

Daniele Nerling

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES NA OBTENÇÃO  
DE LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho

Florianópolis, SC  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nerling, Daniele  
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES NA OBTENÇÃO DE  
LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO / Daniele Nerling ;  
orientador, Cileide Maria Medeiros Coelho, 2017.  
153 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Qualidade  
fisiológica. 3. Mobilização de reservas. 4.  
Endogamia. 5. Melhoramento. I. Coelho, Cileide  
Maria Medeiros . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais. III. Título.

**Qualidade fisiológica de sementes na  
obtenção de linhagens e híbridos de milho**

por

**Daniele Nerling**

Tese julgada e aprovada em 22/03/2017, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

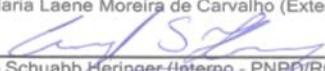
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Cileide Maria Medeiros Coelho (Presidente-CAV/UDESC)



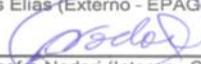
Prof. Dr. Maria Laene Moreira de Carvalho (Externo - UFLA/MG)



Dr. Angelo Schuabb Heringer (Interno - PNPD/RGV)



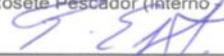
Dr. Haroldo Tavares Elias (Externo - EPAGRI/SC)



Prof. Dr. Rubens Ondre Nodari (Interno - CCA/UFSC)



Prof.ª. Dr.ª. Rosete Pescador (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, março de 2017



Dedico a minha família.  
“Todas as vitórias ocultam uma  
abdicação” (Simone de  
Beauvoir, 1908 - 1986)



## AGRADECIMENTOS

Esta sem dúvida, é a parte mais complicada de escrever por todos os sentimentos e as emoções que carrega. Este trabalho não teria sido possível sem a variada e generosa contribuição de muitas pessoas. Esta tese é tão minha quanto de vocês. Para isso, gostaria de agradecer a todos aqueles que com sua orientação, conselho, apoio, ajuda, críticas, sugestões, estímulos me ajudaram a desenvolver este trabalho:

- À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais e ao seu corpo docente, pela acolhida, pela formação acadêmica e por possibilitar a realização do doutorado.

- A minha orientadora: Dr. Cileide M.M. Coelho, por sua orientação, assessoramento científico, sua predisposição permanente e incondicional em esclarecer minhas dúvidas, sua paciência, apoio, conselhos e por ter-me introduzido e ensinado todo o fascinante e interessante mundo da pesquisa, pela inspiração e pela amizade dedicada. Faltam palavras para expressar todos os meus agradecimentos e toda a gratidão, somente posso dizer: Obrigado por tudo!!!!

- Aos membros da comissão examinadora (Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Laene Moreira de Carvalho, Dr. Haroldo Tavares Elias, Dr. Ângelo Heringer, Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Rosete Pescador) pela disponibilidade, e pelo olhar crítico e construtivo desta tese.

- Ao Movimento dos Pequenos Agricultores – MPA, a Cooperativa Oestebio e as pessoas que a compõe, pela construção política, pelas oportunidades e pela confiança em mim dedicada.

Meus agradecimentos são também:

- A Anderson meu amigo, por todos os conselhos e companheirismo nestes 11 anos de convivência profissional. Obrigado por aguentar-me tanto tempo e por fazer todos os momentos de convivência uma experiência rica tanto profissional quanto pessoal.

- À Pamela pela palavra amiga, pelos conselhos, pelo ombro e pelo sorriso de sempre.

- Ao Dr. Virgílio Uarrota pelas longas conversas e experiências trocadas, pelas jornadas de estudo e pela paciência em repassar seu grande conhecimento a todos nós.

- À Marília Shibata e a Ezequiel Gasparin pelas conversas, pelo apoio e pela palavra amiga, e a todas as pessoas que tive a oportunidade de conviver e encontrar nesse período.

- À todos os colegas do Laboratório de Análise de Sementes da Universidade do Estado de Santa Catarina: Adriele Brümmer, Vanderleia Mathias, Natalia Ehrhardt-Brocardo, Cristhyane Araldi, Isaac Heberle, Diego Gindri, Genésio Dereti, Camila Prazeres e demais amigos, pelos conselhos, ajuda e sobretudo pelo sorriso e bom humor durante o período de convivência no laboratório

- E sobre tudo, agradeço a ESTA FAMÍLIA MARAVILHOSA que tenho, que apesar da distância me apoiou SEMPRE em todas as decisões que tenho tomado e sobretudo durante as ausências. Meus pais, Teobaldo e Inês, meus pais de coração Neuri e Leonice, meus irmãos e sobrinhos meus agradecimentos. Em especial a meu companheiro de vida Elisandro, pelo apoio, compreensão de minhas ausências e pela paciência sempre ao meu lado.

A todos vocês dedico esta tese.

## RESUMO

A utilização de sementes de qualidade garante rápida e uniforme germinação, com estabelecimento de plântulas vigorosas em uma ampla faixa de ambientes. A qualidade fisiológica, como um dos atributos da qualidade de sementes, é importante fator que precisa ser considerado pelos programas de conservação e de melhoramento de milho. O trabalho teve como objetivo verificar as alterações na qualidade fisiológica durante a obtenção de linhagens e o quanto as características de viabilidade, vigor e composição bioquímica podem ser controlados geneticamente. O trabalho foi desenvolvido com uma variedade de polinização aberta crioula (CRI), duas variedades de polinização aberta comerciais (VPA1 e VPA2) e dois híbridos simples comerciais (HIB1 e HIB2). As populações foram submetidas a sucessivas autofecundações até a quinta geração (S<sub>5</sub>). Para o estudo avaliou-se a influência da endogamia e o controle genético na viabilidade e no vigor de sementes; a estimativa da heterose e da capacidade geral e específica de combinação; a divergência genética e o perfil bioquímico das sementes de linhagens e híbridos e sua associação com o vigor de sementes; a influência da hidrólise e mobilização de proteínas, fósforo total, ácido fítico, fósforo inorgânico, amido e açúcares solúveis sobre o vigor das plântulas no estabelecimento inicial; e, a atividade das enzimas fitase e  $\alpha$ -amilase durante a germinação associadas a plântulas com maior vigor. As populações apresentam comportamento distinto quanto aos efeitos da endogamia, de modo geral, todas apresentaram redução na viabilidade e vigor de sementes. Os híbridos apresentaram maior qualidade fisiológica em função da manifestação da heterose. A qualidade fisiológica das sementes está associada a mobilização e hidrólise de reservas. O padrão de hidratação, a maior hidrólise de proteínas de reserva e a maior mobilização de proteína solúvel explicaram o maior vigor de sementes. A maior hidrólise de amido e a maior mobilização de açúcares solúveis está associada a sementes de maior vigor, assim como a maior atividade das enzimas fitase e  $\alpha$ -amilase, que apresentaram aumento gradual ao longo do processo germinativo.

**Palavras-chave:** Contribuição genética. Endogamia. Conservação de germoplasma. Hidrólise e mobilização de reservas.

## ABSTRACT

The use of seeds with quality ensures rapid and uniform germination, with establishment of vigorous seedlings in wide environments. Physiological quality, one aspect of seed quality, is important for maize conservation and breeding programs. The objective of this work was to verify changes in physiological quality during inbred lines obtainment and how much the characteristics of viability, vigor and biochemical composition can be controlled genetically. The work was developed with a landrace (CRI), two commercial open pollinated varieties (VPA1 and VPA2) and two commercial single hybrids (HIB1 and HIB2). Populations were submitted to successive self-pollination up to a fifth generation (S5). For the study, influence of inbreeding and genetic control on the viability and vigor of seeds was evaluated; estimative of heterosis and general and specific combining ability; genetic divergence and biochemical profile of inbred lines and hybrids seeds and their association with seed vigor; influence of hydrolysis and mobilization of proteins, total phosphorus, phytic acid, inorganic phosphorus, starch and soluble sugars on the vigor of the seedlings in the initial establishment; and, phytase and  $\alpha$ -amylase activity during germination associated with seedlings with higher vigor. Populations are different behavior in terms of the effects of inbreeding, in general, all populations reduced viability and seed vigor. The hybrids showed higher physiological quality due the heterosis manifestation. Physiological seeds quality was associated with mobilization and hydrolysis of reserves. Hydration pattern, higher hydrolysis of proteins and higher mobilization of soluble protein explained higher seed vigor. Higher starch hydrolysis and higher mobilization of soluble sugars were associated with seed vigor as well as higher activity of phytase and  $\alpha$ -amylase enzymes, which also showed a gradual increase throughout the germination process.

**Keyword:** Genetic contribution. Inbreeding. Conservation. Hydrolysis and mobilization of reserves.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Curso temporal dos eventos físicos, fisiológicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (Fase I e II) e crescimento da plântula (Fase III). Fonte: Modificado de NONOGAKI et al., 2010. .... | 38 |
| <b>Figura 2.</b> Via hidrolítica da degradação de amido em cereais. Adaptado de Andriotis et al. (2016).....  | 44 |

## CAPÍTULO 2

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 2.1.</b> Means for (a) germination (%), (b) vigor by Accelerated Aging test (%) and (c) vigor by cold test (%) of five inbred lines: CRI, HIB1, HIB2, VPA1 and VPA2 of maize seeds. The means were separated by SkottKnott test at 5% probability and vertical bars indicate $\pm$ standard deviation for 4 replications..... | 74 |
| <b>Figure 2.2.</b> Means for (a) germination (%), (b) vigor by accelerated aging test (%) and (c) vigor by cold test (%) of eight maize hybrids. The means were separated by SkottKnott test at 5% probability and vertical bars indicate $\pm$ standard deviation for n = 4 replications. ....   | 75 |
| <b>Figure 2.3.</b> Means for (a) soluble sugar ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) and (b) soluble protein ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) of five inbred lines of maize seeds. The means were separated by SkottKnott test at 5% probability, and vertical bars indicate $\pm$ standard deviation for n = 3 replications. ....                               | 77 |
| <b>Figure 2.4.</b> Correlation matrix of the biochemical components and physiological data of five inbred lines of maize seeds. ....  | 78 |
| <b>Figure 2.5.</b> Scores of the first and second Principal Component (PCA) for biochemical composition and physiological response in five inbred lines of maize seeds.....   | 80 |
| <b>Figure 2.6.</b> Cluster heat map (HCA) for biochemical composition and physiological quality of maize seeds, with cophenetic correlation coefficient of 88%. ....  | 81 |
| <b>Figure 2.7.</b> Scores of PLS-R component of association between biochemical composition and physiological response in five inbred lines of maize seeds .....  | 83 |

## CAPÍTULO 3

- Figura 3.1.** Padrão de hidratação de sementes utilizado na identificação o padrão trifásico da germinação em sementes. .... 94
- Figura 3.2.** Padrão de hidratação em sementes de linhagens de milho. 98
- Figura 3.3.** Padrão de hidratação em sementes de combinações híbridas de milho ..... 99
- Figura 3.4.** Dinâmica da alteração do conteúdo de fósforo total em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3). ..... 101
- Figura 3.5.** Alteração do conteúdo de proteína solúvel em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3). ..... 102
- Figura 3.6.** Dinâmica da alteração do teor de ácido fítico em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3). ..... 104
- Figura 3.7.** Alteração no conteúdo de fósforo inorgânico em sementes de (a) híbridos e (b) linhagens de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3). ..... 105
- Figura 3.10.** Dinâmica de hidrólise de (a) fósforo total e (b) ácido fítico em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3). ..... 110
- Figura 3.12.** Expressão temporal de proteínas no endosperma de sementes de milho pela técnica SDS-PAGE. As amostras 1, 3, 5, 7 e 9 correspondem ao híbrido de maior vigor (4 x 1), enquanto que 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem ao híbrido de menor vigor (1 x 3). ..... 113

## CAPÍTULO 4

- Figura 4.1.** Alterações no conteúdo de amido nas sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. Média  $\pm$  desvio padrão de 3 repetições (n=3). ..... 123
- Figura 4.2.** Alterações no conteúdo de açúcares solúveis em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. Média  $\pm$  desvio padrão a partir de 3 repetições. .... 126

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 4.3.</b> Hidrólise de amido durante a germinação de sementes híbridas de milho com qualidade fisiológica contrastante.....  | 127 |
| <b>Figura 4.4.</b> Mobilização de açúcar solúvel durante a germinação de sementes híbridas de milho com qualidade fisiológica contrastante ...  | 128 |
| <b>Figura 4.5.</b> Atividade da enzima amilase durante a germinação de sementes híbridas de milho com qualidade fisiológica contrastante...   | 129 |
| <b>Figura 4.6.</b> Micrografias dos grânulos de amido extraídos de sementes de milho 24 HAH. (a) grânulos de amido da combinação híbrida 4 x 1, (b) grânulos de amido da combinação híbrida 1 x 3, (c) detalhe do formato esférico do grânulo de amido individualizado da combinação 4 x 1, (d) detalhe do formato esférico do grânulo de amido individualizado da combinação 1 x 3, (e) integridade do grânulo de amido na combinação híbrida 4 x 1, (f) detalhe da degradação do amido na combinação híbrida 1 x 3. As setas indicam a presença de fibras no material da amostra. . | 130 |
| <b>Figura 6.1.</b> Diagrama de ordenação por Análise de Componentes Principais (PCA) a partir da composição bioquímica da sementes de linhagens e híbridos de milho durante a germinação de sementes. ....  | 152 |
| <b>Figura 6.2.</b> Dinâmica de mobilização de proteína total e proteína solúvel em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes, A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).....   | 153 |



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.1.** Caracterização das populações fonte utilizadas na obtenção de linhagens e híbridos para o estudo dos efeitos da endogamia e o controle genético associado a qualidade fisiológica de sementes. .... 52
- Tabela 1.2.** Safra e local de cultivo, geração de autofecundação, peso e armazenamento das sementes de cinco genótipos de milho..... 53
- Tabela 1.3.** Médias e desvio padrão para germinação, vigor por envelhecimento acelerado e vigor pelo teste de frio de cinco genótipos de milho submetidos a autofecundações. .... 57
- Tabela 1.4.** Estimativa da depressão por endogamia (DE) a partir de características de germinação e vigor pelo teste de envelhecimento acelerado (EA) e vigor pelo teste de frio (TF) em sementes de cinco genótipos de milho. .... 59
- Tabela 1.5.** Médias e desvio padrão para peso de mil sementes e massa seca de plântulas e estimativa da depressão por endogamia (DP) de cinco genótipos de milho submetidos a três gerações de autofecundação..... 60
- Tabela 1.6.** Médias e desvio padrão, e estimativa da heterose (H) e da capacidade específica de combinação (CEC) para germinação (G) e vigor pelo teste de envelhecimento acelerado (EA) e pelo teste de frio (TF) em dez combinações híbridas de milho e seus recíprocos ..... 62
- Tabela 1.7.** Estimativa dos quadrados médios de genótipos de milho (parentais e híbridos), para capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, efeito recíproco (ER) e efeitos residuais e o efeito dos quadrados médios na capacidade de combinação para germinação e vigor de sementes avaliadas em dialelo completo. .... 64
- Tabela 1.8.** Estimativas da Capacidade Geral de Combinação de cinco parentais de milho para germinação e vigor de sementes. .... 65

### CAPÍTULO 3

- Tabela 3.1.** Médias e desvio padrão para germinação e vigor de sementes de linhagens e híbridos de milho. .... 100

## **CAPÍTULO 4**

**Tabela 4.1.** Médias e desvio padrão para germinação e vigor de sementes de linhagens e híbridos de milho..... 124

**Tabela 4.2.** Dimensão do grânulo de amido e capacidade de retenção de água em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes.  
..... 131

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato  
BAM – Beta amilase  
CEC – Capacidade Específica de Combinação  
CGC – Capacidade Geral de Combinação  
CONAB - Companhia Nacional do Abastecimento  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ER – Efeito Recíproco  
GGPAA – Grupo Gestor do Programa de Aquisição de Alimentos  
LD – Limite Dextrina  
LPA – *Low Phytic Acid*  
MOC – Manual de Operações da Conab  
MPA – Movimento dos Pequenos Agricultores  
NADP - Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Fosfato  
PAA – Programa de Aquisição de Alimentos  
QPM – *Quality Protein Maize*  
RNA – Ácido Ribonucleico  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
TCA – Ácido Tricloroacético  
VPA – Variedade de Polinização Aberta



## SUMÁRIO

|  |   |     |
|--|---|-----|
| 1.   | INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....   | 21  |
| 2.   | OBJETIVOS .....   | 23  |
| 2.1.   | OBJETIVO GERAL.....   | 23  |
| 2.2.   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 23  |
| 3.   | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 25  |
| 3.1.   | A CONSERVAÇÃO DO GERMOPLASMA DE MILHO..   | 25  |
| 3.2.   | MERCADO DE SEMENTES E A RESISTENCIA<br>CAMPONESA.....                                     | 28  |
| 3.3.   | CONTROLE GENÉTICO PARA QUALIDADE<br>FISIOLÓGICA DE SEMENTES .....                         | 31  |
| 3.4.   | COMPOSIÇÃO QUÍMICA COMO COMPONENTE DE<br>QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SEMENTES DE MILHO ..... | 37  |
| CAPÍTULO 1 .....   |   | 47  |
| EFEITO DA ENDOGAMIA E CONTROLE GENETICO ASSOCIADO<br>A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES.....  |   | 49  |
| 1.1.   | INTRODUÇÃO.....   | 50  |
| 1.2.   | MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 51  |
| 1.3.   | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 56  |
| 1.4.   | CONCLUSÃO.....  | 66  |
| CAPÍTULO 2 .....   |   | 67  |
| BIOCHEMICAL PROFILING AND ITS ROLE IN PHYSIOLOGICAL<br>QUALITY OF MAIZE SEEDS .....  |   | 67  |
| 2.1.   | INTRODUCTION.....   | 70  |
| 2.2.   | MATERIAL AND METHODS.....   | 71  |
| 2.3.   | RESULTS AND DISCUSSION.....   | 73  |
| 2.4.   | CONCLUSION .....  | 83  |
| 2.5.   | REFERENCES .....  | 84  |
| CAPÍTULO 3 .....   |   | 89  |
| HIDRÓLISE E MOBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E PROTEÍNAS<br>ASSOCIADOS À QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE<br>LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO ..... |   | 91  |
| 3.1.   | INTRODUÇÃO.....   | 91  |
| 3.2.   | MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 93  |
| 3.3.   | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 97  |
| 3.4.   | CONCLUSÃO.....  | 114 |

|  |     |
|--|-----|
| CAPÍTULO 4.....  | 115 |
| HIDRÓLISE E MOBILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO ..... | 117 |
| 4.1. INTRODUÇÃO .....  | 117 |
| 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 118 |
| 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 122 |
| 4.4. CONCLUSÃO .....   | 132 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 133 |
| 5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....  | 137 |
| 6. ANEXOS .....  | 152 |

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A conservação *on farm* pode ser definida como o manejo sustentável da diversidade genética de variedades agrícolas tradicionais localmente desenvolvidas, associadas a formas e parentes selvagens e desenvolvidas por agricultores dentro de um sistema de cultivo agrícola, hortícola ou agroflorestal tradicional (CLEMENT; COLE, 1998). A conservação das variedades agrícolas é importante pela sua diversidade genética, os genes ou características genéticas particulares trazem benefícios, seja a resistência à estresses bióticos e abióticos, estatura e adaptação a outros fatores que afetam a produtividade, fatores de qualidade nutricionais, qualidade de sementes, produtivos, entre outros.

Apesar da eminente importância atrelada às variedades agrícolas tradicionais em cultivo, especialmente o milho objeto deste estudo, estes recursos genéticos encontram-se ameaçados pelas mudanças climáticas, mudanças nos sistemas de cultivo e o uso excessivo de agrotóxicos, no entanto, para Nodari e Guerra (2004), nada é mais ameaçador para as espécies que a contaminação genética de variedades crioulas e parentes silvestres por organismos geneticamente modificados.

Para os agricultores, algumas das consequências da contaminação genética estão relacionadas a diminuição da diversidade genética em cultivo, ocasionando vulnerabilidade genética, redução da fonte de novos alelos ou combinações alélicas, tanto para a seleção praticada pelos agricultores em suas propriedades como para os programas de melhoramento genético.

Com a incorporação da biotecnologia, os programas de melhoramento nacionais sofreram rearranjo, onde exclui-se àquelas que não possuem recursos para o desenvolvimento da tecnologia ou as incorpora pelas multinacionais do setor sementeiro. Neste cenário, a concentração do mercado de sementes em algumas poucas multinacionais parece inevitável. Por outro lado, o desenvolvimento de programas de melhoramento participativo, com o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições locais de produção a partir de variedades locais e cultivares convencionais, aparece como um contraponto ao cenário de monopólio desenhado.

Dentre estes programas, ainda que emergente, pode-se citar o que é desenvolvido pela Cooperativa Oestebio, em São Miguel do Oeste, SC. A cooperativa desenvolve estratégias de melhoramento participativo e tradicional de milho a partir de variedades crioulas e cultivares comerciais convencionais e tem por objetivo disponibilizar aos agricultores, que não

se identificam com o cultivo de variedades crioulas ou transgênicas, cultivares convencionais de milho.

O desenvolvimento de híbridos a partir de variedades de polinização aberta e híbridos convencionais possibilita a incorporação de alelos que conferem característica de adaptação, resistência, resiliência, além de aspectos de qualidade de sementes, como maior vigor e viabilidade. A qualidade das sementes pode ser investigada precocemente, a partir da divergência genética entre os genitores, que pode ser obtida de forma antecipada baseado em características agrônomicas, morfológicas, de qualidade nutricional, fisiológicas e moleculares. Apesar do evidente efeito do ambiente sobre a qualidade das sementes, o máximo potencial de sementes, como germinação, emergência e vigor de plântulas, é controlado geneticamente e pode ser avaliado pelo pesquisador, identificando a variabilidade genética dos cultivos de uma espécie ou dentro de linhagens, para indicação das melhores combinações híbridas.

Em estudos prévios constatou-se que a maior qualidade fisiológica foi obtida em sementes de híbridos intervarietais que possuíam genótipos crioulos na sua composição (NERLING et al., 2013). Ou seja, variedades crioulas conferem características importantes para viabilidade e vigor de sementes. Apesar do grande número de trabalhos envolvendo a espécie, trabalhos que relacionem o comportamento de variedades crioulas e cultivares convencionais durante o processo de obtenção de linhagens, bem como estudos que determinam como se dá o controle genético das características associadas à qualidade de sementes e a possibilidade de sucesso na obtenção de linhagens ainda são escassos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral neste trabalho foi verificar as alterações na qualidade fisiológica de sementes durante a obtenção de linhagens e o quanto as características de viabilidade, vigor e composição bioquímica, podem ser controladas geneticamente em função do parental utilizado na formação do híbrido.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a influência da endogamia na viabilidade e no vigor de sementes e verificar a expressão da heterose em combinações híbridas em função das características fisiológicas em sementes de milho.
- b) Avaliar a divergência genética e o perfil bioquímico das sementes de linhagens e híbridos e sua associação com o vigor das sementes.
- c) Determinar a influência da hidrólise de proteínas de reserva, fósforo total e ácido fítico, a mobilização de proteína solúvel, a atividade da enzima fitase e a disponibilização de fosforo inorgânico sobre o vigor das plântulas no estabelecimento inicial.
- d) Determinar o quanto a hidrólise de amido, a mobilização de açúcar solúvel e atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de híbridos durante a germinação pode explicar a formação de plântulas com maior vigor.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A CONSERVAÇÃO DO GERMOPLASMA DE MILHO

Por milênios, os agricultores cultivaram plantas para fornecimento de alimentos, remédios e abrigo para sua família e sociedade. Em sua sabedoria, eles selecionaram as plantas com melhor desempenho e identificaram, não apenas as com melhores características agrônômicas, mas também, aquelas que possuíam propriedade culinárias ou algum significado cultural e social para seu cultivo. Os cultivos coevoluiram com a humanidade e produziram uma ampla diversidade de variedades locais, tradicionais ou crioulas. No entanto, esta diversidade de variedades está, gradativamente, sendo substituída por cultivares transgênicas, que demandam maior investimento em insumos. A taxa de utilização de sementes fiscalizadas de milho no Brasil é de 90%, em Santa Catarina este valor é de 85% (ABRASEM, 2015). Apesar disso, há agricultores que mantem em suas comunidades grande diversificado de espécies e variedades locais e continuam a seleciona-las, promovendo o uso e a conservação destes recursos, mantendo vivo o sistema coevolutivo (STHAPIT et al., 2015).

A conservação realizada por estes agricultores é denominada conservação *in situ* ou *on farm*. Esta forma de conservação é caracterizada pelo manejo sustentável da diversidade genética de variedades agrícolas tradicionais localmente desenvolvidas, associadas a formas e parentes silvestres (MAXTED et al., 2002). Na conservação *on farm*, as mulheres desempenham papel crucial, sendo determinantes no processo de seleção das sementes, tanto como recurso genético a ser semeado quanto como grãos a ser utilizado como alimento em razão de suas propriedades culinárias (FAO; IPGRI, 2002). A outra forma de conservação de recursos genéticos é a *ex situ*, que é realizada em bancos de germoplasma e, no caso do milho, existem atualmente 116.220 acessos conservados nestes bancos, destes, 2.991 acessos tem como país de origem o Brasil (GENESYS 2016).

Apesar do importante papel das variedades crioulas, a substituição destas, por cultivares “modernas”, tornou-se mais acelerada com o avanço das cultivares transgênicas. Para além da substituição da base genética em

cultivo existe a contaminação genética das variedades e parentes silvestres, que ainda encontra-se em cultivo em comunidades tradicionais.

As variedades crioulas, e pode-se incluir no cenário atual as cultivares convencionais, são reservatórios e fontes de variabilidade genética. Porém, com o avanço da biotecnologia, as variedades crioulas veem-se prejudicadas pela disseminação de genótipos, que as vezes, se sobrepõe aos tipos locais, tanto por deslocamento como por hibridação, aumentando assim a probabilidade de extinção ou assimilação genética, inclusive de populações raras (ELLSTRAND, 2003).

Ao contrário de contribuir, os organismos geneticamente modificados reduzem as chances de inovações e a manutenção dos conhecimentos das comunidades locais e indígenas limitando determinadas práticas, entre elas a troca e a seleção de sementes. Em particular, a perda do conhecimento tradicional, pela dependência da compra anual de sementes e insumos associados, poderá causar mudanças severas em termos de sustentabilidade e estabilidade das comunidades locais e indígenas, decorrente da insegurança alimentar (NODARI; GUERRA, 2015). Para os agricultores a contaminação genética aumenta a vulnerabilidade dos cultivos, reduz a fonte de novos alelos, prejudica a seleção natural a favor da adaptação ao ambiente local. No âmbito da pesquisa, reduz-se a fonte de variações, importantes em um cenário de mudanças climáticas que requer espécies adaptadas, o que amplia a necessidade de conservação e a utilização desses recursos genéticos.

Dentre os recursos genéticos ameaçados pela ampliação do cultivo transgênico, encontra-se o milho e seus parentes silvestres. Por tratar-se de uma planta alógama, a coexistência de cultivares transgênicas com variedades crioulas ou convencionais atualmente é impossível. A primeira razão para isso, refere-se às grandes distâncias alcançadas pelo pólen ou sementes, a segunda, ao fato da troca de sementes entre agricultores e às vezes, seguida de mistura ou cruzamentos entre variedades, onde os agricultores esperam variantes para poder fazer as inovações. Além disso, apenas uma pequena parcela dos agricultores, visa manter alguma pureza varietal, utilizando estratégias de isolamento para proteger variedades, consideradas de alto valor.

O milho, direta ou indiretamente, é a base da alimentação de milhões de pessoas e é de longe o cereal mas cultivado no Brasil (OCDE; FAO, 2015). A sua importância está além da produção de uma cultura anual, mas em toda a produção agropecuária, industrial e na alimentação humana. A motivação para o cultivo da espécie, especialmente para as

famílias camponesas<sup>1</sup>, está atrelada, basicamente, a subsistência familiar, o consumo intermediário e a destinação comercial. A subsistência familiar está relacionada diretamente a alimentação humana, sob as variadas formas de preparo e consumo (milho verde, pamonha, polenta, canjica, bolos, pão, bolacha, broas, quirera, entre outras) que está diretamente associada à tradições e a ritos culturais e místicos (NODARI; GUERRA, 2015). O consumo intermediário refere-se a sua utilização na alimentação animal, que por sua vez também integra a alimentação da família, e, constitui o excedente comercial. O cultivo para fins comerciais tem como principal intuito a geração de renda monetária através da comercialização direta ao mercado como *commodity* (WORDELL FILHO; ELIAS, 2010).

Atualmente o cultivo de milho em escala comercial, está condicionado a cultivares com estreita base genética, comparativamente ao número de variedades crioulas existentes. Esta uniformidade é desejável para muitas características agronômicas de interesse para o agronegócio, processadores e consumidores, porém, ela é responsável por si só por maior vulnerabilidade das lavouras. A vulnerabilidade genética é a condição que ocorre quando uma cultura é uniformemente susceptível a um patógeno ou praga, como resultado da sua constituição genética, criando assim, um potencial de vulnerabilidade ou mesmo desastre. Porém, esta condição pode ser superada com práticas culturais adequadas, e pela mistura de diversos uniformes, mas geneticamente distintos, produzindo populações geneticamente heterogêneas que podem impedir a propagação da doença e evitar uma epidemia, desde que genes de resistência efetiva estejam presentes em algumas das cultivares, sendo que a superioridade do desempenho resulta da acumulação de alelos favoráveis (National Research Council, 1993).

A heterogeneidade genética também é importante para características de qualidade de sementes. Esta associação foi verificada por Nerling et al. (2013), onde os híbridos intervarietais de milho, cuja

---

<sup>1</sup> O termo camponês tem uma conotação de concepção de classe, com identidade e dimensionamento próprio de pequenos agricultores, que cultivam de forma agroecológica, em proporções necessárias à sobrevivência da família, comercializando o excedente, com utilização de mão-de-obra exclusivamente familiar e normalmente braçal. Segundo Silva (2011), o camponês é caracterizado pelo modo de viver, pelo modo de se relacionar com os outros grupos sociais e com a natureza, através do uso que se faz dela, expressos pelos hábitos alimentares e comidas típicas, pela cultura, pela música, pelas danças, pela mística e religiosidade, pelo jeito de produzir e de cuidar da terra.

composição continha genótipos crioulos, apresentaram maior viabilidade e vigor, podendo ser empregados pelos pequenos agricultores em seus sistemas produtivos. A grande variabilidade genética destes genótipos pode conferir aos híbridos intervarietais resiliência e adaptação às distintas condições edafo-climáticas observadas nas pequenas propriedades.

Diante de todos os aspectos apontados, é pertinente inferir que é necessário o uso real e potencial da diversidade de variedades crioulas para a produção sustentável dos elementos essenciais para a humanidade, sendo de fundamental importância a sua conservação pelos agricultores.

### 3.2. MERCADO DE SEMENTES E A RESISTENCIA CAMPONESA

A indústria de sementes do Brasil, passou por transformações significativas a partir da segunda metade da década de 90, principalmente, pelo estabelecimento de novos marcos regulatórios na área de sementes. A biotecnologia na agricultura, através de cultivares geneticamente modificadas, alterou a dinâmica do mercado e a relação entre obtentores e produtores de sementes. Nesta dinâmica, algumas das maiores empresas de agroquímicos passaram a atuar também em atividades nas áreas de biotecnologia e sementes, convergindo segmentos chave do mercado agrícola (ABRASEM, 2015).

O mercado brasileiro de sementes está estimado em aproximadamente R\$ 10 bilhões. As sementes de milho e soja respondem juntas por 74% deste mercado, valores expressivos para apenas duas espécies. Em relação ao número de cultivares disponíveis, segundo dados da Embrapa Milho e Sorgo, obtidos junto às empresas de sementes, para a safra 2015/2016 foram disponibilizadas 477 cultivares de milho, sendo 284 transgênicas e 193 cultivares convencionais (KIST, 2016). Com relação a área cultivada, estimativas apontaram que na safra 2015/2016 foram cultivados 15,3 milhões de hectares de milho, destes, 13,1 milhões de hectares foram implantados com alguma cultivar transgênica (ISAAA, 2015). A partir destes dados é possível verificar que o cultivo e o mercado de sementes apresenta domínio absoluto de cultivares transgênicas. Apesar das empresas mencionarem que há cultivares convencionais, do ponto de vista do agricultor a sua disponibilização real é restrita a poucas cultivares ou inexistente em determinadas regiões. A evidência está no fato de que mais de 90% das sementes são comercializadas no sistema vertical, ou seja, a empresa privada cria, desenvolve e comercializa seu próprio material (PESKE, 2016).

A redução na oferta de cultivares convencionais disponibilizadas se dá em função da concentração do setor à algumas empresas. A nível mundial a concentração do mercado de sementes é dramático, 82% da sementes comercializadas estão patenteadas e apenas dez empresas controlam 77% do mercado, destas, Monsanto, DuPont e Syngenta, controlam 47% da comercialização (SOLANO, 2012). No caso do mercado nacional de milho, verifica-se a mesma tendência, empresas como Monsanto/Bayer, DuPont, Dow AgroSciences e Syngenta, na safra 2013/2014, ofertaram 63% das cultivares de milho disponibilizadas ao mercado, enquanto que empresas públicas ofertaram apenas 7% das cultivares (CRUZ et al. 2014).

Este quadro reflete-se na pesquisa pública, que nos últimos anos perdeu o espaço ocupado durante a revolução verde. Atualmente as empresas multinacionais tem sido as principais executoras de pesquisas agrícolas e, conseqüentemente, ampliaram a participação no mercado de sementes. O fortalecimento de pesquisas locais, voltadas ao desenvolvimento de cultivares apropriadas e adequadas aos ambientes marginalizados, considerando a complexidade e as interações existentes nos sistemas agrícolas é fundamental para a superação da condição de meros receptores de tecnologias simplistas.

Partindo do ponto de vista da conservação o uso de variedades crioulas e cultivares convencionais, mesmo com fragilidades no âmbito da variabilidade genética, tornam-se marcos de resistência frente a ofensiva de multinacionais e sua tecnologia sintética. O trabalho de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias adequadas a pequena agricultura por organizações locais, mesmo que em pequena escala e com ínfimos recursos, são ações importantes para a manutenção da diversidade genética em cultivo.

Dentre as organizações que promovem a conservação e o uso dos recursos genéticos de forma sustentável, é possível destacar o Movimento dos Pequenos Agricultores - MPA<sup>2</sup> e a Cooperativa Oestebio<sup>3</sup>. Estas

---

<sup>2</sup> O Movimento dos Pequenos Agricultores - MPA, foi organizado em 1996, e é um movimento camponês, de caráter nacional e popular, de massa, autônomo e de luta permanente, constituído por grupos de famílias camponesas, que tem como principal objetivo a produção de comida saudável (MPA, 2013).

<sup>3</sup> A Cooperativa Oestebio foi criada em maio de 2007 e tem como objetivo organizar os camponeses em torno da produção, armazenamento, industrialização e comercialização de alimentos, sementes entre outras ações para o fortalecimento e melhoria as condições econômicas, ambientais e sociais dos pequenos agricultores.

organizações atuam resgatando, conservando, multiplicando e melhorando as variedades crioulas mantidas pelas famílias que compõem a sua base social.

O trabalho inicia com um diagnóstico, onde são identificadas as variedades crioulas mais ameaçadas e então organizam uma rede de famílias mantenedoras, as quais assumem um compromisso com a organização de conservar e manter a variedade. Cada variedade, na medida do possível, é mantida por três famílias distribuídas em diferentes regiões do estado, para garantir a maior variabilidade genética e minimizar riscos de perdas por fatores meteorológicos. Paralelo a manutenção da cultivar é realizado um processo de seleção massal realizado pela família com o auxílio de profissional técnico da organização.

No segundo momento é realizada a multiplicação das sementes, para isso, um segundo grupo de famílias, denominadas multiplicadoras, recebem sementes crioulas ou variedades de polinização aberta - VPA<sup>4</sup> e as multiplicam. Nesta etapa, as famílias multiplicadoras também recebem orientação técnica. A produção obtida pelas famílias multiplicadoras, em seus campos de produção, é adquirida pela Cooperativa Oestebio e então é beneficiada e comercializada. A comercialização pode se dar diretamente aos agricultores ou a programas sociais como o PAA<sup>5</sup>, neste caso, o Governo Federal adquire as sementes das organizações e a disponibiliza gratuitamente às famílias em vulnerabilidade social. O diferencial do trabalho desenvolvido por estas organizações está em multiplicar sementes crioulas e varietais em escala comercial sem perder a diversidade, adotando estratégias produtivas voltadas à transição agroecológica com a valorização do conhecimento tradicional, dos aspectos culturais, econômicos e sociais das comunidades, além de

---

<sup>4</sup> Através de parceria entre a Cooperativa Oestebio e empresas públicas de pesquisa são multiplicadas variedades de polinização aberta – VPA. Para esta parceria existe a formalização de contratos e a produção de sementes seguem a legislação pertinente.

<sup>5</sup> Programa de Aquisição de Alimentos - PAA, modalidade Aquisição de Sementes, instituída pelo Decreto 7.775 de 13 de agosto de 2014 e regulamentada pela Resolução nº 68 de 02 de setembro de 2014, do Grupo Gestor do PAA - GGPAA. As regras para operacionalização desta modalidade foram publicadas pela Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB em 31 de dezembro de 2014, no comunicado nº 027, Título 86 do Manual de Operações da CONAB – MOC.

possibilitar que um número maior de agricultores tenham acesso a estes recursos genéticos adaptadas a seus sistemas produtivos.

O trabalho de melhoramento conduzido pelo Movimento dos Pequenos Agricultores - MPA e a Cooperativa Oestebio, tem como foco a produção de variedades e híbridos adaptados aos sistemas agroecológicos e orgânicos de produção, com características diferenciais quanto ao uso, à propriedades nutricionais e a qualidade de sementes. Um exemplo com êxito do melhoramento participativo, está relacionado a variedade MPA 01, obtida a partir da combinação de 25 populações de milho e conduzida na propriedade do agricultor Névio Folgiarini, em Anchieta-SC. Desde o seu desenvolvimento, a variedade passa por métodos de melhoramento que tem possibilitado a obtenção de grãos e de biomassa para silagem na ordem de 6.280 kg.ha<sup>-1</sup> e 15.725 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. A variedade também apresentou potencial como fonte de carotenoides e xantofilas para a produção de alimentos funcionais (KUHNNEN et al., 2011). A produção de híbridos convencionais utilizando variedades crioulas, VPAs e híbridos comerciais também é desenvolvido, porém, ainda em fase inicial, não obtendo até o momento resultados significativos, além dos que compõem a presente tese, que buscou abordar aspectos relacionados a obtenção de sementes de qualidade fisiológica a partir de linhagens obtidas de distintas variedades crioulas e híbridos comerciais.

A produção de sementes e a pesquisa desenvolvidos por estas organizações, mesmo em escala ínfima, comparada ao volume produzido e comercializado por multinacionais, e, sem apoio financeiro, pode ser considerado uma experiência importante de resistência e autonomia produtiva de pequenos agricultores frente ao mercado monopolizado de sementes e um passo além para a conservação dos recursos genéticos.

### 3.3. CONTROLE GENÉTICO PARA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES

#### 3.3.1. Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade de sementes pode ser definida como o somatório dos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade (POPINIGIS, 1985). O aspecto fisiológico pode ser destacado como diretamente responsável pelo desempenho da semente a campo e no armazenamento.

O máximo potencial fisiológico é alcançado na maturidade fisiológica e, logo após esta fase, as sementes tornam-se propensas a

mudanças degenerativas fisiológicas e bioquímicas, dependendo do tempo dispendido até a colheita, das condições ambientais e, dos procedimentos adotados para secagem, beneficiamento e armazenamento das sementes (MARCOS-FILHO, 2015).

O potencial fisiológico das sementes pode ser estimado pelos parâmetros de germinação e principalmente pelo vigor. O vigor pode ser definido como a capacidade das sementes expressarem suas funções vitais sob ampla faixa de ambientes, sejam favoráveis ou desfavoráveis. A definição de ambientes desfavoráveis varia em função da espécie, cultivar e o estágio de desenvolvimento, normalmente inclui temperatura, disponibilidade hídrica, características de solo, além de práticas de manejo (GOGGI et al., 2008, VENTURA et al., 2012, MARCOS-FILHO, 2015). As vantagens do uso de sementes com elevado potencial fisiológico incluem germinação rápida e uniforme, com conseqüente redução de falhas no estande de plantas, obtenção de plântulas com maior tolerância a adversidades ambientais, além disso, possuem maior habilidade competitiva sobressaindo às plantas ruderais (BENNETT, 2001; BORTOLOTTO et al., 2008; DIAS et al., 2010, 2011).

O vigor de sementes é influenciado ainda durante o seu desenvolvimento e maturação. Dentre os fatores é possível destacar a interferência da temperatura, fotoperíodo, nutrição ou estresse hídrico, além disso, o genótipo, especialmente materno, exerce influência nos processos genéticos e bioquímicos específicos, associados a germinação e vigor (DONOHUE, 2009, HE et al., 2014). O efeito materno, relaciona-se à formação da semente. Na fertilização, uma das células espermáticas do grão de pólen funde-se à oosfera para formar o zigoto e a outra célula, espermática, funde-se a um tecido formado a partir da diferenciação dos dois núcleos polares, dando origem a uma estrutura triploide, que formará o endosperma. Desse modo, o zigoto, que dará origem a planta, possui 50% da informação dos cromossomos de origem paterna e, 50% de origem materna. Por outro lado, o endosperma e a camada de aleurona apresentam 66,66% dos cromossomos maternos e apenas 33,33% dos cromossomos paternos (VEIT et al., 1993). O efeito materno sobre a expressão de genes é muito mais forte no endosperma e na camada de aleurona do que em tecidos vegetativos (STUPAR et al., 2007).

### 3.3.2. Testes de vigor de sementes

Em programas de melhoramento, assim como na produção comercial, analisar o vigor de sementes através de testes específicos é importante na identificação de diferenças entre genótipos, especialmente

quando o percentual de germinação é semelhante para todos os materiais analisados. Os testes de vigor tem como objetivo identificar os genótipos ou lotes de sementes que apresentam maior probabilidade de ter um bom desempenho após a semeadura ou durante o armazenamento. Além disso, devem ser sensíveis para diferenciar o potencial fisiológico não detectado pelos testes de viabilidade (MARCOS FILHO, 2015).

O vigor das sementes pode ser determinado através de técnicas diretas ou indiretas que avaliam o atual estado metabólico das sementes e estabelecem uma relação com a emergência das plântulas e a capacidade de armazenamento. Estes testes incluem a condutividade elétrica, tetrazólio e crescimento de plântulas. Por outro lado, alguns testes podem ser realizados com o objetivo de identificar a tolerância ao estresse das sementes, como o teste de frio, envelhecimento acelerado e o teste de deterioração controlada.

Dentre os testes, o teste de frio tem como objetivo avaliar a resposta das sementes submetidas a uma combinação de baixa temperatura, elevada umidade e, se possível, à presença de agentes patogênicos. Neste teste, dois tipos de estresse prevalecem: temperaturas sub ótimas que favorecem o vazamento de solutos celulares durante a hidratação das sementes e a presença de microorganismos. Estas condições contribuem para a redução da velocidade e percentual de germinação. Conseqüentemente, o vigor das sementes é proporcional ao grau de sobrevivência de sementes quando expostas a este ambiente desfavorável. Por outro lado, no teste de envelhecimento acelerado, as sementes são hidratadas até um nível específico quando expostas a temperaturas relativamente elevadas (40 a 45°C) e umidade elevada (100 % de umidade relativa). Após o tratamento, as sementes são submetidas à germinação e as que tolerarem a condição de envelhecimento apresentam maior vigor com número maior de plântulas normais. O teste de vigor fornece informações acerca do potencial de emergência de campo e do armazenamento das sementes (MARCOS FILHO, 2015).

Em função do contraste de condições à que as sementes são submetidas utilizou-se o envelhecimento acelerado e o teste de frio como testes para avaliar o vigor das sementes dos genótipos avaliados.

### 3.3.3. Heterose e capacidade de combinação para qualidade fisiológica de sementes

A influência do genótipo sobre a resposta fisiológica em sementes, indica que esta característica pode ser utilizada pelo pesquisador para a

obtenção de genótipos e combinações híbridas com melhor desempenho para viabilidade e vigor.

A estimativa da heterose é um importante parâmetro para estudar e indicar as melhores combinações híbridas quanto a aspectos de qualidade fisiológica de sementes. A heterose é a expressão genética das diferenças de desenvolvimento de híbridos e seus respectivos pais (PATERNIANI, 2001), em outras palavras, é o desempenho superior, preconizado, de híbridos em relação a seus genitores.

Os estudos bioquímicos que associam a heterose com a germinação de sementes, constataram que plantas híbridas apresentam sistemas enzimáticos mais eficientes que as linhagens, o que explica o maior vigor das sementes. Paleg (1965), verificou que o controle da síntese de  $\alpha$ -amilase e subsequente hidrólise das reservas de sementes, apresentam ligação entre as giberelinas e a heterose em milho. O envolvimento da  $\alpha$ -amilase na heterose em plântulas de milho também foi objeto de estudo de Rood e Larsen (1998). Estes autores verificaram que, após 48 horas de hidratação da semente, a atividade dessa enzima nas plântulas híbridas foi maior do que a de seus parentais, bem como a concentração do ácido giberélico (GA3), resultando numa hidrólise mais rápida do amido do milho. Para Rood et al. (1990), linhagens de milho são menos vigorosas que seus híbridos descendentes, em parte por causa da deficiência de giberelinas. Houve correlação positiva entre o teor de giberelinas encontrado nas plântulas e o aumento da taxa de crescimento, área foliar e altura de plantas de milho. Hoecker et al. (2006), avaliaram quatro linhagens de milho duro e dentado e suas combinações híbridas. Eles observaram alta heterose para os caracteres avaliados, em torno de 51%, demonstrando que a heterose é manifestada durante os estágios iniciais após a emergência.

Ainda buscando a associação da heterose com a germinação através de estudos bioquímicos, Mino e Inoue (1994), verificaram que a maior velocidade de germinação e o crescimento vigoroso das plântulas estavam associados com a maior atividade metabólica de RNA, proteínas e DNA nos embriões. Os autores observaram ainda que, no embrião híbrido, o metabolismo de proteínas e lipídeos é superior aos das linhagens, favorecendo o crescimento do eixo embrionário e a maior germinação das sementes. Li et al. (2009) verificaram os perfis de expressão gênica entre híbridos altamente heteróticos e seus pais, assim como híbridos de baixa heterose, observaram que ambos apresentaram maior expressão gênica que seus pais, em relação aos caracteres avaliados. No trabalho realizado por Oliveira et al. (2015), onde se avaliou a heterose e a expressão genica da enzima amilase associada à

qualidade fisiológica de sementes utilizando duas linhagens e dois híbridos, foi observada heterose positiva para a expressão de genes da amilase. Os autores observam ainda que não é possível indicar um único gene responsável pelo vigor híbrido, mas sim um conjunto de fatores, responsáveis pela manifestação da heterose. Resultado similar foi encontrado por Fu et al. (2011), em trabalho comparativo entre a análise de proteômica e a heterose durante a germinação de sementes de milho. Os autores concluíram que a heterose no híbrido resulta da interação entre os efeitos de várias proteínas, e não de apenas uma proteína.

A estimativa da heterose para características associadas à qualidade fisiológica foi obtida por Gomes et al. (2000). Os autores avaliaram seis linhagens de milho e suas combinações híbridas e observaram que as sementes híbridas de milho apresentaram qualidade fisiológica superior quando comparadas às linhagens, evidenciando a expressão da heterose. Em estudo realizado por Nerling et al. (2013), a contribuição genética dos parentais para características de qualidade fisiológica em híbridos intervarietais, a partir de variedades crioulas, VPAs e híbridos comerciais de milho, indicaram haver heterose para viabilidade e vigor. Os autores também verificaram a existência do efeito recíproco, sugerindo que deve haver atenção no momento da escolha do parental na composição híbrida para obtenção de sementes de melhor qualidade fisiológica.

A heterose é determinada por genes com dominância completa ou parcial e, é dependente do grau de divergência genética entre os genitores, ou seja, das diferenças das frequências alélicas (MIRANDA FILHO; VIEGAS, 1987). De acordo com Guo et al., (2013), a hibridização entre duas linhagens pode causar mudanças na expressão de grande número de proteínas e, a alteração da expressão gênica a nível traducional no híbrido, pode ser responsável pela heterose observada.

Nos híbridos a heterose se manifesta em descendentes de linhagens com alta capacidade específica de combinação (CEC). Assim, para o caso de híbridos é mais interessante a CEC das linhagens, ao passo que em programas de melhoramento de variedades a capacidade geral de combinação (CGC) deve receber maior atenção (NASS et al., 2001). As estimativas da CGC, CEC e o efeito recíproco (ER) para qualidade de sementes foram estudados por Cabral et al. (2013; 2015), onde foram verificados valores significativos para CGC, CEC e o ER em milho pipoca. Os autores encontraram maior significância dos efeitos não-aditivos, pelo fato da CEC apresentar componentes quadráticos maiores que os relacionados a CGC, além disso, indicaram a linhagem com melhores características para utilização como genitor materno. Para Naidoo et al. (2012), os efeitos não aditivos foram mais importantes para

a germinação e o vigor em trabalho com sementes de milho com alta qualidade proteínica (*quality protein maize* – QPM) milho normal e mutante *low phytic acid* (*lpa1-1*). O estudo realizado por Moterle et al. (2011), encontrou valores significativos de CGC e CEC para germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado, frio modificado, condutividade elétrica, emergência de plântulas em areia, velocidade de emergência e índice de velocidade de emergência em nove linhagens e 72 híbridos de milho pipoca, obtidos em dialélio completo. Os autores afirmam que os efeitos não aditivos foram mais importantes do que os efeitos aditivos no controle genético da qualidade fisiológica de sementes. Em trabalho desenvolvido por Gomes et al. (2000), também foi constatado que os efeitos genéticos não-aditivos tiveram um efeito maior sobre a qualidade das sementes de milho em cruzamento dialélico completo a partir de características de viabilidade, vigor e atividade enzimática em sementes. Por outro lado, Antuna et al. (2003) e Ortiz et al. (2006) estudaram o controle genético da qualidade fisiológica de sementes de milho e observaram que os efeitos aditivos tiveram maior influência no controle genético do que os efeitos não-aditivos na maioria dos testes realizados.

Apesar de resultados divergentes, estudar a capacidade de combinação pode trazer informações valiosas, que permitem a seleção dos melhores genitores para o desenvolvimento de híbridos com maior qualidade de sementes. Para o uso comercial é necessário entre outros aspectos, o desenvolvimento de cultivares com alta germinação e vigor, no entanto, ainda é necessário avançar nos estudos que avaliem os efeitos genéticos sob as características associadas à qualidade de sementes.

O outro fenômeno importante no processo de melhoramento está relacionado a endogamia e seus efeitos sobre a qualidade das sementes. A autofecundação sucessiva é a principal estratégia utilizada para a obtenção de linhagens endogâmicas. Esta estratégia aumenta a homozigose média da planta, podendo causar depressão endogâmica. Na produção de híbridos de milho, é possível verificar visualmente as consequências da endogamia, como a redução no tamanho da planta, no tamanho das espigas e no peso dos grãos das linhagens, quando comparadas as cultivares de onde se originaram (ALLARD, 1971).

Do ponto de vista da conservação, a manutenção da variação genética suficiente é importante para que as populações sejam capazes de responder evolutivamente às condições ambientais em mudança (FRANKLIN, 1980). À medida que as populações se tornam cada vez menores e homogêneas, tendem a perder a variabilidade genética e estão suscetíveis à patógenos e pragas.

A endogamia está associada a um grande número de transcritos de genes, principalmente aqueles envolvidos com o metabolismo, estresse e defesa (PAIGE, 2010). A causa da depressão endogâmica foi associada à presença de alelos deletérios e letais em homozigotos, que estão ocultos em condições heterozigotas. A medida que a homozigose aumenta as características recessivas, deletérias na grande maioria, se manifestam, resultando em perda de vigor (ALLARD, 1971).

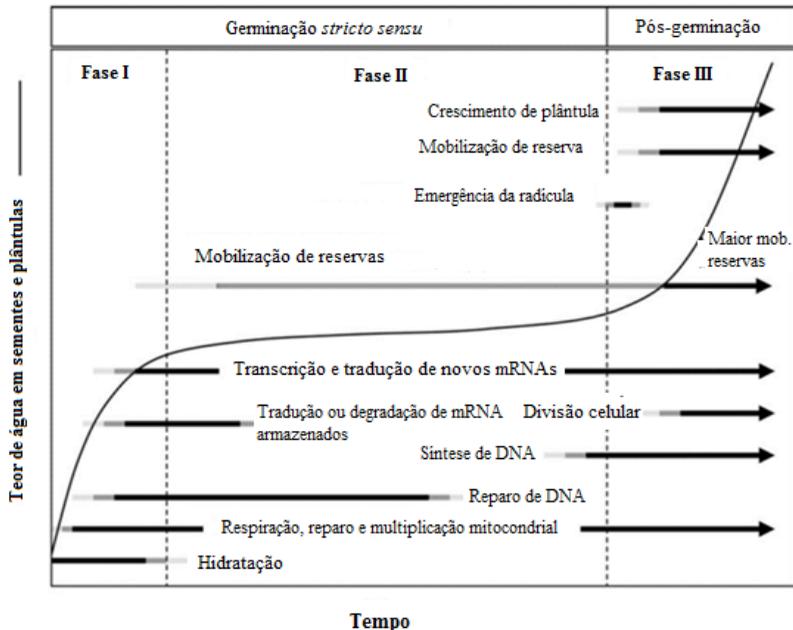
Não foram identificados estudos que associem a endogamia à resposta fisiológica em sementes. A maioria dos estudos, associa a endogamia a redução no rendimento, tamanho de planta, tamanho de espigas, peso de sementes entre outras características. Avaliar a resposta de diferentes populações de milho em função da endogamia pode trazer informações sobre a perda de variabilidade genética e seus impactos na produção de sementes de qualidade.

#### 3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA COMO COMPONENTE DE QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SEMENTES DE MILHO

A composição bioquímica das sementes apresenta a mesma variação qualitativa dos componentes encontrados em outros órgãos da planta. Nas sementes, as reservas acumuladas são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e energia para a germinação (MARCOS FILHO, 2005).

A germinação é a retomada do desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula, compreendendo uma sequência ordenada de atividades metabólicas iniciadas a partir da hidratação (MARCOS FILHO, 1986). Do ponto de vista da tecnologia de sementes, o processo encerra com a formação de uma plântula normal. Por outro lado, do ponto de vista biológico, o processo é encerrado com a protrusão radicular.

A água desempenha papel decisivo no processo germinativo, controlando a reidratação dos tecidos, que por sua vez, intensifica a respiração, o sistema enzimático é ativado e inicia-se a hidrólise e mobilização de reservas, fornecendo energia e nutrientes para a retomada do crescimento do embrião (BEWLEY, 2001, EHRHARDT-BROCARDI e COELHO, 2016). No período compreendido entre o início da hidratação até a emergência da radícula, verifica-se a existência de um padrão trifásico de absorção de água pela semente (Fig. 1).



**Figura 1.** Curso temporal dos eventos físicos, fisiológicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (Fase I e II) e crescimento da plântula (Fase III). Fonte: Modificado de NONOGAKI et al., 2010.

Apresentado na figura 1, inicialmente, ocorre uma rápida absorção de água pelas sementes secas, até que todas as matrizes e conteúdos celulares estejam hidratados, este período é compreendido como a fase I de absorção de água. Nesta fase, é possível verificar a retomada do metabolismo energético, com a reativação de enzimas envolvidas com o processo respiratório, liberando ATP para a fosforilação oxidativa após a hidratação, além do reparo e ativação das mitocôndrias pré-existentes. Seguindo o padrão de absorção de água, verifica-se que após a completa hidratação dos tecidos, há um período de absorção de água limitado, que corresponde a fase II de hidratação. Esta fase é caracterizada pela intensificação do metabolismo celular, ocorre a transcrição e tradução de mRNA armazenado previamente, o reparo do DNA, a hidrólise e mobilização das reservas armazenadas. Os principais componentes armazenados nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídios. Nos cereais, o amido e as proteínas são catabolizados após o início da germinação por enzimas hidrolíticas, dentre elas amilases e proteases, secretadas pela cama de aleurona. O amido e as proteínas atuam como

fonte de energia, fornecendo carbono e nitrogênio para a germinação da semente e subsequente estabelecimento das plântulas. Nesta fase, também são ativados os reguladores genéticos, responsáveis pela promoção ou inibição da fase final da germinação. A fase III é compreendida como o final da germinação e é caracterizada por um novo aumento da absorção de água, que está relacionada ao aumento das divisões mitóticas e expansão celular, eventos relacionados a emissão da radícula e crescimento da plântula (BEWLEY, 2001; NONOGAKI et al., 2010; TAN-WILSON e WILSON, 2012; YAN et al., 2014; WANG et al., 2015).

O tempo necessário para a ocorrência da primeira fase varia entre oito e dezesseis horas. O tempo de duração da fase II varia em função da espécie e da disponibilidade hídrica do substrato. As sementes de ervilha, feijão, milho, soja, alface, entre outras, podem permanecer em relativa pausa durante o período de oito a dez vezes superior a duração da fase I. Por outro lado, as sementes de trigo, mamona, cevada, arroz e aveia, geralmente, não exibem a fase II (MARCOS-FILHO, 2005).

A maior velocidade com que ocorre a passagem pelas distintas fases da germinação, pode ser um indicativo de sementes vigorosas. As sementes de alto vigor possuem maiores teores de composto de reservas e um eficiente metabolismo, com eficientes mecanismos que combatem a deterioração, com respostas antioxidantes e de reparo de DNA, convergindo para a obtenção de plântulas vigorosas na germinação (HAMPTON, 1973; VENTURA et al., 2012; RAJJOU et al., 2012; HAN et al., 2013).

A composição bioquímica das sementes pode ser afetada por uma série de fatores, dentre eles as características genéticas, cultivar, estágio de maturação, fertilidade do solo e condições climáticas, além das práticas de manejo, que alteram a produtividade e a remobilização de nutrientes de diferentes partes da planta para as sementes (PEREIRA, 2009).

As diferenças na composição bioquímica, na eficiência metabólica e na mobilização das reservas, podem também explicar as diferenças no vigor de sementes de linhagens e híbridos. Uma das evidências está relacionada a maior concentração de giberilina em sementes híbridas em relação às linhagens (PALEG, 1965; ROOD; LARSEN, 1988; ROOD et al., 1990), além disso, a atividade enzimática, especialmente da  $\alpha$ -amilase, resultou em hidrólise mais rápida do amido nas sementes de milho. Para Mino e Inoue (1994), a maior velocidade de germinação e o crescimento vigoroso das plântulas está associado à maior atividade metabólica de RNA, proteínas e DNA nos embriões. Os autores verificaram também que, no embrião do híbrido, o metabolismo de

proteínas e lipídeos é superior aos das linhagens, favorecendo o crescimento do eixo embrionário e uma maior germinação das sementes.

O estudo das vias metabólicas associadas ao vigor de sementes e a função de cada componente no processo germinativo são fundamentais para compreensão deste complexo processo. A seguir, serão descritas algumas funções atribuídas à proteínas, fósforo e amido em sementes de milho associados a qualidade fisiológica.

### **3.4.1. Funções das proteínas associadas à qualidade fisiológica em sementes**

A proteína é o segundo maior componente nos grãos de milho, variando entre 8 e 11% (ILYAS, 2015). A fração proteica abundante em milho corresponde a zeína (50-70%) e são específicas do endosperma. Estas proteínas são ricas em prolina e glutamina, daí o nome prolamina, e, são armazenadas na forma insolúvel, rodeadas por proteínas reticuladas e estabilizadas por ligações dissulfeto. Devido a esta conformação, as zeínas armazenam nitrogênio, carbono e enxofre, elementos essenciais no processo germinativo. A localização periférica, especialmente de  $\gamma$ -zeína, nos corpos proteicos e sua associação com amido, conferem textura e a firmeza do grão. As globulinas por sua vez, especialmente GLB1 e GLB2, estão presentes no embrião e não possuem função enzimática conhecida. Estas proteínas são ricas em aminoácidos, como glutamato e glutamina, servindo como fonte de nitrogênio para o crescimento do embrião durante a germinação (PRASANNA et al., 2001; BOSTON; LARKINS, 2009; HOLDING; LARKINS, 2009).

As sementes secas possuem número abundante de enzimas, como as do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e fosfoenolpiruvato carboxilase, mRNA, proteínas ou complexos proteicos do metabolismo celular ativos, em baixa intensidade, vindo a ter participação fundamental nos estágios iniciais da germinação (ROSENTAL et al., 2014).

As proteínas são armazenadas em vacúolos do endosperma e na camada de aleurona em cereais. Um número significativo de enzimas com diferentes funções envolve os vacúolos, hidrolisando proteínas durante o processo germinativo. As peptidases, armazenadas em sementes secas, iniciam o processo de hidrólise nas primeiras horas, enquanto que proteases adicionais são acumuladas com a hidratação das sementes. Estas enzimas são sintetizadas e secretadas pela camada de aleurona no processo de germinação (BEWLEY, 2001).

O início da hidratação das sementes provoca uma rápida recuperação do metabolismo celular com a geração de um estado redox, responsável pela ativação de enzimas essenciais para produção de energia

para a protrusão radicular. A obtenção do estado redox adequado nas células é crítico para a atividade balanceada das desidrogenases do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da cadeia de transportes de elétrons mitocondrial. O estado redox também está relacionado a redução das ligações dissulfeto das proteínas, contribuindo para a degradação de amido e proteínas, reduzindo inibidores para ativação de proteases e amilases (VAN DONGEN et al., 2011; WEITBRECHT et al., 2011; ROSENTHAL et al., 2014).

A síntese *de novo* é requerida durante a germinação, no entanto, os amino ácidos livres presentes nas sementes secas não são suficientes para esta síntese, sendo necessária a degradação de proteínas de armazenamento nas primeiras horas de hidratação (BEWLEY et al., 2013). A medida que o processo germinativo progride, a síntese proteica torna-se cada vez mais dependente da síntese de mRNA, que altera sua composição ao longo deste processo (HE et al., 2015). O número de proteínas envolvidas no processo germinativo é elevado, e apresenta expressão diferencial entre o embrião e endosperma. Em trabalho conduzido por Fu et al. (2011), foram encontradas 54 proteínas, não aditivas distintas no embrião de cinco híbridos de milho. Estas proteínas foram classificadas em nove agrupamentos baseados em sua função. O maior grupo corresponde as envolvidas com o metabolismo (17%), seguido das envolvidas com o processo de desintoxicação celular e as com função desconhecida (15%). As demais foram classificadas como proteínas chaperonas (13%), transdutoras de sinal (11%), do desenvolvimento (9%), transportadoras (6%), envolvidas com a resposta à estresse (6%) entre outras proteínas não classificadas (9%). Em suma, as proteínas podem assumir função estrutural, nutritiva ou enzimática, participado da estrutura dos tecidos, liberando aminoácidos usados como substratos para a respiração e monitorando reações químicas, além de atuarem em mecanismos de transporte, como protetoras ou como reguladoras de processos fisiológicos (MARCOS FILHO, 2005).

A eficiente síntese, acúmulo e ativação do metabolismo deste importante componente, é responsável pelo eficiente mecanismo germinativo, com o combate a deterioração, com respostas antioxidante e de reparo de DNA eficazes, convergindo com a obtenção de plântulas vigorosas. O estudo deste componente de reserva e seu desdobramento, pode trazer informações valiosas sobre a sua associação à qualidade fisiológica de sementes.

### **3.4.2. Funções do fósforo associados à qualidade fisiológica em sementes**

O fósforo é armazenado em sementes de milho sob a forma de fitato (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate; InsP6). Neste cereal, o maior volume de fitato está acumulado escutelo, em seguida na camada de aleurona, enquanto que apenas pequenos traços são encontrados no coleóptilo e na radícula (BEWLEY, 2013). As sementes acumulam fósforo durante sua maturação, nos vacúolos de armazenamento de proteínas, estando principalmente complexado a minerais, em maior escala com potássio e magnésio e, em menor extensão com cálcio, ferro e zinco (LOTT et al., 2000; RABOY, 2009).

O fitato, aparentemente, desempenha dois papéis nas sementes, o primeiro deles, é atuar como reservatório de fosfato de inositol e cátions, o segundo, serve como controlador da homeostase orgânica de fosfato, tanto na germinação como no desenvolvimento de plântulas (LOTT et al. 1995). O fato de estar complexado a outros cátions, faz com que o fitato, seja considerado um eficiente quelante de íons de ferro, agindo como antioxidante. A hidrólise do fitato inicia com o processo de hidratação das sementes (NADEEM et al., 2011), e é realizado pela enzima fitase, que disponibiliza ésteres de mio-inositol e fosfatos, além de liberar os minerais que encontravam-se complexados aquele componente para a germinação.

O fósforo, a partir de suas distintas formas de disponibilização, pode agir como molécula transdutora de sinal, sendo capaz de induzir uma resposta adequada ao estresse oxidativo, tais como a síntese de sistemas enzimáticos capazes de desintoxicar espécies reativas de oxigênio e na manutenção da fosfato homeostase, tem grande importância no metabolismo, por estar ligado a compostos como adenosina- trifosfato (ATP), uridina-trifosfato (UTP), citidina-trifosfato (CTP), guanosina-trifosfato (GTP), fosfolipídios, etc., fontes de energia aos processos metabólicos, além disso, é constituinte de DNA, RNA, amido, lipídeos e proteínas (MEURER et al., 1981; DORIA et al., 2009).

Apesar do importante papel no metabolismo germinativo, não foram identificados estudos que relacionassem a atividade enzimática ou o conteúdo de fósforo à qualidade de sementes. No entanto, acredita-se que a fitase tenha papel chave no processo de germinação, e, sua maior atividade pode estar associada a sementes de melhor qualidade fisiológica.

### **3.4.3. Carboidratos de reserva e suas funções na qualidade fisiológica de sementes**

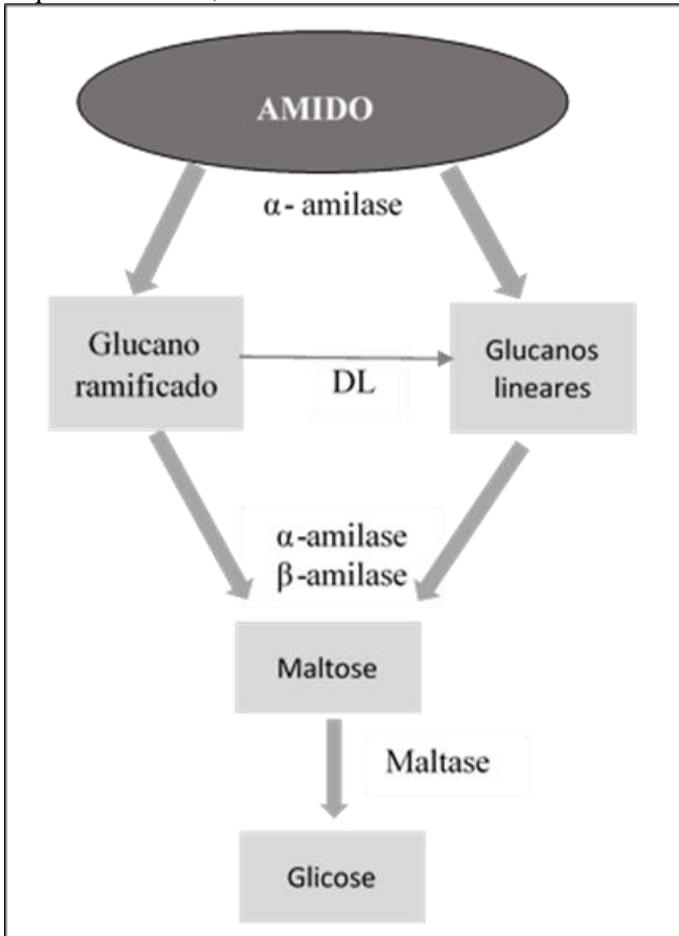
Os carboidratos são as principais substâncias de reserva das sementes de milho, tem função principal de fornecimento de energia para a retomada do desenvolvimento do embrião durante a germinação. Desse modo, admite-se que alterações no teor deste composto podem inferir na qualidade fisiológica das sementes.

Os carboidratos podem ser classificados em monossacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos. Os polissacarídeos são compostos por grandes moléculas formados pela junção de monossacarídeos. Compõem este grupo amido, hemicelulose e celulose. A celulose e a hemicelulose são constituintes da parede celular. O amido é o principal carboidrato com função de reserva em sementes de milho, correspondendo a, aproximadamente, 74% do peso total da semente.

O amido é armazenado em organelas celulares, denominadas amiloplastos e é constituído por longas cadeias de D-glicose: amilose e amilopectina. A amilopectina é uma molécula altamente ramificada e corresponde a 50-70% do grão de amido. A amilose corresponde a 20-25% do grão de amido e é um molécula essencialmente linear (LIU et al., 2013). As características funcionais do amido, como densidade, poder de inchamento e solubilização, são afetadas pelo teor de amilose, distribuição das ramificações das cadeias de amilopectina, conteúdos de fosfato mono-éster, fosfolipídeos, lipídeos, tamanho e distribuição do grânulo, estrutura cristalina e sua arquitetura. Assim, admite-se que as propriedades do amido, como tamanho e forma dos grânulos de amido podem trazer inferências sobre aspectos de qualidade fisiológica das sementes. O trabalho desenvolvido por Xia et al. (2011), avaliou a germinação e o vigor de sementes de milho mutantes *sbe 1*, que são deficientes em amilose e, sementes de genótipo não mutantes denominadas *wt* (*wild-type*). Os autores verificaram que não houve diferença no percentual de germinação entre *sbe 1* e *wt*. Porém, quando avaliado o vigor das sementes através do comprimento do coleóptilo, verificaram que as plântulas do mutante *sbe 1* apresentavam coleóptilo com menor tamanho comparadas ao *wt*, sendo indicativo de menor vigor. Este resultado sugere que a composição do amido e suas propriedades físico-químicas podem auxiliar na compreensão da manifestação do vigor de sementes.

O processo de germinação requer quantidades significativas de energia para o reestabelecimento do metabolismo até a protrusão radicular. Para isso, o amido armazenado é hidrolisado e convertido a açúcares que são facilmente transportáveis para os locais necessários, como órgãos metabolizadores e em crescimento e, servindo como suporte a eventos de produção de energia (WANG et al., 2005). A hidrólise do

amido em cereais durante a germinação é relativamente simples (ANDRIOTIS et al., 2016; BEWLEY et al., 2013). A figura 2 apresenta, esquematicamente, a hidrólise do amido.



**Figura 2.** Via hidrolítica da degradação de amido em cereais. Adaptado de Andriotis et al. (2016).

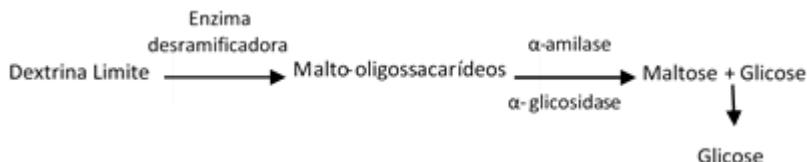
A  $\alpha$ -amilase é a principal enzima que inicia o processo de degradação dos grânulos de amido, atuando, aleatoriamente, apenas as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4), liberando oligossacarídeos, que com auxílio de  $\alpha$ -glucosidases, converte-os em maltose.



Apesar disso, a  $\alpha$ -amilase, não é capaz de hidrolisar as ligações  $\alpha$  (1-6), que correspondem aos pontos de ramificação da amilopectina, e assim são produzidos núcleos altamente ramificados de unidades de glicose, denominadas dextrinas limite (LD).



Para que estas dextrinas limites sejam hidrolisadas, são necessárias enzimas desramificadores, limite destrinasas, que quebram estas ligações, liberando açúcares simples.



A enzima  $\beta$ -amilase (BAM), não é capaz de hidrolisar os grânulos de amido nativos, ela então hidrolisa ligações  $\alpha$  (1-4), a partir da extremidade não-redutora do grânulo de amido, produzindo maltose. A maltose, dissacarídeo, é convertida pela maltase em duas moléculas de glicose.

A glicose é um monossacarídeo, que não sofre hidrólise. As hexoses (glicose, frutose, galactose) e as pentoses (ridose – componente do RNA e desoxiribose – componente do DNA) são monossacarídeos mais comuns e mais importantes nos seres vivos. Além destes açúcares simples, ainda há os oligossacarídeos, formados pela conexão de dois a dez monossacarídeos que podem vir a ser separados por hidrólise. Os oligossacarídeos mais importantes são a sacarose, lactose e a maltose, quem possuem ação energética e, rafinose e a estaquiose que auxiliam na estabilização das membranas celulares (LEOPOLD, 1994; BERNAL-LUGO; LEOPOLD, 1995).

O conteúdo de açúcares solúveis e amido reduz gradualmente e a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase aumentam ao longo do processo germinativo (MEI; SONG, 2008). Em função da sua importante atuação na hidrólise do amido as amilases podem ser consideradas pontos de controle associados a qualidade de sementes. O estudo realizado por Oliveira et al. (2013), avaliou a expressão de enzimas amilases em função da qualidade fisiológica e do tamanho de sementes de 4 linhagens de milho. Os autores verificaram que houve expressão diferenciada de  $\alpha$ -

amilase e  $\beta$ -amilase nas sementes das linhagens com diferentes níveis de qualidade fisiológica, ou seja, as sementes com maior vigor apresentaram maior expressão da enzima. Além disso, a maior expressão de enzimas foi observada em sementes hidratadas e naquelas com maior tamanho. A atividade enzimática associada a testes fisiológicos, em lotes de milho híbrido com diferentes níveis de vigor, foi objeto de estudo de Santos et al. (2016). Os autores verificaram que o lote de sementes com maior vigor apresentava maior atividade da enzima  $\alpha$ -amilase. Além disso, os autores verificaram que houve correlação entre as enzimas piruvato desidrogenase e malato desidrogenase com o vigor de sementes nos híbridos de milho avaliados. Os autores afirmam ainda que a atividade enzimática associada a testes de vigor são confiáveis para definição da qualidade fisiológica de lotes de sementes. A partir destes estudos considera-se que as enzimas podem ser eficientes marcadores associados à qualidade fisiológica de sementes, além de constituir-se em uma importante ferramenta para obtenção de informações precoces sobre a qualidade fisiológica de linhagens e híbridos em programas de melhoramento.

A ação das enzimas amilases está diretamente relacionada à disponibilização e mobilização de açúcares solúveis. Os açúcares solúveis servem de substrato para outras enzimas envolvidas no processo respiratório, como a glicose-6-fosfato desidrogenase, que atua na rota alternativa das pentoses monofosfatadas, sendo responsável pela manutenção de um nível adequado de NADPH nas células (LIN et al., 2005). Além disso, são substrato para a enzima malato desidrogenase, que catalisa a conversão de malato à oxaloacetato, tendo importante função no ciclo de Krebs da respiração celular, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial em outros compartimentos celulares (TUNES et al., 2011). Os açúcares também são importantes no sistema antioxidante, como substrato para enzimas como superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione reductase (BAILLY, 2004). Além disso, principalmente os oligossacarídeos, podem contribuir para a estabilização das membranas intracelular e aumentar a viscosidade do citoplasma e da temperatura de transição do estado vítreo para o líquido, aspectos importantes para reduzir os efeitos do armazenamento (BERNAL-LUGO; LEOPOLD, 1992; LEOPOLD et al., 1994; SUN, 1997; OBENDORF, 1997).

Assim, verificar as alterações na hidrólise e mobilização de carboidratos e a atividade de enzimas amilolíticas durante a germinação, pode trazer informações relevantes da sua relação com o metabolismo da germinação e sua associação com vigor de sementes.

## CAPÍTULO 1

### EFEITO DA ENDOGAMIA E CONTROLE GENÉTICO ASSOCIADO A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES



## EFEITO DA ENDOGAMIA E CONTROLE GENETICO ASSOCIADO A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES

**RESUMO:** Os estudos que avaliem os efeitos genéticos durante a obtenção de linhagens baseados em características de qualidade de sementes são escassos, especialmente aqueles que avaliam os efeitos da endogamia e a manifestação da heterose na viabilidade e no vigor de sementes. O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da endogamia na viabilidade e no vigor de sementes durante a obtenção de linhagens, verificar a capacidade de combinação dos parentais e a expressão da heterose nos híbridos de milho em função das características fisiológicas em sementes. A depressão por endogamia foi estimada ao longo de cinco ciclos de autofecundação em cinco parentais (CRI, VPA1, VPA2, HIB1 e HIB2) a partir da qualidade fisiológica das sementes. Foram estimadas, por meio de dialelo completo, os efeitos genéticos predominantes na expressão de características de qualidade de sementes, a capacidade geral combinação de cinco parentais e a capacidade específica de combinação de 20 híbridos. A qualidade das sementes foi determinada através da viabilidade, vigor por envelhecimento acelerado e tolerância ao frio, massa seca e peso de mil sementes. A endogamia afetou negativamente a qualidade fisiológica de sementes ao longo dos ciclos de autofecundação. Os parentais apresentaram comportamento distinto quanto a tolerância aos efeitos da endogamia. CRI, VPA1 e HIB1 mostraram maior tolerância aos efeitos da endogamia com sementes de melhor qualidade fisiológica em relação aos demais parentais. Os híbridos apresentaram qualidade fisiológica superior quando comparados aos parentais, evidenciando a expressão da heterose na qualidade fisiológica de sementes. Houve maior significância dos efeitos não aditivos no controle genético da qualidade de sementes. O parental HIB1 apresentou estimativas favoráveis da capacidade geral de combinação para o aumento da qualidade fisiológica de sementes. As combinações 3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 2 x 3, 4 x 3 e 4 x 5, apresentaram estimativas positivas para capacidade específica de combinação, sendo os mais promissores para qualidade das sementes.

**Palavras-chave:** homozigose, heterose, capacidade de combinação, híbridos, *Zea mays*

## 1.1. INTRODUÇÃO

A endogamia é o acasalamento de indivíduos que estão relacionados entre si por ascendência. Esse efeito, denominado depressão por endogamia, reduz o valor médio de caracteres quantitativos, relacionados com a capacidade reprodutiva ou com a eficiência fisiológica da planta, devido a homozigose de alelos deletérios (FALCONER, 1976).

A depressão máxima esperada de uma geração de auto polinização ( $S_i$ ) em relação a original ( $S_0$ ) é de 50%. As populações com base genética mais ampla e nunca expostas a consanguinidade tendem a apresentar maior depressão por endogamia quando auto polinizadas, comparadas às populações com uma base genética mais estreita, obtidas a partir da combinação aleatória de linhagens endogâmicas (VIANNA et al., 1982; LIMA et al., 1984). As consequências da endogamia na qualidade fisiológica de sementes de milho não foram profundamente estudadas. Porém, estudos que abordem o efeito da endogamia na qualidade fisiológica de sementes durante a obtenção das linhagens, podem trazer informações pertinentes para a seleção de genótipos tolerantes aos efeitos da endogamia.

A heterose, por outro lado, é um fenômeno natural pelo qual o híbrido descendente tem o potencial de expressar o seu vigor em relação aos seus parentais. A heterose é variável em função da distância genética dos parentais e pode ser vista como o resultado da interação de genes, resultando em complexas mudanças na genética, epigenética e nas cadeias bioquímicas e regulatórias (CHEN, 2013). Para características associadas à qualidade de sementes, estudos apontam a manifestação da heterose para viabilidade e vigor de sementes (GOMES et al., 2000; REIS et al., 2011; NERLING et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; PRAZERES; COELHO, 2016). Em vários desses estudos, os híbridos mostraram maior eficiência nos sistemas enzimáticos do que os parentais, explicando o maior vigor da sementes. Outros estudos observaram que a maior velocidade de germinação e o crescimento vigoroso das plântulas estava associado à maior atividade metabólica de RNA, proteínas e DNA, a maior expressão gênica nos embriões híbridos de milho em comparação com as linhagens (FU et al., 2011; GUO et al., 2013; JIN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). A heterose é causada por eventos moleculares complexos e a interação de genes, de modo que um gene ou via gênica sozinha não representa a base genética da heterose no milho (DING et al., 2012).

Os efeitos gênicos, atribuídos aos fatores aditivos, dominantes ou epistáticos, na qualidade fisiológica de sementes foram objeto de estudo de vários trabalhos (MOTERLE et al., 2011; NAIDOO et al., 2012; CABRAL et al., 2013; 2015). A maioria dos trabalhos encontraram maior significância dos efeitos não-aditivos para atributos de qualidade de sementes, pelo fato da capacidade específica de combinação (CEC) apresentar componentes quadráticos maiores que os relacionados a capacidade geral de combinação (CGC). São desejáveis aquelas combinações híbridas com estimativas de CEC positivas, que envolvam pelo menos um dos genitores que também tenham apresentado estimativas positivas de CGC para qualidade fisiológica. Deve ser dada atenção aos estudos da CEC e CGC associados a qualidade de sementes, especialmente em programas de melhoramento que objetivam a obtenção de sementes com maior qualidade fisiológica.

Neste sentido, estudar os aspectos genéticos sob as características associadas à qualidade de sementes, podem trazer informações valiosas para a produção de híbridos e a identificação de parentais com maior potencial de qualidade de sementes, gerando subsídios para os programas de melhoramento. O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da endogamia na viabilidade e no vigor de sementes durante a obtenção de linhagens, estimar os efeitos genéticos sobre características de qualidade de sementes, bem como como gerar informações sobre a capacidade geral e específica de combinação e a manifestação da heterose para as características fisiológicas em sementes de milho.

## 1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### **Material vegetal**

As populações fonte utilizados neste estudo foram compostas por uma variedade crioula (CRI), duas variedades de polinização aberta comercial (VPA1 e VPA2) e dois híbridos simples comerciais (HIB1 e HIB2), obtidas em programa de melhoramento da Cooperativa de produção de sementes de São Miguel do Oeste, SC. A descrição das características dos genótipos utilizados encontram-se registrados na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1.** Caracterização das populações fonte utilizadas na obtenção de linhagens e híbridos para o estudo dos efeitos da endogamia e o controle genético associado a qualidade fisiológica de sementes.

| Descrição                      | Genótipos                             |                     |                     |                    |                 |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
|                                | Pixurum 05                            | SCS 155 Catarina    | BRS Missões         | CD 393             | 30F53           |
| Identificação                  | CRI                                   | VPA1                | VPA2                | HIB1               | HIB2            |
| Tipo                           | Variedade crioula                     | Variedade sintética | Variedade sintética | Híbrido simples    | Híbrido simples |
| Textura do grão                | Semi duro                             | Duro                | Dentado             | Semi duro          | Semi dentado    |
| Cor do grão                    | Amarela clara com 5% de grãos brancos | Amarela alaranjada  | Amarela             | Alaranjada         | Alaranjada      |
| Ciclo                          | Precoce                               | Precoce             | Precoce             | Precoce            | Precoce         |
| Estatura média das plantas (m) | 2,80                                  | 2,30                | 2,35                | SI                 | 2,14            |
| Usos                           | Grão                                  | Grão e silagem      | Grão                | Grão               | SI              |
| População de plantas/ha (mil)  | 50                                    | 50                  | 50                  | 60 - 70            | 70              |
| Região de adaptação            | Sul                                   | Sul                 | Sul                 | Sul e centro Oeste | Brasil          |

SI – Sem Informação

Cada população foi cultivada em parcela de 4,5m<sup>2</sup> (2 fileiras de 5 metros), nas safras 2012/2013, 2013/2013, 2013/2014 em área experimental localizada nos municípios de Itapejara do Oeste/PR e Caarapó/MT, conforme descrito na Tabela 1.2. As plantas de cada população que apresentaram crescimento inicial rápido, folhas com maior índice de área foliar, maior diâmetro de colmo, estrutura de planta reduzida e interseção da espiga em região mediana foram autofecundadas. Posteriormente as maiores espigas foram colhidas desempalhadas e avaliadas quanto aos aspectos de sanidade e produção de sementes. As

espigas selecionadas de cada população foram misturadas, para que fosse diminuída a frequência de alelos deletérios, homocigotos recessivos, que encontravam-se encobertos por locos em homocigose e, para que a pressão de seleção na população também fossem reduzidos. Em seguida, as sementes foram secas a sombra e beneficiadas em debulhador manual. Foram obtidos, aproximadamente, 1 kg de sementes de cada população, deste montante, 600 gr foram armazenadas em sacos de papel multifoliado tipo “kraft” em sala com temperatura de 17°C, para semeadura no ano seguinte e obtenção da geração de autofecundação subsequente e, 400 gr foram armazenadas para instalação de ensaio para avaliação dos efeitos da endogamia na qualidade de sementes. A condução das populações neste modo se deu até que fossem obtidas quatro gerações de autofecundação (S<sub>4</sub>).

**Tabela 1.2.** Safra e local de cultivo, geração de autofecundação, peso e armazenamento das sementes de cinco genótipos de milho

| Safra de cultivo | Local de cultivo      | Geração obtida | Peso de sementes obtido | Armazenamento das sementes de cada população  |
|------------------|-----------------------|----------------|-------------------------|---|
| 12/13            | Itapejara do Oeste/PR | S <sub>1</sub> | 1 kg                    | - 600 g para obtenção de S <sub>2</sub> na safra 13/13<br>- 400 g para estudo endogamia, cultivo na safra 13/14 em São Miguel do Oeste/SC           |
| 13/13            | Caarapó/MT            | S <sub>2</sub> | 1 kg                    | - 600 g sementes para obtenção S <sub>3</sub> na safra 13/14<br>- 400 g para estudo endogamia, cultivo na safra 13/14 em São Miguel do Oeste/SC     |
| 13/14            | Itapejara do Oeste/PR | S <sub>3</sub> | 0,5 kg                  | - 500 gr de sementes para obtenção S <sub>4</sub> na safra 14/14  |
| 14/14            | Caarapó/MT            | S <sub>4</sub> | 1 kg                    | - 600 gr de sementes para obtenção S <sub>5</sub> na safra 14/15<br>- 400 g para estudo endogamia, cultivo na safra 14/15 em São Miguel do Oeste/SC |

### **Material vegetal para análise do efeito da endogamia**

Para o estudo dos efeitos da endogamia as sementes das populações originais, ( $S_0$ ) e das gerações  $S_1$  e  $S_2$  foram semeadas na safra 2013/2014 em área experimental localizada São Miguel do Oeste/SC. O genótipo da respectiva geração ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ), foi semeado em duas linhas de 20 m espaçadas 0,80 m. As inflorescências masculinas foram protegidas com sacos plásticos antes da emissão dos estilos-estigmas, quando os mesmos encontravam-se receptivos foram realizadas manualmente as autofecundações. As espigas foram colhidas e beneficiadas conforme descrito anteriormente. Foram obtidas 500 gr de sementes das gerações  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ , que foram avaliadas quanto aos parâmetros fisiológicos.

As sementes em  $S_4$ , foram cultivadas em área experimental em São Miguel do Oeste/SC, na safra 2014/2015, e obteve-se sementes da quinta geração de autofecundação ( $S_5$ ). As condições experimentais e a condução do ensaio foram semelhantes aquelas aplicadas na obtenção de  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ .

As sementes das gerações  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  e  $S_5$  foram avaliadas quanto aos parâmetros de viabilidade, vigor por envelhecimento acelerado e teste de frio, massa seca de plântulas e peso de mil sementes. A quarta geração de autofecundação ( $S_4$ ) não foi utilizada no estudo do efeito da endogamia em função do pequeno volume de sementes disponível.

### **Material vegetal para análise da heterose, CGC e CEC**

As sementes em  $S_4$  das cinco populações foram semeadas em área experimental localizada em São Miguel do Oeste, SC, na safra 2014/2015. Os cruzamentos foram realizados artificialmente em um esquema dialelo completo com recíprocos para obtenção de 20 híbridos F1. Para a obtenção dos híbridos os parentais foram cultivados em linhas de 20 metros, espaçadas 0,80 m. Sacos de papel tipo Kraft foram utilizados para coletar os grãos de pólen durante o florescimento e para realizar os cruzamentos. Quando as sementes atingiram aproximadamente 18% de umidade foi realizada a colheita das espigas. O monitoramento da umidade foi realizado pela visualização da senescência da planta e pela mudança da morfologia da semente. Após colhidas as espigas foram debulhadas manualmente e as sementes foram secas sobre sacos de papel em ambiente aberto sob a sombra, até atingirem um grau de umidade de aproximadamente 13%, quando foram armazenadas em câmara seca (8°C e 50% umidade relativa) e posteriormente utilizadas para avaliação da viabilidade e vigor pelos testes de envelhecimento acelerado e teste de frio.

### **Avaliação da qualidade das sementes**

A qualidade das sementes foi avaliada utilizando os seguintes testes: germinação, vigor por envelhecimento acelerado e teste de frio, avaliou-se também a massa seca das plântulas e o peso de mil sementes (PMS).

A viabilidade foi determinada através de teste de germinação, utilizando quatro repetições de 50 sementes, distribuídas entre folhas de papel “germitest” e mantidas em germinador a 25°C. A contagem das plântulas normais foi efetuada apenas no quarto dia após o início do teste, em função das plântulas já apresentarem desenvolvimento adequado para a avaliação.

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, dispostas sobre telas de alumínio fixadas em caixas plásticas contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram mantidas em câmara de envelhecimento por 72 h a 45°C, conforme Marcos-Filho (2005). Após este período as sementes foram colocadas para germinar a 25°C, e, no quarto dia avaliou-se as plântulas normais, de maneira similar ao descrito no teste de germinação.

O teste de frio foi realizado utilizando quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram distribuídas entre papel “germitest”, umedecidas com água destilada e colocadas em câmara a 5°C por sete dias. A temperatura de 5°C foi utilizada em estudos preliminares realizados pelo autor, que verificou que nesta temperatura o nível de diferenciação dos genótipos era maior em relação à temperatura de 10°C, utilizada rotineiramente na pesquisa. Após submetidas à condição de estresse, as sementes foram germinadas e as plântulas normais foram avaliadas de maneira similar ao descrito no teste de germinação.

A massa seca das plântulas foi determinada com 4 repetições de 20 sementes que foram dispostas sobre folhas de papel “germitest” e colocadas para germinar conforme descrito no teste de germinação. No quarto dia, as plântulas normais foram separadas do endosperma e colocadas em estufa a 80°C por 24 horas, após este período, foram pesadas e determinou-se a massa seca das plântulas, expresso em mg/plântula. O peso de mil sementes foi determinado através da contagem e pesagem de oito repetições de 100 sementes (Brasil, 2009).

### **Análise estatística**

Os testes realizados para avaliar a qualidade das sementes foram conduzidos utilizando-se delineamento inteiramente casualizado com

quatro repetições. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância com o teste F.

A estimativa da depressão por endogamia (DE), em porcentagem, nas populações foi obtida utilizando-se a fórmula a seguir:

$$DE = \left[ \frac{(\bar{S}_0 - \bar{S}_1)}{\bar{S}_0} \right] 100$$

$\bar{S}_0$  = média da população original;

$\bar{S}_1$  = média da população após uma geração de autofecundação.

A heterose (%) foi estimada comparando-se cada híbrido com a média de seus parentais, por meio da expressão:

$$H (\%) = [(m\acute{e}dia\ do\ h\acute{i}brido - m\acute{e}dia\ dos\ parentais) / M\acute{e}dias\ dos\ parentais] \times 100$$

Com base na análise de variância, as somas dos quadrados dos parentais e dos híbridos foram divididas em capacidade de combinação geral e específica e efeito recíproco. Para este propósito, foi utilizado o Método 1 de Griffing, onde foram incluídos os parentais, híbridos e recíprocos (CRUZ et al., 2012).

A análise estatística foi realizada em software R (R Core Team 2016), versão 3.3.1. Todas as análises foram realizadas no mesmo software e os dados representados como média  $\pm$  desvio padrão de quatro repetições (n=4). O teste de Scott Knott foi aplicado para separação de médias.

### 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Efeitos da endogamia na qualidade de sementes**

A análise de variância indicou que não houveram diferenças significativas entre S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub> para germinação das sementes (Tabela 1.3). No entanto, quando avaliada as gerações em S<sub>5</sub> verificou-se que o seu desempenho foi inferior às demais gerações, além disso, as diferenças entre os genótipos ficaram evidentes.

Avaliando o desempenho individual entre as gerações de autofecundação, verificou-se que CRI apresentou os menores percentuais de germinação em relação aos demais genótipos em S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>. Porém, em S<sub>5</sub>, verifica-se que VPA2 apresentou desempenho inferior, com 80% de germinação. Apesar de serem visualizadas diferenças entre as gerações

de autofecundação, os genótipos em S<sub>5</sub>, mantiveram o percentual de germinação elevados.

**Tabela 1.3.** Médias e desvio padrão para germinação, vigor por envelhecimento acelerado e vigor pelo teste de frio de cinco genótipos de milho submetidos a autofecundações.

| Genótipos | Germinação               |                |                |                |
|-----------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|
|           | S <sub>1</sub>           | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>5</sub> |
| CRI       | 92±3,09Ab                | 93±2,58Ab      | 92±1,70Ab      | 93±0,95Ab      |
| VPA1      | 98±0,95Aa                | 97±1,73Aa      | 95±1,73Ba      | 84±1,70Cd      |
| VPA2      | 94±3,40Ab                | 95±2,38Aa      | 97±1,50Aa      | 80±0,82Be      |
| HIB1      | 96±2,21Ba                | 95±2,38Ba      | 95±1,70Ba      | 99±0,50Aa      |
| HIB2      | 97±1,73Aa                | 98±1,29Aa      | 96±2,16Aa      | 89±1,29Bc      |
|           | Envelhecimento Acelerado |                |                |                |
|           | S <sub>1</sub>           | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>5</sub> |
| CRI       | 84±4,69Ba                | 67±2,62Cd      | 90±1,63Aa      | 54±1,70Db      |
| VPA1      | 89±4,16Ba                | 95±1,91Aa      | 83±5,50Cb      | 72±1,29Da      |
| VPA2      | 61±1,29Bc                | 87±5,77Ab      | 83±4,12Ab      | 31±1,85Cd      |
| HIB1      | 84±4,24Ba                | 79±2,58Ac      | 62±5,88Bc      | 44±2,62Cc      |
| HIB2      | 67±3,30Bb                | 81±3,46Ac      | 83±3,41Ab      | 5±1,29Ce       |
|           | Tolerância a Frio        |                |                |                |
|           | S <sub>1</sub>           | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>5</sub> |
| CRI       | 97±1,63Aa                | 97±2,82Aa      | 96±3,46Aa      | 67±1,29Bd      |
| VPA1      | 99±0,00Aa                | 99±0,00Aa      | 97±1,63Aa      | 75±1,25Bc      |
| VPA2      | 94±1,15Aa                | 96±2,58Aa      | 95±4,43Aa      | 65±1,70Bd      |
| HIB1      | 89±6,32Ab                | 85±5,41Bb      | 83±5,74Bb      | 91±1,71Aa      |
| HIB2      | 96±2,58Aa                | 99±0,00Aa      | 93±4,43Ba      | 85±1,30Cb      |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. S<sub>1</sub> primeira geração de autofecundação; S<sub>2</sub> segunda geração de autofecundação; S<sub>3</sub> terceira geração de autofecundação; S<sub>5</sub> quinta geração de autofecundação. CRI: Pixurum 05; VPA1 – SCS 155 Catarina; VPA2: BRS Missões, HIB1: CD 393; HIB2: P30F53.

A análise de variância indicou que para as características de vigor constataram-se diferenças entre as gerações de autofecundação e entre os genótipos (Tabela 1.3). Para o vigor por envelhecimento acelerado, verificou-se que os genótipos em S<sub>5</sub> apresentaram desempenho consideravelmente inferior em relação a S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>. O vigor pelo teste de envelhecimento acelerado variou de 5% (HIB2) a 72% (VPA1) nos genótipos em S<sub>5</sub> (Tabela 1.3). As sementes com maior vigor pelo envelhecimento apresentam maior potencial para o armazenamento e a emergência a campo (MARCOS-FILHO, 2015). Assim, é possível

verificar que VPA2, HIB1 e HIB2 apresentam reduzido potencial em relação aos demais genótipos, com vigor inferior a 50% pelo teste de envelhecimento acelerado.

Por outro lado, o teste de frio mostrou redução no vigor das sementes com o avanço das gerações de autofecundação. Os genótipos obtiveram o menor desempenho em  $S_5$ , com variações de 65% (VPA2) a 91% (HIB1) no vigor (Tabela 1.3). Os genótipos CRI, VPA1 e VPA2 apresentaram menor tolerância a condições de baixa temperatura e alta umidade com vigor inferior a 75%. Nota-se ainda que o comportamento de HIB1 e HIB2 no teste de frio, foi distinto daquele observado no envelhecimento acelerado. Ambos os genótipos, mantiveram elevado vigor pelo teste de frio.

A estimativa da depressão por endogamia (DE) pode ser indicativo do nível de tolerância dos genótipos às autofecundações, ela foi calculada para cada geração de autofecundação considerando  $S_1$  como geração que teoricamente apresenta menor grau de homozigose. A medida que as gerações de autofecundações avançaram e elevou-se o grau de homozigose a estimativa de depressão por endogamia aumentou.

Para germinação, observou-se que os genótipos em  $S_2$  e  $S_3$  apresentaram baixas estimativas de DE, comparativamente ao verificado em  $S_5$ , (Tabela 1.4). Na geração  $S_2$ , apenas VPA2 e HIB1 apresentaram DE, com magnitudes de 0,26 e 0,78% respectivamente. As populações em  $S_3$  apresentaram variação na estimativa de 0,54 a 3,32%, com VPA1 apresentando a maior estimativa. Em  $S_5$ , os genótipos VPA1 e VPA2 apresentaram as maiores magnitudes para DE, 14,07% e 15,12%, respectivamente, mostrando-se menos tolerantes a endogamia para esta característica. Apesar da estimativa elevada, os genótipos apresentaram tolerância ao efeitos da endogamia para características de germinação.

Por outro lado, para as características de vigor, verifica-se que a tolerância destes genótipos à condições de estresse, reduziu com o avanço das autofecundações (Tabela 1.4). Para o vigor por envelhecimento acelerado, observou-se que CRI apresentou elevada DE (19,94%) em  $S_2$ , comparativamente aos demais genótipos. Para Vianna et al. (1982) e Lima et al. (1984), populações com ampla base genética, que correspondem à genótipos que não tenham sido expostos a nenhum processo de autofecundação, tendem a apresentar maior DE. Porém, em  $S_5$  as maiores DE foram verificadas em HIB2 (93,22%), VPA2 (60,26%) e HIB1 (50,70%). Estes genótipos apresentaram menor tolerância a endogamia para vigor. Para o vigor de sementes por envelhecimento acelerado, os genótipos de origem híbrida e variedades de polinização aberta, apresentaram maior DE com o avanço das gerações de autofecundação

**Tabela 1.4.** Estimativa da depressão por endogamia (DE) a partir de características de germinação e vigor pelo teste de envelhecimento acelerado (EA) e vigor pelo teste de frio (TF) em sementes de cinco genótipos de milho.

| Genótipos | Germinação (%)   |                 |                  | Vigor por EA (%) |      |       | Vigor por TF (%) |       |       |
|-----------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------|-------|------------------|-------|-------|
|           | DE1 <sup>1</sup> | DE <sup>2</sup> | DE3 <sup>3</sup> | DE1              | DE2  | DE3   | DE1              | DE2   | DE3   |
|           | (%)              | (%)             | (%)              | (%)              | (%)  | (%)   | (%)              | (%)   | (%)   |
| CRI       | -*               | 0,54            | -                | 19,94            | 2,05 | 26,03 | -                | -     | 20,24 |
| VPA1      | 0,26             | 3,32            | 14,07            | -                | -    | 15,54 | -                | 7,30  | 15,73 |
| VPA2      | -                | -               | 15,12            | -                | -    | 60,26 | -                | -     | -     |
| HIB1      | 0,78             | 1,56            | -                | 5,95             | 3,36 | 50,70 | 4,49             | 26,19 | -     |
| HIB2      | -                | 1,54            | 8,72             | -                | -    | 93,22 | -                | -     | -     |

<sup>1</sup> DE calculada em S<sub>2</sub> considerando S<sub>1</sub> como geração com menor grau de homozigose

<sup>2</sup> DE calculada em S<sub>3</sub> considerando S<sub>1</sub> como geração com menor grau de homozigose

<sup>3</sup> DE calculada em S<sub>5</sub> considerando S<sub>1</sub> como geração com menor grau de homozigose

\* Campos apresentados com traço indicam que não foi possível estimar DE, em função da geração em análise apresentar desempenho inferior em relação à geração de referência (S<sub>1</sub>). CRI: Pixurum 05; VPA1 – SCS 155 Catarina; VPA2: BRS Missões, HIB1: CD 393; HIB2: P30F53.

Para o vigor pelo teste de frio, observou-se pequenas estimativas para DE entre S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> (Tabela 1.4). As maiores estimativas DE foram observadas em CRI (20,24%) e VPA1 (15,73%) em S<sub>5</sub>. Nota-se que estes genótipos apresentaram estimativas muito semelhantes aquelas obtidas no envelhecimento acelerado, no entanto, para o vigor por frio CRI e VPA1, mostraram-se menos tolerantes a esta condição de estresse que os demais genótipos. A partir das estimativas DE verificou-se que a tolerância a endogamia nos genótipos estudados no presente trabalho tende a reduzir, como consequência, há redução na qualidade fisiológica das sementes.

Ressalta-se que os parentais que encontram-se em S<sub>5</sub>, foram cultivadas em safra distinta das demais gerações, apesar de serem cultivadas na mesma área experimental e sob condições meteorológicas muito semelhantes. Segundo Lima et al, (1984), a manifestação dos efeitos da endogamia pode variar entre os ambientes. Ainda assim, é possível observar que ocorrem variações entre os genótipos cultivados sob a mesma safra (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>), evidenciando a existência de diferenças genéticas no comportamento dos genótipos.

As maiores diferenças entre os genótipos, em função das autofecundações, podem ser observadas para características do peso de mil sementes (PMS) e da massa seca de plântulas (Tabela 1.5). Para PMS, observou-se que houve redução média de 7% a cada geração de autofecundação. O genótipo HIB2 foi mais sensível a autofecundação

para esta característica com DE1 de 17,37%. Para o genótipo CRI não foi possível estimar DE em função do aumento de PMS em S<sub>2</sub>. Com o avanço da geração de autofecundação (S<sub>3</sub>), observou-se que os maiores efeitos foram observados em HIB1, que apresentou DE de 21,50% em relação à S<sub>1</sub>. A menor estimativa para DE em S<sub>3</sub> foi verificada em CRI, 2,81% em relação a primeira geração de autofecundação.

**Tabela 1.5.** Médias e desvio padrão para peso de mil sementes e massa seca de plântulas e estimativa da depressão por endogamia (DP) de cinco genótipos de milho submetidos a três gerações de autofecundação

| <b>Peso de Mil Sementes</b> |                |                |                |                  |                  |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| <b>Genótipos</b>            | Média (g)      |                |                | DP (%)           |                  |
|                             | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | DE1 <sup>1</sup> | DE2 <sup>2</sup> |
| CRI                         | 368.42±6.34Ab  | 383.67±2.83Ba  | 358.08±8.11Ca  | -                | 2.81             |
| VPA1                        | 345.35±12.08Ac | 318.00±4.66Bd  | 284.90±2.79Cd  | 7.92             | 17.50            |
| VPA2                        | 362.77±8.80Ab  | 355.45±6.93Bb  | 301.68±2.81Cc  | 2.02             | 16.84            |
| HIB1                        | 360.80±2.92Ab  | 318.92±1.93Bd  | 283.23±2.89Cd  | 11.61            | 21.50            |
| HIB2                        | 396.00±5.49Aa  | 327.20±2.03Bd  | 338.15±4.28Cb  | 17.37            | 14.61            |

| <b>Massa Seca Plântula</b> |                     |                |                |        |       |
|----------------------------|---------------------|----------------|----------------|--------|-------|
| <b>Genótipos</b>           | Média (mg/plântula) |                |                | DP (%) |       |
|                            | S <sub>1</sub>      | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | DE1    | DE2   |
| CRI                        | 29.77±4.08Aa        | 23.24±2.60Bb   | 21.25±3.87Ca   | 21.96  | 28.64 |
| VPA1                       | 27.41±2.16Aa        | 28.63±4.12Ba   | 20.42±0.95Ca   | -      | 25.50 |
| VPA2                       | 28.54±2.66Aa        | 28.44±2.87Ba   | 23.80±0.84Ca   | 0.35   | 16.61 |
| HIB1                       | 31.39±2.91Aa        | 23.59±0.86Bb   | 22.33±2.32Ca   | 24.85  | 28.86 |
| HIB2                       | 29.08±3.85Aa        | 21.20±4.47Bb   | 25.34±5.89Ca   | 27.09  | 12.89 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. S<sub>1</sub> primeira geração de autofecundação; S<sub>2</sub> segunda geração de autofecundação; S<sub>3</sub> terceira geração de autofecundação. <sup>1</sup> Depressão por endogamia calculada em S<sub>2</sub> considerando S<sub>1</sub> como geração com menor grau de homozigose; <sup>2</sup> Depressão por endogamia calculada em S<sub>3</sub> considerando S<sub>1</sub> como geração com menor grau de homozigose. CRI: Pixurum 05; VPA1 – SCS 155 Catarina; VPA2: BRS Missões, HIB1: CD 393; HIB2: P30F53.

Para a massa seca de plântulas, a redução também foi significativa a cada geração de autofecundação (Tabela 1.5). A massa seca das plântulas é uma característica importante que pode ser explorada em estudos relacionadas ao vigor de sementes durante a obtenção de linhagens. Os genótipos que apresentam maiores pesos médios de massa seca são considerados mais vigorosos, em função da maior transferência de massa seca de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário durante

a germinação, originando plântulas com maior vigor. A estimativa da depressão por endogamia indica que as maiores reduções para a massa seca foram verificados em S<sub>2</sub>, para CRI, HIB1 E HIB2, e foram da magnitude de 21,96%, 24,85% e 27,09%, respectivamente.

A partir das características de viabilidade, vigor, PMS e massa seca de plântulas observou-se que a tolerância a endogamia variou em função do genótipo, indicando que esta característica pode ser explorada para a obtenção de linhagens com melhor qualidade fisiológica. Observando o comportamento dos genótipos durante as sucessivas autofecundações, mas especialmente, a partir dos resultados obtidos nas avaliações de qualidade fisiológica em S<sub>5</sub>, verificou-se que CRI, VPA1 e HIB1 apresentaram qualidade de sementes superior, em detrimento de VPA2 e HIB2, que demonstraram qualidade fisiológica inferior e maior sensibilidade aos efeitos da endogamia.

### **Heterose, CGC e CEC**

A qualidade fisiológica e a estimativa da heterose para os híbridos e seus recíprocos obtidos a partir das combinações dos genótipos avaliados encontram-se descritos na Tabela 1.6. A análise de variância indicou que houve diferenças significativas entre os genótipos para os dados de germinação e vigor e, de uma maneira geral, constatou-se superioridade dos híbridos em relação aos parentais quanto à qualidade fisiológica.

Para germinação, as combinações híbridas 3 x 1, 3 x 2, 4 x 2, 5 x 4 e 3 x 4 apresentaram desempenho superior em relação aos demais híbridos, com germinação superior à 97%. Os híbridos 2 x 4, 1 x 5 e 3 x 5 apresentaram desempenho inferior em relação aos demais, com germinação inferior a 80%. Para vigor por envelhecimento acelerado, os híbridos 3 x 1, 4 x 2 e 4 x 3 apresentaram os melhores resultados, com vigor superior a 85%. Por outro lado, 5 x 1, 5 x 3, 5 x 4 e 3 x 5, apresentaram vigor inferior a 40%. Para o teste de frio, os híbridos 4 x 1, 4 x 2, 5 x 2, 3 x 4 e 4 x 5, apresentaram vigor superior a 94% e os híbridos 2 x 4 e 3 x 5 vigor inferior. O híbrido 4 x 2 apresentou desempenho superior em todas as avaliações de qualidade fisiológica. Resultado semelhante pode ser observado em 3 x 1, que apresentou desempenho superior para viabilidade e vigor por envelhecimento acelerado. Os híbridos 3 x 1 e 4 x 2, apresentaram potencial para produção de sementes de melhor qualidade. Por outro lado, o híbrido 3 x 5 apresentou desempenho inferior em todos os testes fisiológicos, demonstrando pequeno potencial para produção de sementes de qualidade.

**Tabela 1.6.** Médias e desvio padrão, e estimativa da heterose (H) e da capacidade específica de combinação (CEC) para germinação (G) e vigor pelo teste de envelhecimento acelerado (EA) e pelo teste de frio (TF) em dez combinações híbridas de milho e seus recíprocos

| Híbrido             | G (%)    | H (%)  | CEC    | EA (%)   | H (%)  | CEC    | TF (%)    | H (%)  | CEC    |
|---------------------|----------|--------|--------|----------|--------|--------|-----------|--------|--------|
| Híbridos            |          |        |        |          |        |        |           |        |        |
| 2 x 1*              | 83±3,77d | -3,9   | -5,95  | 59±3,83e | 39,23  | -2,62  | 80±4,43d  | 21,14  | -3,36  |
| 3 x 1               | 98±0,96a | 2,34   | 4,30   | 88±1,29a | 79,49  | 5,37   | 91±1,29b  | 14,74  | 3,89   |
| 4 x 1               | 93±1,83b | 7,36   | 6,30   | 82±1,71b | 94,1   | 7,12   | 96±1,41a  | 46,29  | 11,89  |
| 5 x 1               | 94±3,50b | 5,26   | -3,82  | 33±3,16f | -34    | -25,5  | 92±2,99b  | 22,23  | 0,39   |
| 3 x 2               | 98±1,29a | 18,72  | -2,05  | 73±1,29c | 41,46  | -16,62 | 88±4,62c  | 23,51  | 8,64   |
| 4 x 2               | 97±2,31a | 6,01   | 9,07   | 85±3,40a | 47,07  | -5,75  | 94±2,22a  | 10,95  | -18,48 |
| 5 x 2               | 88±2,22c | -2,89  | 1,90   | 62±2,99e | 113,73 | -12,87 | 97±3,50a  | 28,81  | 17,51  |
| 4 x 3               | 96±1,91b | 6,85   | 5,40   | 85±2,52a | 126,09 | 22,13  | 82±3,11d  | 4,49   | 15,59  |
| 5 x 3               | 95±3,40b | 12,46  | 1,40   | 23±2,36g | 30,99  | -24,48 | 91±2,50b  | 22,28  | -8,41  |
| 5 x 4               | 98±0,96a | 4,94   | 2,27   | 23±3,50g | -5,7   | -17,75 | 81±2,08d  | -8,39  | 1,74   |
| Híbridos Recíprocos |          |        |        |          |        |        |           |        |        |
| 1 x 2               | 82±2,65d | -9,77  | -2,05  | 76±1,71c | 160,94 | -11,62 | 71±1,29e  | -6,62  | 4,64   |
| 1 x 3               | 80±3,42d | -8,23  | 1,40   | 76±1,71c | 79,94  | 29,57  | 73±2,383e | 10,48  | 8,09   |
| 2 x 3               | 84±3,42d | -23,22 | 2,27   | 61±2,65e | 17,57  | 16,57  | 71±4,16e  | -86,09 | 4,84   |
| 1 x 4               | 91±1,29c | 1,67   | -6,3   | 80±1,29b | 18,05  | 9,50   | 86±1,83c  | -0,35  | 4,74   |
| 2 x 4               | 70±2,63f | 7,97   | -14,55 | 68±2,50d | 55,85  | 5,62   | 12±1,71g  | 25,64  | -33,63 |
| 3 x 4               | 97±2,38a | -4,81  | -2,67  | 58±3,95e | 159,23 | 0,31   | 98±2,00a  | 5,3    | 4,24   |
| 1 x 5               | 71±2,65f | 1,61   | -5,97  | 64±4,62d | 59     | 27,42  | 68±2,08f  | 14,57  | -4,56  |
| 2 x 5               | 87±1,29c | -22,42 | -0,6   | 76±1,29c | 119,74 | 49,05  | 80±1,29d  | -10,6  | 4,56   |
| 3 x 5               | 77±2,08f | -9,2   | -1,72  | 29±4,62f | 63,38  | 4,23   | 40±4,16f  | -46,4  | -17,56 |
| 4 x 5               | 94±3,65b | 0,4    | 8,65   | 81±2,22b | 234,72 | 32,80  | 95±3,42a  | 7,54   | 3,90   |

Médias com desvio padrão seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Skott & Knott a 5% de probabilidade. O número que aparece primeiro na combinação híbrida, refere-se ao número do parental feminino e o segundo número indica o parental masculino. \* 1: CRI, 2: VPA1, 3: VPA2, 4: HIB1 e 4: HIB2.

A superioridade dos híbridos em relação aos parentais é evidenciada na estimativa da heterose (Tabela 1.6). A heterose para germinação de sementes apresentou variação de -23,22% (2 x 3) a +18,72% (3 x 2), indicando que o parental VPA2 apresenta potencial para utilização como genitor feminino, quando o objetivo for a obtenção de sementes com maior percentual de germinação. Verificou-se, de modo geral que os híbridos apresentaram maior germinação de sementes em relação aos seus parentais, exceto grande parte dos híbridos recíprocos que apresentaram estimativas de heterose negativas. A heterose para germinação de sementes foi constatada por outros trabalhos. Nerling et al. (2013), observou variação de -8,16% e 5,32% para heterose em

híbridos intervarietais. Prazeres e Coelho (2016), encontraram variação de 0,54% e 25,31% na estimativa da heterose para híbridos simples, triplo e triplo modificado. Reis et al. (2011), observaram heterose de 4,39% a 15,62% para germinação de sementes de milho doce indicando que o desenvolvimento de híbridos por ser uma alternativa para a obtenção de sementes de milho com maior percentual de germinação.

Quanto ao envelhecimento acelerado, verificou-se que os híbridos apresentaram maior vigor (64%) em relação aos parentais (40%). Em relação a estimativa da heterose, houve variação -34% (5 x 1) a 234,72% (4 x 5) para vigor por envelhecimento acelerado. Apesar do híbrido 5 x 1 apresentar heterose negativa, -34%, seu híbrido recíproco apresentou estimativas positivas, +59%. Significância do efeito recíproco (ER) também foi observado para o híbrido 5 x 4. Estimativas de heterose para envelhecimento acelerado também foram encontradas por Nerling et al. (2013), que verificaram estimativas de -7,22% e +12,39% e, por Prazeres e Coelho (2016), que observaram estimativas positivas de 7,04% a 350% para envelhecimento acelerado. As estimativas indicam que as sementes híbridas são mais vigorosas e, conseqüentemente, são mais resistentes ao armazenamento do que seus parentais.

As estimativas da heterose o teste de frio, apresentaram amplitude de variação de -86,09% (2 x 3) a 46,29% (4 x 1). Estimativas positivas na mesma magnitude encontradas neste trabalho foi encontrada por Prazeres e Coelho (2016), os autores obtiveram amplitude de variação para a estimativa de heterose de -1,73% a 47,92%.

A estimativa da heterose indicou quais as combinações híbridas apresentam maior potencial para produção de sementes com maior qualidade fisiológica. Os resultados verificados sobre o efeito recíproco indicaram, a importância da escolha do parental masculino e feminino utilizado na instalação de campos de produção de sementes híbridas, objetivando a obtenção de sementes com alto potencial germinativo e com maior vigor.

A análise de variância para viabilidade e o vigor de sementes no dialelo, indicou que há diferenças para os efeitos de genótipo, fator importante para a obtenção de ganho genético nos híbridos (Tabela 1.7). As características de qualidade de sementes (germinação, vigor por envelhecimento acelerado e teste de frio) também foram significativas para CGC e CEC, indicando a existência de efeitos não aditivos no controle genéticos dessas características. Além disso, ER foi significativo para todas as características avaliadas, mostrando que existe diferenças entre cada híbrido e seu recíproco.

**Tabela 1.7.** Estimativa dos quadrados médios de genótipos de milho (parentais e híbridos), para capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, efeito recíproco (ER) e efeitos residuais e o efeito dos quadrados médios na capacidade de combinação para germinação e vigor de sementes avaliadas em dialelo completo.

| Causas de variação             | GL | Quadrados Médios |            |            |
|--------------------------------|----|------------------|------------|------------|
|                                |    | G                | EA         | TF         |
| Genótipos                      | 24 | 313,29***        | 2255,23*** | 1465,52*** |
| CGC                            | 4  | 93,24***         | 1549,55*** | 98,29**    |
| CEC                            | 10 | 41,07**          | 392,40***  | 280,58***  |
| ER                             | 10 | 109,60***        | 340,91***  | 559,42***  |
| Erro                           | 72 | 5,66             | 11,48      | 15,38      |
| <b>Componentes Quadráticos</b> |    |                  |            |            |
| CGC                            | -  | 8,75             | 153,80     | 8,30       |
| CEC                            | -  | 35,42            | 380,92     | 265,20     |
| ER                             | -  | 51,97            | 164,71     | 272,02     |
| GCR/CEC                        | -  | 0,24             | 0,40       | 0,03       |

\*\*\* Significativo a 0,001% pelo teste F; \*\* Significativo a 0,01% pelo teste F; CGC: Capacidade Geral de Combinação; CEC: capacidade Específica de Combinação; ER: Efeito Recíproco.

Os componentes quadráticos associados a CEC foram maiores que os associados a CGC para todas as características avaliadas, o que revelou a importância dos efeitos não aditivos no controle genético (Tabela 1.7). Este resultado corrobora com o encontrado por Moterle et al. (2011) em trabalho com nove linhagens e 72 híbridos de milho, e, em trabalho desenvolvido por Moterle et al. (2012) com nove linhagens e 36 híbridos de milho. Em ambos os trabalhos os autores verificaram maior significância para o efeito não aditivo no controle genético ao estudar a capacidade de combinação das linhagens para qualidade de sementes utilizando testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio modificado, envelhecimento acelerado e emergência em areia. No entanto, os resultados diferem daqueles encontrados por Cabral et al. (2015) em trabalho com 47 linhagens de milho pipoca e todas as suas combinações híbridas possíveis. Os autores verificaram que para o teste de frio, os efeitos aditivos apresentaram maior contribuição em relação aos efeitos não aditivos no controle genético desta característica.

A estimativa dos componentes quadráticos para o efeito recíproco (Tabela 1.7) foi superior que o efeito da CEC para germinação e o teste de frio, demonstrando a existência de efeito diferencial no uso de parentais masculinos ou femininos na composição dos híbridos. Este

resultado foi semelhante ao encontrado por Moterle et al. (2011), em trabalho com milho, onde os efeitos recíprocos foram superiores ao da CEC para a maioria das características de qualidade de sementes avaliadas. No entanto, o resultado obtido no presente trabalho difere do encontrado por Gomes et al. (2000), que avaliaram a capacidade de combinação dos parentais, híbridos e recíprocos em dialelo com seis linhagens de milho. Os autores concluíram que os efeitos recíprocos eram inferiores a CEC para o controle genético.

O parental HIB1 expressou valores positivos de maior magnitude de CGC para todas as características (Tabela 1.8), o que permite indicá-lo em cruzamentos visando contribuir para a qualidade fisiológica das sementes. Em contraste, os demais parentais, apresentaram variação na magnitude da CGC em função da característica avaliada. Os parentais, VPA2 e HIB2 obtiveram estimativas muito baixas para germinação e valores negativos para o vigor de sementes, indicando que estes parentais não devem ser utilizados, quando o objetivo for obter sementes com maior potencial de armazenamento e emergência a campo. Por outro lado, CRI, VPA1 e HIB1, obtiveram estimativas positivas e de grande magnitude para o envelhecimento acelerado, indicando sua utilização quando o objetivo for melhorar o vigor de sementes. As estimativas da capacidade geral de combinação para qualidade de sementes variaram em função dos genótipos e entre os testes fisiológicos realizados. Os parentais com maior frequência de alelos favoráveis para a característica em questão exibem maior CGC (HALLAUER et al., 2010).

**Tabela 1.8.** Estimativas da Capacidade Geral de Combinação de cinco parentais de milho para germinação e vigor de sementes.

| Parentais | Germinação | Vigor (Env. Acelerado) | Vigor (Teste de Frio) |
|-----------|------------|------------------------|-----------------------|
| CRI       | -1,37      | 7,05                   | 0,01                  |
| VPA1      | -3,32      | 11,50                  | -3,9                  |
| VPA2      | 0,07       | -5,05                  | -2,09                 |
| HIB1      | 5,93       | 5,86                   | 3,58                  |
| HIB2      | -0,3       | -19,41                 | 2,48                  |

No que se refere a capacidade específica de combinação, as melhores combinações híbridas para qualidade de sementes foram 3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 2 x 3, 4 x 3 e 4 x 5 (Tabela 1.6), com estimativas positivas para todas as características avaliadas. Para viabilidade de sementes as melhores combinações foram 3 x 2 e 4 x 5. Os híbridos 2 x 5 e 4 x 5 apresentaram maiores estimativas para vigor por envelhecimento acelerado, enquanto as combinações 5 x 2 e 4 x 3 apresentaram maiores

estimativas para o vigor pelo teste de frio. Os resultados indicam que estas combinações híbridas são promissoras, porém precisam ser avaliadas sob outras condições ambientais, outros testes de vigor e também após a emergência a campo.

A estimativa da CEC, indicou as melhores combinações híbridas e qual o parental pode ser utilizado como genitor feminino e qual deve ser utilizado como polinizador. Entre as combinações híbridas, com estimativas positivas de CEC (3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 2 x 3, 4 x 3 e 4 x 5), é possível observar que HIB1 pode ser considerada um excelente parental feminino, enquanto CRI pode ser utilizado como polinizador. Quanto a origem dos parentais, verificou-se que HIB1 foi obtida de uma cultivar híbrida, enquanto CRI teve como população original uma variedade de polinização aberta crioula.

As melhores combinações híbridas contém em sua composição pelo menos um parental com estimativas positivas de CGC e que demonstrou maior tolerância aos efeitos da endogamia, sendo eles CRI, VPA1 e HIB1. Ressalta-se ainda, que das seis melhores combinações híbridas, quatro delas apresentavam como genitor feminino parentais com maior tolerância a endogamia (4 x 1, 2 x 3, 4 x 3 e 4 x 5). Este resultado está associado a formação das sementes. O embrião apresenta 50% da informação cromossômica masculina e 50% feminina, por outro lado, no endosperma e a camada de aleurona, 66,6% dos cromossomos são de origem materna e apenas 33,3% são de origem paterna (VEIT et al., 1993). Assim, a influência materna deve ser observada para a obtenção de híbridos com melhor qualidade fisiológica de sementes.

#### 1.4. CONCLUSÃO

A endogamia afeta negativamente a qualidade fisiológica de sementes ao longo dos ciclos de autofecundação. Há maior expressão de heterose para o vigor por envelhecimento acelerado e maior significância dos efeitos não aditivos no controle genético da qualidade de sementes. O parental HIB1 apresentou estimativas favoráveis da capacidade geral de combinação para o aumento da qualidade fisiológica de sementes. O HIB1 é indicado como parental feminino e CRI como parental masculino para obtenção de combinações híbridas com maior qualidade de sementes. Os híbridos 3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 2 x 3, 4 x 3 e 4 x 5, apresentam estimativas positivas para capacidade específica de combinação, sendo os mais promissores para qualidade das sementes.

## CAPÍTULO 2

### BIOCHEMICAL PROFILING AND ITS ROLE IN PHYSIOLOGICAL QUALITY OF MAIZE SEEDS



## Biochemical profiling and seed quality

### Biochemical profiling and its role in physiological quality of maize seeds

#### Perfil bioquímico e seu papel na qualidade fisiológica de sementes de milho

**ABSTRACT:** Viability and vigor of seeds are physiological attributes that are influenced by a myriad of factors including the genotype. Identification of physiological responses according to genotype and biochemical profiling of maize seeds are crucial for breeding programs that the aim is seeds of better quality. The main goal of this study was to analyze the genetic diversity among maize inbred lines and evaluate the biochemical components that have an important role in physiological quality of seeds. The seeds of the inbred lines and hybrids were submitted to germination test, vigor by the accelerated aging and cold tolerance, and biochemical profiling (total protein content, soluble proteins, total phosphorus, phytate, inorganic phosphorus, starch and soluble sugars). The genetic divergence between the inbred lines found, prompt us to conclude that genetic gains may exist in association with physiological quality of maize hybrids. Seeds with higher inorganic phosphorus and soluble sugars presented superior physiological quality than seeds with lower levels of those compounds.

**Index Terms:** Vigor, Viability, Genetic Divergence, Reserves Content, *Zea mays*.

**RESUMO:** A viabilidade e o vigor de sementes são atributos fisiológicos influenciados por uma série de fatores, incluindo o genótipo. Identificar as respostas fisiológicas em função do genótipo e do perfil bioquímico das sementes de milho, são cruciais para os programas de melhoramento que visam sementes de melhor qualidade. O objetivo neste estudo foi analisar a diversidade genética entre as linhagens de milho e avaliar os componentes bioquímicos que têm um papel importante na qualidade fisiológica das sementes. As sementes das linhagens e dos híbridos foram submetidas ao teste de germinação, vigor pelo envelhecimento acelerado e teste de frio e a determinação do perfil bioquímico (teor de proteína total, proteínas solúveis, fósforo total, fitato, fósforo inorgânico, amido e açúcares solúveis). A divergência genética encontrada entre as linhagens permite concluir que os ganhos genéticos podem existir em associação com a qualidade fisiológica dos híbridos de milho. As sementes com

maior teor de fósforo inorgânico e açúcares solúveis apresentaram qualidade fisiológica superior à das sementes com níveis menores desses compostos.

**Termos para indexação:** Vigor, Viabilidade, Divergência Genética, Teor de Reservas, *Zea mays*

## 2.1. INTRODUCTION

Seeds presented the basis for successful food production in the modern agriculture and quality attributes are of important significance for the success. Among the attributes of seed quality, germination and vigor have an important role as they can, make possible obtain normal seedlings under different environmental conditions (Ventura et al., 2012). The use of seed quality ensures a rapid and uniform germination and the obtaining vigorous seedlings. The establishment of seedlings occurs after germination and its growth is initially supported by the hydrolysis and conversion of stored reserves, proteins, carbohydrates and lipids mobilized for growth (Bewley et al., 2013).

Seeds are subjected to various factors such as temperature, photoperiod, nutrition and water stress during development and maturation, factors that can interfere in their ability to germinate under varying environmental conditions, moreover, the genotype, especially maternal, exerts influences in specific genetic and biochemical processes, associated with germination and vigor (He et al., 2014). Seed vigor has been linked to signaling pathways, among them, pathways of sulfur amino acids, starch and lipid mobilization, protein synthesis, abscisic acid signaling, among others (Rajjou et al., 2012). The storage proteins, are essential for hydrolytic enzymes such as lipase, phospholipase, protease, DNase, phosphatase and amylase, as well, for enzymes with protective function, such as superoxide dismutase, catalase, ascorbate and glutathione reductase required for germination (Basavarajappa et al., 1991; Bailly, 2004). Carbohydrates such as starch, sucrose, raffinose, stachyose, verbascose, among other sugars, are involved with the provision of respiratory substrate, integrity of membranes, viscosity of the cytoplasm and other processes that interfere with germination and seed vigor (Bernal-Lugo and Leopold, 1995).

Although significant advances involving the study of the biochemical composition associated with germination and vigor, have been made, studies relating the genetic characteristic that affect seed physiological quality are scarce in the literature. The identification of higher genotypes regarding the aspects of physiological quality is

important in a breeding program, since these characteristics are genetically inherited from the parents (Santos et al., 2012). However, for maize, few studies associating genetic aspects and seed quality can be found (Gomes et al., 2000; Moterle et al., 2011; Nerling et al., 2013).

Studies involving biological profiling and data integration from different sources require a differentiated statistic interpretation, with the use of appropriate statistical models that consider the complexities of these processes. In this sense, the use of supervised statistical methods, such as partial least squares regression (PLSR), has become an important tool in the study of biological processes (Varmuza and Filzmoser, 2009). This method allows the identification of the cause and effect relationships for biochemical composition, viability and vigor of seeds, for example. The objective of the study was to analyze the genetic divergence between the inbred lines and evaluate the role of biochemical components in the physiological quality of maize seeds.

## 2.2. MATERIAL AND METHODS

The five inbred lines of maize, CRI, VPA1, VPA2, HIB1 AND HIB2, used in this study were in the fifth generation of self-pollination and were obtained in a local breeding program. The CRI inbred line was obtained from a landrace, VPA1 and VPA2 were obtained from commercial open-pollinated varieties and HIB1 and HIB2 inbred lines, obtained from single hybrids. Initially, on farm experiment was conducted for seed multiplication of inbred lines in São Miguel do Oeste country (Southern Brazil), Santa Catarina (SC), during 2014/2015. Concurrently, through artificial pollination of plants, hybrid combinations were also obtained (1 x 3, 1 x 4, 1 x 5, 2 x 1, 3 x 1, 4 x 1, 4 x 2 and 5 x 2). The first number indicated in the hybrid combination refers to the inbred line used as male parent, in this study: 1 is CRI inbred line, 2 is VPA1, 3 is VPA2, 4 is HIB1 and 4 is HIB2 inbred line. The maize ears were collected manually when seeds reached approximately 18% of moisture content. After that the maize ears were threshed, seeds dried in the shade until they reach 13% of moisture and stored in cold chamber with relative humidity of 50% and 10°C temperature.

The physiological quality of seeds was evaluated by the germination test, cold test, and accelerated aging test. The germination test consisted of four subsamples of 50 seeds, place between sheets of “germitest” paper, moistened with distilled water 2.5 times the weight of the paper at 25°C. Analyzes were performed according to Brasil (2009). The accelerated aging test was conducted, using 4 repetitions of 50 seeds

each. Seeds were distributed on aluminum screens fixed on the inside of plastic boxes and 40 mL of water added. The boxes were closed and kept in an aging chamber for 72 h at 45°C, according to Marcos-Filho (2005). After this period, the seeds were germinated at 25°C and on the fourth day normal seedlings counting was carried out, in a similar manner as described in the germination test. The cold test was also conducted, using 4 repetitions of 50 seeds each. Briefly seeds were placed between sheets of “germitest” paper, moistened with distilled water and kept in cold chamber at 5°C during seven days, and after this period, seeds were germinated, and the normal seedlings evaluated according to Brasil (2009).

The total phosphorus, phytate, inorganic phosphorus, starch, soluble sugars, total protein and soluble protein were also evaluated. The total phosphorus content was quantified by the method proposed by Tedesco et al. (1995) and results were expressed in mg.g<sup>-1</sup> of seeds per dry weight. Total protein content was determined by an official method (AOAC, 1995), and results expressed in mg.g<sup>-1</sup> of seeds per dry weight. Phytate content was determined as described by Latta and Eskin (1980), which is based on the formation of an iron-sulfosalicylic acid compound of dark blue staining (Wade reagent). In the presence of phytate, iron is sequestered and becomes unavailable to react with sulfosalicylic acid, which results in decreased color intensity. Readings were taken in a spectrophotometer (Marte Científica - Spectro 800S) an absorbance at 500 nm. The results were expressed in mg.g<sup>-1</sup> of seeds per dry weight. The inorganic phosphorus content was determined using 0.100 g of dried ground seeds. The sample was extracted twice, for two minutes, with 4 mL of 12.5 % trichloroacetic acid (w/v) in 0.025 M MgCl<sub>2</sub> in a cold mortar. Each extract was centrifuged at 10,000 g<sub>n</sub> for 10 min and filtered through Whatman number 1 filter paper (Raboy & Dickinson 1984). The filtered extracts were combined, diluted to 12.5 mL and inorganic phosphorus was determined colorimetrically, according to Chen et al. (1956). Results were expressed in µg.g<sup>-1</sup> of seeds per dry weight.

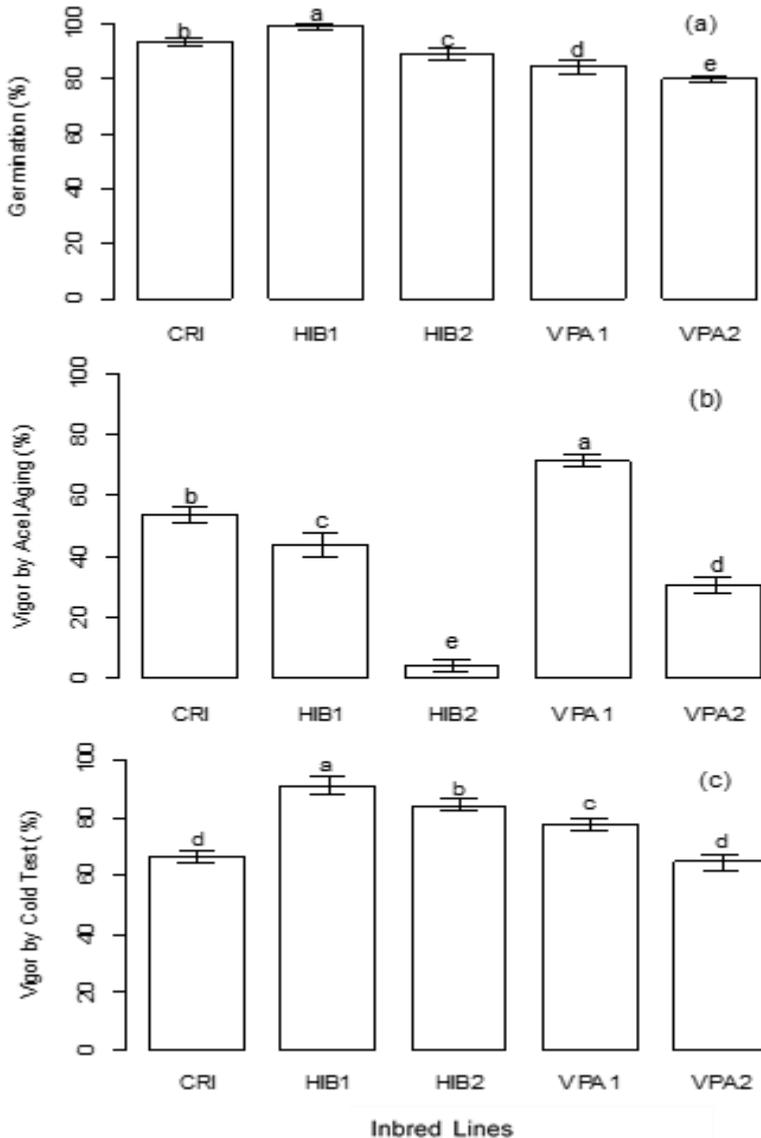
Soluble sugar was analyzed using the method of Clegg (1956). The sample was extracted twice. A 0.250 g of dried and ground seeds were added 25 mL 80% ethanol and incubating for 7 min at 60°C, after de sample was centrifuged for 15 min at 7000 g<sub>n</sub> and the supernatant was stored. Soluble sugars present in supernatant were react with the anthrone reagent under acidic conditions to yield a blue-green color. The sample was mixed with sulfuric acid and the anthrone reagent and then boiled until the reaction was completed. The solution was then allowed to cool and its absorbance was measured at 620 nm. The results were expressed

in  $\text{mg.g}^{-1}$  of seeds per dry weight. Following sugar extraction, each of the sample pellets were dried, resuspended in 20 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.2N and boiled for 2 h. Supernatant were react with anthrone reagent according Clegg (1956), and reading in a spectrophotometer (Marte Científica - Spectro 800S) at 620 nm. The results were multiplied by 0.9 (glucose conversion factor to starch) and were expressed in  $\text{mg.g}^{-1}$  of seeds per dry weight. For soluble protein, samples (0.5 g) were ground in liquid, homogenized within 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1mM of Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), 3 mM dithiothreitol (DTT) and 4% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), as described by Azevedo et al. (1998) and Garcia et al. (2006). The homogenate was centrifuged at  $9000g_n$  for 30 minutes and used for protein determination according to the Bradford method (1976). The results were expressed in  $\text{mg.g}^{-1}$  of seeds per fresh weight.

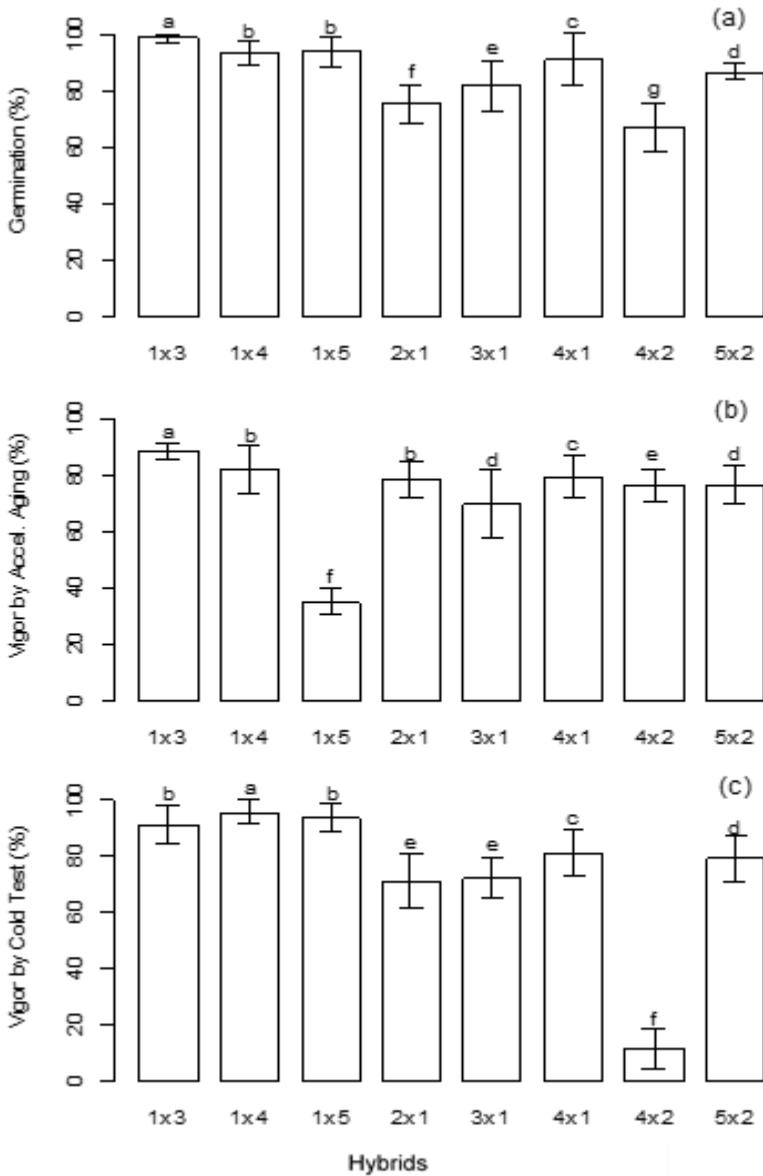
Statistical analyzes were implemented in software R (R Core Team, 2016), version 3.3.1. All statistical analyses were applied using the same software and data represented as mean  $\pm$  standard deviation of four replicates ( $n = 4$ ). Scott Knott test was applied to means separated.

### 2.3. RESULTS AND DISCUSSION

The ANOVA analysis of physiological quality of the inbred lines indicates that there are significant differences between them (Fig. 2.1). The inbred lines CRI and HIB1 were superior in the germination test, 93% and 99%, respectively (Fig 2.1a). The VPA1 inbred line presented higher vigor (71%) in accelerated aging, while, VPA1 and HIB2 were more sensible to this stress, presenting 31% and 4% of vigor, respectively (Fig 2.1b). The HIB1 inbred line, showed greater vigor by the cold test, 91% (Fig 2.1c). The Anova analysis of physiological quality of the hybrids, indicates that there are significant differences between them (Fig. 2.2). When analyzing the behavior of 1 x 4, 2 x 1, 3 x 1, 4 x 1, 4 x 2 and 5 x 2 hybrids, it was found that they had the same behavior of the inbred line used as female parent for viability and vigor by cold test (Fig. 2.2c). These result indicates the importance of studying physiological characteristics in seeds of inbred lines, aiming identify their contribution in vigorous hybrids.



**Figure 2.1.** Means for (a) germination (%), (b) vigor by Accelerated Aging test (%) and (c) vigor by cold test (%) of five inbred lines: CRI, HIB1, HIB2, VPA1 and VPA2 of maize seeds. The means were separated by SkottKnott test at 5% probability and vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation for 4 replications.

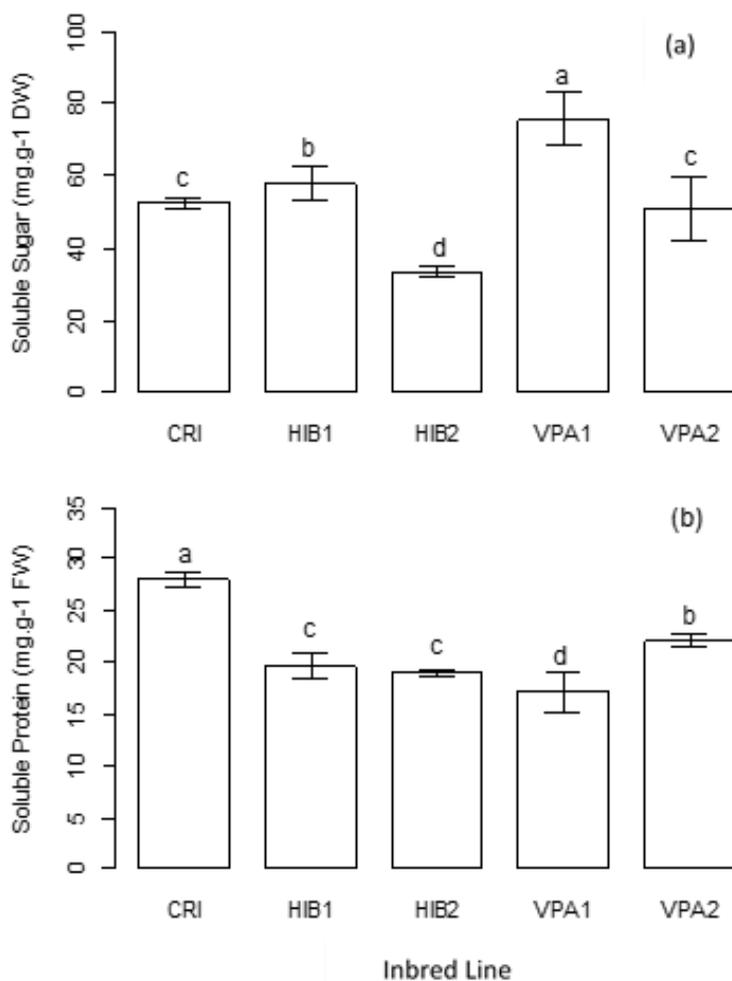


**Figure 2.2.** Means for (a) germination (%), (b) vigor by accelerated aging test (%) and (c) vigor by cold test (%) of eight maize hybrids. The means were separated by SkottKnott test at 5% probability and vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation for  $n = 4$  replications.

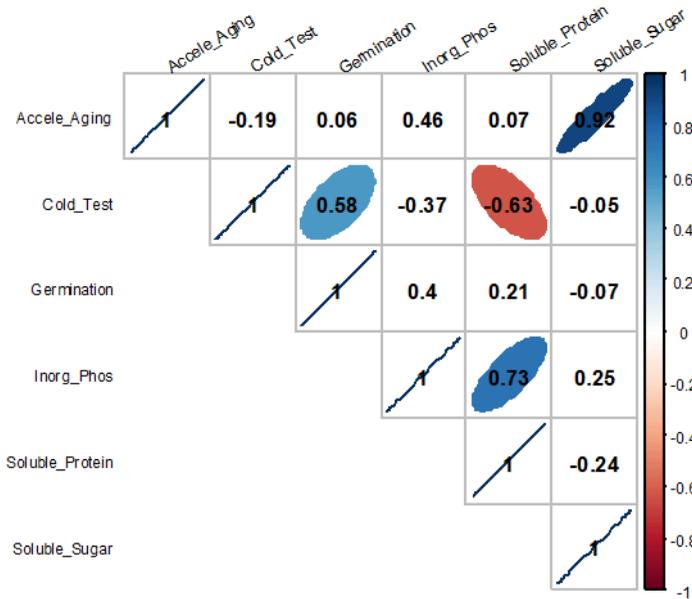
On the other hand, the 1 x 3 hybrid had the highest percentage of normal seedlings in germination test (98%) (Fig. 2.2a) and remained higher for vigor tests for accelerated aging (Fig. 2.2b) and cold test (Fig. 2.2c), with 88% and 91%, respectively. Observing the composition of this hybrid, it is possible to verify that CRI, used as a male parent, has obtained good viability and vigor. While VPA2, as a female parent, obtained 31% of vigor for accelerated aging test and 65% for cold test. The combination of these two inbred line was effective in obtaining seeds with better physiological quality. Thus, besides the physiological quality of the inbred lines, the combination of the same is an important factor that must be observed to obtain hybrids with viable and vigorous seeds in different environmental conditions.

The greater sensitivity observed in VPA2 and HIB2 inbred line in accelerated aging test, may be associated with lower levels of soluble sugars present in seeds (Fig. 2.3a). A significant and positive correlation (0.92) between the soluble sugar content and vigor in accelerated aging in inbred lines was found (Fig. 2.4).

The results of correlation between soluble sugar and vigor by accelerated aging test, suggest that higher initial content of soluble sugar contributes to higher vigor of seeds for VPA1 inbred line. This result indicate that seeds with a higher initial content of soluble sugars could overcome the stress condition in relation to inbred line that had reserves stored in another form, such as starch, for example, who must be hydrolyzed and converted to sugars and other compounds during germination. The soluble sugars are substrate for enzymes involved in the respiratory process, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase. This enzyme operates in the alternative pentose phosphate pathway and is responsible for maintaining an adequate level of NADPH in cells, and malate dehydrogenase, which catalyzes the conversion of malate to oxaloacetate, having an important role in the Krebs cycle. In addition, to participate in malate movement through the mitochondrial membrane in other cellular compartments (Tunes et al., 2011). The sugars are also important in the antioxidant system, as substrates for enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase. Moreover, soluble sugars, especially oligosaccharides, can contribute to stabilization of intracellular membranes, to increase the viscosity of the cytoplasm and the glassy state transition temperature for the liquid, important aspects to reduce the effects of accelerated aging.



**Figure 2.3.** Means for (a) soluble sugar ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) and (b) soluble protein ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) of five inbred lines of maize seeds. The means were separated by SkottKnott test at 5% probability, and vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation for  $n = 3$  replications.



**Figure 2.4.** Correlation matrix of the biochemical components and physiological data of five inbred lines of maize seeds.

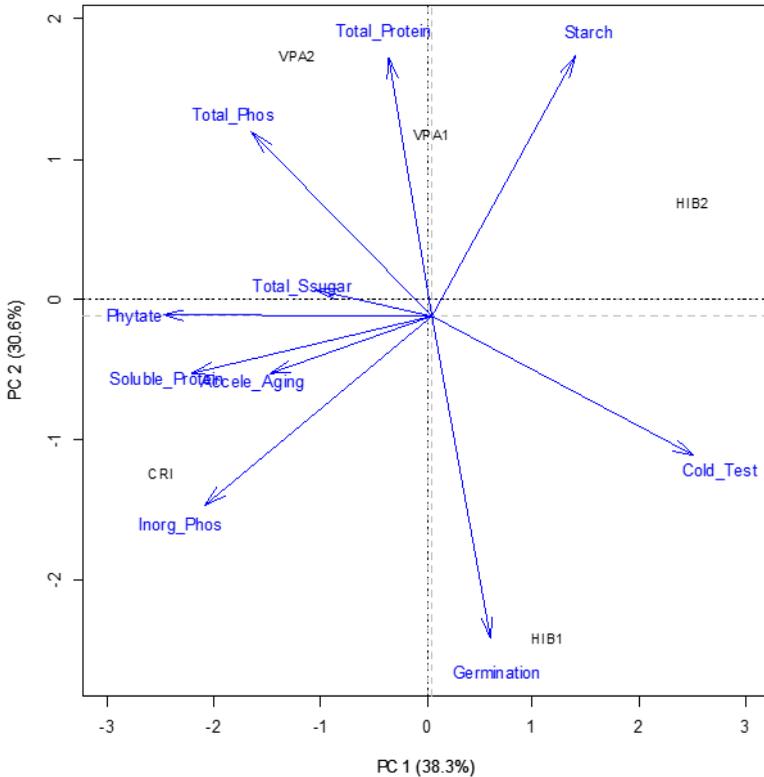
On the other hand, the soluble protein content was negatively correlated with the vigor for cold test (-0,68). This result suggests that the initial protein content in soluble form (Fig 2.3b), does not bring advantages when the seeds are submitted to conditions of stress by cold, for example. Low temperatures induce peroxidation of the membrane lipids, and the production of reactive oxygen species, that require a repair system and to fight against free radicals in an efficient manner. Thus, the proteins that are soluble can not contain forms required for overcoming the stress. In this sense, the proteins still stored in the vacuole, appear to have advantages in this stress condition. The complexed proteins are susceptible to hydrolysis by action of specific enzymes. It was found a negative correlation between the total protein, total phosphorus, phytate and starch with physiological response of seeds, it was found a negative correlation between germination and starch content (-0.63) and the total phosphorus content (-0.65).

The results suggest that the germination and vigor may be associated with an efficient metabolism of hydrolysis and mobilization of reserves during the germination and not necessarily, in a higher initial content of compounds as starch and phosphorus. However, further studies to evaluate the hydrolysis and mobilization of reserves during germination are needed to confirm this hypothesis.

For better understanding the relationship between the biochemical components and the physiological response, that have not been identified in the correlation analysis, and to determine the influence of each variable on the inbred lines, principal component analysis (PCA) was applied. The total variance explained by the two principal components was 68.9%, being 38.3% and 30.6% for component 1 (PC1) and 2 (PC2), respectively (Fig. 2.5).

The loading values showed that HIB1 inbred line grouped in PC1+/PC2- according to their germination and vigor by cold test. In PC1+/PC2+, VPA1 and HIB2 inbred line, grouped according to their starch content. In PC1-/PC2+, VPA2 inbred line grouped according to their total protein content, total phosphorus and soluble sugar, and CRI inbred line grouped in PC1-/PC2- according to their soluble protein content, phytate and inorganic phosphorus content and vigor by accelerated aging. The lines were separated according different biochemical components and it is not clear what component is more important for all inbred lines.

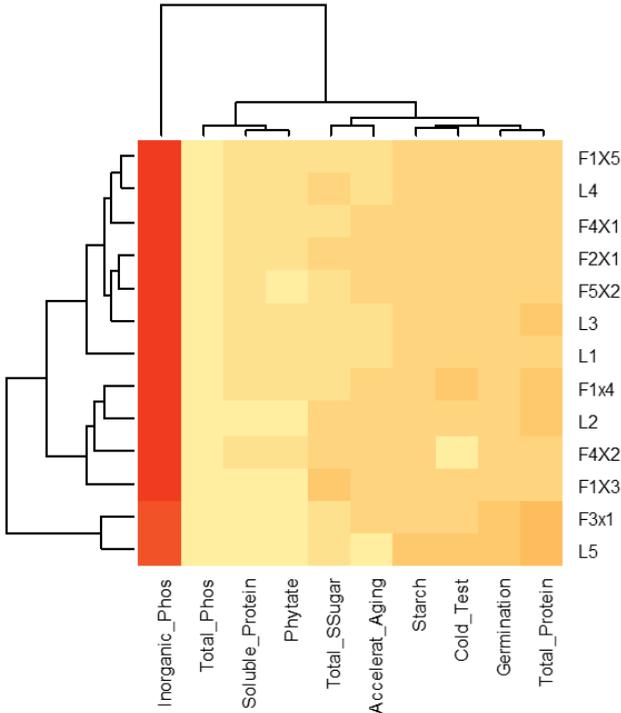
The PCA analysis indicates that the sample VPA1, VPA2 and HIB2 were influenced by biochemical components, such as starch, total protein and total phosphorus (Fig. 2.5). In VPA1 and VPA2 samples, the total protein content had a greater influence in the result of vigor by cold test. These two inbred line showed greater vigor than others samples, except for HIB1, who presented the best performance in cold test, however, this inbred line was not grouped by biochemical components in the PCA analysis. The result observed for VPA1 and VPA2 corroborate with the hypothesis that the seeds that have higher initial protein content in complexed form, have a greater capacity of overcoming the stress condition by cold.



**Figure 2.5.** Scores of the first and second Principal Component (PCA) for biochemical composition and physiological response in five inbred lines of maize seeds.

Hierarchical clustering is an easy and intuitive method to mathematically define the similarity between two objects based on the Euclidean distance (Uarrotta et al., 2014). The cluster heat map was also applied to the biochemical and physiological parameters. Eight groups, were identified indicating that there is dissimilarity between the samples (Fig. 2.6). A cophenetic correlation coefficient of 88% was found. Samples were grouped in 4 groups, and VPA2 and HIB1 grouping together. The identification of groups is important to the choice of the parents used in breeding programs. The inbred lines in distant groups, is

indicative of being dissimilar and can be considered promising in artificial crosses.

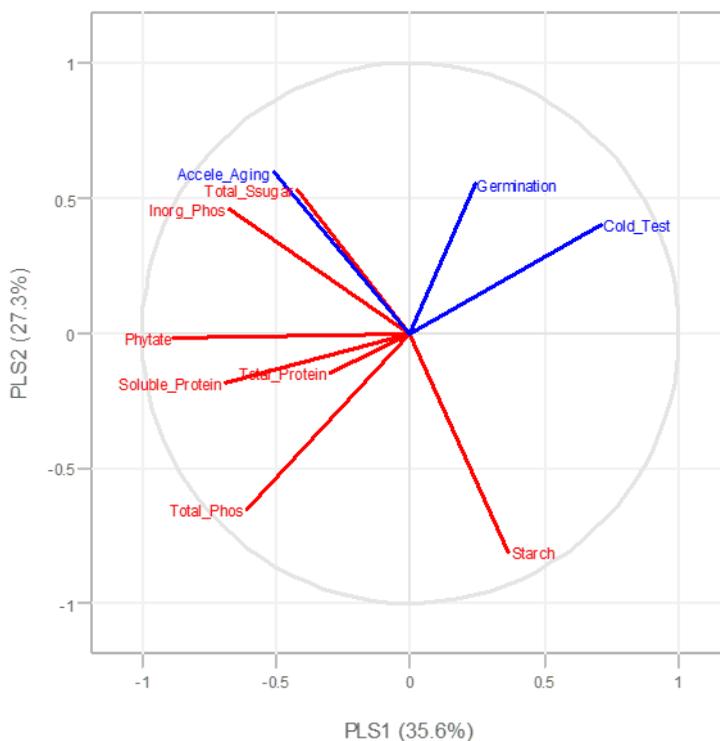


**Figure 2.6.** Cluster heat map (HCA) for biochemical composition and physiological quality of maize seeds, with cophenetic correlation coefficient of 88%.

The cluster heatmap revealed that the inorganic phosphorus content was the variable that most contributed to the formation of clusters (Fig. 2.6), while total phosphorus content exerted smaller influence on the samples. Thus, the forms of phosphorus available, as phytate and inorganic phosphorus, are important parameters in the characterization and identification of differences in performance in the sample, compared to the total phosphorus content of the seeds. The total protein content also influenced the groupings, to a lesser extent compared with inorganic phosphorus, but it was important for the differentiation of VPA1, VPA2 and HIB2 inbred lines.

Cluster analysis revealed that the inorganic phosphorus content is an important parameter for differentiating samples, however, could not identify the association of this component with the physiological response. Thus, Partial Least Squares Regression (PLS-R) was applied to the data in order to verify if there is some degree of association between biochemical components and physiological quality in seeds, moreover, to verify the existence of other relations of cause and effect involving biochemical and physiological response components in the inbred lines.

According to the PLS-R, the soluble sugar and inorganic phosphorus content were the variable that most influenced the vigor by the accelerated aging test (Fig. 2.7). The relationship between the soluble sugar content and accelerated aging has been identified previously by correlation analysis (Fig. 2.4), however, the direct influence of the inorganic phosphorus in the response of accelerated aging had not been previously identified. This component is essential for the synthesis of antioxidant enzyme systems, operating in the signaling and signal transduction (Raboy, 2009), important in stress conditions who require activation of a fast and efficient mechanism to combat the deterioration. Moreover, the inorganic phosphorus is associated with the starch hydrolysis, that becomes sugars, quickly used by the metabolism during germination, having its accentuate consumption by antioxidant enzymes in stress conditions. The analysis also indicates that the starch content and vigor by accelerated aging showed opposing relationship, this suggesting that the larger initial content of starch cause a smaller vigor in accelerated aging. However, studies that observe the association between previously stored starch hydrolysis and the reserves mobilization during accelerated aging are needed to confirm this hypothesis. The PLS-R showed clearly the relationship between the biochemical composition and physiological response in this study.



**Figure 2.7.** Scores of PLS-R component of association between biochemical composition and physiological response in five inbred lines of maize seeds

## 2.4. CONCLUSION

The genetic divergence observed from biochemical composition, viability and vigor of inbred lines is indicative of heterosis effect. The physiological quality of seed was positively influenced by higher initial content of soluble sugars and inorganic phosphorus. Those variables important biochemical components associated with seed vigor and can be applied to identify inbred lines with better physiological quality.

## 2.5. REFERENCES

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Vitamins and other nutrients. In: AOAC. Official methods of analysis. 16. ed. Vol. II. AOAC International: Arlington, cap. 45, p. 58-61, 1995.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, v. 104, 280-292, 1998. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x>

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. v. 14, p. 93-107, 2004. <http://dx.doi.org/10.1079/ssr2004159>.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science Technology*, v.19, p. 279–286, 1991.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. Seeds, physiology of development, germination and dormancy. 3. ed. New York: Springer, 2013, 392p.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A. C. Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Science Research*, v. 5, p. 75-80, 1995. <http://dx.doi.org/10.1017/s0960258500002646>.

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, p. 248-254, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p. Available at: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/2946\\_regras\\_analise\\_sementes.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf)>.

CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of Phosphorus. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 1756-1758, 1956. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60119a033>.

CLEGG, K. M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 7, p. 40-44, 1956. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740070108>.

[GARCIA, J.S.](#); [GRATÃO, P.L.](#); [AZEVEDO, R.A.](#); [ARRUDA, M.A.](#) Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 8623-8630, 2006. <http://dx.doi.org/10.1021/jf061593l>.

GOMES, M.S.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, R.G.; VIEIRA, M.G.G.C. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 22, p. 7-17, 2000. <http://dx.doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v22n1p7-17>.

[HE, H.](#); [VIDIGAL, D.](#) V.; [SNOEK, L. B.](#); [SCHNABEL, S.](#); [NIJVEEN, H.](#); [HILHORST, H.](#); BENTSINK, L. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 6603-6615, 2014. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru378>.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, p. 1313-1315, 1980. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60232a049>

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

MOTERLE, L.M.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; PINTO, R.J.B.; GONÇALVES, L.S.A.; AMARAL JUNIOR, A.T.; SILVA, T.R.C. Combining ability of tropical maize lines for seed quality and agronomic traits. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, p. 2268-2278, 2011. <http://www.geneticsmr.com/articles/1285>

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, p. 449-456, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s2317-15372013000400006>

R CORE TEAM. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. <https://www.R-project.org/>.

RABOY, V. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Science*, v. 177, p. 281-296, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.012>.

RABOY, V.; DICKINSON, D. B. Effect of Phosphorus and Zinc Nutrition on Soybean Seed Phytic Acid and Zinc. *Plant Physiology*, v. 75, p. 1094-1098, 1984. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.75.4.1094>.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, p. 507-533, 2012. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>.

SANTOS, E.R.; BARROS, H.B.; CAAPONE, A.; MELO, A.V.; CELLA, A.J.S.; SANTOS, W.R. Divergência genética entre genótipos de soja com base na qualidade de sementes. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, v. 7, p. 247-254, 2012. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v7i2a1560>.

SUN, W. Glassy State and Seed Storage Stability: The WLF Kinetics of Seed Viability Loss at  $T > T_g$  and the Plasticization Effect of Water on Storage Stability. *Annals of Botany*, v. 79, p. 291-297, 1997. <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1996.0346>.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995, 174p.

TUNES, L.M.; BADINELLI, P.G.; BARROS, C.S.A.; MENEGHELLO, G.E.; AMARANTE, L. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. *Revista Ceres*, v. 58, p. 178-184, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000200008>.

UARROTA, V.G.; MORESCO, R.; COELHO, B.; NUNES, E.C.; PERUCH, L.A.M.; NEUBERT, E.O.; ROCHA, M.; MARASCHIN, M. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA

and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry*, v. 161, p. 67-78, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.110>.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics**. Boca Raton: CRC Press, 2009, 336p.

VENTURA, D.M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D.; BUTTAFAVA, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; BALESTRAZZI, A. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 60, p. 196-206, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.031>



### CAPÍTULO 3

## HIDRÓLISE E MOBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E PROTEÍNAS ASSOCIADOS À QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO



## HIDRÓLISE E MOBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E PROTEÍNAS ASSOCIADOS À QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO

**RESUMO:** A composição das reservas está diretamente relacionada à manifestação do vigor de sementes. No entanto, a manifestação do potencial fisiológico de linhagens e híbridos a partir da hidrólise e mobilização de reservas ao longo da germinação não estão completamente elucidadas. Neste sentido, o objetivo no trabalho foi verificar o padrão de hidratação das sementes e a hidrólise de fósforo e proteínas na germinação de linhagens e híbridos de milho e determinar a associação entre a mobilização de reservas e a atividade enzimática com o vigor de sementes. A qualidade fisiológica das sementes das linhagens e dos híbridos foram avaliadas pelo teste de germinação e de vigor por envelhecimento acelerado e teste de frio. A composição bioquímica foi pela quantificação do teor de proteína total, proteína solúvel, fósforo total, ácido fítico, fósforo inorgânico e atividade da enzima fitase no início e ao longo do processo germinativo. As sementes híbridas apresentam maior qualidade fisiológica com protrusão radicular antecipada. A maior atividade da enzima fitase esteve associado a sementes de maior vigor. O padrão de hidratação, a hidrólise de proteínas de reserva e a mobilização de proteína solúvel explicam o maior vigor de sementes de milho.

**Palavra-chave:** vigor, ácido fítico, fitase, germinação.

### 3.1. INTRODUÇÃO

A utilização de sementes de qualidade superior garante germinação rápida e uniforme, com estabelecimento de plântulas vigorosas em uma ampla faixa de ambientes. A germinação inicia com a hidratação dos tecidos e termina com a protrusão radicular e emergência da plântula (COPELAND; MC DONALD, 1995). A água desempenha papel decisivo no processo germinativo, controlando a reidratação dos tecidos, que por sua vez, intensifica a respiração, ativa o sistema enzimático responsável pela hidrólise e mobilização de reservas, fornecendo energia e nutrientes para a retomada do crescimento do embrião (BEWLEY, 2011, EHRHARDT-BROCARD; COELHO, 2016). Os componentes de reserva armazenados nas sementes, dentre eles, proteína e fósforo, são influenciados pelo genótipo e pelas condições ambientais em que as sementes foram produzidas. Apesar de importantes avanços na

compreensão dos mecanismos de hidrólise e de mobilização de reservas, ainda existem lacunas que associem estes eventos metabólicos às diferenças no vigor de sementes de linhagens e híbridos de milho.

O vigor de sementes depende da correta síntese e acúmulo de reservas, como mRNAs e proteínas, que possibilitam a eficiente reativação do metabolismo celular após a hidratação das sementes, com mecanismos que combatem a deterioração, com respostas antioxidantes e de reparo de DNA, convergindo para a obtenção de plântulas vigorosas (RAJJOU et al., 2012, VENTURA et al., 2012, HAN et al., 2013). O menor vigor observado nas sementes das linhagem em relação ao híbrido pode estar associado à menor atividade metabólica de RNA, proteínas e DNA nos embriões. No embrião híbrido, o metabolismo de proteínas e lipídeos é superior ao das linhagens, favorecendo o crescimento do eixo embrionário e maior germinação das sementes (MINO; INOUE, 1994).

A germinação é caracterizada por inúmeros processos bioquímicos, que ocorrem durante e reidratação das sementes, especialmente durante a fase I, que se caracteriza pela rápida absorção de água, e na fase II, quando a absorção de água é lenta e o metabolismo celular se intensifica. Nas fases I e II inicia-se a síntese *de novo* que é dependente do mRNA armazenado previamente. Ainda nestas fases, as proteínas, constituintes de enzimas, atuam na tradução, na produção de energia, combate a espécies reativas de oxigênio, desempenham papel chave na hidrólise e remobilização de nitrogênio, liberando aminoácidos e outros compostos armazenadas para o embrião em crescimento (TAN-WILSON; WILSON, 2012, WANG et al., 2015). Assim como as proteínas, o fósforo é constituinte de DNA e RNA. Pode constituir também amido, lipídeos e proteínas. Em milho, o fósforo é armazenado sob a forma de ácido fítico, complexado à K, Mg, Ca Fe, Zn, e Mn (RABOY, 2003). O ácido fítico, através da ação da fitase, é hidrolisado e convertido em fósforo inorgânico, myo-inositol e outros cátions, equilibrando os teores de fósforo nas células, atuando como agente antioxidante, produtor de energia e como substrato para o funcionamento de importantes vias metabólicas como a do amido, fundamentais no processo germinativo (DORIA, et al., 2009).

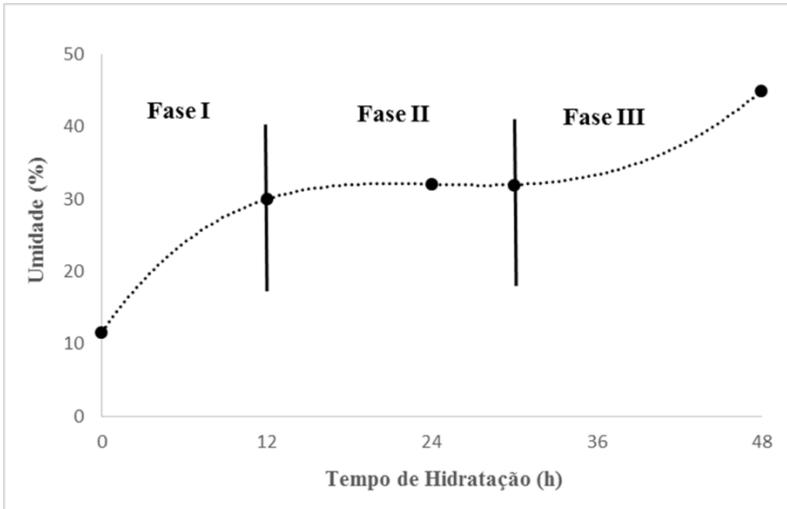
Deste modo, compreender o padrão de hidrólise e mobilização dos componentes de reserva pode trazer subsídios para compreensão das diferenças no vigor de sementes de linhagens e híbridos. Assim, o objetivo no trabalho foi verificar o padrão de hidratação das sementes e a hidrólise de fósforo e proteínas na germinação de linhagens e híbridos de milho, e determinar a associação entre a mobilização de reservas e a atividade enzimática com o vigor de sementes.

### 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido com cinco linhagens de milho parcialmente endogâmica ( $S_5$ ), denominadas de CRI, VPA1, VPA2, HIB1 e HIB2, e, cinco combinações híbridas 3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 1 x 4 e 2 x 5, obtidas em um programa de melhoramento da Cooperativa de produção de sementes em São Miguel do Oeste/SC. Inicialmente foi instalado um campo para a multiplicação de sementes das linhagens e para obtenção das combinações híbridas em área experimental da Cooperativa em São Miguel do Oeste/SC, na safra 2014/2015. O primeiro número indicado no híbrido se refere a linhagem utilizada como parental masculino. Neste estudo o número 1 que aparece na combinação híbrida refere-se à linhagem CRI, 2 à linhagem VPA1, 3 à VPA2, 4 à HIB1 e 5 à linhagem HIB2.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada através do teste de germinação, teste de frio e envelhecimento acelerado. O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, distribuídas entre folhas de papel “*germitest*”, umedecidas com água destilada, 2,5 vezes o seu peso, e mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em germinador tipo Mangelsdorf. As contagens foram efetuadas no quarto dia, avaliando-se as plântulas normais de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O teste de envelhecimento acelerado foi realizado com quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram distribuídas sobre telas de alumínio que foram fixas em caixas plásticas do tipo “gerbox” contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram fechadas e levadas para câmara de envelhecimento por 72 h a  $45^\circ\text{C}$ , de acordo com Marcos-Filho (2005). Após este período as sementes foram colocadas para germinar a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e no quarto dia, as plântulas normais foram contabilizadas, de maneira similar ao descrito no teste de germinação. O teste de frio foi realizado utilizando quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram distribuídas entre papel “*germitest*”, umedecidas com água destilada e colocadas em câmara a  $5^\circ\text{C}$  por sete dias, após este período, as plântulas normais foram avaliadas conforme descrito por Brasil (2009).

O padrão de hidratação das sementes foi utilizado para identificar o padrão trifásico da germinação (Fig. 3.1) e desse modo também determinar a hidrólise e a mobilização de fósforo total, ácido fítico, fósforo inorgânico, proteína total e proteína solúvel durante a germinação.



**Figura 3.1.** Padrão de hidratação de sementes utilizado na identificação o padrão trifásico da germinação em sementes.

A curva de hidratação das sementes foi determinada utilizando quatro repetições de 50 sementes para cada tempo, colocadas entre folhas de papel “germites” umedecidas com água destilada, 2,5 vezes o seu peso. As sementes foram colocadas para germinar a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , e em cada tempo, o conteúdo de água das sementes foi determinado, seguindo o método da estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h (BRASIL, 2009). O padrão de hidratação foi determinado nas sementes não germinadas (0h) e nos tempos de 12h, 24h, 30h e 48h após a hidratação (HAH).

A hidrólise dos componentes foi determinada segundo os pontos da curva de hidratação nos tempos de 0h, 12h, 24h, 30h e 48h após a hidratação. A mobilização das reservas foi determinada em 27h, 30h, 33h e 36h após a hidratação (HAH), período que correspondeu ao final da fase II da germinação (Fig. 3.1). O eixo embrionário foi removido e o conteúdo de ácido fítico, fósforo inorgânico, atividade da fitase e o teor de proteína solúvel foram determinados.

O teor de fósforo total em cada tempo de hidratação foi quantificado pelo método proposto por Tedesco et al. (1995), que consiste na digestão sulfúrica, iniciada com a pesagem de 200 mg de sementes moídas. Posteriormente a amostra foi colocada em tubos de digestão e adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio. Os tubos foram colocados em blocos digestores à temperatura

inicial de 160°C por aproximadamente uma hora, posteriormente aumentou-se a temperatura até atingir 360°C, por tempo suficiente até as amostras adquirirem coloração transparente. Posteriormente, retirou-se os tubos do bloco para esfriar e completou-se com água destilada para um volume final de 50 mL. Tomou-se 1 mL da alíquota digerida, adicionou-se 2 mL de água destilada, 3 mL de solução P-B (molibdato de amônia) e 3 gotas de solução P-C (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, sulfito de sódio e metabissulfito de sódio), agitou-se e após 15 minutos efetuou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro na faixa de 660 nm. A curva padrão para o fósforo foi obtida através de uma solução estoque de 1000 mg.kg<sup>-1</sup> de fósforo preparada com um padrão (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Tritisol - Merck) diluído para obter as concentrações de: 0; 4; 8; 12; 16 e 20 mg.kg<sup>-1</sup> de fósforo. As análises foram realizadas a partir de três repetições.

O teor de ácido fítico foi determinado de acordo com o método descrito por Latta e Eskin (1980). Uma amostra de 0,5 g de sementes moídas foi colocada em tubo falcon de 15 ml, foi adicionado 10 mL de HCL (2,4%), posteriormente colocou-se as amostras sob agitação constante por 3 horas para extração e solubilização do ácido fítico. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (2000g) por 20 minutos a 20°C. O sobrenadante (2 mL) foi transferido para tubo falcon de 15 mL contendo 8 mL de água e 3 mL de resina tratada que foram agitados por 1 hora e posteriormente foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos. Ao resíduo adicionou-se 8 mL de NaCl 0,07M e manteve-se em agitação por 10 minutos para retirada de impurezas. Posteriormente a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos. O resíduo foi novamente ressuspensionado em 8 mL de NaCl 0,7M e mantido em agitação por 1 hora para eluir o fitato da resina. Após procedeu-se a centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 20°C. Em uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi adicionado 2 mL do reagente de Wade, centrifugou-se a 6000 rpm por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Marte Científica - Spectro 800S) em absorbância de 500 nm. A curva padrão para o ácido fítico foi obtida através de uma solução estoque de 300 ppm de fitato de sódio diluído para obter as concentrações de: 0; 35; 70; 105; 140; 175 e 210 ppm. As análises foram realizadas a partir de três repetições. Os resultados foram expressos em mg.g<sup>-1</sup> de sementes secas.

O conteúdo de fósforo inorgânico foi determinado utilizando 100 mg de sementes secas e moídas. As amostras foram extraídas duas vezes, por dois minutos, com 4 mL de 12,5% ácido tricloacético (w/v) em 0,025 M MgCl<sub>2</sub>. As extrações foram centrifugadas 10000 g por 10 min e filtradas em filtro de papel tipo Whatman nº 1 (RABOY; DICKINSON,

1984). Os extratos filtrados foram diluídos para 12,5 mL e o fósforo inorgânico foi determinado pelo método colorimétrico, de acordo com o método descrito por Chen et al. (1956). A curva padrão para o fósforo inorgânico foi obtida através de uma solução estoque de 80 ppm de fósforo preparada com um padrão ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Tritisol - Merck) diluído para obter as concentrações de: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 ppm de fósforo. As análises foram realizadas a partir de três repetições e os resultados foram expressos  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de sementes secas.

A atividade da enzima fitase foi determinada seguindo método descrito por Ou et al. (2011), com modificações. Aproximadamente 0,5 g de sementes moídas foram misturadas a 10 mL de tampão de acetato de sódio (0,22 M, pH 5,4) e mantidos sob agitação constante a 4°C por 1 h. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4400 g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade da fitase. Fitato de sódio (1 mL, 10 mM) foi usado como substrato e misturado a 3 mL do sobrenadante, seguido de incubação a 37°C por 1 h. Em seguida, 4 mL da solução de heptamolibdato foi adicionada para finalizar a reação. A mistura foi centrifugada a 4400 g por 10 min e a absorbância do sobrenadante foi mensurada a 415 nm. A curva padrão para a atividade da fitase foi obtida através de uma solução estoque de fósforo preparada com um padrão ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Tritisol - Merck) diluído em tampão de acetato (0,22 M pH5,5) para obter as concentrações de: 0; 1,6; 3,3; 5; 6,6; 8,3 e 50  $\mu\text{g.mL}$  de fósforo. As análises foram realizadas a partir de três repetições. Uma unidade de atividade (1 U) foi definida como a quantidade de enzima que irá liberar 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato a partir de ácido fítico por minuto a 37°C em pH 5,5. A atividade da fitase foi calculada pela seguinte fórmula:

$$U = \frac{C}{m \cdot 60} \cdot F \cdot 1000$$

m- Massa da amostra, g

U- Atividade da fitase em sementes de milho,  $\text{U Kg}^{-1}$

C – Atividade da fitase calculada pela equação da regressão linear a partir da absorbância das amostras;

F- Fator de diluição da amostra

Para quantificação da proteína total foi utilizado o método proposto por Kjehdahl (AOAC, 1995), o qual se baseia no teor de nitrogênio total contido na amostra. A partir de uma alíquota de 10 mL da amostra diluída obtida da digestão sulfúrica, procedeu-se a destilação em micro-destilador de nitrogênio. O sal formado após processo de destilação, foi titulado com

solução padrão de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2677M, até ponto de viragem, que é a passagem da coloração azulada da amostra para coloração rosa claro. A determinação do teor de proteína total foi realizada seguindo a fórmula: % Proteína = conteúdo de N  $\times$  6,25 (AOAC, 1995). O valor obtido foi convertido e expresso em  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes secas.

Para o conteúdo de proteínas solúvel, amostras (0,5 g) foram trituradas em nitrogênio líquido, homogeneizada em tampão de fosfato de potássio (10 mM, pH 7,5), contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), 3 mM de ditioneitol (DTT) e 4% polivinilpirrolidona (PVPP), de acordo com Azevedo et al. (1998) e Garcia et al. (2006). A proteína solúvel foi estimada de acordo com o método proposto por Bradford (1976) e a absorbância mensurada em 595 nm. A curva padrão foi preparada com *Bovine serum albumin* (BSA) na concentração de 0; 30; 50; 100; 200; 300 e 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ . O resultados foram expressos em  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes úmidas.

Amostras de proteína solúvel também foram separada utilizando SDS-PAGE. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizado em gel separador de 12%. O gel concentrador continha 3% de acrilamida. Amostras contendo 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada tratamento, foram corridas em temperatura ambiente por 3 horas a 30 volt. Os géis foram colocados em solução de azul de Coomassie e as bandas das proteínas clareadas em solução contendo metanol e ácido acético. O peso molecular de cada banda de proteína foi calculado utilizando marcador molecular padrão (Prestained SDS-PAGE Standards – Bio-Rad).

A análise estatística foi realizada em software R (R Core Team 2016), versão 3.3.1. Todas as análises foram realizadas no mesmo software e os dados representados como média  $\pm$  desvio padrão de três repetições ( $n=3$ ). O teste de Scott Knott foi aplicado para separação de médias e a Análise de Componentes Principais – PCA foi aplicada com o objetivo de identificar a influência das variáveis (fisiológica e bioquímicas) sobre as linhagens e as combinações híbridas.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações no teor de água das sementes, permitiram identificar o padrão trifásico de germinação e diferenciar os genótipos avaliados (Fig. 3.2 e Fig. 3.3). As linhagens CRI e VPA1 foram similares quanto ao padrão de hidratação, assim como HIB1 e HIB2, enquanto que VPA2

apresentou padrão distinto das demais, com maior teor de água (54%) e protrusão radicular em 36 horas (Fig. 3.2).

Para os híbridos, verifica-se que 4 x 1 e 1 x 3 foram similares para o padrão de hidratação, assim como 1 x 4 e 2 x 5. Por outro lado, 3 x 1 apresentou padrão distinto, com germinação mais rápida em relação aos demais, com protrusão radicular em 30 horas (Fig. 3.3). A protrusão radicular para os demais híbridos se estendeu até 36 horas de hidratação. Para as linhagens a protrusão radicular ocorreu entre 36 e 40 horas. A protrusão radicular antecipada dos híbridos é indicativo que os mesmos apresentam maior vigor em relação às linhagens, em função da manifestação da heterose para esta característica. Sob o ponto de vista fitotécnico, a germinação antecipada permite rápido estabelecimento da cultura, possibilitando a superação de condições adversas a que as sementes à campo estão sujeitas durante a fase germinativa.

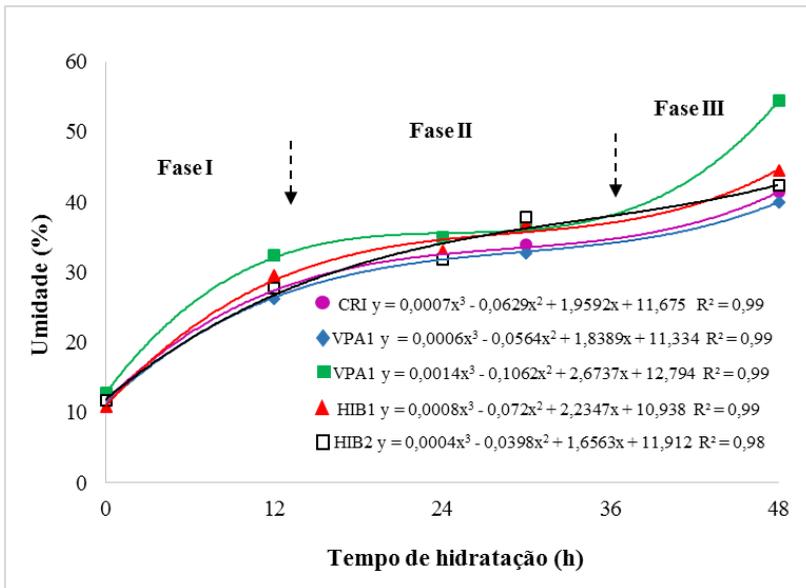
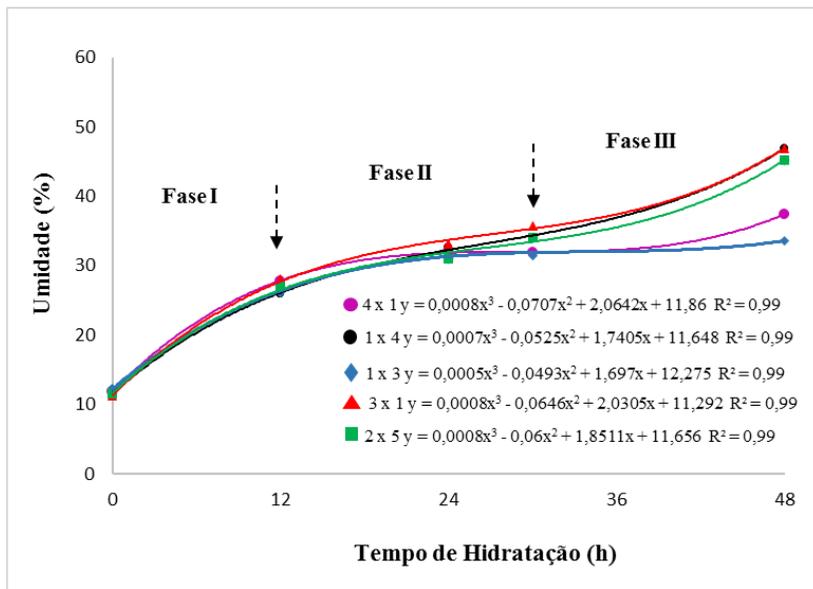


Figura 3.2. Padrão de hidratação em sementes de linhagens de milho.



**Figura 3.3.** Padrão de hidratação em sementes de combinações híbridas de milho

O padrão de hidratação também indicou que o comportamento da combinação 1 x 3 esteve associado à linhagem materna VPA2, ambos apresentaram protrusão radicular antecipada em relação às demais, porém, apenas o híbrido apresentou melhor qualidade fisiológica, com 98% de germinação, 88% e 91% de vigor pelos testes de envelhecimento acelerado e teste de frio, respectivamente (Tabela 3.1). O padrão de hidratação mostrou relação com o vigor das sementes dos híbridos. Por outro lado, o padrão de hidratação não mostrou-se eficiente na identificação das linhagens com melhor desempenho fisiológico. O padrão de hidratação esteve associado ao maior vigor de sementes também para outras espécies. Ehrhardt-Brocardo e Coelho (2016), verificaram que as sementes de genótipos de feijão que apresentavam taxas de hidratação elevadas apresentavam também maior vigor, resultado semelhante ao verificados nos híbridos de milho neste estudo.

Além das diferenças na hidratação das sementes, verificou-se alterações na hidrólise de fósforo e proteínas de reserva entre as linhagens e os híbridos (Fig. 3.4 e 3.5). Houve tendência de redução nos teores de proteína total, proteína solúvel, fósforo total e ácido fítico, em detrimento do teor de fósforo inorgânico que apresentou elevação de seu conteúdo ao longo da germinação. A redução no teor de fósforo total pode estar associada a elevação nos níveis de ATP e de fosforo inorgânico. Por outro

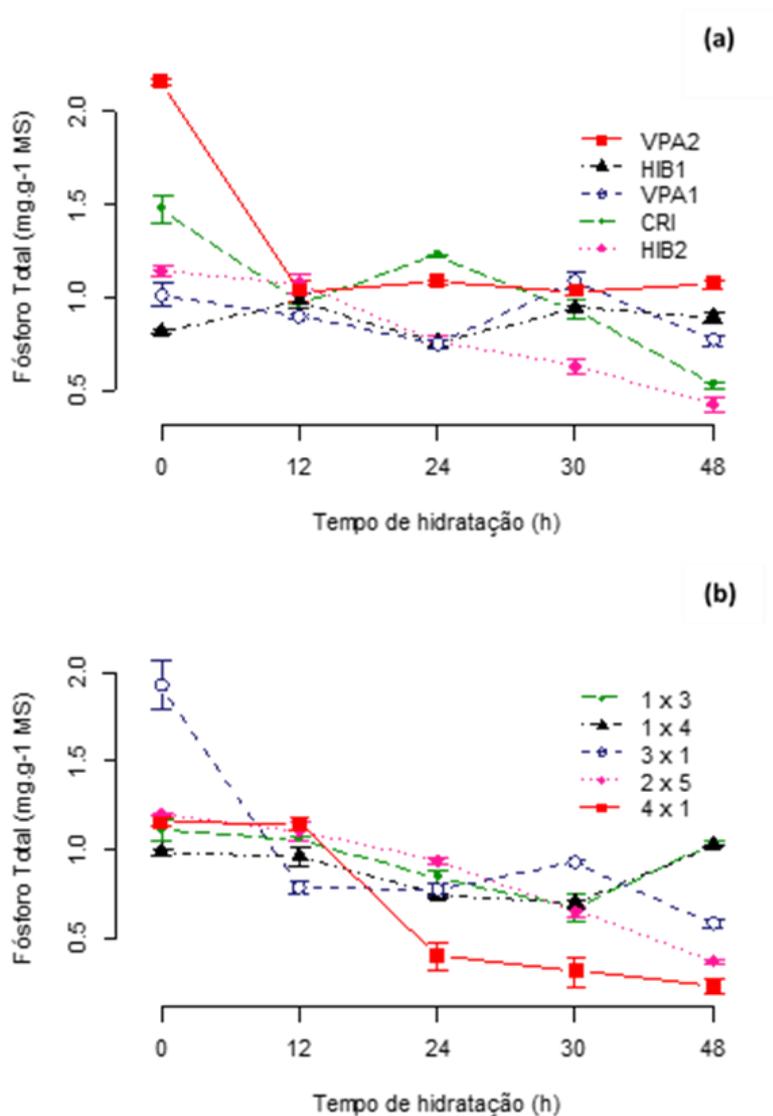
lado, a redução no teor de proteína total pode estar associada a elevação nos níveis de proteínas solúveis, aminoácidos, peptídeos e demais compostos utilizados na síntese de enzimas e novos tecidos.

**Tabela 3.1.** Médias e desvio padrão para germinação e vigor de sementes de linhagens e híbridos de milho.

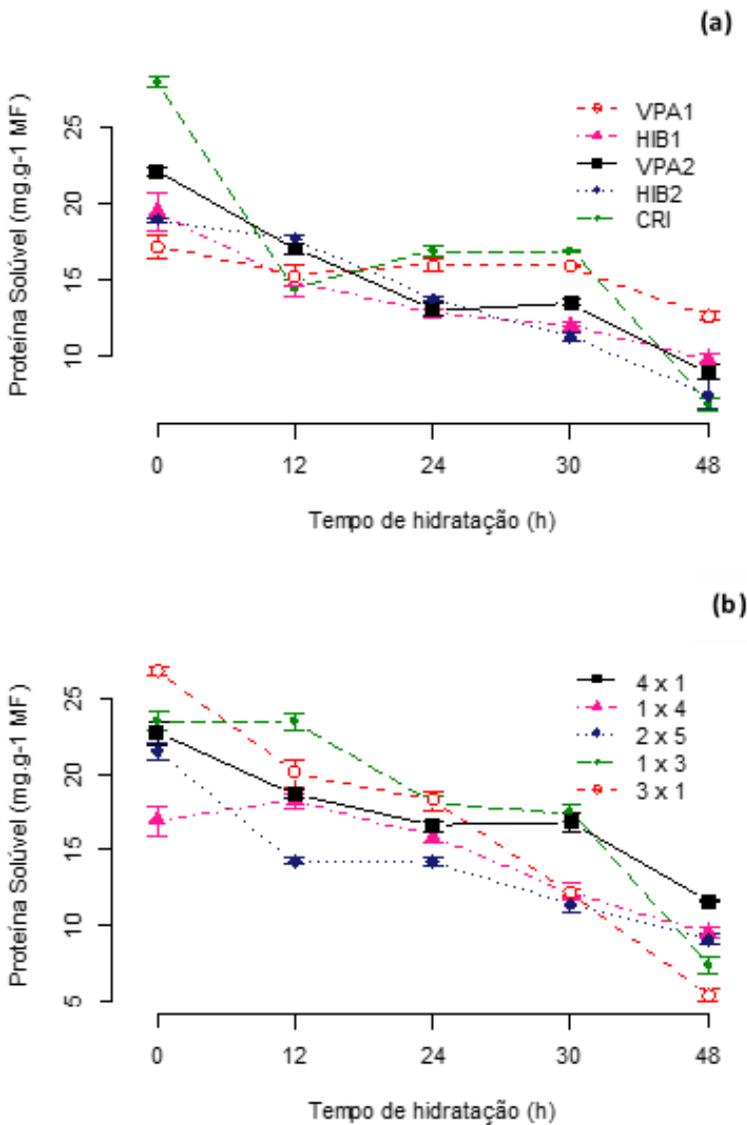
| Genótipos | Germinação (%) | Vigor - EA (%) | Vigor - TF (%) |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| Linhagens |                |                |                |
| CRI       | 93±0,9b        | 54±1,7b        | 67±1,2d        |
| VPA1      | 84±1,7d        | 72±1,3a        | 78±1,2c        |
| VPA2      | 80±0,8e        | 31±1,6d        | 65±1,7d        |
| HIB1      | 99±0,5a        | 44±2,6c        | 91±1,7a        |
| HIB2      | 89±1,3c        | 5±1,2e         | 85±1,3b        |
| Híbridos  |                |                |                |
| 3 x 1     | 98±0,9a        | 88±1,3a        | 91±1,2b        |
| 1 x 3     | 87±3,4c        | 76±1,7d        | 80±2,3d        |
| 4 x 1     | 93±1,8b        | 80±1,7c        | 86±1,4c        |
| 1 x 4     | 91±1,3b        | 82±1,3b        | 96±1,8a        |
| 2 x 5     | 80±1,3d        | 76±1,3d        | 73±1,3e        |

Médias ± desvio padrão seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. EA: Envelhecimento Acelerado; TF: Teste de Frio.

As diferenças nos teores iniciais e finais e entre cada tempo de hidratação, foi calculada para determinar a taxa de hidrólise dos componentes de reserva ao longo da germinação. A redução no teor de fósforo total entre linhagens e híbridos foi semelhante 12 HAH, com diminuição de 16% em relação as sementes não hidratadas (Fig. 3.4a e 3.4b). Nos tempos de avaliação subsequentes, verificou-se que os híbridos mantiveram este mesmo percentual de redução, enquanto que nas linhagens a redução foi menos acentuada, (8%). Resultado semelhante foi observado para o teor de proteína solúvel das sementes (Fig. 3.5a e 3.5b). Observou-se redução de 59,2% no teor de proteína solúvel 48 HAH em relação as sementes não germinadas nos híbridos, enquanto que nas linhagens a redução foi de 54,6%, evidenciando o menor uso da proteína solúvel no processo de mobilização.



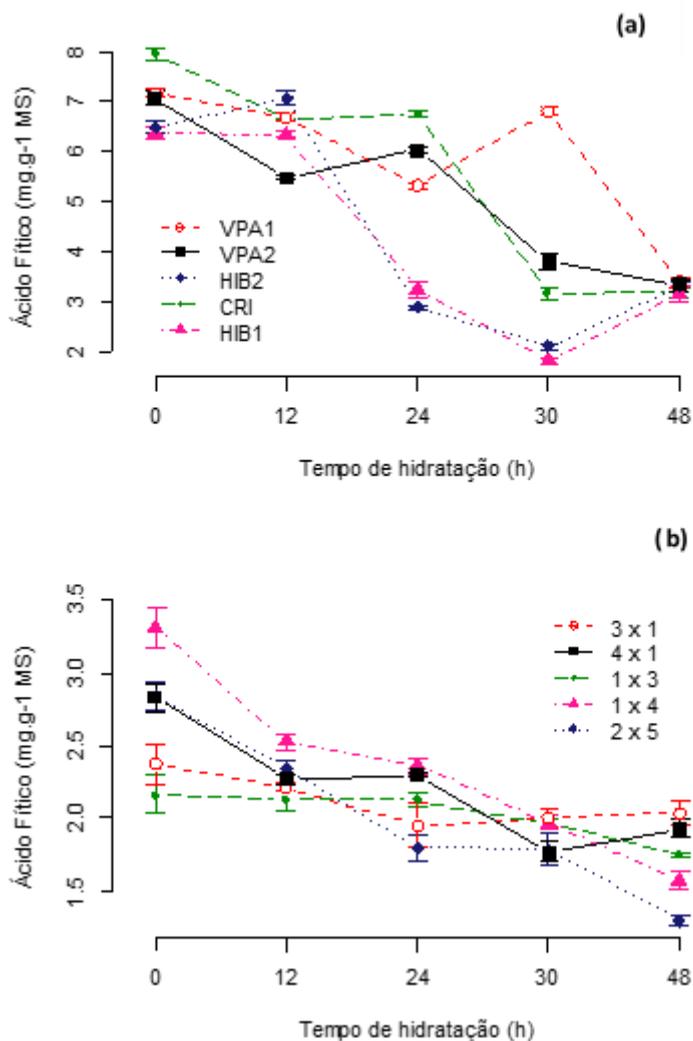
**Figura 3.4.** Dinâmica da alteração do conteúdo de fósforo total em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).



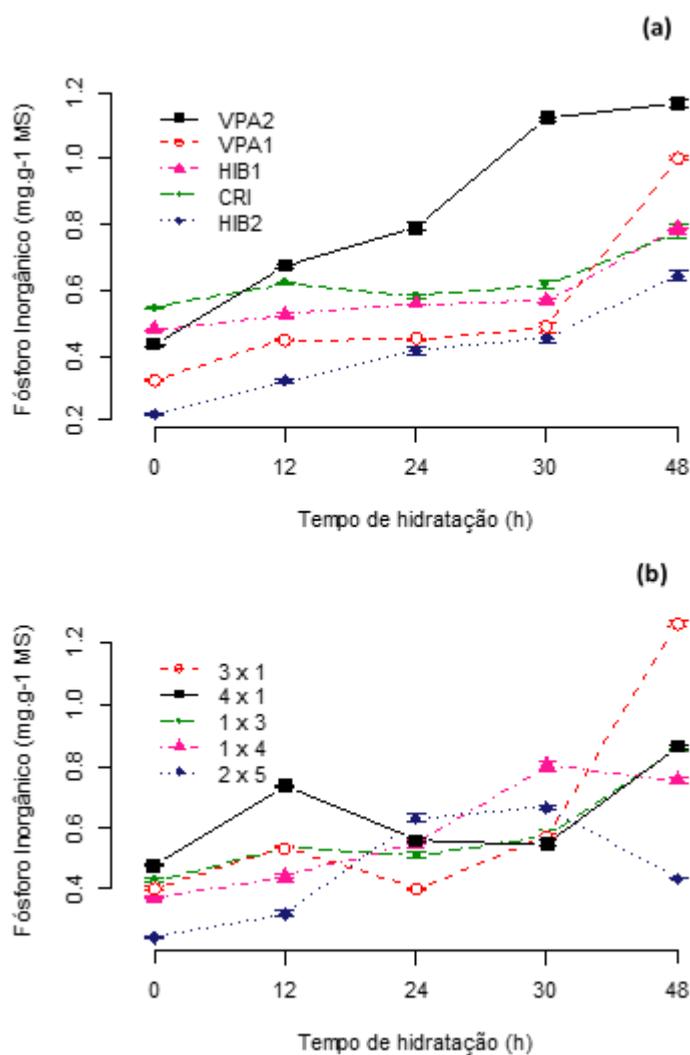
**Figura 3.5.** Alteração do conteúdo de proteína solúvel em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).

O teor de ácido fítico entre linhagens e híbridos foi distinto. A redução nos níveis deste composto em relação as sementes não germinadas, foi mais acentuada nas linhagens (57%), em detrimento dos híbridos que apresentaram pequena redução no teor final em relação ao inicial (35%) (Fig. 3.6a e 3.6b). A disponibilização de fósforo inorgânico inicialmente foi semelhante entre híbridos e linhagens, com aumento de 32% verificado 12 HAH (Fig. 3.7a e 3.7b). No período subsequente a taxa de disponibilização sofreu alteração e os híbridos apresentaram maior disponibilização de fósforo inorgânico. No entanto, 30 HAH verificou-se que a disponibilização de fósforo inorgânico entre linhagens e híbridos foi novamente equivalente. Igualmente observa-se que a hidrólise de proteína total, foi mais elevada nas linhagens em relação aos híbridos, com aumento pronunciado 30 HAH (Fig. 3.8a e 3.8b). Por outro lado, a menor hidrólise de fósforo total, a redução no teor de proteína solúvel e a menor disponibilização de fósforo inorgânico, pode caracterizar a menor atividade metabólica das linhagens em relação aos híbridos, e conseqüentemente, menor vigor de sementes, refletindo em atraso na protrusão radicular, conforme visualizado no padrão de hidratação. A maior hidrólise de ácido fítico nas linhagens, podem estar associada a ativação de sistemas enzimáticos de reparo, uma vez que este composto é responsável pela prevenção de estresse oxidativo em milho (DORIA et al., 2009).

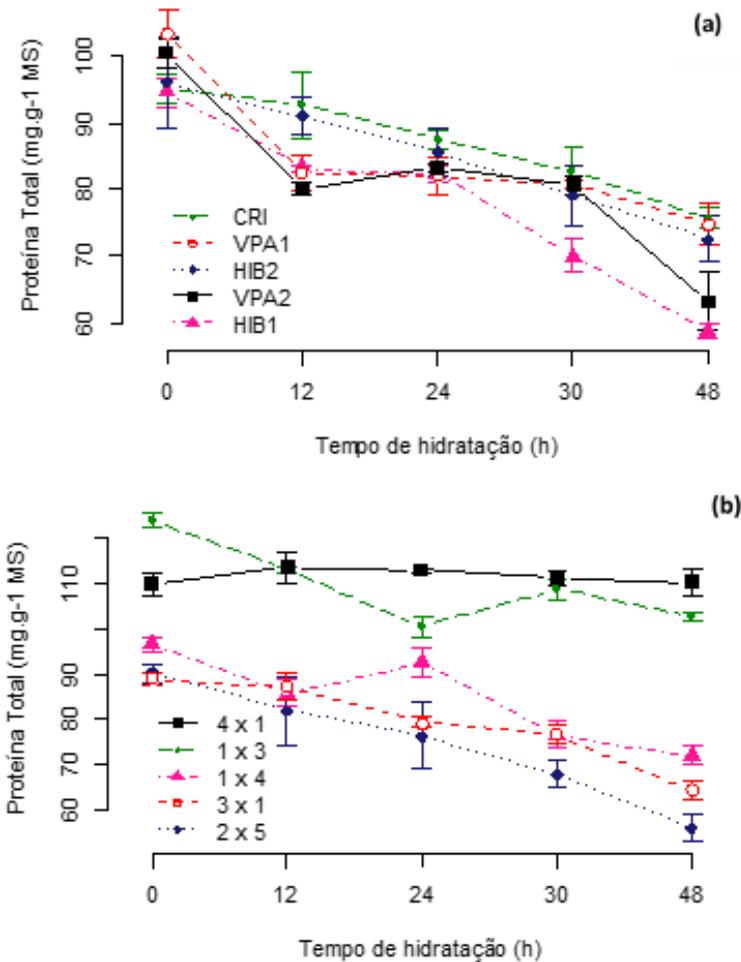
A hidrólise é um mecanismo que pode explicar as diferenças no vigor de sementes, isto pode ser visualizado no parental CRI e nas combinações híbridas 5 x 2 e 3 x 1. As sementes de CRI apresentaram teores iniciais elevados de ácido fítico, fósforo inorgânico e proteína solúvel em relação aos demais parentais, no entanto, ela não apresentou o melhor desempenho fisiológico. Este aspecto pode estar atrelado a origem da linhagem. O genótipo CRI é oriundo de uma variedade de polinização aberta crioula e demanda maior tempo para obtenção de linhagens puras com características desejadas associadas a qualidade de sementes. Por outro lado, a composição bioquímica diferencial associada a resposta fisiológica pode ser intrínseca ao genótipo CRI e estratégias diferenciais de hibridação podem ser vantajosa, especialmente quando se deseja incrementos na composição bioquímica dos híbridos que estejam associados a maior germinação e vigor.



**Figura 3.6.** Dinâmica da alteração do teor de ácido fólico em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).



**Figura 3.7.** Alteração no conteúdo de fósforo inorgânico em sementes de (a) híbridos e (b) linhagens de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).



**Figura 3.8.** Dinâmica da alteração de teor de proteína total em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).

O resultado verificado em CRI foi semelhante ao encontrado para a combinação 2 x 5, verificou-se que o mesmo apresentou teores intermediários em relação aos demais para os componentes bioquímicos avaliados, no entanto, o seu desempenho fisiológico foi inferior aos demais. Por outro lado, o híbrido 3 x 1, que apresentou teores iniciais

elevados de fósforo total, ácido fítico e proteína solúvel em relação aos demais híbridos obteve maior viabilidade e vigor de sementes. Desse modo, acredita-se que o teor inicial dos componentes não é o fator decisivo para o desempenho fisiológico das sementes, mas sim, a taxa de hidrólise dos componentes, associado às combinações híbridas que possibilitem ganho genético para composição bioquímica e vigor de sementes.

A combinação híbrida 3 x 1, foi a única que apresentou estimativas de heterose positiva para fósforo total (5,2%) e proteína solúvel (6,9%) em sementes não germinadas, enquanto que 2 x 5 apresentou heterose positiva para fósforo inorgânico (11,5%) e 1 x 3 para proteína total (26,5%). Os demais híbridos manifestaram heterose negativa para as características avaliadas. As estimativas observadas, sugerem pequenos ganhos genéticos para características de composição bioquímica, que variaram em função das combinações híbridas. Por outro lado, verificou-se heterose positiva para o vigor de sementes, destacando o híbrido  $F_{1 \times 3}$  com as maiores estimativas para germinação (6,9%), vigor por envelhecimento acelerado (32%) e tolerância ao frio (18%). Estimativas positivas de heterose para qualidade fisiológica em sementes de milho também foram encontradas por (REIS et al., 2011, NERLING et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2015, PRAZERES; COELHO, 2016), indicando que é possível haver ganho genético para qualidade fisiológica de sementes.

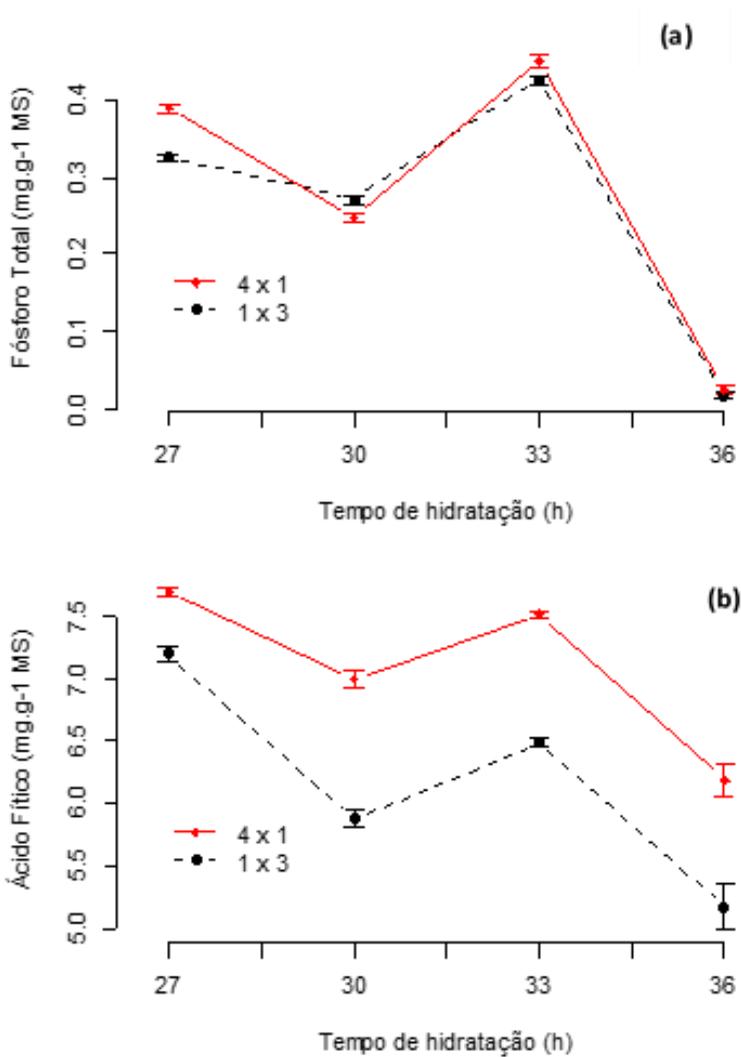
A análise de componentes principais – PCA foi aplicada com o objetivo de identificar a influência das variáveis sobre as linhagens e híbridos ao longo da germinação (Fig. 3.9). A variância total explicada pelos dois primeiros componentes foi de 75,1%, sendo 53% no primeiro componente (PC1) e 22,1% no segundo componente (PC2). A análise possibilitou a separação de linhagens e híbridos e os tempos de hidratação avaliados a partir da hidrólise das reservas.

As amostras do componente PC1-/PC2+ foram compostas pelas linhagens que foram agrupadas em função do seu teor de fósforo total e ácido fítico. No componente PC1-/PC2- as amostras formadas pelos híbridos, foram agrupadas em função do teor de proteína total e solúvel. No componente PC1+/PC2+ as amostras foram agrupadas em função do fósforo inorgânico. Compõem este componente linhagens e híbridos. De acordo com a PCA, as linhagens foram fortemente influenciadas pelo fósforo total e ácido fítico, enquanto que os híbridos pelo teor de proteína total e solúvel.

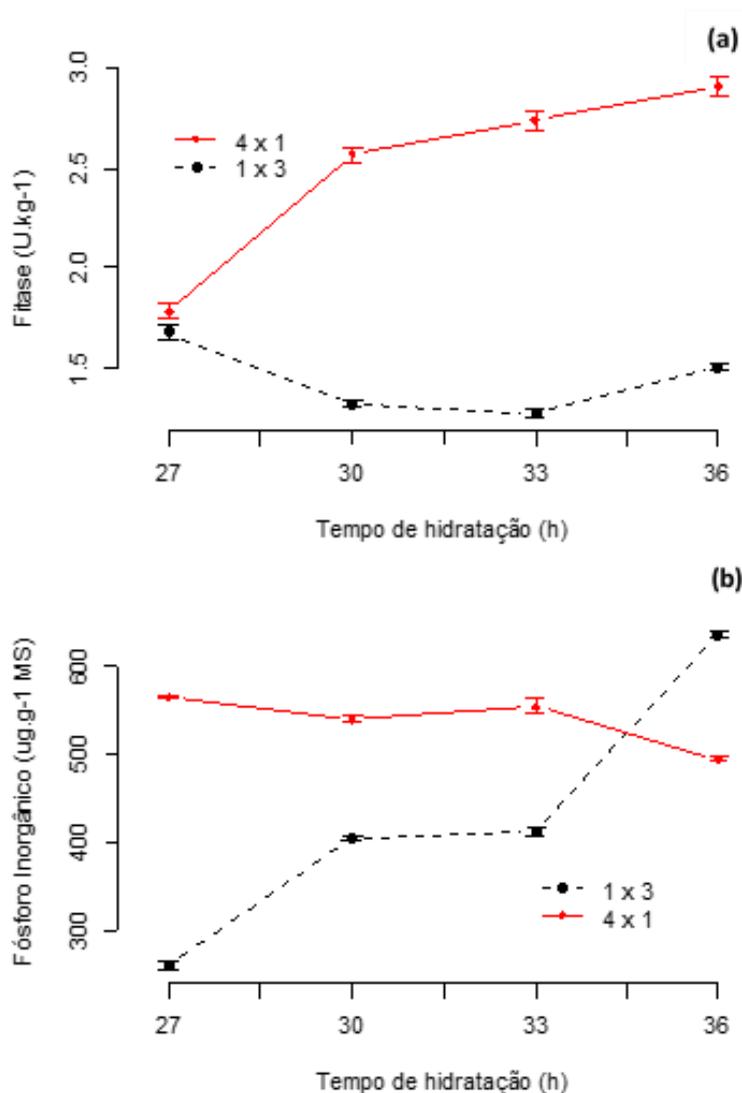


total, com redução acentuada no teor do componente nas sementes 33 HAH (Fig. 3.10a). A redução no teor deste componente 36 HAH em relação às sementes não germinadas, foi de 97,8% no híbrido 4 x 1 e de 98,5% em 1 x 3. O teor de ácido fítico foi semelhante em ambos os híbridos no tempo 27 horas, com valores de 7,7 mg.g<sup>-1</sup> para 4 x 1 e 7,2 mg.g<sup>-1</sup> para 1 x 3 (Fig. 3.10b). O híbrido de maior vigor (4 x 1) apresentou menor redução no teor de ácido fítico ao longo do período avaliado, em detrimento do híbrido de menor vigor que apresentou níveis maiores deste componente.

A redução no conteúdo de ácido fítico nas sementes apresentou relação com o aumento da atividade da enzima fitase. A atividade da fitase, no híbrido de maior vigor foi superior em relação ao de menor vigor (Fig. 3.11a). A atividade da enzima está diretamente relacionada a disponibilização de fósforo inorgânico para o embrião em crescimento. O aumento na atividade da fitase na combinação 4 x 1 coincidiu com a maior translocação de fósforo inorgânico observado em 33 HAH, quando houve protrusão radicular e ocorre intensa divisão celular (Fig. 3.11b). Por outro lado, na combinação 1 x 3, foi observado aumento nos teores de fósforo inorgânico, indicando pouca mobilização que pode ser explicado pelo atraso na protrusão radicular deste híbrido não demandando grandes quantidades do componente. A origem do fósforo inorgânico no híbrido de menor vigor, não parece estar associada a hidrólise de ácido fítico, uma vez que a atividade da enzima na combinação 1 x 3 foi inferior comparada à 4 x 1. O maior teor verificado em 1 x 3, pode estar associado ao genótipo CRI, utilizado como genitor feminino. Verificou-se que CRI apresentava teores iniciais elevados de ácido fítico e fósforo inorgânico, mantendo esta característica na combinação com o parental VPA2. Por outro lado, CRI não manteve o mesmo comportamento quando utilizado como parental masculino na combinação com HIB1 (4 x 1). No presente trabalho, verificou-se que o genótipo materno exerceu a maior influência na hidrólise e mobilização de ácido fítico e fósforo inorgânico.



**Figura 3.80.** Dinâmica de hidrólise de (a) fósforo total e (b) ácido fítico em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).



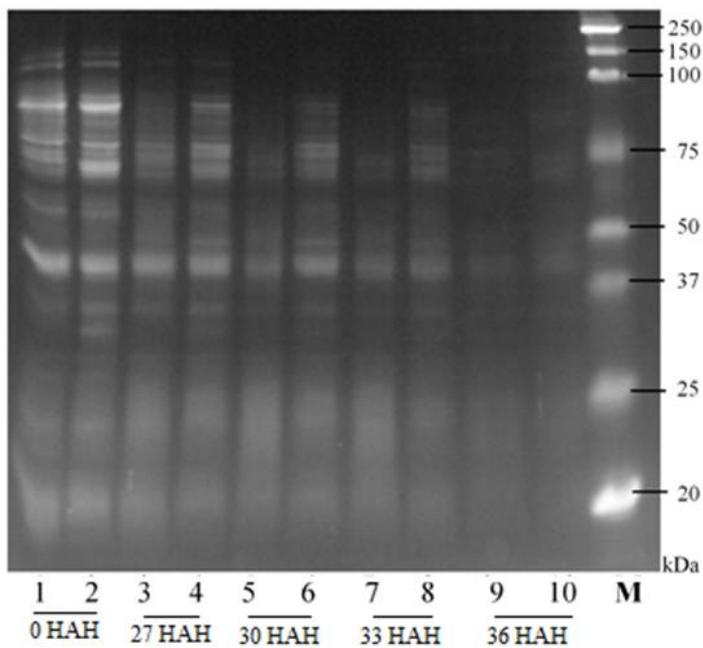
**Figura 3.11.** Dinâmica da atividade da enzima fitase (a) e de mobilização de fósforo inorgânico em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).

Apesar das diferenças observadas na mobilização de fósforo inorgânico, não é possível afirmar que a maior mobilização deste componente apresente relação direta com o vigor das sementes, uma vez que as formas hidrolisadas de fósforo são armazenadas temporariamente na semente e posteriormente são mobilizados para o embrião (NADEEM et al., 2011). Por outro lado, a atividade da fitase apresentou associação com o vigor de sementes. A maior atividade enzimática foi verificada no híbrido de maior vigor, indicando que esta enzima explicou as diferentes respostas quanto ao vigor de sementes neste trabalho.

Os híbridos avaliados, também apresentaram diferenças quanto a hidrólise e mobilização de proteínas. A hidrólise de proteínas durante a germinação em híbridos de maior e menor vigor, indicam a redução temporal na expressão de proteínas de reserva do endosperma, à medida que o processo germinativo avançou (Fig. 3.12). Nas primeiras horas da germinação as proteínas são enzimas hidrolíticas, dentre elas cisteína protease, aspartato protease e serina protease, além de proteínas relacionadas a sinalização hormonal. Com o avanço da germinação ocorre a degradação proteica para suprimento das necessidades energéticas e a disponibilização de aminoácidos para os pontos em crescimento (HAN et al., 2013, YU et al., 2014).

As maiores diferenças na expressão das proteínas de reserva visualizadas na figura 3.6, encontra-se entre 25 e 37 kDa, entre 75 e 100 kDa e em 150 kDa. A maior expressão de proteínas nestes pesos moleculares, podem estar associadas a sistemas enzimáticos antioxidantes ou de compensação energética para a conclusão da germinação. Estudos de proteômica podem trazer maiores inferências sobre o tipo de proteína associada as diferenças de vigor nos pesos moleculares identificados. De acordo com a figura, o híbrido com maior vigor hidrolisou com maior eficiência as proteínas de reserva em relação ao de menor vigor.

A combinação híbrida 4 x 1 apresentava 104,6 mg.g<sup>-1</sup> de proteína total 27 HAH, neste mesmo tempo, a combinação 1 x 3 apresentava conteúdo de 140,7 mg.g<sup>-1</sup> no endosperma das sementes (Anexo 2). Nos períodos subsequentes verificou-se que o híbrido 4 x 1 apresentou redução no teor de proteínas a níveis de 102,9 e 79,2 mg.g<sup>-1</sup>, em 33 e 36 HAH, respectivamente. O híbrido 1 x 3, apresentava elevado teor de proteínas totais 27 HAH, nos períodos subsequentes, apresentou redução constante no conteúdo de proteínas, chegando ao valor de 98,9 mg.g<sup>-1</sup> 36 HAH.



**Figura 3.92.** Expressão temporal de proteínas no endosperma de sementes de milho pela técnica SDS-PAGE. As amostras 1, 3, 5, 7 e 9 correspondem ao híbrido de maior vigor (4 x 1), enquanto que 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem ao híbrido de menor vigor (1 x 3).

Para o conteúdo de proteína solúvel, verificou-se que ambos os híbridos apresentaram a mesma tendência de mobilização deste componente. O teor de proteínas solúvel 27 HAH, foi de  $25,3 \text{ mg.g}^{-1}$  na combinação 4 x 1 e  $27 \text{ mg.g}^{-1}$  em 1 x 3. No entanto, 33 HAH o conteúdo de proteínas solúveis no endosperma na combinação 1 x 4 foi superior ao observado nos períodos anteriores ( $29,6 \text{ mg.g}^{-1}$ ), enquanto que o híbrido 1 x 3 apresentou pequena elevação ( $25,8 \text{ mg.g}^{-1}$ ) em relação ao teor observado 30 HAH. Após 36 HAH verificou-se redução nos teores de proteína solúvel em ambos os híbridos em relação a 30 HAH. A redução foi mais acentuada no híbrido de maior vigor, em detrimento do híbrido de menor qualidade fisiológica.

### 3.4. CONCLUSÃO

As sementes híbridas apresentam maior qualidade fisiológica e protrusão radicular antecipada em relação às linhagens. A maior atividade da enzima fitase esteve associado a sementes de maior vigor. O padrão de hidratação, a hidrólise de proteínas de reserva e a mobilização de proteína solúvel explicaram o maior vigor de sementes de milho.

## CAPÍTULO 4

### HIDRÓLISE E MOBILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO



## HIDRÓLISE E MOBILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LINHAGENS E HÍBRIDOS DE MILHO

**RESUMO:** A qualidade fisiológica das sementes de milho é afetada pelo genótipo. O entendimento das diferenças na hidrólise e na mobilização de reservas pode explicar as diferenças no vigor de sementes em linhagens e híbridos. O objetivo no trabalho foi identificar o padrão de hidrólise de amido em sementes de linhagens e híbridos de milho e verificar a associação entre a mobilização de açúcares solúveis e a atividade  $\alpha$ -amilase com o vigor de sementes. Foram utilizadas cinco linhagens e cinco combinações híbridas de milho. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio de germinação e teste de envelhecimento acelerado. A hidrólise do amido e açúcares solúveis foi determinada em 0, 12, 24, 30 e 48 horas após a hidratação, a partir da curva de hidratação das sementes. A mobilização e a atividade da  $\alpha$ -amilase foi verificada no final da fase II da germinação em 27, 30, 33 e 36 horas após a hidratação das sementes. A hidrólise do amido seguiu padrão materno da linhagem VPA2, utilizada na combinação híbrida 3 x 1. A maior hidrólise de amido, a maior atividade da  $\alpha$ -amilase e a maior mobilização de açúcares solúveis está associada ao maior vigor de sementes.

**Palavra-chave:** amido, vigor, germinação, qualidade de sementes

### 4.1. INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica das sementes é afetada pelo genótipo e, deste modo, deve ser considerada em programas de melhoramento genético. Apesar disso, estas características são pouco observadas durante a obtenção das cultivares. No final do processo de obtenção, as cultivares são produtivas, mas podem apresentar baixa qualidade fisiológica de sementes que inviabiliza sua utilização em cultivo (OLIVEIRA et al., 2013).

Além da qualidade fisiológica, o genótipo influencia a composição de reservas das sementes, sua hidrólise e mobilização durante a germinação. O amido é o principal componente de reserva no endosperma de milho, correspondendo a 70% do peso das sementes e serve como fonte primária de carbono na germinação (SHAIK et al., 2014; WANG et al., 2015). A hidrólise do amido armazenado é o evento bioquímico central durante a germinação (ZEEMAN et al., 2010), liberando oligossacarídeos

que são hidrolisados, produzindo glicose e maltose. A glicose é convertida à açúcares simples e mobilizada para os tecidos em crescimento (SÁNCHEZ-LINARES et al., 2012). A  $\alpha$ -amilase é responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho (FRANCO et al., 2002). Esta enzima, em conjunto com a  $\beta$ -amilase, está altamente relacionadas à viabilidade e ao vigor de sementes. A associação entre a maior atividade da  $\alpha$ -amilase e o maior vigor de sementes já foram relativamente estudados (WATTANAKULPAKIN et al., 2012; DIN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2015). A semente com maior expressão da enzima  $\alpha$ -amilase tem maior facilidade na disponibilização de carboidratos para o embrião em crescimento, resultado em maior velocidade e vigor de germinação (OLIVEIRA et al., 2013). A atividade enzimática associada a testes de vigor são eficientes na diferenciação do potencial da qualidade de sementes, podendo ser recomendados como testes confiáveis para a definição da qualidade dos lotes de sementes (SANTOS et al., 2016). Apesar de importantes avanços na compreensão dos mecanismos de hidrólise e de mobilização de carboidratos, a associação destes eventos metabólicos às diferenças no vigor de sementes de linhagens e híbridos de milho ainda não estão completamente elucidadas.

Uma das evidencias que explicam as diferenças na qualidade fisiológica das sementes está associada a repressão de miRNAs nos híbridos que possibilita a maior expressão gênica observada nos híbridos em relação às linhagens parentais (DING et al., 2012). Outras evidencias indicam que o maior vigor está associado a maior atividade metabólica de RNA, proteínas, enzimas e DNA nos embriões de sementes híbridas (GUO et al., 2013; JIN et al., 2014).

Assim, verificar as alterações na hidrólise e mobilização de carboidratos em função da atividade enzimática durante a germinação, pode trazer informações relevantes da sua relação com o metabolismo da germinação e sua associação com vigor de sementes de linhagens e híbridos. Diante disso, o objetivo no trabalho foi identificar o padrão de hidrólise de amido em sementes de linhagens e híbridos de milho e verificar a associação entre a mobilização de açúcares solúveis e a atividade da  $\alpha$ -amilase com o vigor de sementes.

#### 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido com cinco linhagens de milho parcialmente endogâmica ( $S_5$ ), denominadas de CRI, VPA1, VPA2, HIB1 e HIB2, e, cinco combinações híbridas 3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 1 x 4 e 2 x 5, obtidas em um programa de melhoramento da Cooperativa de

produção de sementes em São Miguel do Oeste/SC. Inicialmente foi instalado um campo para a multiplicação de sementes das linhagens e para obtenção das combinações híbridas em área experimental da Cooperativa em São Miguel do Oeste/SC, na safra 2014/2015. O campo de produção de sementes consistia em 2 linhas de 20 metros para cada linhagem, instaladas a um espaçamento de 0,8 m. A fertilização, o manejo e a colheita foi realizado de acordo com o recomendado para a cultura. As combinações híbridas foram obtidas através da fertilização artificial de 20 espigas. A inflorescência masculina foi protegida com sacos de papel tipo “kraft” para obtenção do pólen. Os estilos-estigmas das linhagens foram protegidos sacos de plástico para evitar a polinização cruzada e quando os mesmos encontravam-se receptivos efetuou-se as autofecundações, obtendo-se as combinações híbridas desejadas. O primeiro número indicado na combinação híbrida refere-se a linhagem utilizada como parental feminino. Neste estudo o número 1 que aparece na combinação híbrida refere-se à linhagem CRI, 2 à linhagem VPA1, 3 à VPA2, 4 à HIB1 e 5 à linhagem HIB2.

As espigas das linhagens e das combinações híbridas foram colhidas manualmente quando as sementes atingiram 18% de umidade. O monitoramento da umidade foi realizado pela visualização da senescência da planta e pela mudança da morfologia da semente. As espigas foram desempalhadas e debulhadas manualmente e secas à sombra até atingirem 13% de umidade, posteriormente foram armazenadas em câmara seca (UR 50% e T 12°C) até a realização das análises. A amostra de trabalho de cada linhagem e híbrido, foi composta por 4 repetições de 125 g obtida pela passagem das sementes secas em quarteador de cereais (tipo Johnes).

### **Qualidade fisiológica**

A qualidade fisiológica das sementes foi determinada avaliando-se a germinação e o vigor das sementes. O teste de germinação foi realizado utilizando-se quatro repetições de 50 sementes, distribuídas entre folhas de papel “*germites*” e mantidas em germinador a 25°C. A contagem foi efetuada no quarto dia, seguindo os critérios de normalidade e anormalidade de plântulas determinados por Brasil (2009). O vigor foi determinado pelo teste de envelhecimento acelerado, utilizando quatro repetições de 50 sementes, dispostas sobre telas de alumínio fixadas em caixas plásticas contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram mantidas em câmara de envelhecimento por 72 h a 45°C, conforme Marcos-Filho (2005). Após este período as sementes foram colocadas para germinar a 25°C, e, no quarto dia avaliou-se as plântulas normais, de maneira similar ao descrito no teste de germinação.

### **Hidrólise de reservas**

Para cada linhagem e híbrido, 3 repetições de 50 sementes foram colocadas para germinar, conforme descrito no teste de germinação, para identificação do padrão trifásico da germinação e, deste modo, determinar a hidrólise e mobilização de amido e açúcares solúveis, nas sementes não germinadas (0h) e nos tempos de 12h, 24h, 30h e 48h após a hidratação (HAH).

Para a determinação do conteúdo de açúcares solúveis em cada um dos tempos, as sementes foram moídas e efetuou-se a extração dupla com etanol 80%. Os açúcares solúveis foram determinados pelo método da antrona, de acordo com Clegg (1956). Em 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 2 mL da solução de antrona (0,04 g em 1 mL de água e 20 mL de ácido sulfúrico), a solução foi mantida durante 3 minutos em banho maria a 96°C, em seguida mantida em gelo por 5 min, posteriormente efetuou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a comprimento de onda de 620 nm. A curva padrão para o açúcar solúvel foi obtida através de uma solução de glicose diluída para obter as concentrações de: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 e 1  $\mu\text{g.mL}$ . As análises foram realizadas a partir de três repetições e os resultados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa seca.

Após a extração dos açúcares solúveis, o resíduo remanescente foi ressuspenso em 20 mL de ácido sulfúrico 0,2N. A solução foi agitada e levada para fervura por 2 horas para hidrólise do amido presente no resíduo. Alíquotas do sobrenadante foram quantificadas pelo método da Antrona conforme Clegg (1956). Em 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 3 mL da solução de antrona (0,04 g em 1 mL de água e 20 mL de ácido sulfúrico), a solução foi mantida durante 3 minutos em banho maria a 96°C, em seguida mantida em gelo por 5 min. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm. A curva padrão para o amido foi obtida através de uma solução de glicose diluída para obter as concentrações de: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 e 1  $\mu\text{g.mL}$ . Os resultados obtidos foram multiplicados por 0,9, fator de conversão da glicose em amido e expressos em % de massa seca.

### **Mobilização de reservas**

A mobilização dos açúcares solúveis foi determinada em 27h, 30h, 33h e 36h após a hidratação (HAH), período que correspondeu ao final da fase II da germinação. O eixo embrionário foi removido e o conteúdo de amido, açúcares solúveis e a atividade da  $\alpha$ -amilase foram determinados em cada um dos tempos.

Os teores de amido e açúcares solúveis foi determinado conforme descrito anteriormente. A atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi determinada por meio da técnica de espectrofotometria. A extração da enzima ocorreu pela adição de 10 mL de tampão 0,1 mol/L de Tris-HCl, pH 7,0 contendo 0,1 mol/L NaCl e 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  a 0,5 g de sementes moídas. O homogenato foi centrifugado a 3600 rpm por 10 min a 4°C. Para a quantificação das amilases foram utilizados 0,5 mL do sobrenadante, 1 mL de substrato (amido 2,5% em tampão de acetato de sódio 50mM, pH 5,2, contendo 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ). As amostras foram incubadas a 70°C por 15 min e adicionou-se 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) para inibir a reação. As amostras foram aquecidas por 5 minutos em banho-maria (100 °C), resfriadas em água corrente e em seguida adicionaram-se 7,5 mL de água (CUGLIELMINETTI et al., 1995). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nanômetros e a atividade da amilase foi calculada a partir de uma curva padrão de glicose, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 2 mg.mL. Uma unidade de atividade (U) equivale a um microMol de produto formado por minuto nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em  $\text{U/kg}^{-1}$  de sementes.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

Amostras das combinações híbridas 1 x 4 e 1 x 3 foram colocadas para hidratar por 24 horas, após a retirada do pericarpo e do embrião o endosperma foi triturado (5 g) e adicionou-se 200 mL de água destilada. O homogenato obtido foi filtrado em suporte de tecido voil em duas peneiras sobrepostas (60 mesh) e o resíduo utilizado para nova extração com 200 mL de água destilada. Os volumes filtrados foram transferidos para um béquer e decantados durante 5 horas. Em seguida, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspenso em 200 mL de água destilada, agitado e mantido overnight na geladeira. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (amido) foi transferido para placas de vidro e seco em estufa (45°C) com circulação de ar. As amostras secas foram moídas na granulometria de 60 mesh. O diâmetro e a morfologia dos grânulos de amido foram determinados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram depositados aproximadamente 10 mg de cada amostra sobre fitas de carbono de dupla face fixadas sobre os suportes de alumínio (stubs), devidamente identificados e cobertos com uma fina camada de ouro usando polarina E5001. As micrografias foram registradas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6390LV nas magnificações de 500x e 2000x, operando na faixa de energia de 8 Kv.

### Capacidade de retenção de água do amido

A capacidade de retenção de água do amido das combinações 4 x 1 e 1 x 3 foi determinada pelo método proposto por Beuchat (1977), com adaptações. Em tubos falcon devidamente tarados foram adicionadas 0,5 g de amostras moídas e 7,5 mL de água destilada. A suspensão foi agitada por 30 minutos a 37°C e centrifugada a 4000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado, a farinha úmida drenada por 10 minutos e depois pesada. O resultado obtido foi aplicado na fórmula (equação 1), em função da densidade da água (1 g.mL<sup>-1</sup>), para obtenção do volume (mL) de água. Os valores médios de três repetições, foram expressos em mL de água retido por grama de farinha seca.

$$\text{Equação 1} \quad d = \frac{m}{v}$$

Onde:

d = densidade da água (1 g.mL<sup>-1</sup>)

m = massa da água retida (descontado o tudo e a farinha)

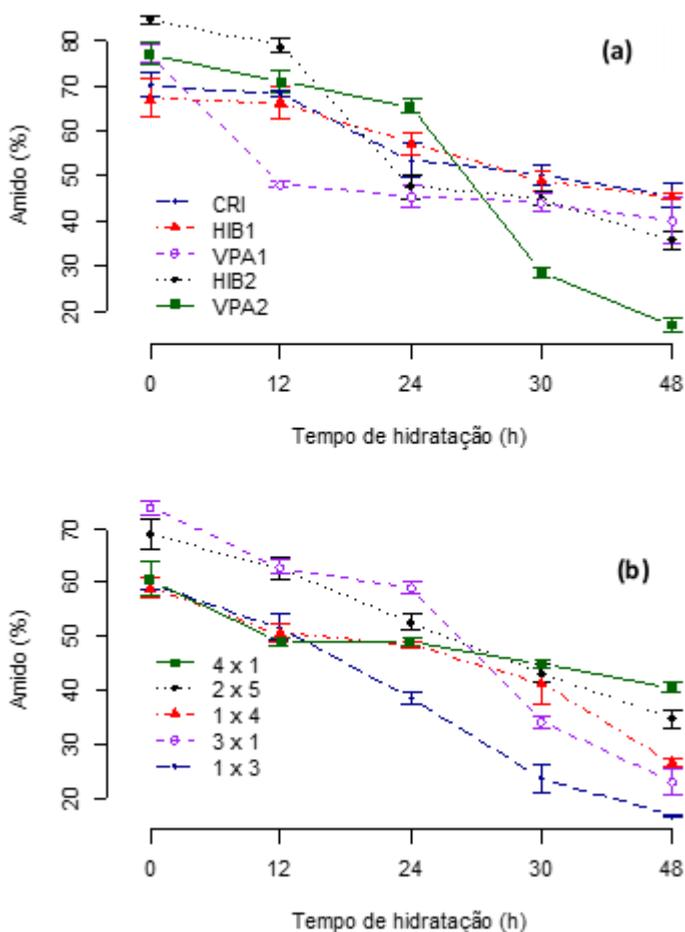
v = volume de água (mL)

### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R (R CORE TEAM 2016), versão 3.3.1. Todas as análises foram realizadas no mesmo software e os dados representados pela média ± desvio padrão com 3 repetições (n=3) para as avaliações bioquímicas. O teste de Scott Knott foi aplicado para separação de médias.

## 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrólise do amido e a disponibilização de açúcares solúveis apresentou padrão diferencial em linhagens e híbridos ao longo da germinação (Fig. 4.1). O conteúdo médio de amido, nas sementes não germinadas das linhagens, foi de 75,3 ± 6,9% (Fig. 4.1a), enquanto que os híbridos apresentaram em média 64±6,7% de amido (Fig. 4.1b). O teor de amido das sementes apresentou decréscimo 12 horas após a hidratação (HAH), com redução de 9% no teor em relação às sementes não germinadas. Esta redução foi semelhante tanto nas linhagens quanto nos híbridos, porém, em 24 HAH a redução foi mais acentuada nas linhagens. Verificou-se que nas linhagens o decréscimo no teor de amido no período de 0 HAH para 24 HAH foi de 28,5%, enquanto que nos híbridos o decréscimo foi de 23,3%.



**Figura 4.1.** Alterações no conteúdo de amido nas sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. Média  $\pm$  desvio padrão de 3 repetições (n=3).

O teor residual de amido nas sementes após 48 HAH foi de  $36,7 \pm 11,9\%$  nas linhagens e  $28,2 \pm 9,4\%$  nos híbridos. A hidrólise total de amido foi maior nos híbridos em relação às linhagens, com redução de  $56,2\%$  e  $51,3\%$  respectivamente, indicando que os híbridos apresentam metabolismo mais intenso. O teor residual de amido foi maior na combinação 4 x 1, onde a redução em relação às sementes não germinadas

foi de 33,1%. Entre as linhagens, CRI e HIB1 apresentaram menores decréscimos, 34,7 e 32,4%, respectivamente, em relação às sementes não germinadas. Nos híbridos o maior decréscimo foi verificado na combinação 1 x 3, com redução de 72,2% e em 3 x 1 que apresentou 68,9% de decréscimo no teor de amido ao final do período avaliado em relação às sementes não germinadas.

A associação entre o decréscimo do teor de amido ao longo da germinação e a qualidade fisiológica de sementes, indicou que as linhagens com menor decréscimo apresentam maior qualidade fisiológica (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Médias e desvio padrão para germinação e vigor de sementes de linhagens e híbridos de milho.

| Genótipos        | Germinação (%) | Vigor - EA (%) |
|------------------|----------------|----------------|
| <b>Linhagens</b> |                |                |
| CRI              | 93±0,9b        | 54±1,7b        |
| VPA1             | 84±1,7d        | 72±1,3a        |
| VPA2             | 80±0,8e        | 31±1,6d        |
| HIB1             | 99±0,5a        | 44±2,6c        |
| HIB2             | 89±1,3c        | 5±1,2e         |
| <b>Híbridos</b>  |                |                |
| 3 x 1            | 98±0,9a        | 88±1,3a        |
| 1 x 3            | 87±3,4c        | 76±1,7d        |
| 4 x 1            | 93±1,8b        | 80±1,7c        |
| 1 x 4            | 91±1,3b        | 82±1,3b        |
| 2 x 5            | 80±1,3d        | 76±1,3d        |

Médias ± desvio padrão seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. EA: Envelhecimento Acelerado.

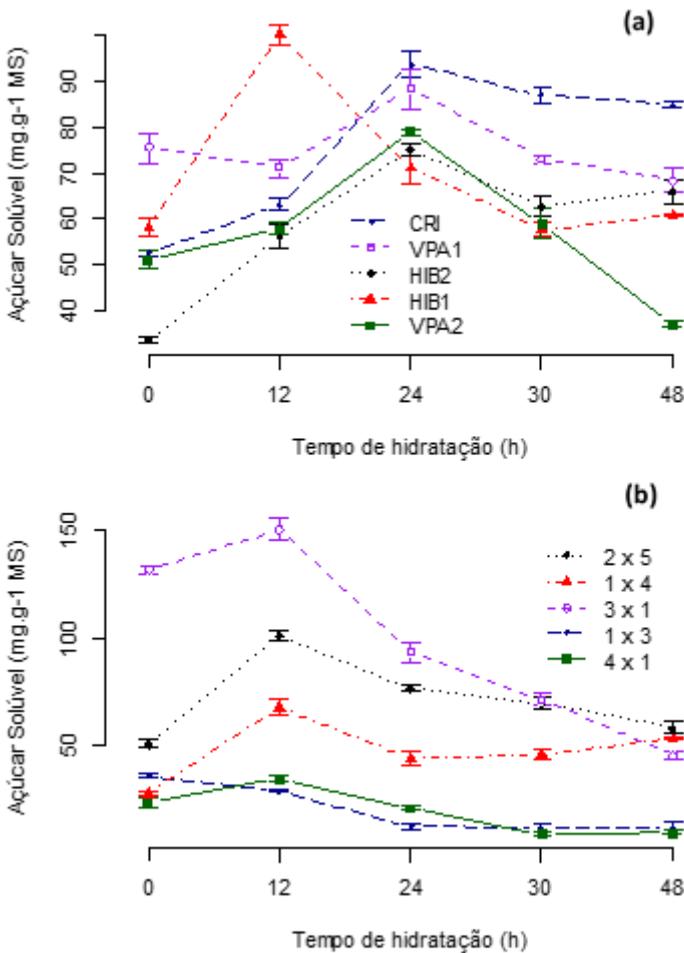
As linhagens CRI e HIB1, apresentaram menor decréscimo (33%) no teor de amido após 48 HAH em relação às sementes não germinadas, porém apresentaram maior germinação e vigor em relação às demais linhagens. Por outro lado, verificou-se que a linhagem VPA2, apresentou redução de 78,2% do teor de amido obteve menor germinação (80%). Este resultado sugere que entre as linhagens, CRI e HIB1 apresentaram eficiente mecanismo de utilização dos compostos do catabolismo do amido, mesmo com menor gasto energético obtiveram 96% de germinação.

Entre as combinações híbridas, 3 x 1 apresentou redução de 68,9% no teor de amido após 48 HAH, e obteve o melhor desempenho fisiológico entre os demais híbridos, com 98% de viabilidade e 88% de

vigor pelo envelhecimento acelerado (Tabela 4.1). Por outro lado, 2 x 5 apresentou redução de 49,8% no conteúdo de amido, e apresentou menor qualidade fisiológica, com 80% de viabilidade e 76% de vigor. A maior hidrólise de amido está associada ao maior vigor de sementes. Os resultados também indicam que o mesmo comportamento na hidrólise do amido verificado na linhagem materna também foi verificado no híbrido. A redução semelhante observada em VPA2 e na combinação 3 x 1 está associada a formação das sementes. O endosperma e a camada de aleurona apresentam 66,6% de cromossomas maternos, enquanto no embrião estas proporções são equivalentes (VEIT et al., 1993). Assim, VPA2 e a combinação 3 x 1 apresentaram maior decréscimo no teor de amido das sementes, porém, o híbrido apresentou maior qualidade fisiológica, em função da manifestação da heterose.

O decréscimo no teor de amido nas sementes está associado a mobilização de açúcares solúveis e sua posterior utilização pelas partes em crescimento. Os níveis de açúcares solúveis identificados nas sementes de híbridos e linhagens estão representados na Fig. 4.2a e 4.2b. As sementes não germinadas das linhagens apresentaram em média  $54,1 \pm 2,9$  mg.g<sup>-1</sup> de açúcares solúveis, resultado semelhante ao encontrado nos híbridos,  $53,5 \pm 2,8$  mg.g<sup>-1</sup>. As linhagens e os híbridos apresentaram acréscimo de 27,6% e 42,5%, respectivamente, no conteúdo de açúcares solúveis em 12 HAH, o que coincide com percentual de decréscimo no teor de amido. No entanto, a partir de 24 HAH, verificou-se que nas sementes híbridas, houve redução no teor destes compostos, enquanto que nas linhagens manteve-se o acréscimo nos teores, com exceção de HIB1 que apresentou comportamento semelhante aos híbridos. Em 24 HAH verificou-se que o conteúdo de açúcares nas linhagens apresentou acréscimo de 15,2% em relação a 12 HAH, alcançando teor médio de  $81,5 \pm 4,08$  mg.g<sup>-1</sup>. Nos híbridos, 24 HAH houve redução de 35,5% no conteúdo de açúcares solúveis em relação ao conteúdo em 12 HAH, sugerindo sua mobilização.

O maior acréscimo em 12 HAH e a maior mobilização de açúcares solúveis em 24 HAH, sugere que os híbridos apresentam maior atividade metabólica. Além disso, a maior mobilização pode estar associada a sistemas de organização celular, uma vez que houve antecipação de 10 horas na protrusão radicular nas sementes híbridas em relação às linhagens.



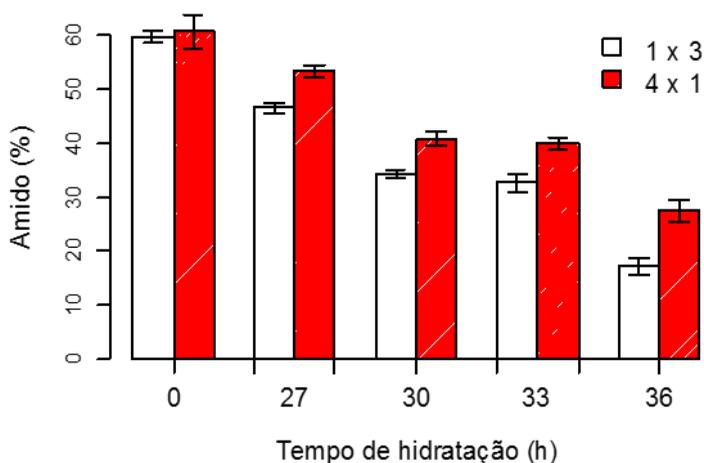
**Figura 4.2.** Alterações no conteúdo de açúcares solúveis em sementes de (a) linhagens e (b) híbridos de milho durante a germinação. Média  $\pm$  desvio padrão a partir de 3 repetições.

A antecipação da protrusão radicular dos híbridos em relação às linhagens foi verificada em trabalho complementar realizado pelo autor, que considerou germinado o genótipo que apresentava 50% das sementes com protrusão radicular. A antecipação da germinação em sementes de milho esteve associada ao acréscimo no teor de aminoácidos nas primeiras horas de hidratação das sementes em trabalho realizado por

Limani et al. (2002). Os autores verificaram que a germinação foi mais rápida nos genótipos que apresentaram as maiores taxas de acumulação de aminoácidos nas primeiras horas de hidratação. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os genótipos que apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis nas primeiras horas de hidratação apresentam germinação mais rápida.

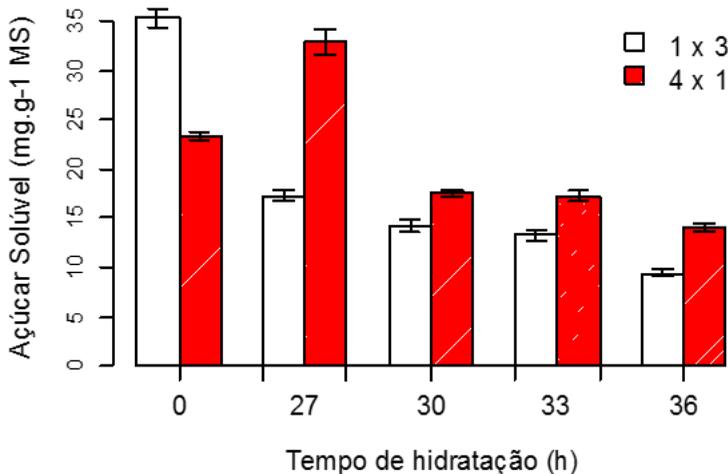
A partir das diferenças na hidrólise do amido, na mobilização de açúcares solúveis e objetivando identificar as diferenças tênues entre as combinações 4 x 1 e 1 x 3, analisou-se a mobilização de reservas. Para isso, identificou-se o padrão trifásico da germinação e no período correspondente ao terço final da fase II, observou-se a hidrólise do amido e a mobilização de açúcares solúveis, bem como a atividade da  $\alpha$ -amilase nas sementes destes híbridos.

Os híbridos não diferiram quanto ao conteúdo de amido nas sementes não germinadas (Fig 4.3). No entanto, 27 HAH foi possível verificar que a combinação híbrida de maior vigor, 4 x 1, apresentava maior conteúdo de amido ( $53,2 \pm 1,85\%$ ) em relação ao de menor vigor, 1 x 3, ( $46,5 \pm 1,72\%$ ). A diferença na hidrólise manteve-se até o final da avaliação, onde o teor de amido verificado em 4 x 1 foi de  $27,4 \pm 3,44\%$  e em 1 x 3 foi de  $17,2 \pm 2,67\%$ . A maior hidrólise de amido está diretamente relacionada a demanda por açúcares solúveis pelo metabolismo germinativo.



**Figura 4.3.** Hidrólise de amido durante a germinação de sementes híbridas de milho com qualidade fisiológica contrastante.

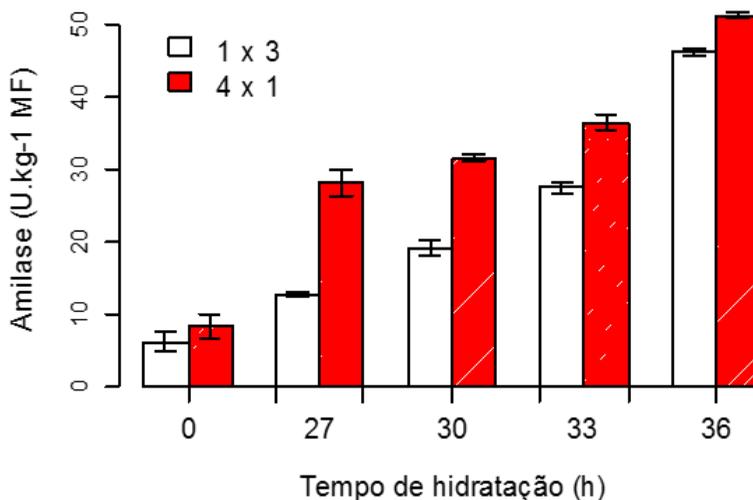
O teor de açúcares solúveis nas sementes não germinadas foi superior no híbrido de menor vigor (Fig. 4.4). Porém, 27 HAH, este híbrido apresentava menor conteúdo de açúcares solúveis em relação ao híbrido de maior vigor, indicando mobilização deste componente. A maior mobilização verificada no período 0 a 27 HAH do híbrido 1 x 3, pode estar relacionado ao maior teor de açúcares solúveis inicialmente disponível. Quando analisado o período subsequente, 27 a 36 HAH, verificou-se que a mobilização de açúcares solúveis foi inferior no híbrido de menor vigor, possivelmente em função da menor disponibilização deste componente ao longo do período.



**Figura 4.4.** Mobilização de açúcar solúvel durante a germinação de sementes híbridas de milho com qualidade fisiológica contrastante

A menor disponibilização de açúcares solúveis pode estar associada a menor atividade da  $\alpha$ -amilase verificada neste híbrido em relação ao híbrido de maior vigor (Fig. 4.5). A atividade diferencial da enzima também foi observada em trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2013). Os autores observaram correlação positiva entre a expressão de amilases e a qualidade fisiológica de sementes em 4 linhagens de milho após 70 horas de hidratação. O trabalho desenvolvido por Santos et al. (2016), verificou que a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi eficiente na separação de lotes de sementes de híbridos de milho com diferenças no vigor. Os autores também verificaram correlação positiva entre o vigor de sementes de híbridos com outras enzimas, como aquelas associadas a via

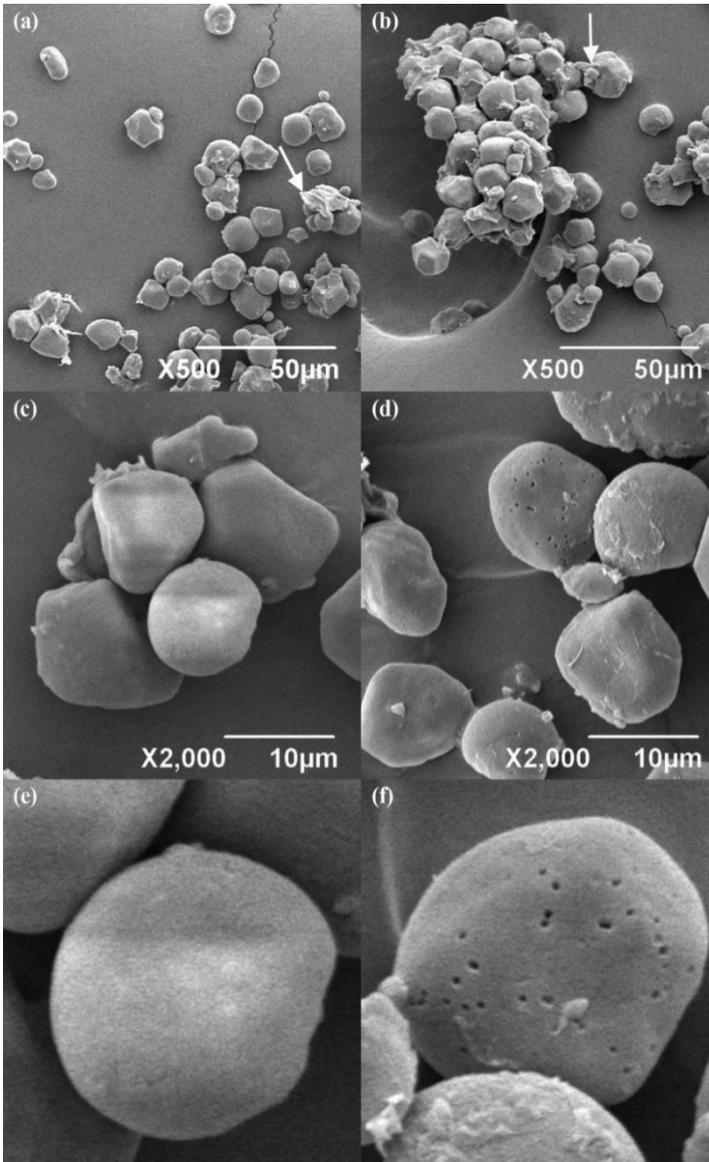
respiratória, piruvato desidrogenase e malato desidrogenase, revelando a complexidade de relações que ocorrem durante a germinação.



**Figura 4.5.** Atividade da enzima amilase durante a germinação de sementes híbridas de milho com qualidade fisiológica contrastante.

No presente trabalho foi possível verificar que houve aumento gradual da atividade enzimática durante a hidratação das sementes. A  $\alpha$ -amilase é responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho, desempenhando papel fundamental na hidrólise do amido, assim, as sementes com maior atividade desta enzima tem maior facilidade na disponibilização de carboidratos para o embrião, resultado em maior velocidade de germinação e vigor (FRANCO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013). A maior atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi verificada no híbrido de maior vigor, evidenciando a importância dos estudos sobre a enzima associada a qualidade de sementes.

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada com o intuito de verificar a ocorrência de diferenças na morfologia dos grânulos de amido nas primeiras horas de hidratação, que possam explicar as diferenças na hidrólise deste componente nos dois híbridos (Fig. 4.6).



**Figura 4.6.** Micrografias dos grânulos de amido extraídos de sementes de milho 24 HAH. (a) grânulos de amido da combinação híbrida 4 x 1, (b) grânulos de amido da combinação híbrida 1 x 3, (c) detalhe do formato esférico do grânulo de amido individualizado da combinação 4 x 1, (d) detalhe do formato esférico do grânulo de amido individualizado da combinação 1 x 3, (e) integridade do

grânulo de amido na combinação híbrida 4 x 1, (f) detalhe da degradação do amido na combinação híbrida 1 x 3. As setas indicam a presença de fibras no material da amostra.

As dimensões dos grânulos de amido dos híbridos não diferiram entre si (Tabela 4.1). Porém, a combinação híbrida 4 x 1 apresentavam grânulos com superfície lisa, incorporada numa matriz contínua e na combinação 1 x 3, verificou-se a existência de superfícies ásperas com pequenos poros. Os poros evidenciam que houve ação da  $\alpha$ -amilase, indicando avanço na hidrólise do amido em relação à 4 x 1 precocemente. Este fato pode ter facilitado a ação de outras enzimas, como a  $\beta$ -amilase, permitindo que houvesse maior hidrólise de amido neste híbrido.

Por outro lado, a menor hidrólise do amido em 4 x 1, e a maior atividade da  $\alpha$ -amilase é indicativo de maior eficiência na conversão das reservas das sementes deste híbrido. Esta eficiência pode estar associada a fração amilose, que é uma molécula formada por resíduos de glicose, ligados por pontes glicosídicas  $\alpha(1-4)$ , que podem ser completamente convertidas em maltose pelas amilases. Esta também pode ser uma evidência que explica o maior vigor das sementes da combinação 4 x 1. Em trabalho com arroz, Huang et al. (2016), verificaram que sementes com maior teor de amilose apresentavam maior atividade de amilase e possuíam maior vigor de sementes, além de apresentarem maior mobilização de reservas.

**Tabela 4.2.** Dimensão do grânulo de amido e capacidade de retenção de água em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes.

| Híbridos | Dimensão grânulo<br>( $\mu\text{m}$ ) | Capacidade de<br>retenção de água<br>( $\text{mL.g}^{-1}$ ) |
|----------|---------------------------------------|---|
| 4 x 1    | 14,92                                 | 47,33*  |
| 1 x 3    | 15,70                                 | 32,66   |

\*Significativo pelo teste t

O teor de amilose e amilopectina é responsável pelas propriedades físico-químicas do amido, dentre elas a capacidade de retenção de água. Associando esta propriedade à qualidade fisiológica de sementes nos dois híbridos, verificou-se que o híbrido de maior vigor apresentou também maior capacidade de retenção de água em detrimento do híbrido de menor vigor (Tabela 4.2). Esta propriedade apresentou correlação positiva com germinação (0,78) e com o vigor das sementes (0,57). Apesar da associação encontrada entre propriedades físico-químicas do amido e a

qualidade fisiológica, o presente estudo comparou apenas dois híbridos e alguns testes de vigor como teste de frio, condutividade elétrica, emergência a campo, além de propriedades do amido como poder de inchamento e solubilidade não foram realizados, sendo necessários estudos adicionais para a confirmação desta associação em sementes de milho.

#### 4.4. CONCLUSÃO

A maior hidrólise de amido, em função da maior atividade da  $\alpha$ -amilase e a maior mobilização de açúcares solúveis está associada ao maior vigor em sementes de milho.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade de sementes é definida como um conjunto de características que determinam o seu valor de sementeira. Entre os aspectos relacionados a qualidade de sementes, estão os atributos fisiológicos, que se caracterizam pela germinação, vigor e longevidade das sementes. Segundo a literatura, a qualidade fisiológica das sementes é influenciada pelas características herdadas de seus parentais, sendo importante o acompanhamento das etapas de seleção com testes de vigor, pois fornecem informações importantes para conservação de germoplasma e para programas de melhoramento.

As pesquisas locais voltadas para o desenvolvimento de cultivares apropriadas e adequadas a ambientes marginalizados, considerando a complexidade das interações existentes nos sistemas agrícolas, são fundamentais para a manutenção da diversidade produtiva, para a conservação de recursos genéticos e para a autonomia produtiva dos pequenos agricultores.

As populações de milho utilizadas no presente estudo são cultivadas cotidianamente pelos agricultores e podem ser importantes fontes de variação para a melhoria da qualidade das sementes. Mesmo em fase inicial do programa de melhoramento, as alterações visualizadas na qualidade fisiológica das populações ao longo do processo de obtenção de linhagens, trouxe informações pertinentes sobre o comportamento dos genótipos aos efeitos da endogamia.

O aumento da homozigose, com o avanço das gerações de autofecundação, reduziu a qualidade fisiológica das sementes, especialmente quando as sementes foram submetidas a condições de estresse como no envelhecimento acelerado e no teste de frio. Os níveis de tolerância variaram em função do genótipo, CRI, VPA1 e HIB1 mostraram-se mais tolerantes aos efeitos da endogamia para características de sementes.

O parental HIB1, mostrou importantes estimativas de CGC, com produção de descendentes com maior qualidade fisiológica, especialmente quando utilizado como parental feminino. O mesmo ocorreu com CRI, sendo indicado como polinizador. Além desta estimativa, verificou-se que há divergência genética entre os parentais, importante aspecto para a manifestação da heterose. Os híbridos manifestaram heterose para características de qualidade fisiológica, além disso, observou-se efeito recíproco, indicando que deve haver atenção no momento da escolha do parental utilizado como genitor masculino ou feminino. As combinações híbridas 3 x 1, 4 x 1, 1 x 3, 2 x 3, 4 x 3 e 4 x 5

apresentaram maior qualidade de sementes, indicando serem promissoras para o cultivo e obtenção de sementes de qualidade. No entanto, estudos que avaliem este comportamento em distintas safras e locais associados com aspectos de rendimento precisam ser realizados para a confirmação dos resultados.

A manifestação da heterose também foi observada no padrão de hidratação das sementes, onde observou-se que os híbridos apresentam germinação mais rápida com protrusão radicular antecipada em 10 horas em relação aos parentais, em função do maior metabolismo de hidrólise e mobilização de reserva. Quanto ao conteúdo de reservas, verificou-se que o inicial não foi fator decisivo para o desempenho fisiológico das sementes, mas sim, a taxa de hidrólise e mobilização das reservas, associado às combinações híbridas que possibilitam ganho genético e eficiência metabólica. Os híbridos apresentaram maior taxa de hidrólise de fósforo total e amido, menor hidrólise de proteína total e ácido fítico, maior disponibilização de fósforo inorgânico, maior mobilização de proteína solúvel e açúcares solúveis durante a germinação em relação aos seus parentais o que lhes conferiu melhor qualidade fisiológica.

A hidrólise e mobilização de reservas está diretamente relacionado a ação de enzimas, como a fitase e  $\alpha$ -amilase. A atividade dessas enzimas foi maior nas sementes de maior vigor, configurando-se como importantes marcadores associados a qualidade das sementes. A identificação de marcadores que estejam associados a qualidade fisiológica de sementes, pode ser uma importante ferramenta para obtenção de informações precoces sobre a qualidade de sementes. As enzimas podem ser consideradas eficientes marcadores e a expressão diferencial de genes associados a elas, pode ser utilizada para identificar os níveis de vigor de lotes de sementes. Os estudos de genética molecular na expressão diferencial de genes envolvidos com a atividade enzimática podem trazer informações importantes que elucidem as diferenças no vigor de sementes. A técnica de microscopia eletrônica de varredura e as características físico químicas do amido, também podem elucidar pontos chave no processo de hidrólise de reservas para compreensão dos mecanismos envolvidos na germinação e no vigor de sementes. Porém, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para identificar a associação destas características com qualidade fisiológica de sementes.

O presente trabalho trouxe informações pertinentes sobre o comportamento dos genótipos quanto aos aspectos de qualidade de sementes para o programa de melhoramento de milho da Cooperativa Oestebio de São Miguel do Oeste/SC. Das linhagens parcialmente endogâmicas, CRI, VPA1 e HIB1, mostraram maior tolerância aos efeitos

da endogamia e podem ser utilizados pelo programa de melhoramento para obtenção de ganhos genéticos para os aspectos de qualidade de sementes. As autofecundações e as avaliações de qualidade dos genótipos, até a obtenção de linhagens puras, devem ser realizadas para verificar a ocorrência de alterações na qualidade das sementes e identificar a contribuição genética para os aspectos de qualidade fisiológica. A avaliação ao longo do processo de obtenção de linhagens permite identificar as gerações de autofecundações que mais contribuem para a qualidade de sementes, objetivando reduzir tempo e custo na obtenção de linhagens, tornando as sementes mais acessíveis aos agricultores e valorizando os recursos genéticos disponíveis nas comunidades rurais.



## 5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. **Anuário 2015**. Brasília, 2015.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 381 p, 1971.

ANDRIOTIS, V.M.E.; REJZE, M. RUGEN, M.D.; SVENSSON, B.; SMITH, A.M.; FIELD, R.A. Iminosugar inhibitors of carbohydrate - active enzymes that underpin cereal grain germination and endosperm metabolism. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, p. 159–165, 2016.

ANTUNA, O.G.; SANCHES, F.R.; RIO, E.G.; TORRES, N.A.R.; GARCIA, L.B. Componentes genéticos de caracteres agronômicos y de calidad fisiológica de semillas en líneas de maíz. **Revista Fitotecnia Mexicana**. 26: 11-17, 2003

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Vitamins and other nutrients. In AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed. Vol. II. AOAC International, Arlington, cap. 45, 58-61.

AZEVEDO, R. A., ALAS, R.M., SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiol Plant**, 104, n. 2, p.280-292, 1998.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93–107, 2004.

BENNETT, M.A. Determination and standardization challenges of vigor tests of vegetable seeds. **Informativo Abrates**, n. 11, p. 58-62, 2001.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. **Plant Physiology**, v. 98, n. 3, p. 1207–1210, 1992.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A.C. Seed stability during storage: raffinose content and seed glassy state. **Seed Science Research**, v.5, p. 75–80, 1995.

BEUCHAT, L. R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 258-261, 1977

BEWLEY, J. D. **Seed Germination and Reserve Mobilization**. p. 1–7, 2001.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.H.; NONOGAKI, H. **Seeds Physiology of Development, Germination and Dormancy**, 3<sup>o</sup> ed., New York: Springer, 392p, 2013.

BORTOLOTTO, R.P.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; MATTIONI, N.M. Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**, v.67, p.513-520, 2008

BOSTON, R. S.; LARKINS, B. A. The genetics and biochemistry of maize zein storage proteins. **Handbook of Maize: Genetics and Genomics**, v. II, p. 715–730, 2009.

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**, 72, n. 1-2, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da agricultura agropecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**, Brasília, 2009, 398p.

CABRAL, P.D.S.; AMARAL JUNIOR, A.T.; VIEIRA, H.D.; SANTOS, J.S.; FREITAS, I.L.J.; PEREIRA, M.G. Genetic Effects on Seed Quality in Diallel Crosses of Popcorn. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 37, n. 6, p. 502–511, 2013.

CABRAL, P.D.S.; AMARAL JUNIOR, A.T.; VIANA, A.P.; VIEIRA, H.D.; FREITAS, I.L.J.; VITTORAZZI, C.; VIVAS, M. Combining ability between tropical and temperate popcorn lines for seed quality and agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, p. 256-263, 2015.

CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of Phosphorus. **Analytical Chemistry**, 28, n. 11, p.1756-1758, 1956.

CHEN, Z. J. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 7, p. 471–82, 2013.

CLEGG, K. M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, 7, n. 1, p.40-44, 1956

CLEMENT, C. R.; COLE, D. M. Conservação *on Farm*. In: Nass, L.L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 1998 (no prelo).

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of Seed Science and Technology**, Ed 3. Chapman & Hall, New York, p. 59–110, 1995

CUGLIELMINETTI, L.; PERATA, P.; ALPI, A. Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. **Plant Physiol**, n.109, p. 1069-1076, 1995.

CRUZ, J.C.; FILHO, I.A.P.; QUEIROZ, L.R. Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14. Sistemas de Produção. Embrapa Milho e Sorgo. Versão Eletrônica. 2014.  
<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>

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

DIAS, M.A.N.; MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M. Vigor de sementes de milho associado à mato-competição. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p.93-101, 2010.  
<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n2/v32n2a11.pdf>

DIAS, M.A.N.; PINTO, T.L.F.; CICERO, S.M.; MONDO, V.H.V.; PEDRINI, L.G. Direct effects of soybean seed vigor on weed competition. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.2, p.346-351, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v33n2/17.pdf>

DIN, A.R.J.M.; HANAPI, S.Z.; ALAM, S.A.Z.; JAVED, M.A.; TIN, L.C.; SARMI, M.R. Germination, seedling growth, amylase and protease activities in Malaysian upland rice seed under microbial inoculation condition. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 2627–2635, 2014.

DING, D.; WANG, Y.; HAN, W.; FU, Z.; LI, W.; LIU, Z.; HU, Y.; TANG, J. MicroRNA transcriptomic analysis of heterosis during maize seed germination. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

DONOHUE, K. Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories. **Biological sciences**, v. 364, n. 1520, p. 1059–74, 2009.

DORIA, E.; GALLESCHI, L.; CALUCCI, L.; PINZINO, C.; PILU, R.; CASSANI, E.; NIELSEN, E. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: Evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 967–978, 2009.

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, 2016.

ELLSTRAND, N. C. Going to “Great Lengths” to Prevent the Escape of Genes That Produce Specialty Chemicals. **Plant Physiology**, v. 132, n. August, p. 1770–1774, 2003.

FALCONER, D.S. **Introducción a la genética cuantitativa**. 7ª impresión, México, 430 p., 1976.

FAO; IPGRI. **The role of women in the conservation of the genetic resources of maize**. Rome, 2002.

FRANKLIN, I. R. Evolutionary changes in small population. In: SOULÉ, M.E.; WILCOX, R.A. **Conservation biology - An evolutionary - ecological perspective**. Massachusetts, Sunderland.p.135-149, 1980.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI DE SA, M.F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.269, p.397-412, 2002.

FU, Z.; JIN, X.; DING, A.; LI, Y.; FU, Z.; TANG, J. Proteomic analysis of heterosis during maize seed germination. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1462–1472, 2011.

GARCIA, J.S.; GRATÃO, P.L.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A. Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, n. 22, p.8623-8630, 2006.

GENESYS. Portal global de informação sobre recursos genéticos vegetais. Disponível em: <https://www.genesys-pgr.org>.

GOGGI, A.S.; CARAGEA, P.; POLLAK, L.; MCANDREWS, G.; DEVRIES, M.; MONTGOMERY, K. Seed quality assurance in maize breeding programs: Tests to explain variations in maize inbreds and populations. **Agronomy Journal**, v. 100, n. 2, p. 337–343, 2008.

GOMES, M.S.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, R.G.; VIEIRA, M.G.G.C. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.

GUO, B. et al. Comparative Proteomic Analysis of Embryos between a Maize Hybrid and Its Parental Lines during Early Stages of Seed Germination. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

HALLAUER, A. R.; CARENA, J. M.; MIRANDA FILHO, J. B. de. **Quantitative genetics in maize breeding**. New York: Springer, 2010. 500 p

HAN, C.; YIN, X.; HE, D.; YANG, P. Analysis of Proteome Profile in Germinating Soybean Seed, and Its Comparison with Rice Showing the Styles of Reserves Mobilization in Different Crops. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

HAMPTON, J.G. Vigor testing within laboratories of the International Seed Testing Association: a survey. **Seed Science and Technology**, v. 20, p. 427-452, 1973

HE, H.; VIDIGAL, D.S.; SNOEK, B.; SCHNABEL, S.; NIJVEEN, H.; HILHORST, H.; BENTSINK, L. Interaction between parental

environment and genotype affects plant and seed performance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 22, p. 6603–6615, 2014.

HE, M.; ZHU, C.; DONG, K.; ZHANG, T.; CHENG, Z.; LI, J.; YAN, Y. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. **BMC plant biology**, v. 15, p. 97, 2015.

HOECKER, N.; KELLER, B.; PIEPHO, H.P.; HOCHHOLDINGER, F. Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 421-429, 2006.

HOLDING, D. R.; LARKINS, B. A. **Zein Storage Proteins**. v. 63, p. 269–286, 2009.

HUANG, M.; ZHANG, R.; CHEN, J.; CAO, F.; JIANG, L.; ZOU, Y. Morphological and physiological traits of seeds and seedlings in two rice cultivars with contrasting early vigor. **Plant Production Science**, n. p. 1–7, 2016.

ILYAS, M. Estimation of carbohydrate , starch , protein and oil contents of maize (*Zea mays*). **European Academic Research**, v. 2, p.5230-5240, 2015.

ISAAA. Biotech Crop Highlights in 2015. Disponível em <https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/default.asp>. Acesso em Novembro 2016.

JIN, X.; FU, Z.; DING, D.; LI, W.; LIU, Z.; TANG, J. Proteomic Identification of Genes Associated with Maize Grain-Filling Rate. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

JIN, X.; FU, Z.; DING, D.; LI, W.; LIU, Z.; HU, Y.; TANG, J. Proteomic analysis of plumules and coleoptiles in maize between hybrids and their corresponding inbred lines. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 36, n. 2, p. 355–370, 2014.

KIST, B.B. **Anuário Brasileiro de Milho**. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul , 96 p., 2016.

KUHNEN, S.; LEMOS, P.M.M.; CAMPESTRINI, L.H.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1548–1553, 2011.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 28, n. 6, p.1313-1315, 1980.

LEOPOLD, A.C.; SUN, W.Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds: analysis and function. **Seed Science Research**, 4, n. 03, p.267-274, 1994. <http://dx.doi.org/10.1017/s0960258500002294>.

LI, B.; ZHANG, D.F.; JIA, G.Q.; DAI, J.D.; WANG, S.C. Genome-wide comparisons of gene expression for yield heterosis in maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, p. 162–176, 2009.

LIMA, M.; MIRANDA FILHO, J. B.; GALLO, P. B. Inbreeding depression in Brazilian populations of maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, Bergamo, v.29, p.203-215, 1984.

LIMAMI, A.M.; ROUILLON, C.; GLEVAREG, G.; GALLAIS, A.; HIREL, B. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. **Plant physiology**, v. 130, n. 4, p. 1860–70, 2002.

LIN, L.; OCKENDEN, I.; LOTT, J.N.A. The concentrations and distribution of phytic acid-phosphorus and other mineral nutrients in wild-type and low phytic acid1-1 (*lpa1-1*) corn (*Zea mays* L.) grains and grain parts. **Canadian Journal of Botany**. vol.83, 131–141, 2005.

LIU, D.; PARKER, M.L.; WELLNER, N.; KIRBY, A.R.; CROSS, K.; MORRIS, V.; CHENG, F. Structural variability between starch granules in wild type and in a high-amylose mutant maize kernels. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 458–468, 2013.

LOTT, J.N.A.; GREENWOOD, J.S.; BATTEN, G.D. Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds) **Seed Development and Germination**. Marcel Dekker, New York, pp 215–235, 1995

LOTT, J.N.A.; OCKENDEN, I.; RABOY, V.; BATTEN, G.D. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. **Seed Science Research**. 10:11–33, 2000.

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

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing : an overview of the past , present and future perspective. **Scientia Agricola**, v.72, n.4, p.363-374, 2015.

MAXTED, N.; GUARINO, L.; MYER, L.; CHIWONA, E.A. Towards a methodology for on-farm conservation of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 49, n. 1, p. 31–46, 2002.

MEI, Y.Q.; SONG, S.Q. Early Morphological and Physiological Events Occurring During Germination of Maize Seeds. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 8, p. 950–957, 2008.

MEURER, E. J.; MA WANG, G. & WANG, S. R. Função dos nutrientes e sintomas de deficiências. In: MIYASAKA, S. & MEDINA, J. C.(Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas, ITAL, p.156-16, 1981

MINO, M.; INOUE, M. Analysis of glucose metabolism in the heterotic viability in seedling grow of maize F1 hybrid. **Japan Journal Crop Science**, Tokyo, v. 63, n. 4, p.682-688, Dec. 1994.

MIRANDA FILHO, J.B; VIÉGAS, G.P. Milho Híbrido. In: Ernesto Paterniani e Glauco P. Viégas (Editores). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas. Fundação Cargill. 2ª edição. 1987.

MOTERLE, L.M.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; PINTO, R.J.B.; GONÇALVES, L.S.A. AMARAL JUNIOR, A.T.; SILVA T.R.C. Combining ability of tropical maize lines for seed quality and agronomic traits. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 2268-2278, 2011. <http://www.geneticsmr.com/articles/1285>

MOTERLE, L.M.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; PINTO, R.J.B.; GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JUNIOR, A.T. Combining ability of popcorn lines for seed quality and agronomic traits. **Euphytica**, v.185, n.3, p.337-347, 2012.

MOVIMENTO DOS PEQUENOS AGRICULTORES. MPA: uma alternativa de organização do campesinato brasileiro. Disponível em [www.mpabrazil.org.br](http://www.mpabrazil.org.br).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Managing Global Genetic Resources. **National Academy Press Washington**, D.C. pp. 47-84. 1993.

NADEEM, M. et al. Relative contribution of seed phosphorus reserves and exogenous phosphorus uptake to maize (*Zea mays* L.) nutrition during early growth stages. **Plant and Soil**, v. 346, n. 1, p. 231–244, 2011.

NAIDOO, R.; TONGOONA, P.; DERERA, J.; LAING, L.D.; WATSON, G.M.F. Combining ability of low phytic acid (*lpa1-1*) and quality protein maize (QPM) lines for seed germination and vigour under stress and non-stress conditions. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 529–541, 2012.

NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARIS-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p. 2001.

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**, p. 449–456, 2013.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. La bioseguridad de las plantas transgênicas. In: BARBACENA, A.; KATZ, J.; MORALES, C.; SCHAPER, M. (Org.). **Los transgênicos en América latina y el caribe: un debate abierto**. Santiago: Editora Nações Unidas, p.111-122. 2004.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. A agroecologia: Estratégias de pesquisa e valores. **Estudos Avancados**, v. 29, n. 83, p. 183–207, 2015.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010.

OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, 7, n. 02, p.63-74, 1997. <http://dx.doi.org/10.1017/s096025850000341x>.

OCDE; FAO. **Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024**. p. 1–54, 2015.

OLIVEIRA, G.E.; VON PINHO, R.G.; ANDRADE, T.; VON PINHO, E.V.R.; SANTOS, C.D.; VEIGA, A.D. Qualidade fisiológica e expressão das enzimas amilases em sementes de milho. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 40–48, 2013.

OLIVEIRA, G. E.; VON PINHO, E.V.R.; ANDRADE, T.; SOUZA, J.C.; CAIXETA, F.; FERREIRA, R.A.D.C. Relationship among physiological quality, heterosis, and amylase gene expression in maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8623–8633, 2015.

ORTIZ, F.C. et al. Análisis dialélico para caracteres de vigor de semilla y de plântula en genótipos de maíz tropical. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v.32, n.1, p.77-87, 2006.

OU, K.; CHENG, Y.; XING, Y.; LIN, L.; NOUT, R.; LIANG, J. Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 598–603, 2011.

PAIGE, K.M. The Functional Genomic of Inbreeding Depression: a New Approach to an Old Problem. **BioScience**, v.60, p. 267-277. 2010.

PALEG, L. G. Physiological effects of giberellins. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 16, p. 291-322, 1965.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Use of Heterosis in Maize Breeding : History , Methods and Perspectives. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 159–178, 2001.

PEREIRA, A.F.; MELO, P.G.S.; PEREIRA, J.M.; ASSUNÇÃO, A.; NASCIMENTO, A.R.; XIMENES, P.A. Caracteres agronômicos e nutricionais de genótipos de milho doce. **Bioscience Journal**. v. 25, p. 104-112, 2009.

PESKE, S. **O Mercado de Sementes no Brasil**. Seed News, n.3, 2016. Disponível em: [http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem\\_capa/imprimir.php?id=263](http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=263)

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 289 p., 1985

PRASANNA, B. M. et al. **Quality protein maize**. v. 81, n. 10, 2001.

PRAZERES, C. S.; COELHO, C.M.M. Divergência genética e heterose relacionada à qualidade fisiológica em sementes de milho. **Bragantia**, p. 411–417, 2016.

PRAZERES, C. S.; COELHO, C.M.M. Heterose para qualidade fisiológica de sementes na obtenção de híbridos de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.15, n.1, p. 124-133, 2016.

RABOY, V.; DICKINSON, D. B. Effect of Phosphorus and Zinc Nutrition on Soybean Seed Phytic Acid and Zinc. **Plant Physiology**, 75, n. 4, p.1094-1098, 1984.

RABOY, V. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1033–1043, 2003.

RABOY, V. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science**, v. 177, n. 4, p. 281–296, 2009.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, 63, n. 1, p.507-533, 2012. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

REIS, L.S.; PEREIRA, M.G.; SILVA, R.F.; MEIRELES, R.C. Efeito da heterose na qualidade de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 2 p. 310 - 315, 2011.

ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. **Seed Science Research**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 2014.

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

ROOD, S. B.; BUZZELL, R. I.; MAJOR, D. J.; PHARIS, R. P. Gibberellins and heterosis in maize: quantitative relationships. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 2, p. 281-286, 1990.

SANCHEZ-LINARES L.; M. GAVILANES-RUIZ, M.; DIAZ-PONTONES, D.; GUZMAN- CHAVEZ, F.; CALZADA-ALEJO, V.; ZURITA-VILLEGAS, V.; LUNA-LOAIZA, V.; MORENO-SANCHEZ, R.; BERNAL-LUGO, I.; SANCHEZ-NIETO, S. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4513–4526, 2012.

SANTOS, H.O.; VON PINHO, E.V.R.; DUTRA, S.M.F.; ANDRADE, T.; GUIMARÃES, R.M. Physiological quality and gene expression during the development of habanero pepper (*Capsicum Chinense* Jacquin) seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 5085–5098, 2015.

SANTOS, H.O.; VON PINHO, I.V.; VON PINHO, E.V.R.; PIRES, R.M.O.; SILVA, V.F.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, R.M.E. Physiological quality of hybrid maize seeds through respiratory and enzymatic activities. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 1879-1886, 2016.

SHAIK, S.S.; CARCIOFI, M.; NARTENS, H.J.; HEBELSTRP, K.H.; BLENNOW, A. Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 9, p. 2257–2270, 2014.

SILVA; M.T. Violação dos direitos e resistência aos transgênicos no Brasil: uma proposta camponesa. In: ZANONI, M.; FERMENT, G. (org). **Transgênicos para quem? Agricultura Ciência e Sociedade**. Brasil. MDA. p. 446-461, 2011.

SOLANO, D. V. **Las leyes que privatizan y controlan el uso de las semillas, criminalizan las semillas criollas.** p. 13–19, 2012.

STHAPIT, S.; MELDRUM, G.; PADULOSI, S.; BERGAMIN, N. **Strengthening the role of custodian farmers in the national conservation programme of Nepal.** Rome, 2015.

STUPAR, R.M.; HERMANSON, P.J.; SPRINGER, N.M. Nonadditive Expression and Parent-of-Origin Effects Identified by Microarray and Allele-Specific Expression Profiling of Maize Endosperm. **Plant Physiology**, V. 145, pp. 411–425, 2007.

SUN, W. Glassy State and Seed Storage Stability: The WLF Kinetics of Seed Viability Loss at  $T > T_g$  and the Plasticization Effect of Water on Storage Stability. **Annals of Botany**, v. 79, n. August, p. 291–297, 1997.

TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, n. 145, p.140–153, 2012.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C.A., BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

TUNES, L.M.; BADINELLI, P.G.; BARROS, C.S.A.; MENEGHELLO, G.E.; AMARANTE, L. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Revista Ceres**, v. 58, p. 178-184, 2011.

VAN DONGEN, J.T.; GUPTA, K.J.; RAMIREZ-AGUILARA, S.J.; ARAUJO, W.L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A.R. Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 12, p. 1434–1443, 2011.

VEIT, B.; SCHMIDT, R. J.; HAKE, S.; YANOFSKY, M. F. Maize floral development: new genes and old mutants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1205- 1215, 1993.

VENTURA, D.M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D.; BUTTAFAVA, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; BALESTRAZZI, A. Understanding the

molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 196-206, 2012.

VIANNA, R.T.; GAMA, E.E.G.; NASPOLINI FILHO, V.; MORO, J.R.; VENCOVSKY, R. Inbreeding depression of several introduced populations of maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, Bergamo, v.27, p.151-157, 1982.

WANG, T.; WANG, M.; HU, S.; XIAO, Y.; TONG, H.; PAN, Q.; XUE, J.; YAN, J.; LI, J.; YANG, X. Genetic basis of maize kernel starch content revealed by high-density single nucleotide polymorphism markers in a recombinant inbred line population. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 288, 2015.

WANG, X. F.; JING, X. M.; LIN, J. Starch mobilization in ultradried seed of maize (*Zea mays* L.) during germination. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 4, p. 443–451, 2005.

WATTANAKULPAKIN, P.; PHOTCHANACHAI, S.; RATANAKHANOKCHAI, K. Hydropriming effects on carbohydrate metabolism, antioxidant enzyme activity and seed vigor of maize (*Zea mays* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3537–3547, 2012.

WEITBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: Early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289–3309, 2011.

WORDELL FILHO L.A.; ELIAS H.T. **A cultura do milho em Santa Catarina**. 1 ed. Florianópolis: Epagri, v. 1, p. 480, 2010.

XIA, H.; YANDEAU-NELSON, M.; THOMPSON, D.B.; GUILTINAN, M. Deficiency of maize starch-branching enzyme I results in altered starch fine structure, decreased digestibility and reduced coleoptile growth during germination. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 95, 2011.

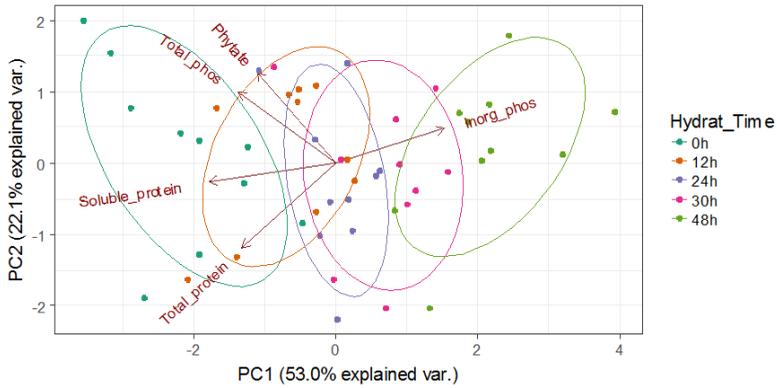
YAN, D.; DUERMEYER, L.; LEOVEANU, C.; NAMBARA, E. The Functions of the Endosperm During Seed Germination. **Plant Cell Physiol.** v. 55, p. 1521–1533, 2014.

YU, Y.; GUO, G.; LV, D.; HUL, Y.; LI, J.; LI, X.; YAN, Y. Transcriptome analysis during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. **BMC plant biology**, v. 14, p. 20, 2014.

ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A. M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 209–234, 2010.

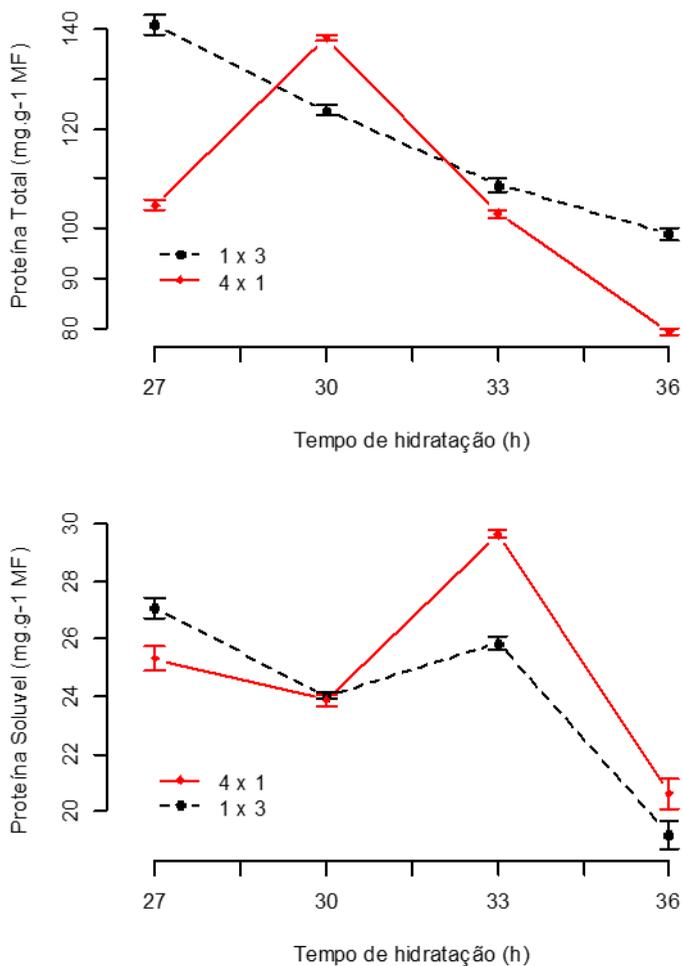
## 6. ANEXOS

## Anexo 1



**Figura 6.1.** Diagrama de ordenação por Análise de Componentes Principais (PCA) a partir da composição bioquímica da sementes de linhagens e híbridos de milho durante a germinação de sementes.

## Anexo 2



**Figura 6.2.** Dinâmica de mobilização de proteína total e proteína solúvel em híbridos de milho contrastantes quanto ao vigor de sementes. A barra de erros indica o desvio padrão de três repetições (n=3).