

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**DÉFICIT HIDRICO EM PLÂNTULAS DE MILHO: ASPECTOS
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

LUIS HERMINIO CHAIREZ TEJEDA

Pelotas, 2019

Eng. Agr. Luis Herminio Chairez Tejeda

**Déficit hídrico em plântulas de milho: aspectos morfológicos e
moleculares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Luciano Carlos da Maia, Dr. – FAEM/UFPeI

Co-orientadores: Camila Pegoraro, Dra. – FAEM/UFPeI

Railson Schreinert dos Santos. Dr. – FAEM/UFPeI

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T253d Tejada, Luis Herminio Chairez

Déficit hídrico em plântulas de milho: aspectos morfológicos e moleculares / Luis Herminio Chairez Tejada ; Luciano Carlos da Maia, orientador ; Railson Schreinert dos Santos, Camila Pegoraro, coorientadores. — Pelotas, 2019.

74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Zea mays*. 2. Variabilidade genética. 3. Genes. 4. Autofagia. 5. ATG. I. Maia, Luciano Carlos da, orient. II. Santos, Railson Schreinert dos, coorient. III. Pegoraro, Camila, coorient. IV. Título.

CDD : 633.15

Banca Examinadora:

Dr^a. Camila Pegoraro – Professora do Departamento de Fitotecnia. FAEM/UFPeI –
Presidente

Dr. Carlos Busanello – Professor do Departamento de Fitotecnia. FAEM/UFPeI –
Examinador

Dra. Vivian Ebeling Viana – Professora colaboradora do Departamento de Fitotecnia.
FAEM/UFPeI – Examinadora

Dr. Daniel, da Rosa Farias – Professor do Instituto Federal Catarinense – Examinador
externo

A Deus, por me abençoar e me dar forças.

Aos meus pais, Matilde Tejeda Saldana e Herminio Chaires Avendano por todo amor e apoio.

A toda minha família, por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado.

Aos meus queridos irmãos, Eddie Chaires, Diana Patrícia, Odalis Chairez, Katy Ruiz e Giulia Maria, Anais, Larissa e Mikaela pelo amor e carinho, amizade e incentivo

A Deus, pela minha existência. Obrigado, por mais essa etapa profissional e pessoal concluída.

Meus pais pelos ensinamentos, amor, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

Dedico

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus por mais essa jornada e permitindo a conclusão deste trabalho com sucesso.

À minha família pelo apoio e as palavras de incentivo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador de mestrado, o Professor Luciano, por estar sempre dando suporte e conhecimentos transmitidos.

Ao doutor Antonio Costa de Oliveira pelos ensinamentos das aulas.

À minha Coorientadora Professora Camila Pegoraro pela paciência e valiosos ensinamentos.

Aos alunos de Pós-doutorado Eduardo e Vivian, a Doutoranda Cintia, a Mestranda Latóia e ao Professor Carlos pelo valioso tempo e dedicação.

Ao Professor Railson dos Santos pelo apoio e participação durante minha formação de mestrado e a doutora Lílian Barros pela ajuda incondicional no mestrado.

À minha orientadora de graduação a Doutora Jacel Adame Garcia, pelos conselhos, conhecimentos transmitidos e pelos momentos de alegria e descontração.

Agradeço ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia por ter permitido o acesso à grandes novos conhecimentos.

Meus colaboradores e amigos por me ajudar incondicionalmente sempre estando presentes mesmo aos sábados, domingos e feriados, com boas conversas entre um café e outro.

A todos os professores que participaram da minha formação na nossa grande Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – FAEM/UFPel.

Ao Instituto Tecnológico de Úrsulo Galvan e seção 19 sindicatos de açucareiros por fazer parte da minha formação.

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias baixam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

Resumo

TEJEDA, Luis C. **Déficit hídrico em plântulas de milho: aspectos morfológicos e moleculares**. 2019. 74f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, 2019.

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais consumido no mundo e garantir a produtividade desta cultura sob déficit hídrico é fundamental para a segurança alimentar mundial, especialmente no contexto das mudanças climáticas globais que levam a um aumento da frequência de episódios de seca. Desenvolver variedades de milho tolerantes ao déficit hídrico é uma maneira eficaz de reduzir as perdas de produtividade. No entanto, o processo de melhoramento só é possível na presença de variabilidade genética. Variedades de milho crioulo (*landraces*), mantidas por pequenos agricultores, são fonte de variabilidade genética. Para o uso eficiente dessa variabilidade é necessária a caracterização da resposta dessas plantas sob condição de déficit hídrico. Ainda, estudos buscando identificar mecanismos e genes candidatos associados à tolerância ao déficit hídrico é outra estratégia para auxiliar os melhoristas. O processo de autofagia é o principal mecanismo de degradação e reciclagem de constituintes citoplasmáticos, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e organelas inteiras. Este mecanismo está associado à manutenção da homeostase celular, adaptação a estresse e resposta imune, além de promover morte celular programada em determinadas situações. Considerando o papel crítico da autofagia no desenvolvimento e nas respostas à estresses, uma melhor compreensão desse mecanismo em milho sob déficit hídrico pode levar a aplicações agrícolas benéficas. Com base no exposto, este estudo teve por objetivo caracterizar a resposta ao déficit hídrico em variedades de milho e estudar o perfil transcricional de genes *ATG* de plântulas submetidas a essa condição. Nesse estudo verificou-se que ocorre um efeito negativo do déficit hídrico na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas quando se utiliza o potencial osmótico de -0.2 MPa, no entanto, não houve diferenças acentuadas entre as variedades avaliadas. No potencial osmótico -0.6 MPa ou superior não há condições de sobrevivência após a germinação. Considerando o perfil transcricional de genes *ATG* verifica-se que ocorre uma variação no comportamento e no acúmulo de transcritos dos genes de acordo com a variedade,

com a condição ambiental e com o tecido analisado. Com base nos resultados obtidos pode-se sugerir que o processo de autofagia está envolvido na resposta ao déficit hídrico. Os resultados obtidos nesse estudo trazem novas perspectivas para o melhoramento de milho visando tolerância a déficit hídrico.

Palavras-chave: *Zea mays*, variabilidade genética, seca, autofagia, genes *ATG*.

Abstract

TEJEDA, Luis M. **Water deficit in maize seedlings: morphological and molecular aspects.** 2019. 74f. Dissertation (Master) – Graduate in Agronomy Program. Federal University of Pelotas, Pelotas - RS, 2019.

Maize (*Zea mays* L.) is the third most consumed cereal in the world and ensure the productivity of this crop under water deficit is fundamental to world food security, especially in the context of global climate changes that lead to an increase in the frequency of episodes of drought. Developing water deficit tolerant maize varieties is an effective way to reduce yield losses. However, the breeding process is only possible in the presence of genetic variability. Varieties of creole maize (landraces), maintained by small farmers, are an important source of genetic variability. For the efficient use of this variability it is necessary to characterize the response of these plants under drought condition. Also, studies to identify mechanisms and candidate genes associated to water deficit tolerance is another strategy to help breeders. The autophagy process is the major mechanism of degradation and recycling of cytoplasmic constituents, including proteins, lipids, nucleic acids and whole organelles. This mechanism is associated with the maintenance of cellular homeostasis, adaptation to stress and immune response, besides promoting programmed cell death in certain situations. Considering the critical role of autophagy in development and stress responses, a better understanding of this mechanism in maize under water deficit can lead to beneficial agricultural applications. Based on the above, this study aimed to characterize the response to water deficit in maize varieties and to study the transcriptional profile of *ATG* genes from seedlings submitted to this condition. In this study it was verified that a negative effect of the water deficit on the germination and initial development of the seedlings occurs when the osmotic potential of -0.2 MPa is applied, however, there were no marked differences among the evaluated varieties. At the osmotic potential -0.6 MPa or higher there are no survival conditions after germination. Considering the transcriptional profile of *ATG* genes, there is a variation in the behavior and accumulation of transcripts of the genes according to the variety, the environmental condition and the analyzed tissue. Based on the results obtained it can be suggested that the autophagy process is involved in the response to the water

deficit. The results obtained in this study bring new perspectives for maize improvement aiming at tolerance to water deficit.

Keywords: *Zea mays*, genetic variability, drought, autophagy, ATG genes.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre o vigor (primeira contagem de germinação) e percentual de germinação de sementes de diferentes variedades de milho. PCG – Primeira contagem de germinação; G – Porcentagem de germinação.455
- Figura 1- continuação.** Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre o vigor (primeira contagem de germinação) e percentual de germinação de sementes de diferentes variedades de milho. PCG – Primeira contagem de germinação; G – Porcentagem de germinação.....466
- Figura 2.** Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre a massa fresca de raiz e massa seca de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho. MFR – Massa fresca de plântula; MSR – Massa seca de plântula.49
- Figura 2- continuação.** Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre a massa fresca de raiz e massa seca de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho. MFR – Massa fresca de plântula; MSR – Massa seca de plântula.50
- Figura 3.** Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre o comprimento de raiz e parte aérea e massa fresca e seca de parte aérea plântulas de diferentes variedades de milho. A – Comprimento de raiz e parte aérea; B – Massa fresca e seca de parte aérea; CR – Comprimento de raiz; CPA – Comprimento de parte aérea; MFP – Massa fresca de parte aérea; MSP – Massa seca de parte aérea.52
- Figura 4.** Resposta de plântulas de milho de diferentes variedades cultivadas em diferentes potenciais osmóticos.54
- Figura 5.** Caracterização fenotípica (comprimento de parte aérea – CPA; comprimento de raiz – CR; massa seca de parte aérea – MSPA; e massa seca de raiz – MSR) através do desempenho relativo nas variedades de milho Taquarão e Argentino Amarelo sob condição de déficit hídrico.55

Figura 6. Quantificação relativa da expressão dos genes *ZmATG8* nos tecidos de parte aérea e raiz das variedades Taquarão e Argentino Amarelo submetidas ao déficit hídrico (-0.2 MPa) por 7 dias. Médias \pm desvio padrão, n = 3.....58

Figura 7. Quantificação relativa da expressão do gene *ZmATG12* nos tecidos de parte aérea e raiz das variedades Taquarão e Argentino Amarelo submetidas ao déficit hídrico (-0.2 MPa) por 7 dias. Médias \pm desvio padrão, n = 3.59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variedades de milho utilizadas no experimento.....	344
Tabela 2. Resumo da análise da variância para oito características agronômicas em quatorze variedades de milho, na safra2018/2019.....	399
Tabela 3. Percentual primeira contagem de germinação (%) e percentual de germinação total (GT%) de diferentes variedades de milho submetidas a diferentes potenciais osmóticos.	422
Tabela 4. Massa fresca e massa seca de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho submetidas a diferentes potenciais osmóticos durante a germinação.....	478
Tabela 5. Comprimento de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho submetidas a diferentes potenciais osmóticos durante a germinação.	511

Sumario

1. Introdução geral	17
2. Revisão de Literatura	19
2.1 Classificação e caracterização botânica.....	19
2.2 Importância do milho no México	20
2.3 Importância do milho no mundo e no Brasil	21
2.4 Genética e melhoramento do milho.....	22
2.5 Déficit hídrico.....	23
2.6 Estresse ocasionado por déficit hídrico na germinação de sementes de milho	27
2.7 Estresse ocasionado por déficit hídrico no desenvolvimento do milho.....	28
2.8 Variabilidade genética em milho.....	29
2.9 Expressão gênica.....	30
2.10 Autofagia	31
3. Material e métodos	34
3.1 Experimento 1 – Avaliação de variedades de milho submetidas ao estresse por déficit hídrico	34
3.1.1 Avaliações de plântulas.....	35
3.1.2 Análise estatística	36
3.2. Experimento 2 – Avaliação de expressão de genes associados a autofagia em milho sob condição de déficit hídrico.....	36
3.2.1 Material vegetal	36
3.2.2 Caracteres morfológicos.....	37
3.2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA	37
3.2.4 Análise de PCR em tempo real	38
3.2.5 Normalização dos dados de expressão.....	38

4. Resultados e discussão.....	39
4.1 Experimento 1 – Avaliação de variedades de milho submetidas ao estresse por déficit hídrico	39
4.1.2 Conclusão	53
4.2 Experimento 2 – Avaliação de expressão de genes associados a autofagia em milho sob condição de déficit hídrico.....	54
4.2.1 Identificação de potencial osmótico.....	54
4.2.2 Perfil fenotípico das variedades sob condição de déficit hídrico	54
4.2.3 Perfil de expressão dos genes <i>ATGs</i> em variedades de milho sob condição de déficit hídrico.....	55
4.2.4. Conclusão	60
5. Considerações Finais	61
6. Referências Bibliográficas	62

1. Introdução geral

O milho (*Zea mays* L.) é a terceira cultura alimentar mais importante do mundo, ficando atrás do trigo (*Triticum aestivum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.). No entanto, de modo similar a maioria dos cereais de importância alimentar, a produtividade do milho é afetada negativamente pelo déficit hídrico. A cultura é mais sensível à essa condição nos períodos de pré-antese e enchimento de grãos, porém o déficit hídrico no estágio de plântula também pode ser devastador. Esse estágio é determinante para o estabelecimento da lavoura para alcançar o número de plantas desejado, buscando a máxima produtividade.

A manutenção da produtividade de milho em condições adversas como o déficit hídrico é um requisito básico para manutenção da segurança alimentar. Diferentes estratégias têm sido utilizadas para atingir esse objetivo como a utilização de irrigação e o desenvolvimento de genótipos superiores. Considerando que a irrigação é uma alternativa onerosa devido a estrutura necessária e que a água é um recurso cada vez mais escasso, o desenvolvimento de novos genótipos é a alternativa mais promissora.

A tolerância ao déficit hídrico é uma característica complexa, controlada por muitos genes, que apresenta diferentes respostas dependendo da intensidade e de acordo com o estágio de desenvolvimento em que essa condição ocorre. Ainda, a herdabilidade dessa característica é baixa e existe características secundárias que influenciam a resposta das plantas. Esses fatores fazem com que o melhoramento para tolerância ao déficit hídrico seja uma atividade muito difícil. Assim, o entendimento da base molecular da tolerância ao déficit hídrico pode ser aplicado efetivamente para auxiliar os melhoristas no desenvolvimento de plantas com maior tolerância. Dessa forma, é necessária a identificação de mecanismos e genes associados a resposta ao déficit hídrico. Um grande número de genes associados a resposta ao déficit hídrico já foi identificado, no entanto, o mecanismo de tolerância ainda não é claro.

A autofagia é um processo no qual componentes celulares são transportados para o vacúolo para degradação e reciclagem. Essa reciclagem é fundamental para manutenção da homeostase celular, e também é ativada sob

condições de estresses bióticos e abióticos, quando as células das plantas precisam degradar e reciclar componentes danificados. Diferentes estudos têm apontado a autofagia como um mecanismo de resposta a diferentes estresses e discutido sua importância para o melhoramento de plantas. Os genes que controlam a autofagia (*ATG*) foram inicialmente identificados em leveduras e posteriormente em animais e plantas. Dessa forma, o estudo do perfil transcricional de genes *ATGs* pode levar a evidências da associação da autofagia com a resposta ao déficit hídrico em milho, podendo ser uma rota alvo potencial para o melhoramento.

Outra questão relevante a ser considerada no melhoramento para tolerância ao déficit hídrico em milho é a variabilidade genética, já que a maior parte do milho cultivado é híbrido. Os híbridos disponíveis para cultivo apresentam alta produtividade se cultivados em condições ideais de adubação, irrigação e manejo fitossanitário. Por outro lado, se as condições ambientais não são favoráveis, como por exemplo, com escassez de água, o alto rendimento do híbrido não será alcançado. Dentro desse contexto, fica evidente a necessidade de conservação de variedades de milho crioulo (*landraces*) e sua utilização no desenvolvimento de linhagens promissoras para obtenção de híbridos com maior tolerância a estresses ambientais. Assim, estudos de caracterização de variedades crioulas buscando delinear a resposta ao déficit hídrico é fundamental no melhoramento de milho.

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo caracterizar a resposta de plântulas de milho sobre condição ao déficit hídrico e avaliar o perfil transcricional de genes *ATG* em plântulas submetidas a essa condição.

2. Revisão de Literatura

2.1 Classificação e caracterização botânica

O milho é uma espécie vegetal pertencente à família Poaceae, do gênero *Zea* e espécie *Zea mays*, sendo taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. subsp. *mays*, visto que é da mesma espécie do seu parente silvestre mais próximo o teosinto (*Zea mays* subsp. *parviglumis*, (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Estudos reconhecem a existência de cinco espécies pertencentes ao gênero *Zea*, sendo elas *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* e *Zea mays* L. A espécie *Zea mays* apresenta as subespécies *Zea mays* L. subsp. *huetenangensis*, *Zea mays* L. subsp. *mexicana*, *Zea mays* L. subsp. *parviglumis* e *Zea mays* L subsp. *mays* (BUCKLER; STEVENS, 2006).

A espécie *Zea mays* L. subsp. *mays* é caracterizada como diploide com $2n = 2x = 20$ cromossomos, apresenta plantas monoicas o que confere alogamia (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987). O milho é planta anual, estival, ereta, com baixo afilamento, classificada no grupo das plantas C-4, com ampla adaptação a diferentes condições de ambiente. Para apresentar o seu máximo potencial produtivo, a cultura requer temperatura alta (24 e 30°C), radiação solar elevada e adequada disponibilidade hídrica do solo (SILVA, 2009).

O milho apresenta sistema radicular fasciculado com presença de raízes adventícias, a altura de planta varia de 1 a 4 metros, o colmo é cilíndrico e ereto, sem ramificações e com folhas completas expostas de forma alternada, com presença de lígula e aurícula, e os limbos foliares são longos, largos e planos (GOODMAN; SMITH, 1987). A inflorescência masculina recebe o nome popular de pendão, é composta de um eixo central e com várias ramificações laterais, posicionada na extremidade apical da planta. A inflorescência feminina é denominada espiga, e se origina de um colmo com entrenós mais condensados, onde a flor é parcialmente envolvida por lema e pálea. As flores são pequenas e apresentam um pistilo funcional com um único ovário basal e estigmas longos que são expostos para a polinização. A ráquis é formada pelo arranjo polístico das espiguetas muito adensadas (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Os grãos são frutos caracterizados como cariopse (tegumento da semente totalmente ligado ao pericarpo), constituídos por 85% endosperma,

10% embrião e 5% pericarpo. Na semente, o embrião está posicionado em uma depressão da face superior do endosperma perto da base do grão (GOODMAN; SMITH, 1987).

2.2 Importância do milho no México

O México é considerado o centro de origem, domesticação e diversidade do milho (*Zea mays L.*). No país, o milho é um dos cereais mais importantes, fornecendo nutrientes para os seres humanos e animais, sendo uma matéria-prima básica da indústria. É uma cultura representativa do México por sua importância econômica, social e cultural. Sua produção é dividida em branco e amarelo, onde o milho branco é destinado principalmente ao consumo humano, enquanto a produção de milho amarelo é destinada à indústria ou à fabricação de alimentos para a produção animal.

A produção de milho em 2017 foi de 27,8 milhões de toneladas, enquanto a área plantada no mesmo ano foi de 7,5 milhões de hectares. Boa parte do território nacional é propício à produção de milho. Os principais estados produtores são Sinaloa (22%), Jalisco (14%), México (8%), Michoacan (7%), Guanajuato (6%), Guerrero (5%), Vera (5%), Chiapas (5%), Chihuahua (4%), Puebla (4%) e os demais estados representam o restante (20%). O México ocupa o oitavo lugar na produção mundial de milho, e em 2017 exportou o cereal para 17 países, Venezuela (58%), Quênia (33%) e Estados Unidos (4%), entre outros (6%) o que coloca o país como o 10º exportador mundial de grãos de milho (SIAP, 2017).

Parte da produção nacional de milho ocorre por agricultura de subsistência (SANCHEZ, 2016). Contribuindo significativamente para a segurança alimentar dos mais pobres estratos rurais. É nesse sistema que as variedades crioulas são selecionadas, produzidas, conservadas, diversificadas e domesticadas de acordo com as necessidades das populações locais (TURRENT et al., 2012). A cada dia, a variabilidade de milho aumenta, primeiro pela polinização natural, e também porque é uma prática milenar que os agricultores, ano após ano, mantêm, trocam e experimentam suas próprias sementes.

Em termos de rendimento, as variedades melhoradas mostraram-se significativamente superiores às nativas, mas os pequenos produtores geralmente preferem suas variedades locais. Isso se deve a algumas vantagens identificadas nas variedades crioulas, que são em grande parte semeadas nas áreas com condições edafoclimáticas mais limitadas (TURRENT et al., 2012).

2.3 Importância do milho no mundo e no Brasil

O milho é um dos cereais de maior importância na economia mundial, que se caracteriza pelas diferentes formas de utilização, que vai desde a alimentação humana, animal até a sua utilização na indústria de alta tecnologia. O uso deste cereal na alimentação animal representa cerca de 70% da produção mundial. É um dos principais cultivos agrícolas no mundo, com uma complexa cadeia agroindustrial. A área mundial cultivada na safra 2016/2017 foi de aproximadamente 177 milhões de hectares, com produção de 970 milhões de toneladas de grãos, obtendo média de produtividade 5,65 toneladas por hectare. Os maiores produtores deste cereal são os Estados Unidos, China e Brasil, os quais são responsáveis por cerca de 67% da produção mundial (FAOSTAT, 2019).

O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor mundial e segundo maior exportador de milho na safra agrícola 2015/2016, com área semeada de 16,2 milhões de hectares, atingindo produção de 84,0 milhões de toneladas e produtividade média de 5,19 toneladas por hectare (CONAB, 2016). Na região Sul o principal estado produtor de milho é o Paraná. O estado do Rio Grande do Sul, na safra 2015/2016 semeou em média uma área de 823 mil hectares, obtendo produção total de 5,8 milhões de toneladas, sendo a produtividade média de 7,16 toneladas por hectare (CONAB, 2016).

O milho também tem relação com aspectos sociais e culturais, representando a base da sustentabilidade para muitas famílias rurais. Em nível nacional, do total de agricultores que cultivam milho, 30,8% cultivam menos de um hectare, o que representa 1,89% da produção (CRUZ et al., 2016). Estes índices demonstram que a conservação e o uso sustentável dos recursos da agrobiodiversidade são estratégias fundamentais para a produção de alimento para muitas comunidades de agricultores (MUNARINI, 2013). Ainda, esta estatística revela a necessidade

de atenção especial com a conservação das variedades crioulas, que detém variabilidade genética, base do melhoramento do milho.

As variedades de milho crioulas são cultivadas por comunidades como povos indígenas e agricultores familiares, as quais normalmente são submetidas à seleção para características relacionadas à produção (TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, a cultura do milho ainda envolve outros fatores de importância econômica que ainda não são mensuráveis, como o valor genético das variedades crioulas, também denominadas de locais ou tradicionais. Essas variedades podem ser usadas para o desenvolvimento de novas combinações mais adaptadas aos diferentes locais de cultivo devido ao resgate de genes associados as características de interesse. Ainda, apresenta importância com relação ao valor da conservação e do uso dos genótipos pelos povos de classe social mais humilde, e a confiável forma de produzir alimento sob condições adversas de clima e solo (SHIOGA et al., 2001).

2.4 Genética e melhoramento do milho

Em especial para a cultura do milho, o melhoramento tem sido responsável por incrementos espetaculares de rendimento, principalmente pela exploração do fenômeno da heterose, fator este bastante expressivo nas plantas alógamas (SILVA, 2010). Até meados de 1930 o processo de melhoramento das variedades de polinização aberta estava sendo ineficiente para aumentar a produtividade. Shull (1908) reportou que linhas endogâmicas de milho apresentavam deterioração no vigor e na produtividade, mas os híbridos oriundos dessas linhas endogâmicas se recuperavam imediatamente e completamente, e em muitos casos excedia a produtividade das variedades das quais as linhas endogâmicas tinham se originaram. Ao mesmo tempo East (1936) identificou o efeito deletério da autofecundação. A produção de híbridos simples seria um método de melhoramento altamente impactante na produtividade do milho, mas as linhas endogâmicas apresentavam baixa produtividade, o que dificultava o processo de produção de sementes. Jones (1926, 1965) propôs o desenvolvimento de híbrido duplo, oriundo do cruzamento de dois híbridos simples, resultando em alta produção de semente. Híbridos duplos são mais variáveis que híbridos simples, porém menos variáveis que

variedades de polinização aberta. Devido à alta produtividade dos híbridos, nos Estados Unidos houve a substituição das variedades de polinização aberta por híbridos de forma muito rápida. De acordo com Borém (2001), o Brasil foi o segundo país a utilizar híbridos comercialmente, o que causou um aumento de 75% na produtividade de grãos em relação a cultivares utilizadas anteriormente. Com o melhoramento das linhagens se obteve um aumento na produtividade do híbrido simples (alta quantidade de sementes) e esse tipo de híbrido passou a ser utilizado majoritariamente.

Embora a maior parte do milho cultivado no mundo seja híbrido, alguns agricultores cultivam variedades de polinização aberta melhoradas e variedades crioulas. Para o melhoramento de populações com os objetivos de desenvolver linhagens endogâmicas ou obter variedades de polinização aberta, o melhorista tenta identificar os indivíduos geneticamente superiores ou mais adaptados. A seleção, por sua vez, é mais efetiva quando age sobre caracteres de alta herdabilidade e que tenham alguma associação com a produção ou outro caráter de importância econômica (PEREIRA, 1985). Entre os métodos de seleção utilizados no milho pode-se citar a seleção massal, seleção com teste de progênies, seleção recorrente para capacidade geral de combinação, seleção recorrente para capacidade específica de combinação, seleção recorrente recíproca, seleção recorrente em famílias de meios irmãos e seleção recorrente em famílias de irmãos completos (PINTO, 1995).

De um modo geral, as populações crioulas são menos produtivas que híbridos. No entanto, são extremamente importantes por constituírem fonte de variabilidade genética para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas em programas de melhoramento e na busca por genes associados a tolerância e/ou resistência a fatores abióticos e bióticos (ARAUJO; NASS, 2002).

2.5 Déficit hídrico

O déficit hídrico resulta da disponibilidade insuficiente de água no solo para atender à demanda de uma planta em determinado momento, resultando em uma mudança no status da água da planta. Essa condição envolve tanto a capacidade do sistema radicular de fornecer água para a parte aérea quanto a taxa de transpiração da planta (TARDIEU et al., 2018).

A condição de déficit hídrico altera muitos processos fisiológicos, como transpiração, fotossíntese, crescimento de folhas e raízes e desenvolvimento do sistema reprodutivo. Também impacta processos fisiológicos subjacentes, como a divisão celular, a mecânica da parede celular, o metabolismo primário e secundário e a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. Vários hormônios estão envolvidos na sinalização, como o ácido abscísico – ABA (principal), etileno, citocininas, estrigolactonas e ácido jasmônico. Por fim, o controle molecular envolve mudanças na expressão de fatores de transcrição, no silenciamento de genes por RNA interferente e no status da cromatina (TARDIEU et al., 2018).

A abertura estomática facilita a entrada de CO₂ para carboxilação, porém pode levar a desidratação dos tecidos vegetais. Então, para evitar o aumento da transpiração ocorre o fechamento dos estômatos. O fechamento estomático é benéfico para manutenção de água nos tecidos, porém pode levar a deficiência de CO₂ para o processo fotossintético, assim o controle é bastante rigoroso quando as plantas estão sob condição de déficit hídrico. O fechamento estomático é sinalizado pelo ABA (CHRISTMANN et al., 2007).

A condutância hidráulica do xilema é muito alta em comparação com a dos tecidos vivos, portanto o xilema pode ser considerado um órgão de conexão entre raízes, caules e folhas. A condutância hidráulica da planta é determinada pelas propriedades de transferência de água dos tecidos vivos nas raízes e folhas e não no xilema. A demanda por evaporação e taxa de transpiração tendem a aumentar a condutância hidráulica da planta inteira, causando assim a estabilização do potencial da água da parte aérea contra as flutuações da demanda evaporativa. Da mesma forma, o ABA tende a aumentar a condutância hidráulica das raízes, diminuindo a das folhas que transpiram. Isso ajuda os órgãos localizados entre esses dois limites da planta a manter um potencial hídrico mais próximo ao das raízes do que ao das folhas que transpiram. Proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIPs), pertencentes à família das aquaporinas, são fundamentais neste controle de sinais ambientais via acúmulo de transcritos ou proteínas e a fosforilação de PIPs. Existe uma grande variabilidade genética para a condutância hidráulica das plantas, mas ainda são necessárias explorações genéticas sistemáticas para estimar se as modulações

da condutividade hidráulica da planta podem ser exploradas no melhoramento para melhor desempenho da planta sob condições de seca (TARDIEU et al., 2018).

As células mostram homeostase parcial para o turgor devido ao ajuste osmótico. Essa homeostase de turgescência é obtida por meio do rápido acúmulo ou captação de solutos que diminuem o potencial osmótico de água da célula sempre que o potencial de água da célula diminui. Como o potencial da água do órgão (negativo) é a soma do turgor (positivo) e o potencial osmótico (negativo), uma diminuição no potencial osmótico resulta na manutenção do turgor da célula mesmo que o potencial da água diminua. No entanto, processos como o crescimento ou a fotossíntese permanecem afetados pelo déficit hídrico mesmo quando o turgor das células foliares é mantido via ajuste osmótico (BOUCHABKE et al., 2006). Isso explica porque a variabilidade genética na capacidade de ajuste osmótico das plantas, muitas vezes não se correlaciona com as consequências do déficit hídrico no crescimento e rendimento das plantas.

A taxa de transpiração das plantas depende principalmente da área foliar, que é fortemente afetada pelo déficit hídrico via processos de crescimento. A redução da expansão da folha pode afetar grandemente a taxa de transpiração, economizando água para outras fases do ciclo da planta e reduzindo o gradiente de potencial hídrico entre raízes e folhas. Diferentemente do fechamento estomático que causa o aquecimento das folhas, a redução da área foliar não está associada ao risco de estresse térmico (TARDIEU et al., 2018).

Quando o solo seca, o crescimento das plantas é afetado com mais intensidade do que a fotossíntese, devido à resiliência do aparato fotossintético ao déficit hídrico. Como consequência, as plantas cultivadas sob déficit hídrico frequentemente contêm excesso de carbono, e as raízes e os órgãos reprodutivos apresentam uma limitação de dreno e não de fonte, o que pode ser interpretado como um mecanismo para evitar a carência de carbono (BLASING et al. 2005). Isso não significa que não há problemas na aquisição de carbono pelas plantas sob déficit hídrico, pois o fechamento estomático e a redução da área foliar impactam negativamente a captura de CO₂.

O ciclo curto da planta é uma característica positiva sob déficit hídrico, mas afeta negativamente o acúmulo e a produção de biomassa. Regiões genômicas associadas às variações de rendimento sob condições déficit hídrico também controlam o tempo de floração, com efeitos positivos ou negativos sobre o rendimento, dependendo das condições ambientais (MACCAFERRI et al. 2008).

A maioria das espécies mostra uma alta sensibilidade ao déficit hídrico na floração, o que afeta o número de grãos por planta, como observado em milho e trigo. O aborto de grãos é decorrente da esterilidade masculina ou feminina ou da competição de carbono nas fases iniciais do seu desenvolvimento. Esse evento causa perda maciça de rendimento sob déficit hídrico, mas é um processo adaptativo que permite que as plantas produzam algumas sementes viáveis apesar da redução na oferta de carbono. Assim, a baixa taxa de aborto é um dos principais alvos do melhoramento para tolerância a déficit hídrico (TARDIEU et al., 2018).

A domesticação e o melhoramento levaram à redução do tamanho do sistema radicular em comparação com ancestrais do tipo selvagem ou variedades nativas. Provavelmente isto ocorreu devido ao custo metabólico do crescimento e manutenção das raízes. O melhoramento para tolerância à seca no milho levou ao desenvolvimento de plantas com sistemas radiculares limitados, possivelmente porque o processo de melhoramento foi executado em solos rasos. Várias espécies tendem a diminuir o tamanho do sistema radicular sob déficit hídrico, por supressão parcial ou total das raízes iniciadas a partir de nós basais abaixo do solo. Por outro lado, o efeito positivo do enraizamento profundo ou vigoroso depende do condicionamento climático. Em situações onde a água está presente na semeadura e não há mais chuva ou irrigação durante a época de cultivo, pode ser desejável reduzir o consumo de água nos estádios iniciais para garantir a disponibilidade de água em estádios posteriores (MACCAFERRI et al. 2008).

Outra adaptação é o fenótipo *stay-green* (senescência retardada), que mantém a fotossíntese eficiente por um período mais longo, promovendo assim acúmulo de biomassa. A senescência retardada sob déficit hídrico pode ser modificada por meio do metabolismo das citocininas (DUVICK, 1992;

GENCHEV, 1993; SMART, 1993; WALULU et al., 1994). O fenótipo *stay-green* também pode ser consequência do baixo consumo de água durante a fase vegetativa em plantas com perfilhamento reduzido e menor tamanho de folhas, resultando no aumento da disponibilidade de água durante os estádios finais do ciclo da planta. Este fenótipo também pode resultar do aumento do crescimento radicular em solos profundos, o que sugere um controle genético comum para o fenótipo *stay-green* e arquitetura de raiz (TARDIEU et al., 2018).

2.6 Estresse ocasionado por déficit hídrico na germinação de sementes de milho

A tolerância às condições de déficit hídrico é variável dependendo do estágio de desenvolvimento da cultura. No entanto, é importante também a identificação precoce de genótipos que apresentem tolerância a este estresse, o que justifica o seu estudo mesmo durante o processo de germinação (TAIZ; ZEIGER, 2006). Nesta fase inicial de desenvolvimento, ocorre uma série de reações de hidrólise e síntese de substâncias e tecidos, as quais exigem plena disponibilidade de água.

Além de mediar os processos metabólicos do desenvolvimento, a água é responsável pela manutenção da organização do sistema de membranas celulares (NEVES et al., 2010). O processo de germinação inicia-se com a absorção de água e a embebição acompanha um padrão trifásico. A velocidade da embebição depende da superfície de contato entre a semente e a água, das condições físicas das sementes, da temperatura e da pressão hidrostática (CARVALHO, 2000). Déficit hídricos durante o processo de germinação podem impedir que está aconteça, alterar sua velocidade, tempo e uniformidade, comprometendo o estabelecimento da cultura. Deficiências posteriores poderão paralisar o crescimento, bem como retardar o desenvolvimento reprodutivo das plantas. Entretanto, os níveis de respostas em relação a essas variáveis dependem tanto do grau do déficit hídrico quanto da tolerância do genótipo (KRANNER et al., 2010).

A capacidade da semente para germinar sob amplo limite de condições é definida com a manifestação do seu vigor, dependendo, dentre outros fatores, das condições ambientais encontradas no local em que é semeada (SIMONI et

al., 2011). Um dos vários procedimentos utilizados na determinação do vigor é submeter as sementes ao estresse osmótico em condições de laboratório, uma vez que sementes com maior vigor seriam mais tolerantes às condições de estresse de déficit hídrico criadas no substrato (SANTOS et al., 1996). Em laboratório, situações de estresse hídrico podem ser simuladas utilizando diversas soluções osmóticas. Dentre estas, pode-se citar o polietileno glicol [HOCH₂ (6CH₂CH₂) N OH], um composto quimicamente inerte e não tóxico, que é usado em quantidades específicas, como agente osmótico para simular condições de déficit hídrico (PARMAR; MOORE, 1968).

2.7 Estresse ocasionado por déficit hídrico no desenvolvimento do milho

O milho é uma cultura de primavera-verão, semeada nos meses de outubro a janeiro, que nas condições climáticas do Sul do Brasil, só costuma expressar seu pleno potencial produtivo em condições de disponibilidade de água. A absorção de água, o transporte e a transpiração são função da evapotranspiração potencial, da maior ou menor resistência dos estômatos, da difusão do vapor de água, da retenção de umidade que o solo tem disponível e da densidade de raízes que a planta apresenta.

A planta absorve água para suprir a sua necessidade em nutrientes e controlar sua temperatura através da transpiração. Da totalidade da água absorvida pela planta, apenas cerca de 1% é retida. Quando a disponibilidade hídrica é baixa, devido à pouca quantidade de água no solo ou devido à elevada transpiração (o que sucede nas horas do dia de temperaturas mais elevadas) a planta ativa mecanismos fisiológicos que permitem uma redução da perda de água, como por exemplo, fechamento dos estômatos ou alteração do ângulo foliar com consequente redução da incidência de raios solares, fazendo com que não se realize fotossíntese na mesma intensidade e, portanto, prejudicando a produção de biomassa (PEREIRA et al., 2008).

A necessidade total de água para a cultura do milho depende de diversos fatores, tais como capacidade de retenção de água do solo, duração do ciclo do genótipo, da evapotranspiração e da precipitação ocorrida durante o ciclo (CARVALHO, 2000). O período de maior sensibilidade à deficiência hídrica é no florescimento feminino, quando o déficit hídrico compromete grandemente a

produção final (BÄNZIGER et al., 2000). Ainda, pode ocorrer a inibição do florescimento, falhas na fertilização e aborto dos embriões (WESTGATE, et al., 1994). O acúmulo de matéria seca nos grãos está diretamente relacionado com a fotossíntese e uma vez que esse processo é afetado pela limitação hídrica, a assimilação de carboidratos torna-se prejudicada, resultando em menor acúmulo de matéria seca nos grãos (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Cultivares de ciclos precoce e superprecoce apresentam menor consumo de água que cultivares de ciclo tardio. A planta exige um mínimo de 350 a 500 mm de precipitação e seu consumo diário raramente excede 3 mm até o estádio de sete folhas. Durante os estádios reprodutivos, pode atingir 10 mm, principalmente sob altas temperaturas, (BOYLE; BOYER; MORGAN, 1991). A disponibilidade de água é função direta do desenvolvimento do sistema radicular e outros mecanismos, como maior relação entre raiz e parte aérea, pequeno tamanho de células, cutícula foliar ou ângulo foliar, ajuste osmótico, comportamento e frequência estomática, acúmulo de metabolitos intermediários e resistência à desidratação das células, que conferem maiores graus de tolerância a déficit hídrico (BERGONCI et al., 2000).

2.8 Variabilidade genética em milho

Estudos arqueológicos no vale do Tehucan relatam que os primeiros cultivos de milho ocorreram por volta de 7000 a.C (BERTOLINI et al., 2009). Algumas teorias foram desenvolvidas com intuito de elucidar o surgimento desta espécie, sendo estas baseadas em estudos moleculares e de distância genética, onde revelaram que o milho é descendente da espécie *Zea mays* subsp. *parviglumis* (DOEBLEY, 2004), conhecido popularmente como teosinto.

Devido a variabilidade genética do milho o melhoramento permitiu o surgimento de novas combinações alélicas. Durante os vários ciclos de cultivo, as seleções involuntárias e ou direcionadas, resultaram no aumento da frequência de alelos favoráveis para as características agrônômicas (GARBUGLIO et al., 2009).

A maior parte da variabilidade genética do milho se encontra nos bancos de germoplasma e nas variedades crioulas. O conhecimento da variabilidade genética entre os acessos do programa de melhoramento proporciona com

maior segurança o trabalho com grupos heteróticos (PADILHA; 2002). De acordo com Hallauer e Miranda-Filho (1981) grupos heteróticos podem ser definidos como “germoplasmas que, quando avaliados em combinações híbridas exibem superioridade consistente, geralmente resultante da heterose” a qual depende diretamente da variabilidade genética.

Atualmente, a grande importância dos estudos de variabilidade genética se dá em função da preocupação que ocorre com a erosão genética, a qual diminui a variabilidade populações, decorrente da substituição das antigas variedades por formas genotípicas uniformes (GORGULHO,2001). As análises de variabilidade visam a identificação de genitores para a formação de populações com boa variabilidade e conseqüente ganho genético em ciclos sucessivos de seleção. O milho possui uma enorme variabilidade genética disponível, mas que ainda necessita de uma adequada avaliação e estudos para sua efetiva utilização no melhoramento (PATERNIANI, 1980).

2.9 Expressão gênica

A expressão gênica é um processo pelo qual a informação contida em um gene é transformada em outras estruturas presentes em um determinado tipo celular, seja um RNA ou uma proteína. Em organismos multicelulares a expressão gênica regula processos fundamentais para o desenvolvimento embrionário e a diferenciação ao ser responsável pela resposta do indivíduo frente a cada condição ambiental (SANTOS, 2017). Em eucariotos, a regulação da transcrição é mediada por fatores de transcrição (FT) que reconhecem e se ligam em elementos regulatórios cis (CRE), que são sequências curtas presentes na região promotora dos genes. Os FT interagem com os CRE, outros FT e com o maquinário basal para regular a expressão de genes alvo (FINATTO et al., 2018)

Em condições adversas as mudanças são primariamente percebidas por um receptor e depois transmitida para o núcleo por uma complexa rede de interações entre proteínas e mecanismos bioquímicos e moleculares. A análise da função de genes induzidos por estresses abióticos é uma ferramenta importante não só para entender o mecanismo molecular de tolerância a

estresses das plantas, mas também para melhorar a tolerância a estresses das culturas pela manipulação gênica.

Existem diferentes técnicas para estudo da expressão gênica, ou seja, para identificar genes envolvidos na resposta a diferentes estresses. São exemplos as técnicas de Northern blot, RNase protection assay (RPA), differential display of mRNA by PCR (DD-PCR), serial analysis of gene expression (SAGE), RNA arrays, real-time quantitative PCR (qPCR), e high-throughput sequencing or next-generation sequencing (RNASeq) (MOUSTAFA; CROSS, 2016).

Quando se busca identificar genes associados a determinada condição adversa se utiliza ferramentas como RNA arrays ou RNASeq, que são estratégias que permitem a identificação de um grande número de genes. No entanto, quando se quer investigar o perfil transcricional de genes específicos pode-se utilizar ferramentas como o Real-time PCR (RT-qPCR), também conhecido como PCR quantitativo (qPCR). Esta técnica é uma variação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que revolucionou os métodos de detecção de RNA, pois apresenta alta sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade e quantificação precisa do gene de interesse (MOUSTAFA; CROSS, 2016).

Genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica quando submetidos a períodos de déficit hídrico. A identidade desses genes precisa ser estudada tanto na forma de transcritos (RNA) como proteínas (KUHN et al., 2001). A identificação de genes chave na resposta ao déficit hídrico pode ser útil aos melhoristas de plantas no desenvolvimento de genótipos tolerantes a essa condição.

2.10 Autofagia

A degradação e reciclagem de componentes celulares no vacúolo das células vegetais através da autofagia (auto alimentação) possibilita a manutenção da homeostase celular, desenvolvimento e tolerância a estresses (BASSHAM, 2018; ÜSTÜN et al., 2017). Os produtos da degradação de

proteínas, agregados e organelas inteiras são enviados para o citoplasma para sua reutilização (BASSHAM 2018).

Em plantas foi descrito três tipos de autofagia, a microautofagia (conteúdo citoplasmático reúne-se na superfície do vacúolo e fica preso pela invaginação do tonoplasto), a macroautofagia (conteúdo citoplasmático preso em autofagossomos que transportam a carga para o vacúolo) e mega autofagia (ruptura ou permeabilização do tonoplasto e liberação de hidrolases que degradam o citoplasma, caracterizando a última etapa da morte celular programada) (MARSHALL; RICHARD, 2018). Tem sido demonstrado que a macroautofagia (que será denominada autofagia daqui em diante) tem um papel crítico na adaptação das plantas a estresses ambientais drásticos como deficiência de carbono e nitrogênio, calor, seca, salinidade, estresse oxidativo e estresse osmótico, e na adaptação a estresses bióticos (HAN et al., 2011; SIGNORELLI et al., 2019).

Os mecanismos moleculares que controlam a autofagia foram preservados ao longo do tempo, existindo no genoma de diversos organismos um conjunto de genes, descritos como genes ATGs (*autophagy related*), que foram caracterizados pela primeira vez em leveduras (TSUKADA and OHSUMI 1993). Em plantas tem sido identificado aumento no número de genes das diferentes famílias associadas a autofagia, o que pode incrementar a amplitude e especificidade de suas funções (HAYWARD et al., 2009).

A autofagia divide-se em três processos distintos, tais como, indução, alongamento e maturação, controladas pelos produtos dos genes ATG (DWIVEDI; AHNN 2009). Esse processo se inicia pela formação de uma membrana dupla proveniente do retículo endoplasmático e outras de membranas, denominada fagóforo. O desenvolvimento do fagóforo requer a ação coordenada de proteínas codificadas por genes relacionados a autofagia (ATG). Proteínas ATG participam da indução do fagóforo (ex. ATG1, ATG11 e ATG13), transporte de lipídeos para alargamento da membrana (ex. ATG9), nucleação de vesículas (ex. ATG5, ATG12), e expansão e fechamento do fagóforo (ex. ATG4, ATG8, ATG3 e ATG7) (SIGNORELLI et al., 2019).

O aumento do acúmulo de transcritos de genes *ATG* em resposta a condições ambientais adversas tem sido demonstrado em diferentes espécies

como tomate, pimenta, arroz e trigo, demonstrando que a autofagia é transcricionalmente regulada por estresses abióticos. No entanto, o mecanismo responsável pela indução da transcrição ainda não é conhecido (AVIN-WITTENBERG; 2019).

O silenciamento do gene *ATG18a* resultou na maior sensibilidade de plantas *Arabidopsis thaliana* quando submetidas a condições de salinidade, seca e outros estresses osmóticos (LIU et al., 2009). Por outro lado, a superexpressão de *ATG3* de maçã (*Malus doméstica*) em *A. thaliana* aumentou a tolerância a salinidade e ao estresse osmótico (WANG et al., 2017). Do mesmo modo, a superexpressão de *ATG18a* de maçã em plantas de tomate e maçã aumentou a tolerância ao estresse por seca quando comparado a plantas do tipo selvagem (SUN et al., 2018). Em condições de estresse, a autofagia estimula mudanças rápidas na célula visando a adaptação do seu metabolismo para se proteger contra os danos (KROEMER et al., 2010). Ainda, alguns autores sugerem que a tolerância a estresses está relacionada a autofagia para proteger as células da morte celular programada (WILLIAMS et al., 2015). Esta constatação, evidencia a necessidade e a importância dos genes ATG para as plantas se adaptarem a ambientes desfavoráveis.

Considerando o papel crítico da autofagia no desenvolvimento e nas respostas ao estresse, uma melhor compreensão desse mecanismo em plantas cultivadas pode levar a aplicações agrícolas benéficas (TANG; BASSHAN, 2018). Assim, o estudo do perfil transicional de genes associados a autofagia pode ser uma estratégia interessante para a identificação de genes candidatos para auxiliar o processo de melhoramento de plantas.

3. Material e métodos

3.1 Experimento 1 – Avaliação de variedades de milho submetidas ao estresse por déficit hídrico

O experimento foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, localizado junto à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/RS.

Foram utilizadas duas variedades sintéticas, uma variedade de polinização aberta (VPA), oito variedades crioulas e três variedades híbridas comerciais (Tabela 1). As sementes estavam armazenadas em câmara fria a 16°C até o momento da condução do experimento.

Tabela 1. Variedades de milho utilizadas no experimento.

Variedades	Classificação	Origem
Argentino amarelo	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Argentino branco	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Astequinha	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Branco roxo índio	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Cateto amarelo	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Cunha	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Dente de ouro	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
Taquarão	Crioula	UNAIC - Canguçu/RS
AL 25	VPA	UNAIC - Canguçu/RS
BRS 5202	Sintética	Embrapa Clima Temperado
BRS 473	Sintética	Embrapa Clima Temperado
LG 6302	Híbrido duplo	Agranda - Limagrain Sementes
SHS 5050	Híbrido triplo	Santa Helena Sementes
SHS 7990	Híbrido simples	Santa Helena Sementes

UNAIC – União das Associações comunitárias do Interior de Canguçu/RS.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Estação Clima Temperado

Para cada variedade foram utilizadas 600 sementes, distribuídas em três repetições com quatro subamostras de 50 sementes, para cada tratamento aplicado. Para simular a condição de déficit hídrico foi utilizado Polietilenoglicol

– PEG 6000 em cinco doses crescentes de acordo com a literatura, assim, as sementes foram submetidas aos potenciais osmóticos de 0 (controle); - 0,2; - 0,4; - 0,6; - 0,8 e 1,0 MPa. As sementes foram semeadas uniformemente sobre três folhas de papel Germitest® umedecidas com água destilada (controle) e soluções de PEG 6000, na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel (BRASIL; 2009), mantidas a 25°C e fotoperíodo de 24 horas de luz em câmara de crescimento com parâmetros controlados até o momento das avaliações. Para a primeira contagem de germinação os rolos foram retirados, avaliados e recolocados na câmara até o momento da segunda avaliação.

3.1.1 Avaliações de plântulas

As avaliações foram efetuadas no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, com a finalidade de determinar os seguintes caracteres.

Germinação: A primeira contagem do teste de germinação foi realizada quatro dias após a semeadura considerada, como um teste de vigor, a segunda contagem aos sete dias após a semeadura, ambas expressas em porcentagem. Foram consideradas germinadas plântulas normais com extensão radicular igual ou superior a 2 mm e comprimento de parte aérea mínimo de 0,3 mm, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL; 2009).

Avaliação de parte aérea e sistema radicular: Aos sete dias após a semeadura, concomitante a segunda contagem de germinação, foram selecionadas dez plântulas de cada subamostra para a avaliação dos comprimentos de parte aérea e raiz, expressos em centímetros, obtidos com auxílio de régua graduada.

Massa fresca de parte aérea e raiz: logo após a mensuração do crescimento, as plântulas avaliadas foram separadas em parte aérea (PA) e raiz (R) e foram pesadas em balança de precisão para a obtenção de massa fresca, expressa em miligramas.

Massa seca de parte aérea e raiz: após a obtenção da massa fresca, as plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel, devidamente identificados, e transferidas para estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, até obtenção de massa constante para determinação da massa seca, expressa em miligramas, obtida em balança de precisão.

3.1.2 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos e posterior análise da variância em esquema fatorial para a verificação da diferença estatística significativa entre as variedades avaliadas e os tratamentos aplicados, bem como a interação tratamento x variedade. Após, se procedeu o desmembramento da interação em um teste de Tukey para a comparação entre as médias das variedades e análise de regressão polinomial para a verificação do efeito dos diferentes tratamentos sobre as variáveis em estudo. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando 5% de probabilidade de erro e executadas no software estatístico SAS (SAS, 2000). Os gráficos foram realizados no software SigmaPlot (KORNBROT, 2000).

3.2. Experimento 2 – Avaliação de expressão de genes associados a autofagia em milho sob condição de déficit hídrico

3.2.1 Material vegetal

Um estudo preliminar foi desenvolvido buscando identificar qual potencial osmótico é indicado para a discriminação de variedades de milho sob condição de déficit hídrico. Para isso foram germinadas sementes de milho de diferentes variedades (Taquarão, Dente de Ouro, Argentino Branco, Argentino Amarelo, Cateto Amarelo e BRS 473) nos potenciais osmóticos 0, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8 e 1.0 MPa, utilizando polietilenoglicol – PEG 6000. O potencial osmótico que possibilitou a discriminação de variedades foi o -0.2 MPa.

Posteriormente, sementes de milho das variedades Taquarão e Argentino Amarelo, que são as mais cultivadas na região Sul do Brasil, foram germinadas sob potencial osmótico de 0 MPa (controle) e -0.2 MPa (déficit hídrico). Como substrato foram utilizadas três folhas de papel do tipo Germitest[®] embebidas com água (0 MPa) e com solução de PEG (-0.2 MPa), utilizando quantidade de líquido equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 2 variedades (Taquarão e Argentino Amarelo), 2 tratamentos (0 MPa e -0.2 MPa) e 3 repetições biológicas, com 50 sementes em cada repetição.

Os substratos com as sementes foram mantidos em câmara de germinação, a 25°C durante 7 dias, quando parte das plântulas foi caracterizada morfológicamente e a parte restante foi fixada em N líquido para extração de RNA. Plântulas da condição 0 MPa receberam água novamente no quarto dia.

3.2.2 Caracteres morfológicos

As características morfológicas comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, peso seco de parte aérea e peso seco de raiz foram mensuradas em plântulas germinadas na condição controle (0 MPa) e déficit hídrico (-0.2 MPa). A massa seca foi determinada depois que os comprimentos da parte aérea e raiz foram estimados. Para a massa seca, partes aéreas foram separadas das raízes e ambas foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de ar forçado a 80°C por 72 h. As amostras foram pesadas em balança analítica com precisão de 0.001 g.

Considerando que as variedades estudadas apresentam características intrínsecas de desenvolvimento, para avaliação do efeito do déficit hídrico nas características morfológicas foi calculado o desempenho relativo. Para o cálculo, o controle foi utilizado como valor absoluto de 100%, de acordo com a equação:

$$DR \text{ variável} = (\bar{x} \text{ variável em } -0.2 \text{ MPa} / \bar{x} \text{ variável em } 0 \text{ MPa}) * 100$$

3.2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

Após o período estabelecido de déficit hídrico as amostras de parte aérea e raiz de plântulas de milho foram coletadas, fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA. O RNA total foi extraído de 2 g de tecido vegetal fresco da parte aérea e de raízes utilizando Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A quantidade de RNA foi verificada em espectrofotometria e a qualidade por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen), e reações de PCR controle utilizando RNA não convertido em cDNA foram também realizadas para confirmar a ausência de DNA genômico. Cada amostra (1 µg) foi convertida em cDNA usando oligo (dT) com o kit comercial SuperScript[®] III first-strand system for RT-PCR (Invitrogen).

3.2.4 Análise de PCR em tempo real

O experimento de RT-qPCR foi realizado de acordo com o manual MIQE (Bustin et al. 2009) usando oligonucleotídeos para os genes *ZmATG8a*, *ZmATG8b*, *ZmATG8c*, *ZmATG8d*, *ZmATG8e* e *ZmATG12* (Li et al., 2015) e três genes de referência *ZmUBC* (Li et al., 2015), *Zm β ACT* (Zhang et al., 2018) e *ZmGAPDH* (Zhang et al., 2017).

Os experimentos de validação foram realizados utilizando quatro diluições de cDNA visando determinar a eficiência de amplificação e a especificidade de cada oligonucleotídeo. Foram utilizados oligonucleotídeos que apresentaram eficiência e 90 a 110% e com apenas um pico na curva de dissociação. Os ensaios de expressão gênica foram conduzidos no termociclador Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system usando SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Três replicatas biológicas independentes de cada amostra e três replicatas técnicas de cada replicata biológica foram usadas para a análise em RT-qPCR. A quantificação foi conduzida de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen 2001).

3.2.5 Normalização dos dados de expressão

Neste estudo foram testados três genes de referência, *Zm β ACT*, *ZmGAPDH* e *ZmUBC*. Os dados de expressão foram submetidos à análise de estabilidade no software DataAssist™ v3.0 Software (Applied biosystems). Após análise os genes *Zm β ACT* e *ZmGAPDH* apresentaram valores de score abaixo de 1.0 e foram utilizados para normalizar os dados de expressão dos genes alvo ATG.

4. Resultados e discussão

4.1 Experimento 1 – Avaliação de variedades de milho submetidas ao estresse por déficit hídrico

De acordo com a análise da variância, pode-se observar que houve interação entre as variedades e os diferentes potenciais osmóticos para as variáveis primeira contagem de germinação, porcentagem de germinação, massa fresca de raiz e massa seca de raiz (Tabela 2).

As demais variáveis analisadas apresentaram diferença significativa somente em relação aos diferentes potenciais osmóticos, com exceção do comprimento de raiz, que apresentou diferença também entre as variedades utilizadas.

Tabela 2.Resumo da análise da variância para oito características agronômicas em quatorze variedades de milho.

FV	QM Variedade	QM Dose	QM Variedade*dose	QM Erro	CV (%)
GL	13	5	65	252	
G%	3539,291*	10306,14*	213,066*	125,1329	13,41
PCG	3445,009*	56223,21*	267,306*	173,237	23,34
MSR	248,209*	7178,029*	172,38*	86,566	47,03
MSP	24,13256 ^{ns}	3847,316*	32,983 ^{ns}	32,983	48,16
MFR	7153,244*	2644,16*	408433,4*	1523,702	33,50
MFP	6820,042 ^{ns}	471993,9*	1020,549 ^{ns}	1081,391	37,55
CR	31,104*	908,307*	3,310 ^{ns}	4,754	26,48
CPA	0,740 ^{ns}	296,342*	0,426 ^{ns}	0,653	30,85

* Significativo ($p \leq 0,05$). QM – Quadrado médio; GL – Graus de liberdade; G – germinação (G%); PCG – Primeira contagem de germinação (%); MSR – Massa seca de raiz (mg); MSP – Massa seca de plântula (mg); MFR – Massa fresca de raiz (mg); MFP – Massa fresca de plântula (mg); CR – Comprimento de raiz (cm); CPA – Comprimento de parte aérea (cm).

As variedades apresentaram diferença significativa entre si quando expostas a diferentes potenciais osmóticos (Tabela 3). Para a primeira contagem de germinação (vigor) e porcentagem de germinação total, a variedade BRS 473 está entre as que apresentaram as menores médias em todos os potenciais osmóticos, mostrando que a mesma possui dificuldades no desenvolvimento inicial, mais precisamente, na fase de embebição, quando exposta a estresse por déficit hídrico. Os déficits hídrico e salino influenciam a expressão do vigor das sementes, este pode ser observado através do crescimento de plântulas, ou seja, sementes mais vigorosas originam plântulas maiores, em função da maior capacidade de suprimento de reservas dos tecidos de armazenamento e da maior incorporação destes pelo eixo embrionário (DAN et al., 1987).

Para ocorrer germinação homogênea, é primordial que as sementes atinjam um nível adequado de hidratação durante a fase de embebição de água, a qual é necessária para promover a reativação dos processos metabólicos na semente, permitindo assim o crescimento do eixo embrionário. O fluxo de água durante a embebição se dá pela diferença de potencial hídrico ($\Psi_{\text{osmótico}} + \Psi_{\text{mátrico}} + \Psi_{\text{pressão}}$) entre a semente e o ambiente externo, os quais tendem ao equilíbrio. Assim, quanto maior a diferença de potencial entre eles mais rapidamente ocorrerá o processo de embebição. Devido a isso, sementes submetidas a estresse por déficit hídrico severo precisam de um período maior para ajustar o potencial osmótico interno de acordo com o ambiente externo (SANTARÉM et al., 1996). As respostas mais comuns das plantas à redução do potencial osmótico são um atraso na germinação inicial e uma redução na taxa e na germinação total, ocasionando desuniformidade na germinação e problemas de estabelecimento de estande (QUEIROZ et al., 2019). O potencial osmótico altamente negativo pode afetar a absorção de água das sementes, tornando a germinação impossível (MENESES et al., 2011).

As variedades Argentino Amarelo, Argentino Branco, Dente de Ouro e Taquarão apresentaram as melhores porcentagens de germinação total quando expostas ao potencial osmótico de -1.0 MPa, superando 85% de germinação. Nos demais potenciais osmóticos avaliados, houve pouca diferenciação entre as variedades, sendo que a maioria delas apresentou respostas similares. Variedades com tolerância ao déficit hídrico no período de germinação são de

grande importância, pois garantem o estabelecimento de estande inicial, evitando assim, a possibilidade de perdas na produtividade final, devendo ser alvo de estudos complementares.

Segundo Bewley e Black (1994) o processo de absorção de água pelas sementes obedece ao padrão trifásico no qual a fase I, denominada embebição, ocorre independentemente das sementes serem viáveis ou dormentes, dominado principalmente pelo potencial mátrico e osmótico. A fase II é quando ocorre a ativação do metabolismo, podendo ser a fase mais longa a depender da espécie trabalhada, a semente absorve água lentamente, devido a atuação do potencial de pressão, ou de turgor. A fase III inicia-se com a protrusão radicular, e acontece novamente elevação no grau de umidade das sementes pelo afrouxamento das paredes celulares, diminuindo o potencial de pressão, e pela diminuição do potencial osmótico, provocado pela quebra dos compostos de reserva (JUSTO et al., 2007).

Albuquerque et al. (2009) verificou que a velocidade de embebição de água pelas sementes depende das características que cada espécie apresenta, e entre essas, está a permeabilidade do tegumento. Conforme há um aumento de volume da semente pela entrada de água em seu interior, ocorre o rompimento da casca facilitando a emergência do eixo hipocólito radicular (BORGES et al., 2009). Trabalhando com sementes híbridas, Rodrigues (1988) destacou que o tempo de absorção de água pelas sementes, para o início do processo germinativo, pode ser mais longo ou mais curto, a depender das características do meio, como tipo de substrato e temperatura, assim como características da semente. Sementes com maior teor de proteína tendem a embeber mais rapidamente, devido a maior afinidade desse a água. Sabe-se também que sementes menores, devido a sua maior área superficial específica, embebem mais rapidamente que sementes maiores, além de necessitarem de menos água para iniciar o processo de germinação, pois atingem 50% do peso em água, de forma mais rápida.

Tabela 3. Percentual primeira contagem de germinação (%) e percentual de germinação total (GT%) de diferentes variedades de milho submetidas a diferentes potenciais osmóticos.

Pot. Osmótico (MPa)	-1.0	-0.8	-0.6	-0.4	-0.2
Variedades	Desempenho relativo da primeira contagem de germinação (%)				
AL 25	13.5 a	23.4 cde	80.1 a	79.6 ab	87.0 ab
Argentino amarelo	9.3 a	60.3 a	59.3 abcde	91.2 a	99.2 a
Argentino branco	15.4 a	45.7 ab	50.6 cde	92.5 a	99.5 a
Astequinha	11.6 a	25.2 cde	54.6 bcde	76.1 abc	85.8 ab
Branco roxo índio	3.8 a	15.6 de	42.2 def	59.3 cd	77.1 bc
BRS 473	1.1 a	9.8 e	15.8 g	43.2 d	58.2 c
BRS 5202	13.3 a	36.5 bc	61.1 abcd	88.0 a	92.5 ab
Cateto amarelo	14.3 a	36.0 bc	40.3 ef	74.3 abc	83.7 ab
Cunha	7.6 a	36.8 bc	60.1 abcd	89.1 a	97.8 a
Dente de ouro	17.3 a	57.7 a	45.5 cde	84.7 ab	97.2 a
LG 6302	7.0 a	35.1 bcd	64.2 abc	89.5 a	99. a5
SHS 5050	13.6 a	45.1 ab	70.8 ab	93.0 a	99.5 a
SHS 7990	7.5 a	17.5 cde	51.5 bcde	83.0 ab	100 a
Taquarão	10.2 a	13.9 e	23.9 fg	66.7 bc	87.1 ab
	Desempenho relativo do percentual de germinação (%)				
AL 25	55.4 bc	75.5 de	88.2 ab	87.3 ab	85.5 a
Argentino amarelo	85.9 a	97.2 ab	98.7 a	98.7 a	99.2 a
Argentino branco	86.0 a	95.5 abc	97.5 a	99.2 a	99.5 a
Astequinha	47.9 bc	69.2 de	83.2 abc	86.3 ab	88.0 a
Branco roxo índio	40.7 c	51.5 fg	68.6 c	84.8 ab	83.4 a
BRS 473	11.4 d	36.9 g	74.2 bc	83.6 ab	88.0 a
BRS 5202	58.1 b	79.7 cde	84.4 abc	95.8 a	95.3 a
Cateto amarelo	53.3 bc	62.6 ef	92.6 a	94.7 a	95.1 a
Cunha9	46.8 bc	83.4 abcd	91.7 a	98.4 a	97.8 a
Dente de ouro	93.9 a	99.5 a	98.7 a	99.2 a	99.6 a
LG 6302	55.0 bc	86.0 abcd	95.5 a	100 a	100 a
SHS 5050	59.0 b	95.5 abc	97.0 a	99.5 a	100 a
SHS 7990	63.5 b	80.0 bcde	93.0 a	74.5 b	100 a
Taquarão	86.2 a	81.0 abcde	94.9 a	97.4 a	96.6 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De maneira geral, existe variabilidade entre as variedades, a qual pode ser justificada pelo fato da resposta das sementes submetidas à restrição hídrica, terem se mostrado dependente do genótipo (KAPPES et al., 2010). Sementes de diferentes variedades possuem níveis distintos de amido e outros nutrientes armazenados, o que pode influenciar na germinação e na taxa de crescimento de plântulas. A germinação pode depender da capacidade da semente em utilizar reservas de forma mais eficiente, através da mobilização das mesmas (QUEIROZ et al., 2019). Portanto, o uso de variedades com maior eficiência metabólica é desejável sob condições de seca, quando a emergência e o estabelecimento são retardados devido à umidade insuficiente do solo.

Todas as variedades estudadas apresentaram redução do vigor na primeira contagem de germinação, bem como redução na porcentagem de germinação total (Figura 1). A maioria das variedades apresentou tendência linear negativa de acordo com a diminuição do potencial osmótico e algumas (Argentino amarelo e SHS 5050) apresentaram tendência quadrática, mantendo-se estáveis com o início do declínio do potencial osmótico, não se diferenciando, em média, até -0,4 MPa, havendo decréscimo a partir desse valor. As variedades Branco Roxo Índio, BRS 473 e Taquarão tiveram tendência a apresentar as menores porcentagens de germinação.

A resposta germinativa das sementes de milho foi significativamente afetada pelo estresse por déficit hídrico induzido pelas soluções de PEG 6000. Quando as sementes foram expostas a potenciais osmóticos altamente negativos, a capacidade de germinação foi drasticamente reduzida. A porcentagem de germinação foi reduzida de 85% a 100% no tratamento controle (0 MPa) para um mínimo de 20% a 70% quando as sementes de milho foram expostas a um menor potencial osmótico (-1,0 MPa). Resultados semelhantes foram relatados por Khodarahmpour (2011), que descobriu que o potencial osmótico -1,2 MPa reduziu a taxa de germinação de milho em 71% comparado ao tratamento controle (0 MPa). Kappes et al. (2010) também verificaram que o potencial osmótico de -1,2 MPa reduziu a germinação de quatro híbridos de milho de 32 a 63% quando comparado ao controle. Pias et al. (2017) concluíram

que o potencial osmótico de -0,8 MPa inibiu completamente a formação de plântulas normais em todos os quatro híbridos de milho testados.

Quando as plantas são expostas a condições de estresse, essas direcionam seu metabolismo a contornar tais condições, apresentando gasto energético maior com a adaptação a adversidade do que à germinação propriamente dita (VAZ-DE-MELO et al., 2012). Estudos mostram que o estresse por déficit hídrico afeta as reações de síntese de amido e o processo de produção de energia (adenosina trifosfato-ATP) através da respiração, resultando em redução da porcentagem de germinação e na diminuição do vigor de plântulas (QUEIROZ et al., 2019).

Reduções no vigor de sementes de milho obtidas pela primeira contagem também foram encontradas em outros estudos que avaliaram a restrição de água simulada com soluções de PEG 6000, ocasionando redução na porcentagem de germinação das variedades utilizadas (VAZ-DE-MELO et al., 2012; KAPPES et al., 2010).

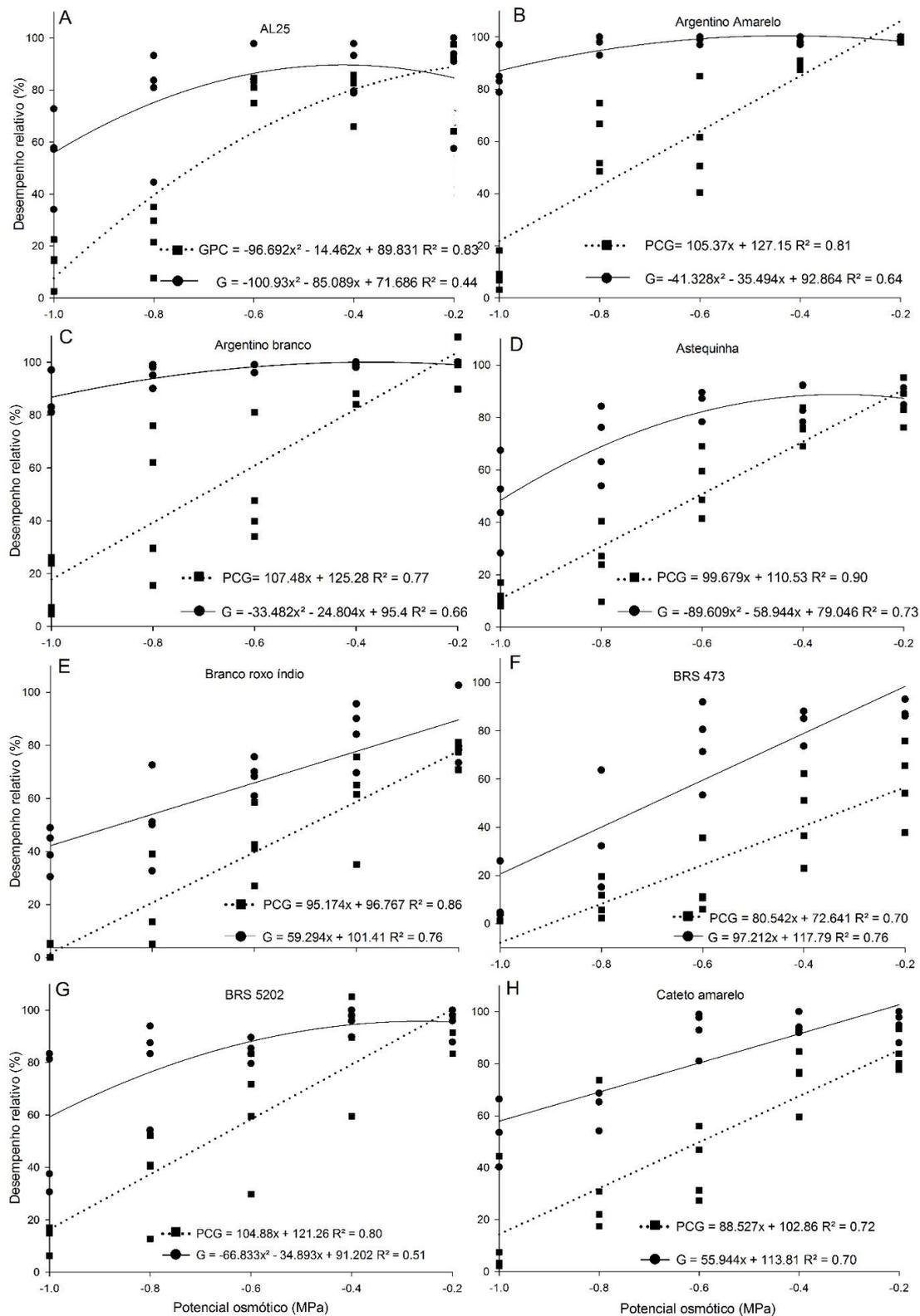


Figura 1. Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre o vigor (primeira contagem de germinação) e percentual de germinação de sementes de diferentes variedades de milho. PCG – Primeira contagem de germinação; G – Porcentagem de germinação. A – AL 25; B – Argentino amarelo; C – Argentino branco; D – Astequinha; E – Branco roxo índio; F – BRS 473, H – Cateto amarelo; I – Cunha. Continua.

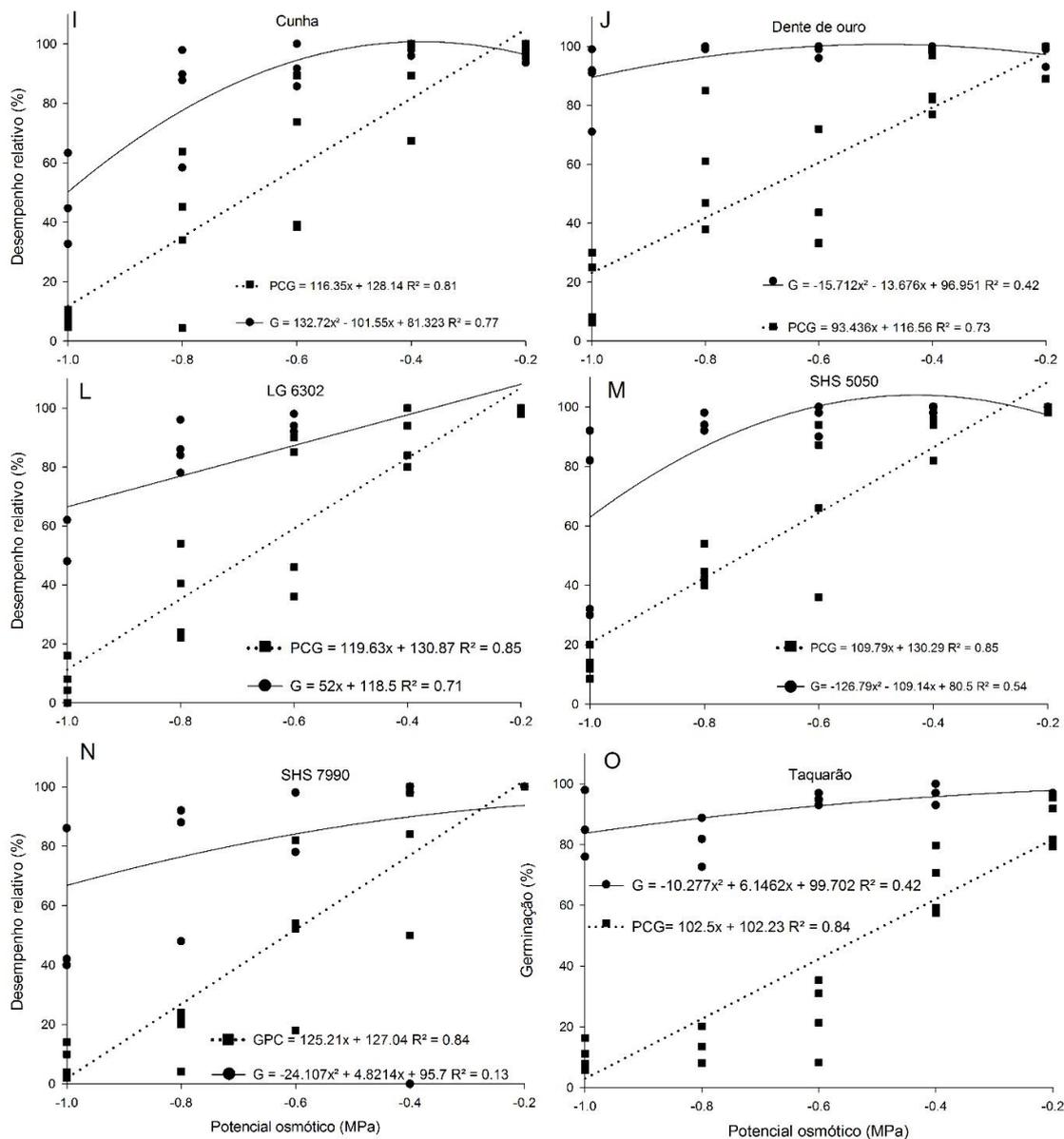


Figura 1- continuação. Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre o vigor (primeira contagem de germinação) e percentual de germinação de sementes de diferentes variedades de milho. PCG – Primeira contagem de germinação; G – Porcentagem de germinação. I – Cunha; J – Dente de ouro; L – LG 6302; M – SHS 5050; N – SHS 7990; O – Taquarão.

As variedades não apresentaram diferença significativa entre si quando expostas aos potenciais osmóticos mais negativos (-0,6, -0,8 e -1,0 MPa) para massa seca e fresca de raiz (Tabela 4). Nos demais potenciais osmóticos, as variedades BRS 473, Cateto amarelo e Taquarão estão entre as que apresentaram as menores médias de massa fresca e seca de raiz. Em estudo com quatro híbridos de milho, testando potenciais osmóticos entre 0 e -1,2 MPa, os resultados obtidos foram diferentes do presente estudo, sendo que a diferenciação entre os híbridos só ocorreu com potenciais osmóticos mais

negativos, a partir de -0,6 MPa, e com resultados semelhantes entre 0 e -0,3 MPa (KAPPES et al., 2010). Essa diferença pode estar associada ao uso de híbridos, que costumam manter maior homogeneidade, apresentando resultados diferenciados sob estresse e diferente das variedades.

No potencial osmótico de -0,4 MPa, as variedades Argentino branco, Astequinha, Branco roxo índio, Dente de ouro, LG 6302, SHS 5050 e SHS 7990 apresentaram as melhores médias de massa seca de raiz (Tabela 4), porém não diferiram significativamente das demais. Essas variedades também estão entre as que apresentaram médias superiores de germinação nesse mesmo potencial osmótico, evidenciando potencial para cultivo em ambientes com restrição hídrica.

Para massa seca de raiz, no potencial osmótico de -1,0 MPa, as variedades apresentaram médias inferiores a 10 mg, tendo redução de mais de 30% em relação ao tratamento controle (0 MPa). Essa redução drástica do vigor pode influenciar negativamente o estabelecimento da cultura e desenvolvimento inicial, prejudicando a sua produtividade.

Sob condições de baixa disponibilidade de água no solo ou de alta demanda evaporativa, plantas de milho apresentam redução no acúmulo de matéria seca, tanto pela menor produção de fotoassimilados, como pelo maior consumo de energia para a captação de água (WU et al. 2011). Todas as variedades apresentaram diminuição na massa fresca e massa seca de raiz (Figura 2). Algumas variedades apresentaram tendência quadrática para massa fresca de raiz, com um decréscimo acentuado até -0,6 MPa, seguido da estabilização até -1,0 MPa. As variedades Argentino amarelo, Argentino branco, Cunha, Dente de ouro e Taquarão apresentaram tendência linear para massa fresca de raiz, diminuindo de acordo com o potencial osmótico mais negativo. Para massa seca de raiz, o decréscimo foi linear para todas as variedades.

Pode-se observar que as curvas de massa fresca e massa seca de raiz não são paralelas, demonstrando que quanto mais negativo o potencial osmótico, menor é o acúmulo de água nos tecidos. De acordo com Padilha et. al. (2016), os primeiros sintomas em plantas de milho sob deficiência hídrica estão relacionados a redução de crescimento das mesmas devido a redução da turgescência celular, a qual está diretamente ligada à expansão celular.

Tabela 4. Massa fresca e massa seca de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho submetidas a diferentes potenciais osmóticos durante a germinação.

Genótipos	Pot. Osmótico						
	(Mpa)	0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0
Massa fresca de raiz (mg)							
AL 25		231,25 def	108,17 cd	51,75 ab	57,25 a	55,38 a	33,61 a
Argentino amarelo		225,31 ef	122,41 bcd	88,27 ab	54,76 a	50,27 a	20,11 a
Argentino branco		304,73 bc	150,90 abcd	105,35 a	62,93 a	56,10 a	28,58 a
Astequinha		251,25 cde	154,98 abc	81,60 ab	60,67 a	34,54 a	24,35 a
Branco roxo índio		284,51 bcd	154,55 abc	46,70 ab	45,03 a	30,57 a	21,42 a
BRS 473		145,36 g	50,00 e	41,06 b	27,16 a	18,63 a	17,00 a
BRS 5202		254,43 cde	162,20 abc	60,36 ab	56,01 a	53,80 a	28,12 a
Cateto amarelo		181,53 fg	99,15 de	79,83 ab	31,20 a	41,21 a	26,68 a
Cunha		241,55 de	163,82 ab	52,41 ab	49,81 a	58,22 a	22,23 a
Dente de ouro		239,53 de	128,20 bcd	104,18 a	42,05 a	48,31 a	36,25 a
LG 6302		362,58 a	150,76abcd	69,25 ab	58,00 a	51,73 a	26,17 a
SHS 5050		303,51 bc	196,30 a	53,76 ab	46,35 a	33,78 a	26,45 a
SHS 7990		330,72 ab	141,16 bcd	77,13 ab	21,55 a	44,96 a	30,01 a
Taquarão		209,91 ef	123,73 bcd	71,92 ab	37,61 a	34,18 a	20,43 a
Massa seca de raiz (mg)							
AL 25		35,73 def	26,70 bcd	9,00 c	13,25 a	9,22 ab	6,56 a
Argentino amarelo		26,45 fg	19,38 cde	9,85 bc	16,70 a	14,12 ab	8,90 a
Argentino branco		39,63 cde	23,43 bcd	18,10 abc	15,71 a	17,47 a	10,85 a
Astequinha		41,48 cde	31,53 abc	22,54 ab	5,43 a	6,81 ab	4,51 a
Branco roxo índio		44,36 bcd	32,10 abc	18,80 abc	6,37 a	4,35 b	3,17 a
BRS 473		17,46 g	7,33 e	10,10 bc	7,42 a	8,45 ab	7,02 a
BRS 5202		36,48 cdef	42,04 a	9,97 bc	13,09 a	12,18 ab	6,77 a
Cateto amarelo		23,93 fg	14,43 de	12,48 bc	6,43 a	15,12 ab	12,68 a
Cunha		35,11 def	34,50 ab	11,44 bc	6,82 a	12,06 ab	3,69 a
Dente de ouro		29,71 efg	19,63 cde	17,43 abc	10,38 a	15,73 ab	11,75 a
LG 6302		57,57 a	32,22 abc	21,93 ab	11,21 a	9,57 ab	5,30 a
SHS 5050		48,91 abc	27,10 bcd	26,49 a	15,59 a	4,04 b	4,82 a
SHS 7990		55,15 ab	23,46 bcd	13,81 abc	6,59 a	3,60 b	6,24 a
Taquarão		26,13 fg	22,20 bcd	11,67 bc	7,86 a	11,43 ab	8,51 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

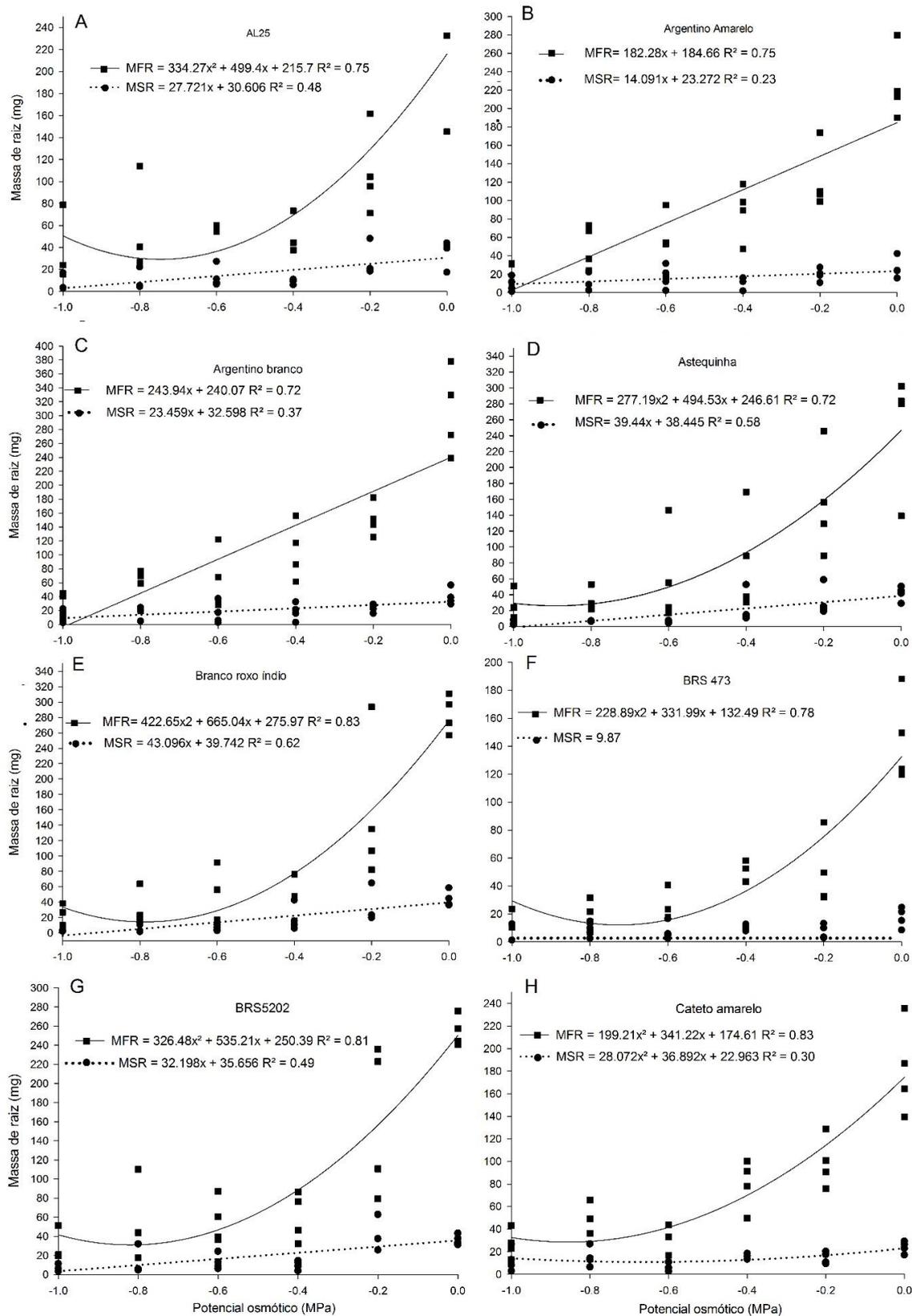


Figura 2. Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre a massa fresca de raiz e massa seca de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho. MFR – Massa fresca de plântula; MSR – Massa seca de plântula. C – Argentino branco; D – Astequinha; E – Branco roxo índio; F – BRS 473; G – BRS 5202; H – Cateto amarelo. Continua.

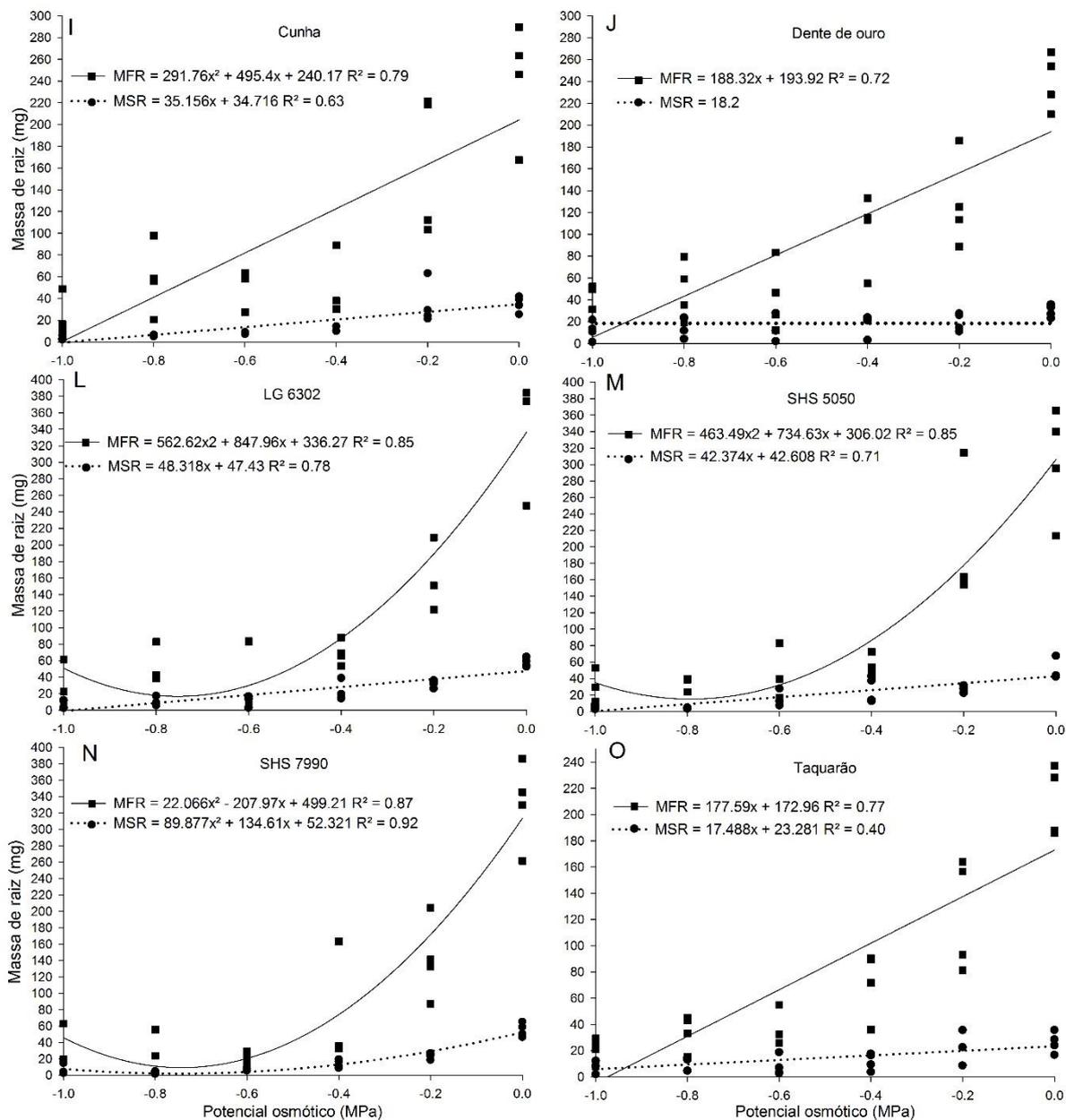


Figura 2 - continuação. Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre a massa fresca de raiz e massa seca de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho. MFR – Massa fresca de plântula; MSR – Massa seca de plântula. I – Cunha; J – Dente de ouro; L – LG 6302; M – SHS 5050; N – SHS 7990; O – Taquarão.

A maioria das variedades não diferiu entre si no comprimento de raiz (Tabela 5), com exceção da BRS 473 e da Taquarão, que apresentaram as menores médias de comprimento de raiz. Esta característica pode ser prejudicial para o desenvolvimento das plântulas, pois variedades com maior

desenvolvimento radicular possuem maior vantagem em ambientes adversos, conseguindo buscar água e nutrientes, diferente de variedades com raízes menores. Segundo Toorchi et al. (2009), um sistema radicular bem desenvolvido é um mecanismo eficiente para as plantas superar o estresse osmótico, pois nessas condições os ajustes na expansão da parte aérea são devidos à quantidade de água acumulada nas raízes, permitindo o desenvolvimento da planta.

Tabela 5. Comprimento de raiz de plântulas de diferentes variedades de milho submetidas a diferentes potenciais osmóticos durante a germinação.

Variedades	Comprimento de raiz
AL 25	7.50 ab
Argentino amarelo	6.90 ab
Argentino branco	7.22 ab
Astequinha	8.09 a
Branco roxo índio	7.12 ab
BRS 473	4.03 c
BRS 5202	7.98 a
Cateto amarelo	6.87 ab
Cunha	8.13 a
Dente de ouro	7.13 ab
SHS 7990	8.62 a
LG 6302	7.54 ab
SHS 5050	8.13 a
Taquarão	5.77 bc

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Variedades que apresentam crescimento radicular em condições de déficit hídrico conseguem conservar os tecidos mais hidratados que o meio circundante através do ajustamento osmótico (ECHER et al., 2010). O comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e massa fresca e seca de parte aérea apresentaram decréscimo em relação a potenciais osmóticos mais negativos (Figura 3 A e B), todas com tendência quadrática, com redução mais acentuada até -0,6 MPa e estabilização, com leve aumento até -1,0 MPa. O

estresse por déficit hídrico causa redução do potencial hídrico da célula, conseqüente diminuição da pressão de turgor, afetando negativamente a expansão e o crescimento celular, o metabolismo, crescimento e estabelecimento das plântulas, reduzindo o crescimento do hipocótilo e da radícula (VIÇOSI et al., 2017). Em estudo realizado com quatro híbridos de milho, com diferentes potenciais osmóticos, o comprimento da parte aérea teve redução, porém, essa redução variou de acordo com o genótipo, diferente do presente estudo, em que as variedades não apresentaram diferença em relação aos potenciais osmóticos (Figura 3 A). Em estudo com duas cultivares de milho pipoca, com potenciais osmóticos variando entre 0 e -0,9 MPa, foi observado que o comprimento das raízes primárias das plântulas foi influenciado negativamente com o aumento dos níveis de potencial osmótico (FERREIRA et al., 2019).

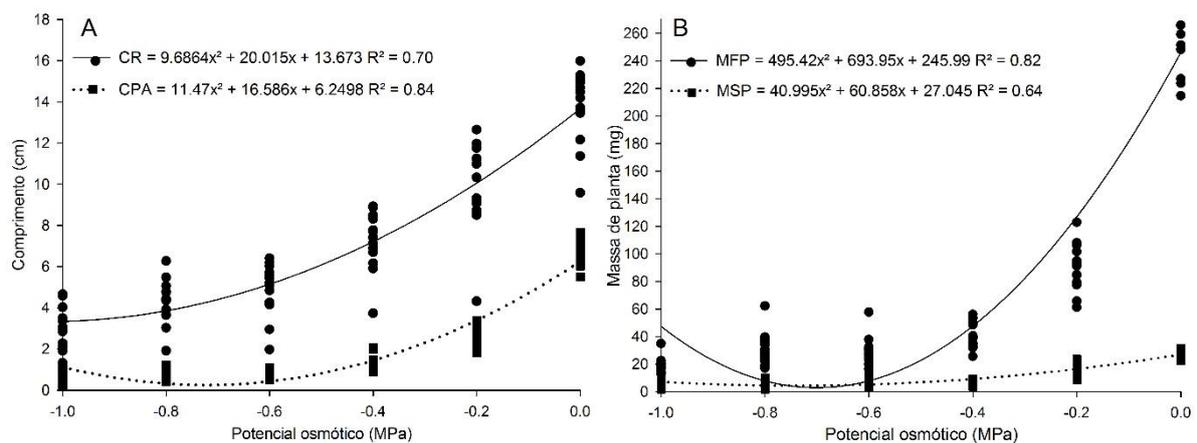


Figura 3. Efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol sobre o comprimento de raiz e parte aérea e massa fresca e seca de parte aérea plântulas de diferentes variedades de milho. A – Comprimento de raiz e parte aérea; B – Massa fresca e seca de parte aérea; CR – Comprimento de raiz; CPA – Comprimento de parte aérea; MFP – Massa fresca de parte aérea; MSP – Massa seca de parte aérea.

4.1.2 Conclusão

Ocorre um efeito negativo do déficit hídrico na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de milho quando se utiliza o potencial osmótico de -0.2 MPa, no entanto, não houve diferenças acentuadas entre as variedades avaliadas. No potencial osmótico -0.6 MPa ou superior não há condições de sobrevivência após a germinação. Nesse sentido, mais estudos são necessários para identificação de genótipos com tolerância ao déficit hídrico.

4.2 Experimento 2 – Avaliação de expressão de genes associados a autofagia em milho sob condição de déficit hídrico

4.2.1 Identificação de potencial osmótico

O potencial osmótico que permitiu a discriminação das variedades foi o de -0.2 MPa, pois a partir desse potencial já ocorre inibição do desenvolvimento da parte aérea (Figura 4).

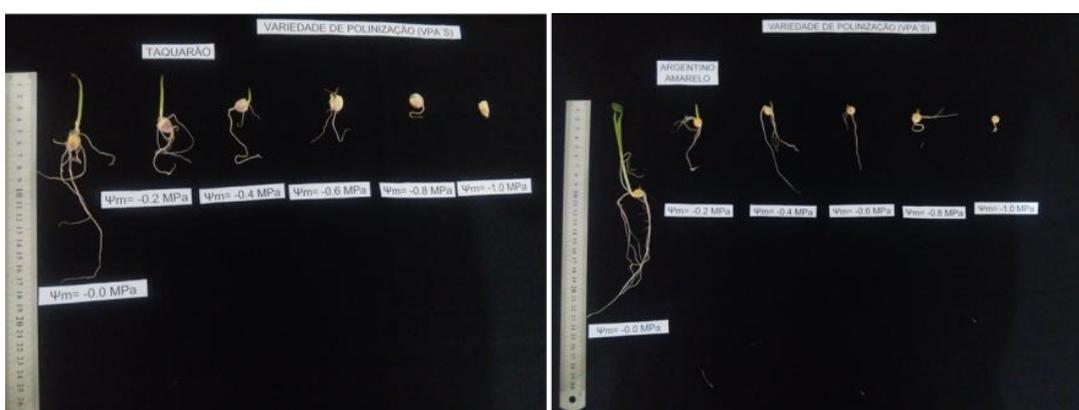


Figura 4. Resposta de plântulas de milho de diferentes variedades cultivadas em diferentes potenciais osmóticos.

4.2.2 Perfil fenotípico das variedades sob condição de déficit hídrico

O desempenho relativo dos caracteres morfológicos de Taquarão e Argentino Amarelo em condição de déficit hídrico mostram uma resposta diferente entre as variedades, evidenciando a variabilidade presente nessas populações. Menor efeito do déficit hídrico foi observado na variedade Taquarão para todos os caracteres morfológicos analisados (Figura 5).

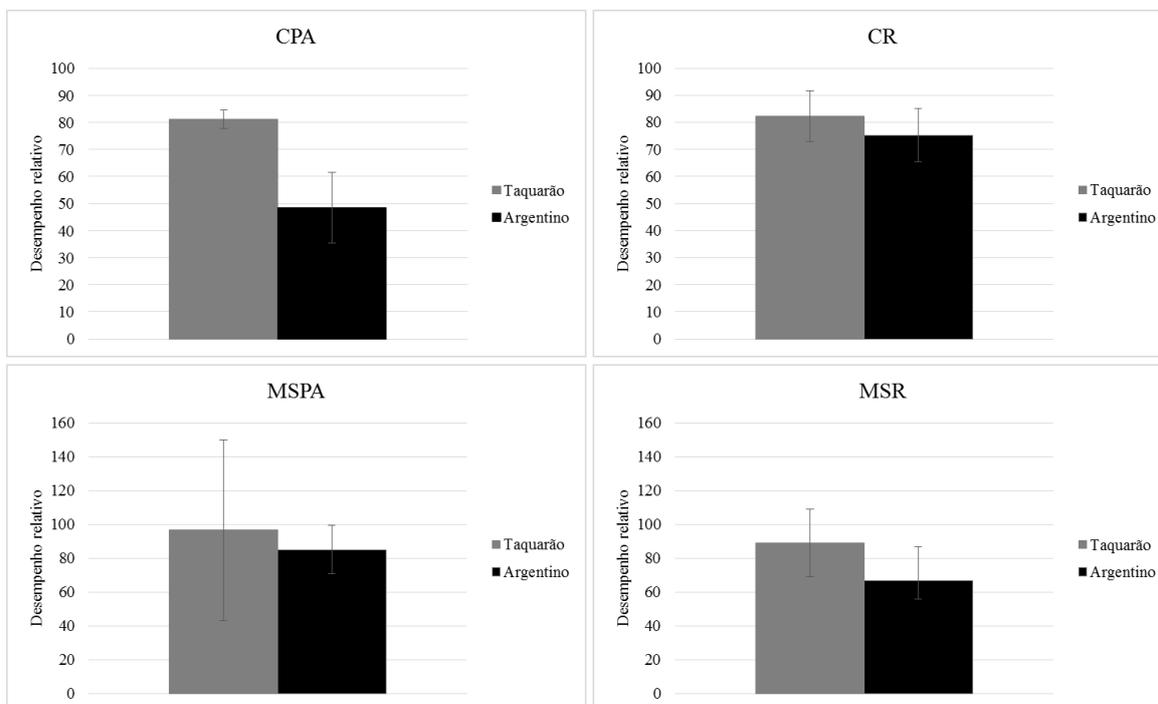


Figura 5. Caracterização fenotípica (comprimento de parte aérea – CPA; comprimento de raiz – CR; massa seca de parte aérea – MSPA; e massa seca de raiz – MSR) através do desempenho relativo nas variedades de milho Taquarão e Argentino Amarelo sob condição de déficit hídrico.

A característica comprimento de parte aérea foi a mais afetada na variedade Argentino Amarelo, a qual apresentou menor desempenho relativo deste tecido quando germinada sob condição de déficit hídrico (Figura 5).

4.2.3 Perfil de expressão dos genes *ATGs* em variedades de milho sob condição de déficit hídrico

Em condições normais a autofagia funciona de modo basal para manter a homeostase celular. No entanto, sob condições de estresse abiótico esse processo se intensifica para remover materiais citoplasmáticos danificados ou indesejados, ou ainda para reciclar materiais citoplasmáticos para fornecer substratos anabólicos e metabólitos para as células (WANG et al., 2017). Esse processo é mediado por genes *ATG* (genes relacionados a autofagia). As proteínas codificadas por esses genes podem ser divididas em quatro grupos funcionais: (i) o complexo *ATG1* kinase envolvido na iniciação da formação do autofagossomo; (ii) o complexo *ATG9* para recrutamento de membranas; (iii) o complexo fosfatidylinositol 3-kinase (*PI3K*) para nucleação da vesícula; e (iv) o sistema de conjugação *ATG8* e *ATG12 ubiquitin-like* para expansão e fechamento da vesícula (YANG et al., 2019). Nesse estudo buscou-se caracterizar o perfil transcricional de genes associados ao sistema de

conjugação ATG8 e ATG12 *ubiquitin-like* em duas variedades de milho sob condição de déficit hídrico. No genoma do milho foram identificados cinco genes da família ATG8 (*ZmATG8a*, *ZmATG8b*, *ZmATG8c*, *ZmATG8d* e *ZmATG8e*) e apenas um gene ATG12 (*ZmATG12*) (CHUNG et al., 2009).

Quando plântulas de milho da variedade Argentino Amarelo foram mantidas sob condição de déficit hídrico verificou-se um aumento no acúmulo de transcritos do gene *ZmATG8a*, e esse aumento ocorreu tanto na raiz quanto na parte aérea. Por outro lado, plântulas da variedade Taquarão submetidas a essa condição apresentaram pouca variação no perfil transcricional desse gene (Figura 6). O comportamento observado na variedade Argentino Amarelo pode estar associado a resposta da plântula para se recuperar dos efeitos danosos ocasionados pelo agente estressor, ou seja, sinalizando para intensificar a reciclagem de componentes citoplasmáticos danificados. Ainda, observa-se que nessa variedade a maior expressão do gene *ZmATG8a* foi verificada na raiz, o primeiro órgão que tem contato com a condição de déficit hídrico. Pelo comportamento fenotípico da variedade Taquarão acredita-se que o déficit hídrico cause menos danos celulares e por isso não há a necessidade de acelerar o maquinário da autofagia, o que pode explicar a menor variação da transcrição do gene *ZmATG8a* verificado nessa variedade. De modo similar, o gene *ZmATG8e* apresentou perfil de transcrição idêntico ao *ZmATG8a*.

O envolvimento da autofagia em resposta a seca foi elucidado pela primeira vez em *Arabidopsis thaliana*, demonstrando o aumento de expressão de *AtATG18a* e a indução da formação do autofagossomo em resposta ao estresse osmótico. Na sequência, vários estudos têm demonstrado a indução de genes *ATG* em resposta à seca em diferentes espécies, como por exemplo, maçã, milheto, cevada, pimenta, arroz, tomate e trigo (TANG; BASSHAM, 2018). O estresse osmótico decorrente da seca leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a oxidação de proteínas. A autofagia pode remover proteínas oxidadas e regular o nível de EROs, o que sugere o seu envolvimento na resposta ao estresse osmótico. Em *A. thaliana* já foi reportada a participação de *AtATG8* em resposta a estresse osmótico (HAN et al., 2011). Esses estudos dão suporte para os dados obtidos nesse estudo para os genes *ZmATG8a* e

ZmATG8e, reforçando a hipótese da participação da autofagia em resposta ao déficit hídrico.

Quando se avalia o perfil de transcrição dos genes *ZmATG8b*, *ZmATG8c* e *ZmATG8d* verifica-se que não houve alterações marcantes quando as plântulas de ambas as variedades foram submetidas ao déficit hídrico, e isso ocorreu tanto na raiz quanto na parte aérea (Figura 6). Esse comportamento indica que esses genes não estão envolvidos com a resposta a essa condição, pelo menos no estágio de desenvolvimento avaliado. Alterações na resposta dos genes da família ATG8 já tem sido verificada em outras espécies, como em *A. thaliana*, que apresenta 8 isoformas da proteína ATG8. Nessa espécie a superexpressão do gene *AtATG8f* ocasionou a maior sensibilidade das plantas a estresse salino e osmótico (SLÁVIKOVÁ et al., 2005). Por outro lado, a superexpressão do gene *SiATG8a* (*Setaria italica* L.) melhorou a tolerância a deficiência de nitrogênio e a tolerância a seca de plantas de *A. thaliana* (LI et al., 2015). Esses estudos, juntamente com os resultados apresentados sugerem que os diferentes genes *ATG8* não são ativados no mesmo momento, e podem resultar em respostas diferenciadas.

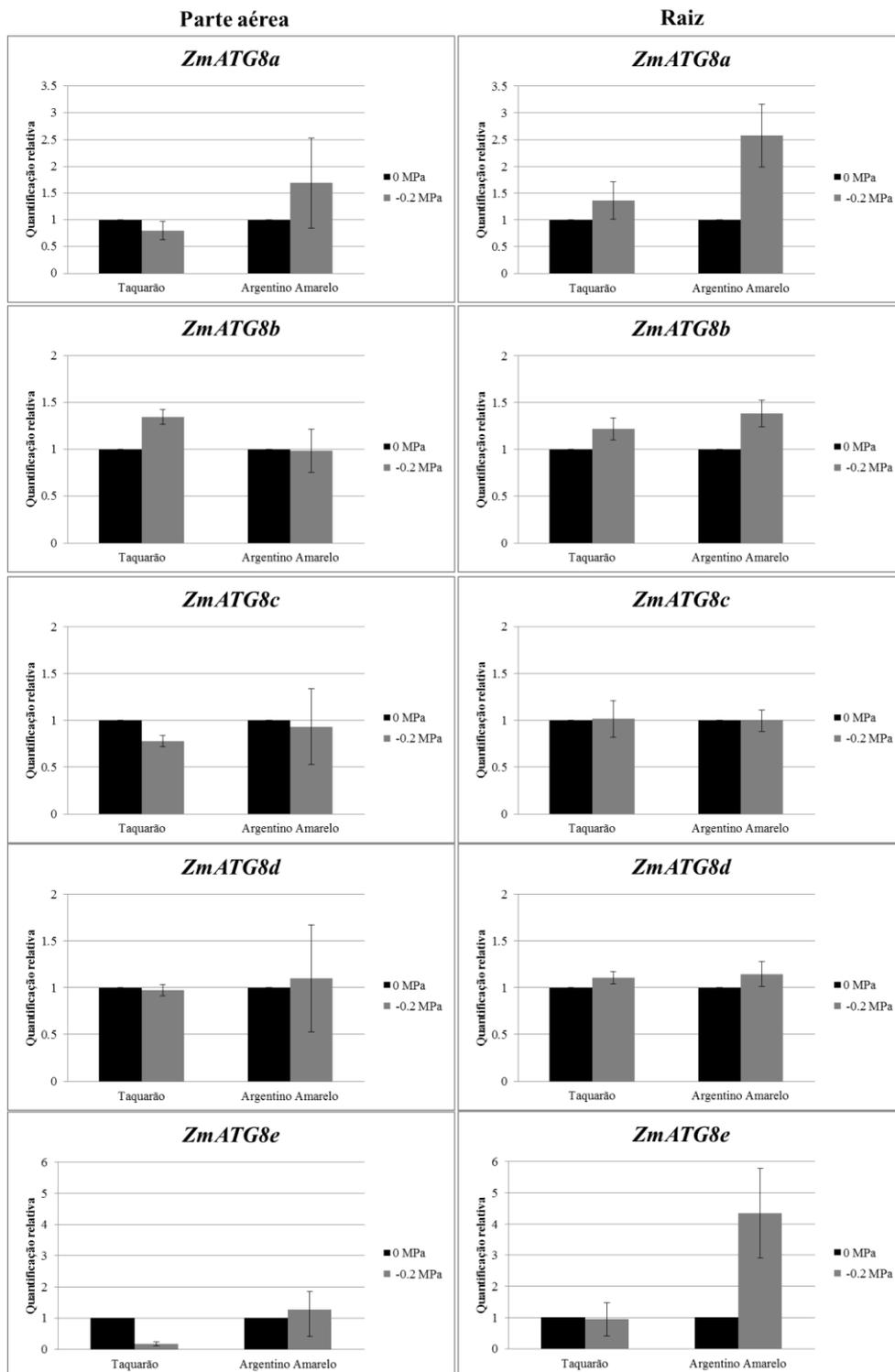


Figura 6. Quantificação relativa da expressão dos genes *ZmATG8* nos tecidos de parte aérea e raiz das variedades Taquarão e Argentino Amarelo submetidas ao déficit hídrico (-0.2 MPa) por 7 dias. Médias \pm desvio padrão, n = 3.

O gene *ZmATG12*, cuja proteína atua juntamente com as proteínas ATG8, apresentou um aumento no acúmulo de transcritos apenas no tecido radicular, não diferindo entre as variedades (Figura 7). Esse perfil de expressão foi um pouco diferente do observado para os genes *ZmATG8a* e *ZmATG8e*, que apresentaram diferença de expressão entre as variedades, demonstrando que embora atuem junto, apresentam regulação dependente do genótipo, não apenas da condição ambiental. Em um estudo avaliando a expressão de genes *ATG8* e *ATG12* em *A. thaliana* durante a senescência, os autores também verificaram que nessa condição há aumento de expressão de *ATG8* e não de *ATG12* (WANG; SCHIPPERS, 2019).

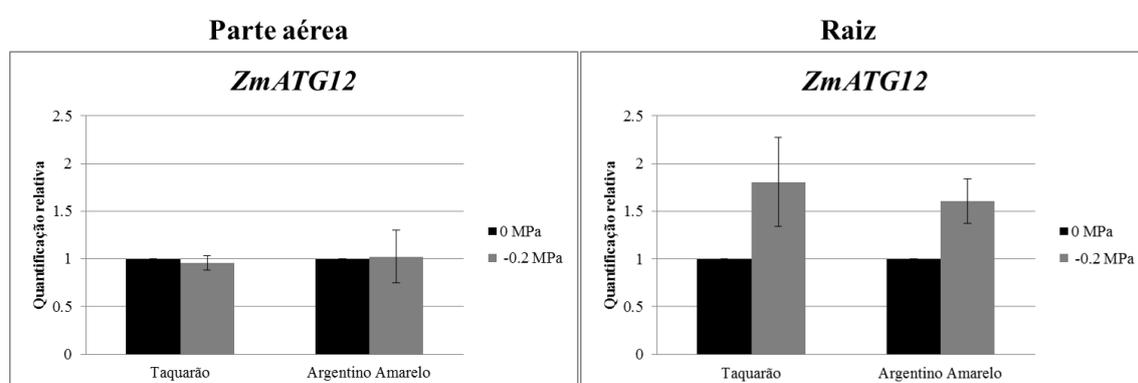


Figura 7. Quantificação relativa da expressão do gene *ZmATG12* nos tecidos de parte aérea e raiz das variedades Taquarão e Argentino Amarelo submetidas ao déficit hídrico (-0.2 MPa) por 7 dias. Médias \pm desvio padrão, n = 3.

Neste estudo foi observado um elevado desvio padrão, tanto para os caracteres morfológicos quanto para a expressão gênica. Essa variação ocorreu devido ao modelo de estudo utilizado, variedades de polinização aberta, que são compostas por diferentes genótipos, que podem responder de forma diferenciada na mesma condição. Se o modelo utilizado fosse um híbrido simples ou uma linhagem, que são compostos por apenas um genótipo, a resposta seria mais uniforme.

4.2.4. Conclusão

Este estudo traz os primeiros indícios da participação da autofagia em resposta ao déficit hídrico em plântulas de milho de variedades crioulas. No entanto, novos estudos utilizando outros genes da rota são necessários, assim como outras variedades devem ser testadas.

5. Considerações Finais

Os resultados desse trabalho fornecem informações que poderão ser usadas para delinear futuras pesquisas, além de conter elementos que poderão ser usados para estudos na cultura do milho em relação à autofagia e déficit hídrico.

O desenvolvimento do primeiro experimento permitiu caracterizar a resposta de variedades de polinização aberta, variedades híbridas e variedades crioulas frente ao déficit hídrico. Os resultados podem ser aplicados em programas de melhoramento de milho visando tolerância ao déficit hídrico em estádios iniciais de desenvolvimento.

O segundo experimento traz evidências do envolvimento da autofagia na resposta ao déficit hídrico, o que pode ser entendido como um mecanismo de defesa através do reparo aos danos celulares ocasionados pelo déficit hídrico nas plântulas de milho.

No entanto, pela complexidade dos aspectos fisiológicos e moleculares envolvidos na tolerância ao déficit hídrico, há a necessidade de estender esta pesquisa utilizando condições de campo e manejo agrônomico da cultura afim de identificar genótipos tolerantes que possam ser utilizados em blocos de cruzamento. Com relação a autofagia, estudos mais aprofundados, envolvendo outros genes e variedades também precisam ser conduzidos.

6. Referências Bibliográficas

ARAÚJO, Pedro Mário; NASS, Luciano Lourenço. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

AVIN-WITTENBERG, Tamar. Autophagy and its role in plant abiotic stress management. **Plant, cell & environment**, vol. 42, no 3, p. 1045-1053. 2019.

BÄNZIGER, Marianne. Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice. Mexico, D.F.: **CIMMYT**, p. 68, 2000.

BASSHAM, Diane C. Spheres of autophagy in maize. *Nature plants*, vol. 4, no 12, p. 985.2018.<https://doi.org/10.1038/s41477-018-0313-8>.

BERGONCI, João Ito, et al. Potencial da água na folha como indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa agropecuária brasileira**: 1977. Brasília. Vol. 35, n. 8 (ago. 2000), p. 1531-1540, 2000.

BERTOLINI, Erick Vinicius. Adubação de pré-semeadura na cultura do milho em diferentes espaçamentos entrelinhas e manejos do solo. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) –Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.207. Junho – 2009.

BLÄSING, Oliver E., et al. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 2005, vol. 17, no 12, p. 3257-3281.

BORÉM, A. Melhoramento de Plantas, 3^o edição. **Viçosa: UFV**, 453 p. 2001.

BOUCHABKE, Oumaya; TARDIEU, Francois; SIMONNEAU, Thierry. Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative

demand under moderate irrigation but not in water-saturated soil. **Plant, Cell & Environment**, 2006, vol. 29, no 6, p. 1138-1148.

BOYLE, Mark G.; BOYER, John S.; MORGAN, Page W. Stem infusion of maize plants. **Crop Science**, 1991, vol. 31, no 5, p. 1241-1245.

BUCKLERIV, Edwards; STEVENS, Natalie M. Maize origins, domestication, and selection. **Darwin's harvest: New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops**, p. 67, 2006.

BUSTIN, Stephen A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, 2009, vol. 55, no 4, p. 611-622.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p

CARVALHO, NM de, et al. Sementes: ciência, tecnologia e produção. **Jaboticabal**: Funep, Vol. 4, p.429, 2000.

CHRISTMANN, Alexander et al. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. **The Plant Journal**, v. 52, n. 1, p. 167-174, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03234.x>.

CHUNG, Taijoon; SUTTANGKAKUL, Anongpat; VIERSTRA, Richard D. The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. **Plant physiology**, vol. 149, no 1, p. 220-234. 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: nono levantamento da safra 2015/2016. Brasília, 2016. p 174.

CRUZ, J. C. et al. Milho – Cultivares para 2015/2016. Embrapa CNPMS. Disponível em: < <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>>. Acesso em fevereiro. de 2016.

DOEBLEY, John. F. The genetics of maize evolution. Annual **Review of Genetics**, v. 38, p. 37-59, 2004.

DUVICK, D. N. Genetic contributions to advances in yield of U.S maize. **Maydica**, Bergamo, v. 37, p. 69-79, 1992.

DAN, E.L.; MELLO, V.D.C.; WETZEL, C.T.; POPINIGIS, F.; SOUZA, E.P. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v.9, n.3, p.45-55. 1987.

EAST, Edward M. Heterosis. **Genetics**, v. 21, n. 4, p. 375, 1936.

ECHER, F. R.; CUSTÓDIO, C. C.; HOSSOMI, S. T.; DOMINATO, J. C.; MACHADO NETO, N. B. Estresse hídrico induzido por manitol em cultivares de algodão. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 4, p. 638-645, 2010.

FINATTO, Paula, et al. Pilates training improves 5-km run performance by changing metabolic cost and muscle activity in trained runners. **PloS one**, vol. 13, no 3, 533–544, 2018.

FERNÁNDEZ SUÁREZ, Rocío; MORALES CHÁVEZ, Luis A.; GÁLVEZ MARISCAL, Amanda. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional: Una revisión indispensable. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 36, p. 275-283, 2013.

FERREIRA, B R; CHICHANOSKI, C; MORTELE, L M; SANTOS, R F; BRACCINI, A L. Potencial fisiológico de sementes de milho pipoca submetidas ao estresse hídrico após tratamento com biorregulador. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, n. 2, p. 573-584, 2019.

FAOSTAT – **Food and Agriculture Organization of the United Nations** – Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 13 de janeiro de 2019.

GARBUGLIO, Deoclécio Domingos; DE MIRANDA FILHO, José Branco; CELLA, Marcos. Variabilidade genética em famílias S1 de diferentes populações de milho. *Acta Scientiarum*, v.31, n.2, p.209213, 2009.

GENCHEV, D. Asynchronously ripening of stem and pods of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 36, p. 87-88, 1993.

GOODMAN, M. M.; SMITH, J. S. C. Botânica In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção de milho**. Volume I. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 41-70.

GORGULHO, ELIANA PATRÍCIA; MIRANDA FILHO, JOSÉ BRANCO DE. Estudo da capacidade combinatória de variedades de milho no esquema de cruzamento dialélico parcial. **Bragantia**, 2001, vol. 60, no 1.

GOODMAN, M. M. et al. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. **Economic Botany**, v. 54, n. 1, p. 43-59, 2000.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1981. 468 p.

HAN, Shaojie, et al. Role of plant autophagy in stress response. **Protein & cell**, vol. 2, no 10, p. 784-791. 2011.

HAYWARD AP, TSAO J, DINESH-KUMAR SP (2009) Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in cell & developmental biology* 20 (9):1041-1047.

HAYWARD, Andrew P.; TSAO, Jeffrey; DINESH-KUMAR, S. P. Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation. **En Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press. p. 1041-1047. 2009.

KRANNER, Ilse, et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, vol. 188, no 3, p. 655-673, 2010.

KAPPES, C; ANDRADE, J A C; HAGA, K I; FERREIRA, J P; ARF, M V. Germinação, vigor de sementes e crescimento de plântulas de milho sob condições de déficit hídrico. *Scientia Agraria*. v.11, n.2, p.125-134. 2010.

KROEMER, Guido; MARIÑO, Guillermo; LEVINE, Beth. Autophagy and the integrated stress response. **Molecular cell**, vol. 40, no 2, p. 280-293. 2010.

KHODARAHMPOUR, Z. Effect of drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) on germination indices in corn (*Zea mays* L.) hybrids. *African Journal of Biotechnology*. V. 10, N. 79, P. 18222-18227, 2011.

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

KORNBROT, D. Statistical software for microcomputers: SigmaPlot 2000 and SigmaStat2. *The British journal of mathematical and statistical psychology*, 2000, vol. 53, p. 335-337.

LI, Faqiang, et al. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. **The Plant Cell**, vol. 27, no 5, p. 1389-1408. 2015.

LI, Wei-wei, et al. Overexpression of the autophagy-related gene SiATG8a from foxtail millet (*Setaria italica* L.) confers tolerance to both nitrogen starvation and

drought stress in Arabidopsis. **Biochemical and biophysical research communications**, vol. 468, no 4, p. 800-806. 2015.

LIU, Yimo; XIONG, Yan; BASSHAM, Diane C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. **Autophagy**, vol. 5, no 7, p. 954-963. 2009.

MACCAFERRI, Marco, et al. Quantitative trait loci for grain yield and adaptation of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) across a wide range of water availability. **Genetics**, 2008, vol. 178, no 1, p. 489-511.

MAGALHÃES, Paulo César; DURÃES, Frederico OM. Fisiologia da produção de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica** (INFOTECA-E), p. 10, 2006.

MARSHALL, Richard S.; VIERSTRA, Richard D. Autophagy: the master of bulk and selective recycling. Annual Review of **Plant Biology**, vol. 69, p. 173-208. 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040606>.

MUNARINI, Anderson et al. **Avaliação de híbridos intervarietais de milho em sistemas de produção camponesa de Santa Catarina. 2013.** Tese (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

MENESES, C. H. S. G.; BRUNO, R. L. A.; FERNANDES, P. D.; PEREIRA, W. E.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Germination of cotton cultivar seeds under water stress induced by polyethyleneglycol-6000. *Scientia Agricola*, V. 68, N. 2, P. 131-138, 2011.

MENA, Luna et al. Perspectivas de desarrollo de la industria semillera de maíz en México. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 35, n. 1, p. 1-7, 2012.

NEVES, J. M. G., et al. Padrão de absorção de água em sementes de cutieira. **Revista Verde**, 2010, vol. 5, p. 190-195.

O'CONNOR, Brian P. SPSS and SAS programs for determining the number of components using parallel analysis and Velicer's MAP test. *Behavior research methods, instruments, & computers*, 2000, vol. 32, no 3, p. 396-402.

PADILHA, Lilian. Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. 2002. Teses Doutoral. Universidade Federal de Lavras, MG (Brasil). 2002. 85 p.

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

PATERNIANI, Ed. Melhoramento e produção do milho no Brasil. ESALQ; [Campinas]: Fundação Cargill, 1980. Vol. único 650p.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. **Melhoramento do milho**. In: BORÉM, A. (ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p.429-486, 1999.

PIAS, O. H.C.; DAMIAN, J. M.; ALBA, F.; GIACOMELLI, A. H.; LOWE, M. A.; TESTA, V. Germination and vigor of maize hybrids seeds submitted to water stress. *Acta Iguazu*. V. 6, N. 1, P. 1-13, 2017.

PRADO, Santiago Alvarez, et al. Phenomics allows identification of genomic regions affecting maize stomatal conductance with conditional effects of water deficit and evaporative demand. **Plant, cell & environment**, 2018, vol. 41, no 2, p. 314-326.

PEREIRA, F. R. S. et al. Arranjo espacial de plantas de milho em sistema plantio direto Spa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 69–74, 2008.

PEREIRA FILHO, Israel A.; RAMALHO, Magno A. Patto. Efeito do dobramento do milho na produção do feijão consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 11, p. 1279-1288, 1985.

PEREIRA, J. R. **Seleção de irmãos completos, visando a qualidade da semente e outros caracteres agronômicos em soja (Glycine max (L.) Merrill)**. UFV.85 p. 1985.

PINTO, R. J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. EDUEM, 1995.

PADILHA, L. (2002) Marcadores moleculares semi-automatizados e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese de Doutorado Lavras: UFLA. 85p.

QUEIROZ, MS; OLIVEIRA, C E S; STEINER, F; ZUFFO, A M; ZOZ, T; VENDRUSCULO, E P; SILVA, M V; MELLO, B F F R; CABRAL, R C; MENIS, F T. Drought Stresses on Seed Germination and Early Growth of Maize and Sorghum. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 11, No. 2, 2019.

SANCHEZ, Lidia Susana Ibarra; IBARRA, Lidia Susana Viveros. Propiedades del pinole, alimento tradicional elaborado de maíz y su relación en la seguridad alimentaria en México. **EDUCATECONCIENCIA**, v. 12, n. 13, 2016.

SANTOS, M. de L. Prospecção e caracterização de genes análogos de resistência (RGAs) em *Elaeis spp.* E avaliação da tolerância de *Setaria viridis* a estresse salino e de frio. Embrapa Agroenergia-Tese/dissertação (ALICE), p. 1–115.2017.

GERAGE, A. C.; SHIOGA, P. M. Avaliação estadual de cultivares de milho “safrinha”. **Londrina: IAPAR**, 2001. 78p

SILOTO, Romildo Cássio. **Danos e biologia de Spodoptera frugiperda (JE Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae) em genótipos de milho**. 2002. 105 p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SLÁVIKOVÁ, Silvia, et al. The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. **Journal of experimental botany**, vol. 56, no 421, p. 2839-2849. 2005.

SILVA, GLACY JAQUELINE. **Desenvolvimento de marcadores moleculares para a caracterização do gene gametófito indeterminado (ig1) em genótipos de milho**. Lavras, MG (Brasil), 2009.

SILVA, PAULO CÉSAR et al. Avaliação de híbridos interpopulacionais de milho quanto a características químicas e agronômicas para silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 03, 2010.

SANTOS, V.L.M.; SILVA, R.F.; SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A.A. A utilização do estresse osmótico na avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.1, p.83-87, 1996.

SIMONI, Fabiana, et al. Sementes de *Sorghum bicolor* L.-Gramineae, submetidas ao estresse hídrico simulado com PEG (6000). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 11, no 1, p. 188-192, 2011.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2007) Situación Actual y Perspectivas del Maíz en México 1996 - 2012. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)**. México, D.F. 208 p.

SU, Yanjun, et al. Evaluating maize phenotype dynamics under drought stress using terrestrial lidar. **Plant methods**, vol. 15, no 1, p. 11. 2019.

SUN, Xun, et al. Improvement of drought tolerance by overexpressing MdATG18a is mediated by modified antioxidant system and activated autophagy in transgenic apple. **Plant biotechnology journal**, vol. 16, no 2, p. 545-557. 2018.

SANTARÉM, E. R., ALMEIDA-CORTEZ, J. S., SILVEIRA, T. S. A., & FERREIRA, A. G. Efeito do estresse hídrico na germinação e crescimento inicial de três espécies de leguminosas. *Acta Botânica Brasileira*, v.10, N. 2, p. 213-251, 1996.

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. **Nature protocols**, 2008, vol. 3, no 6, p. 1101.

TARDIEU, François; SIMONNEAU, Thierry; MULLER, Bertrand. The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. **Annual review of plant biology**, v. 69, p. 733-759, 2018.

TAIZ, L., and E. ZEIGER. "Ethylene: the gaseous hormone." **Plant Physiology**, 4th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, pp.571-591. 2006.

TANG, Jie; BASSHAM, Diane C. Autophagy in crop plants: what's new beyond Arabidopsis?. **Royal Society Open Biology**, vol. 8, no 12, p. 180162. , 2018.

TOORCHI, M.; YUKAWA, K.; NOURI, M.; KOMATSU, S. Proteomics approach for identifying osmotic-stressrelated proteins in soybeans roots. *Peptides*, v. 30, n. 12, p. 2108-2117, 2009.

TEIXEIRA, F. F. et al. Boas práticas na manutenção de germoplasma e variedades crioulas de milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico**, 2005.

Turrent-Fernández A, T A Wise, E Garvey (2012) Factibilidad de alcanzar el potencial productivo de maíz de México. *Mex. Rural Develop. Res. Rep.* 24:1-36.

THOMAS, H.; SMART, C. M. Crops that stay green. **Annals Applied of Biology**, Warwick, v. 123, n. 1, p. 193- 219, 1993.

TSUKADA, Miki; OHSUMI, Yoshinori. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letter**, vol. 333, no 1-2, p. 169-174. 1993.

ÜSTÜN, Suayib; HAFREN, Anders; HOFIUS, Daniel. Autophagy as a mediator of life and death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 40, p. 122-130. 2017.

VILLELA, F. A.; DONI, F. L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 11/12, p. 1957–1968, 1991.

VÁZQUEZ-Carrillo M. G., J. P. PÉREZ-Camarillo, J. M. HERNÁNDEZ-Casillas, M. L. Marrufo-DIAZ y E. Martínez-Ruiz, Calidad del grano y de tortilla de maíces criollos del altiplano y Valle del Mezquital, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(Núm. esp. I 4):49-56.2010.

VIÇOSI, K A; FERREIRA, A A S; OLIVEIRA, L A B; RODRIGUES, F. Estresse hídrico simulado em genótipos de feijão, milho e soja. *Revista de Agricultura Neotropical*, v. 4, n. 1, p. 36-42, 2017.

VIÉGAS, G. P. Práticas culturais. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho**. Volume I. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 277-340.

VAZ-DE-MELO, A.; SANTOS, L. D. T.; FINOTO, E. L.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Germinação e vigor de sementes de milho-pipoca submetidas ao estresse térmico e hídrico. *Bioscience Journal*, v. 28, n. 5, p. 687-695, 2012.

WALULU, R. S.; ROSENOW, D. T.; WERTER, D. B.; NGUYEN, H. T. Inheritance of the stay green trait in sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 970-972, 1994

WANG, Haojie; SCHIPPERS, Jos HM. The Role and Regulation of Autophagy and the Proteasome During Aging and Senescence in Plants. **Genes**, vol. 10, no 4, p. 267. 2019.

WANG, Ping, et al. Apple autophagy-related protein MdATG3s afford tolerance to multiple abiotic stresses. **Plant Science** , vol. 256, p. 53-64. 2017.

WANG, Wenyi, et al. Autophagy: an important biological process that protects plants from stressful environments. **Frontiers in plant science**, vol. 7, p. 2030. 2017.

WESTGATE, Mark E. Seed formation in maize during drought. *Physiology and determination of crop yield, no physiologyandde*, p. 361-364. 1994.

WILLIAMS, Brett, et al. Trehalose accumulation triggers autophagy during plant desiccation. *PLoS Genetics*, vol. 11, no 12, p. e1005705. 2015.

WU, Y.; HUANG, M.; WARRINGTON, D. N. Growth and transpiration of maize and winter wheat in response to water deficits in pots and plots. *Environmental and Experimental Botany*, v. 71, p. 65–71, 2011.

Yang, Mingkang et al. "Multiple Regulatory Levels Shape Autophagy Activity in Plants." **Frontiers in plant science** ol. 10 532. 24 Apr. 2019.

ZHANG, Xiaojing, et al. Genome-wide identification of gene expression in contrasting maize inbred lines under field drought conditions reveals the significance of transcription factors in drought tolerance. **PloS one**, 2017, vol. 12, no 7, p. e0179477.

ZIMMER, P. D. Fundamentos da qualidade da semente. *Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos*, 2012, vol. 3, p. 105-160.

ZHANG, Xiangbo, et al. Effects of drought stress and water recovery on physiological responses and gene expression in maize seedlings. *BMC plant biology*, 2018, vol. 18, no 1, p. 68.