uma vez que as proteínas solúveis são convertidas em aminoácidos. Portanto, genótipos tolerantes à alta temperatura durante a germinação parecem apresentar maior eficiência nos processos de hidrólise e mobilização do componente proteico, o que pode estar associado à tolerância nesta condição de estresse.

A concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FIGURA 12) em sementes secas foi maior em sementes híbridas 91x44 e 44x91, além disso, há concentração maior de peróxido em sementes da população  $F_2$  44x91, em relação a população  $F_2$  91x44.

Figura 12 - Quantificação do  $H_2O_2$  em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D);  $F_2$  91x44 (E) e  $F_2$  44x91 (F). Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da autora (2022).

Na temperatura de 25 °C é possível observar redução da concentração de peróxido de hidrogênio em relação à observada em sementes secas, em sementes da linhagem L44, dos híbridos 91x44 e 44x91.

À 35 °C houve o aumento da concentração do peróxido hidrogênio em sementes dos genótipos L91, L44 e F<sub>2</sub> 44x91, em relação ao observado em sementes germinadas à 25 °C. Ressalta-se menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sementes da linhagem L91, do híbrido 91x44 e da população F<sub>2</sub> 91x44.

Segundo Santos *et al.* (2017), em condições de altas temperaturas há o aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e essa alta concentração de H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> pode contribuir para a redução da qualidade fisiológica em sementes de milho, principalmente em genótipos que não são tolerantes a essa condição de estresse, a exemplo da linhagem L44 a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é baixa em sementes secas e germinadas a 25 °C, mas tem grande aumento quando colocadas para germinar a 35 °C, o que relaciona com a menor tolerância desse material genético.

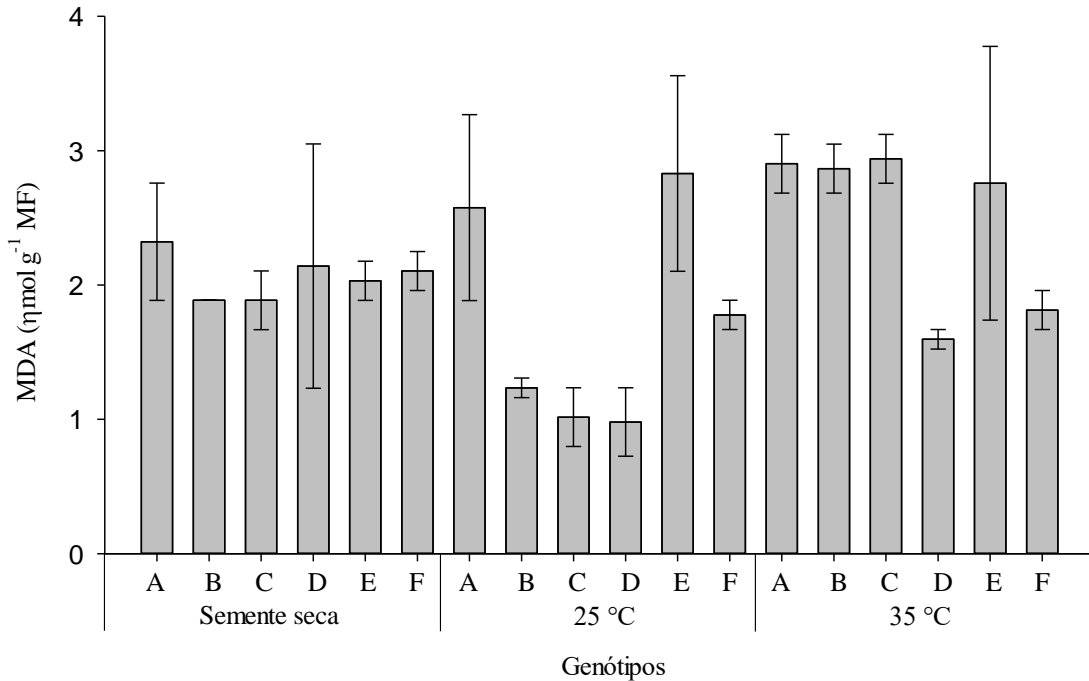
Na presente pesquisa, maior concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à temperatura de 35 °C, em sementes da linhagem L44 classificada como intolerante à alta temperatura durante a germinação das sementes e também naquelas em que a linhagem L44 era o parental feminino, parece estar associada à baixa tolerância a condições ambientais adversas.

Silva Neta *et al.* (2020), estudaram o controle genético para tolerância à baixa temperatura durante a germinação de sementes de milho. Foram cruzadas linhagens contrastantes e observaram que existe efeito de heterose e efeito do recíproco para a característica de tolerância ao frio durante o processo germinativo.

Em condições ideais de temperatura a produção das EROs é menor (SANTOS *et al.*, 2017) como observado para a maioria dos genótipos nesta pesquisa, quando as sementes foram germinadas à 25 °C. No entanto, o mesmo autor relata que diante de uma condição de estresse a homeostase celular é rompida e, conseqüentemente, ocorre o aumento da produção das EROs.

A quantificação do malonaldeído (MDA) encontra-se na Figura 13, sendo que em sementes secas observa-se maior concentração do MDA na linhagem L91, em relação à linhagem L44. Já entre os genótipos 91x44, 44x91, F<sub>2</sub> 91x44 não houve diferença significativa nos valores de MDA. Na temperatura de 25 °C, as maiores concentrações de MDA foi observada na linhagem L91 e na população F<sub>2</sub> 91x44, cujos valores não diferenciaram entre si. Sob a temperatura de 35 °C, as maiores concentrações de MDA foram observadas em sementes dos genótipos L91, L44, 91x44 e F<sub>2</sub> 91x44 e menores nas do genótipo 44x91.

Figura 13 - Quantificação do malonaldeído (MDA) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F2 91x44 (E) e F2 44x91 (F). Barras verticais representam o erro padrão das médias.



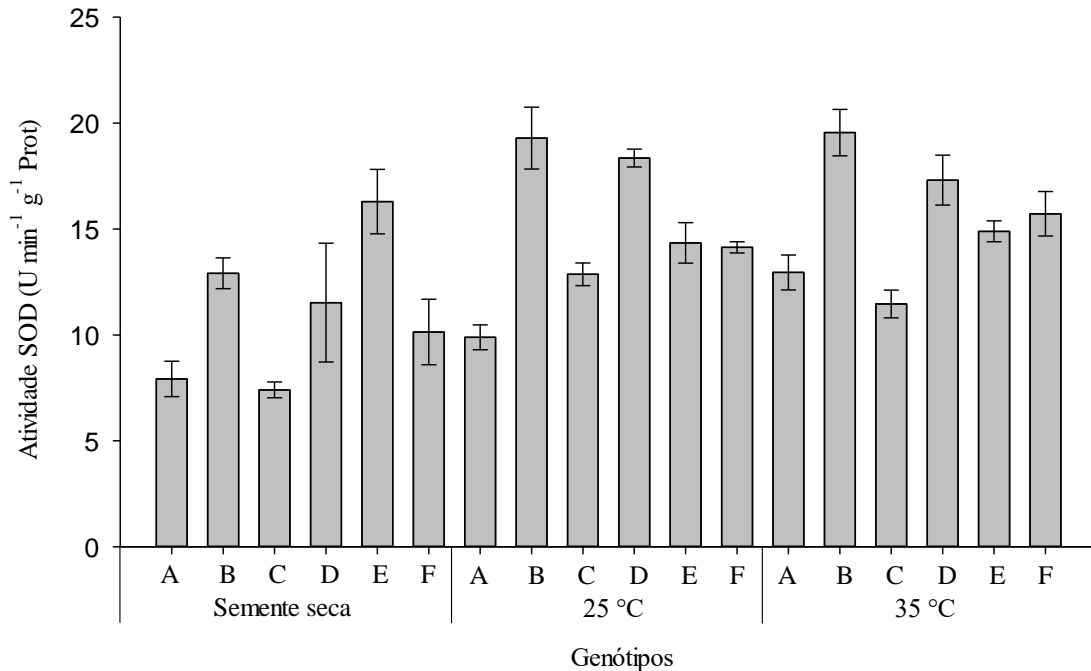
Fonte: Da autora (2022).

Quando comparados os resultados observados em sementes germinadas à 25 e 35 °C, observa-se de uma maneira geral, aumento da concentração de MDA. Para os genótipos F<sub>2</sub> 91x44 e F<sub>2</sub> 44x91 não houve diferenças significativas nestas mesmas condições. O aumento da concentração MDA pode ser um indicador de altas taxas de peroxidação lipídica (SANTOS *et al.*, 2017), associado também à qualidade fisiológica das sementes.

Sabe-se também que a peroxidação lipídica não é causada apenas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outras espécies reativas de oxigênio também podem estar associadas ao aumento da concentração de MDA, a exemplo do superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).

Com relação à atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 14), maior atividade em sementes secas foi observada nas da linhagem L44 e nas combinações híbridas que ela se encontrava como parental feminino. Quando as sementes foram submetidas a temperaturas de 25 °C e 35 °C, houve aumento da atividade da SOD em sementes da linhagem L44 e nas do recíproco 44x91. No entanto, em sementes do híbrido e recíproco da população F<sub>2</sub> os resultados não diferiram entre si.

Figura 14 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F). Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da autora (2022).

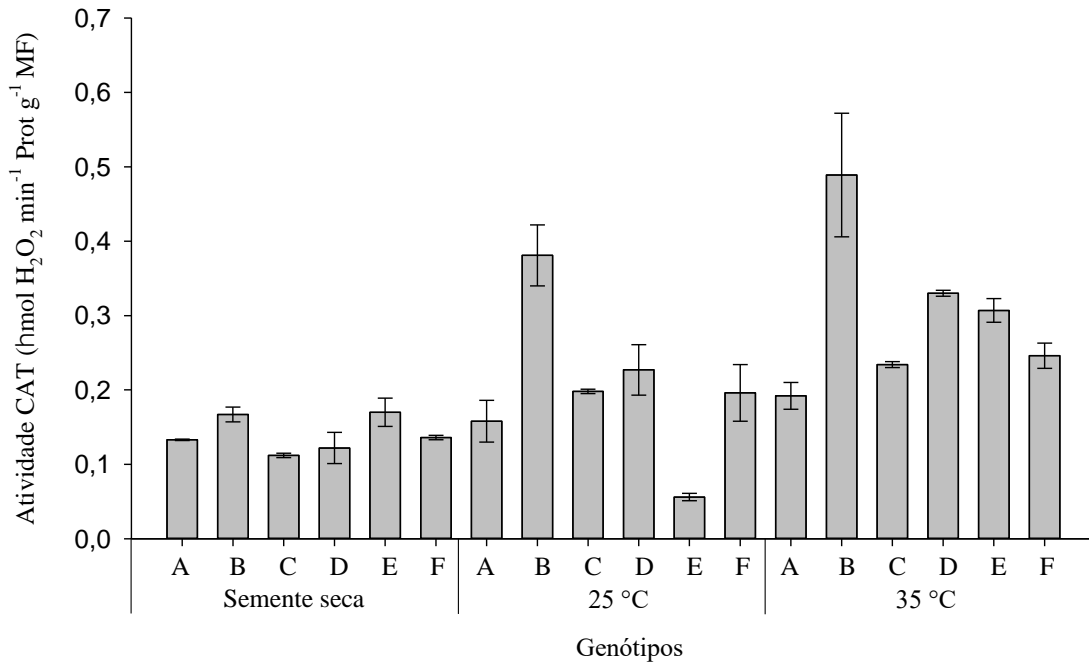
Para a maioria dos genótipos, a maior atividade da SOD ocorreu em sementes submetidas à 25 e 35 °C, em relação às sementes secas. Menor atividade da SOD foi observada em sementes da linhagem L 91 e nas do híbrido 91x44. Ressalta-se que a linhagem L91 na combinação 91x44 foi utilizada como parental feminino. Parece ser possível inferir que em materiais tolerantes à alta temperatura há menor expressão desta enzima, provavelmente por estar menos sujeitos à oxidação e formação em excesso de EROs.

A SOD é considerada a primeira enzima antioxidante no processo de defesa contra as EROs, que atua anulando a ação dos superóxidos, catalisando sua conversão a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (LIU; SOUNDARARAJAN; MANIVANNAN, 2019; GILL; TUTEJA, 2010).

Na presente pesquisa houve aumento da atividade desta enzima sob alta temperatura durante o processo de germinação para a maioria dos genótipos avaliados. Embora seja uma importante enzima do sistema antioxidante, a ação desta enzima não deve ser avaliada individualmente, pois POX, APX e/ou CAT, também são exemplos de outras enzimas envolvidas no processo.

Houve menor atividade da catalase (CAT) em sementes secas para todos os genótipos (FIGURA 15), quando comparada à observada em sementes germinadas às 25 e 35 °C.

Figura 15 - Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F). Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da autora (2022).

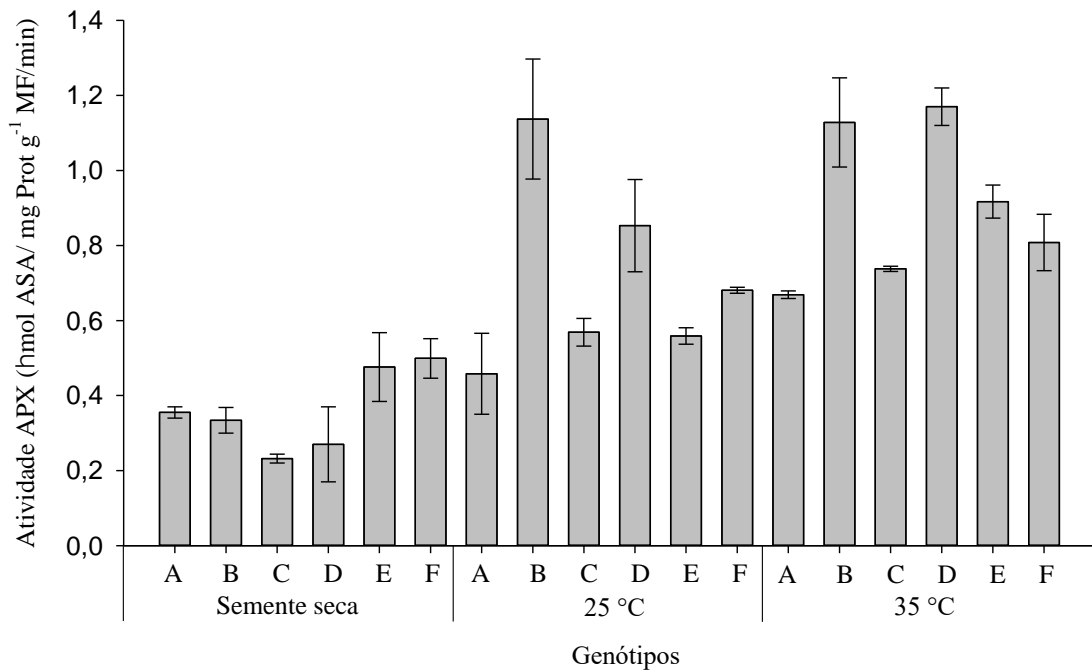
Ao analisar a Figura 15, é possível inferir que, como observado para atividade da SOD, também houve maior atividade da catalase em sementes da linhagem L44 e naquelas do híbrido 44x91, comparadas às observadas em sementes da linhagem L91 e nas do híbrido 91x44. Importante também observar, que nos materiais mais intolerantes à alta temperatura durante o processo de germinação há aumento da atividade desta enzima quando são submetidas à alta temperatura.

A catalase é uma enzima que atua principalmente nos peroxissomos (CHOUHARY; KUMAR; KAUR, 2019), responsável pela desintoxicação celular, transformando o peróxido de hidrogênio em moléculas menores, água e oxigênio (CHOUHURY *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2019).

Como observado para a SOD e a CAT, menor atividade da ascorbato peroxidase (APX) também foi observada em sementes secas de todos os genótipos. Também foi observada maior

atividade em sementes da linhagem L44e nas do híbrido 44x91, em relação à dos genótipos L91 e 91x44 (FIGURA 16). A enzima APX possui alta afinidade por  $H_2O_2$  e tem importante papel na remoção das EROs (MITTLER, 2017).

Figura 16 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em sementes de milho secas e submetidas à embebição a 25 °C e 35°C até o início da fase III de germinação. Tratamentos: L91 (A); L44 (B); 91x44 (C); 44x91 (D); F<sub>2</sub> 91x44 (E) e F<sub>2</sub> 44x91 (F). Barras verticais representam o erro padrão das médias.



Fonte: Da autora (2022).

Prazeres, Coelho e Souza (2021), ao avaliarem a atividade do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX) em sementes de alta e baixa qualidade fisiológica, relacionado com a tolerância ao déficit hídrico em plantas de milho após 20 dias de semente, verificaram que em sementes classificadas com alta qualidade fisiológica houve aumento das enzimas antioxidantes, mesmo nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, em comparação com o híbrido de baixo vigor, em que os níveis das atividades das enzimas permaneceram inalterados.

É importante ressaltar, que os materiais genéticos utilizados nesta pesquisa são diferentes dos utilizados em outras, assim como a forma e o tipo de estresse aos quais as sementes foram impostas. Isso dificulta a comparação entre os resultados obtidos em diferentes pesquisas.

A CAT e a APX têm a capacidade de eliminar  $H_2O_2$ . No entanto, a atividade da enzima CAT é alta, mas a afinidade pelo  $H_2O_2$  é fraca, e a APX possui alta afinidade pelo  $H_2O_2$ . (MITTLER, 2002; MITTLER, 2017). Os mesmos autores afirmam que a APX é responsável para sinalização celular, CAT é responsável por remover o excesso de EROs gerado durante condições de estresse.

Por meio dos resultados observados para os valores de peróxido de hidrogênio e da atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX) parece ter ocorrido maior estresse oxidativo em sementes da linhagem não tolerante e nas dos híbridos em que a mesma estava como parental feminino.

Dessa forma, as maiores atividades das enzimas do sistema antioxidantes foram observadas em genótipos não tolerantes ao estresse à alta temperatura, o que pode estar associado à menor qualidade fisiológica das sementes, quando comparada aos demais genótipos.

De maneira geral, maior expressão das enzimas ADH, GOT, EST,  $\alpha$ -amilase e SOD, avaliadas pela técnica de eletroforese e de proteína total e MDA, avaliadas por meio de espectrofotometria foram observadas em sementes da linhagem L91 e naquelas de genótipos em que esta linhagem foi utilizada como parental feminino, quando submetidas à germinação à 35 °C

Por outro lado, para estes mesmos genótipos e sob as mesmas condições de germinação, à 35 °C, menor expressão foi verificada para as enzimas PVD, MDH, CAT e POX, avaliadas pela técnica de eletroforese e de CAT, APX,  $H_2O_2$  e SOD, avaliadas por meio de espectrofotometria.

As interpretações dos resultados de expressões destes componentes bioquímicos devem ser realizadas de forma conjunta, com os resultados obtidos em análises fisiológicas, uma vez que vários são os fatores que interferem nesta expressão.

Sementes de genótipos tolerantes à alta temperatura durante o processo de germinação e emergência de plântulas parecem formar menos acetaldeído na rota anaeróbica da respiração, uma vez que a expressão da enzima PDC é menor. No entanto, nestas sementes a atividade da ADH é maior, o que de alguma forma protege a célula do acetaldeído que é mais tóxico que o etanol. Enzimas da respiração parecem ser bons marcadores para estudar a tolerância à altas temperaturas, uma vez que podem ser associadas à qualidade fisiológica das sementes.

Enzimas que como a  $\alpha$ -amilase e esterase que estão associadas ao processo de germinação de sementes de milho, se expressam mais em materiais tolerantes à altas temperaturas.

Em sementes de genótipos tolerantes à alta temperatura parece tolerar mais ao peróxido de hidrogênio, o que pode ser observado pela maior atividade da SOD e menor atividade das enzimas CAT e POX, avaliadas pela técnica de eletroforese e  $H_2O_2$ , MDA, APX, CAT, quantificados por meio de espectrofotometria.

#### 4 CONCLUSÃO

Há variações das expressões de enzimas associadas à respiração e ao sistema antioxidante em sementes secas e embebidas à 25 e 35 °C, de genótipos classificados quanto a tolerância à alta temperatura durante o processo de germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas.

As enzimas da respiração piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase e as do sistema antioxidantes superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase, foram identificadas como bons marcadores para avaliar os genótipos de milho tolerantes à alta temperatura durante a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas.

Há maior expressão das enzimas  $\alpha$ -amilase e esterase em genótipos tolerantes à alta temperatura.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. S. *et al.* Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.12-19, 2009.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- ALMEIDA, F. A. *et al.* Germination temperatures affect the physiological quality of seeds of lettuce cultivars. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 4, p. 1143-1152, 2019.
- AMARA, I. *et al.* Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. **Journal of plant physiology**, v. 9, n. 170, p. 864-873, 2013.
- ANDRADE, T. **Controle genético e expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho**. 2015. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2015.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BLACKMAN, S. A. *et al.* Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, n. 3, p. 868-874, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *In: Methods in enzymology*. Academic Press, 1978. p. 302-310.
- CARVALHO, E. R. *et al.* Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.
- CASTRO, D. G. *et al.* Qualidade fisiológica e expressão enzimática de sementes de soja RR®. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 222-225, 2017.
- CHAENGSAKUL, C. *et al.* Ethanol production and mitochondrial-related gene expression of maize (*Zea mays*) seed during storage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 11, p. 2435-2445, 2019.
- CHELIKANI, P.; RAMANA T.; RADHAKRISHNAN, T. M. Catalase: A repertoire of unusual features. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 131-135, 2005.

CHOUDHURY, F.K. *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 856-867, 2017.

CHOUDHARY, A.; KUMAR, A.; KAUR, N. ROS and oxidative burst: Roots in plant development. **Plant Diversity**, Beijing, 2019.

DINIZ, R. P. *et al.* Qualidade fisiológica e expressão de alfa-amilase em sementes de milho produzidas em condições de estresse salino e hídrico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 17, n. 1, p. 37-48, 2018.

DUTRA, S. M. F. *et al.* Genes related to high temperature tolerance during maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18047-18058, 2015.

EHRHARDT-BROCARDI, N. C. M.; COELHO, C. M. M. Mobilization of seed storage proteins is crucial to high vigor in common bean seeds. **Ciência Rural**, v. 52, n. 2 p. 1-10, 2022.

FRAGKOSTEFANAKIS, S. *et al.* HsfA2 controls the activity of developmentally and stress-regulated heat stress protection mechanisms in tomato male reproductive tissues. **Plant Physiology**, v. 170, n. 4, p. 2461-2477, 2016.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

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

LEMES, E. *et al.* Aplicação de sílicio no solo: efeito na expressão enzimática de sementes oriundas de plantas de arroz sob estresse salino. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n. 1, p. 129-136, 2018.

LI, R. *et al.* Genetic variation for maize root architecture in response to drought stress at the seedling stage. **Breed Science**, v. 64, n. 4, p. 298-307, 2015.

LIU, B.; SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A. Mechanisms of silicon-mediated amelioration of salt stress in plants. **Plants**, v. 8, n. 9, n. 1-13, 2019.

LIU, L. *et al.* Salinity inhibits rice seed germination by reducing  $\alpha$ -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2018.

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

- LONG, X. *et al.* Molecular identification and characterization of the pyruvate decarboxylase gene family associated with latex regeneration and stress response in rubber tree. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 35-44, 2015.
- MANI, V. P. *et al.* Breeding hybrids and inbreds for temperature tolerance in maize. **Journal of Biotechnology & Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 32-40, 2016.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 660 p.
- MARINI, P. *et al.* Antioxidant activity of corn seeds after thermal stress. **Ciência Rural**, v. 43, n. 6, p. 951-956, 2013.
- MARQUES, T. L. *et al.* Expression of ZmLEA3, AOX2 and ZmPP2C genes in maize lines associated with tolerance to water deficit. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2019.
- MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. L.; SILVA, L. J. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Árvore**, v. 39, n. 1, p. 115-125, 2015.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- OHAMA, N. *et al.* The transcriptional cascade in the heat stress response of Arabidopsis is strictly regulated at the expression levels of transcription factors. **Plant Cell** v. 28, n. 1, p. 181-201, 2016.
- OLIVEIRA, G. E. *et al.* Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 40-48, 2013.
- PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties. **Plant Gene**, v. 11, n. 2, p. 124-132, 2017.
- PIRES, R. M. O. *et al.* Physiological and enzymatic alterations in sesame seeds submitted to different osmotic potentials. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-16, 2017.
- PEDÓ, T. *et al.* Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 1, p. 5-9, 2015.

- PRAZERES, C. S.; COELHO, C. M. M.; SOUZA, C. A. Biochemical compounds and enzymatic systems related to tolerance to water deficit of maize seedlings. **Plant Physiology Reports**, v. 6, n. 1, p. 402-411, 2021.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020.
- REIS, R. G. E. **Métodos de secagem e armazenamento de sementes de berinjela submetidas ao condicionamento fisiológico**. 2013. 82 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.
- SABAGH, A. E. *et al.* Maize adaptability to heat stress under changing climate. *In* HOSSAIN, A. (org.). **Plant stress physiology**. 1.ed. 2020, 418p. Disponível em: Maize Adaptability to Heat Stress under Changing Climate | IntechOpen. Acesso em: 20 ago. 2021.
- SANTOS, H. O. *et al.* Physiological quality of hybrid maize seeds through respiratory and enzymatic activities. **African Journal of Agricultural Research** v. 11, n. 20, p. 1879-1886, 2016.
- SANTOS, M. M. *et al.* Germination of seeds of melanoxydon brauna schott. under heat stress: production of reactive oxygen species and antioxidant activity. **Forests** v. 8, n. 11, p. 1-13, 2017.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SCHULZE E. D.; BECK E.; MULLER-HOHENSTEIN K. **Plant ecology**. 1.ed. Berlin: Springer, 2005. 702p.
- SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, n. 2, p. 1-26, 2012.
- SHRESTHA, J.; GURUNG, D. B.; DHITAL, K. P. Agronomic performance of maize genotypes under high temperature condition. **Farming and Management**, v. 3, n. 1, p. 23-29, 2018.
- SILVA NETA, I. C. *et al.* Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.
- SILVA NETA, I. C. *et al.* Gene expression and genetic control to cold tolerance during maize seed germination. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 188, p. 1-14, 2020.
- TIWARI, Y. K.; YADAV, S. K. High temperature stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): physiological and molecular mechanisms. **Journal of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 93-102, 2019.

- TUNNACLIFFE, A. *et al.* LEA proteins: versatility of form and function. In: LUBZENS, E.; CERDA, J.; CLARK, M. **Dormancy and resistance in harsh environments**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 91-108.
- VEIGA, A. D. *et al.* Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 953-960, 2010.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants—protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.
- VIEIRA, E. S. N. *et al.* Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n. 1, p. 86-94, 2009.
- ZAFAR, S. A. *et al.* Genome wide analysis of heat shock transcription factor (HSF) family in chickpea and its comparison with Arabidopsis. **Plant Omics**. v. 9, n. 2, p. 136-139, 2016.
- WAHID A. *et al.* Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.
- WREGGE, M. S. *et al.* **Climate Atlas of Southern Brazil: States of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul** (p. 211). Pelotas: Embrapa temperate climate; Colombo: Embrapa Forests, 2011.