

## Sementes híbridas de milho submetidas a diferentes níveis de estresse salino durante a germinação

**Heloisa Oliveira dos Santos<sup>(1)</sup>; Fernanda de Oliveira Bustamante<sup>(1)</sup>; Eric Schwan Resende<sup>(1)</sup>; Edila Vilela de Resende Von Pinho<sup>(2)</sup>; Carla Massimo Caldeira<sup>(2)</sup>; Maria Laene Moreira de Carvalho<sup>(2)</sup>.**

<sup>(1)</sup>Estudante; Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras/MG; [heloisasantos@dag.ufla.br](mailto:heloisasantos@dag.ufla.br); [fobustamante@hotmail.com](mailto:fobustamante@hotmail.com); <sup>(2)</sup> Professor, UFLA, Lavras/MG; [edila@dag.ufla.br](mailto:edila@dag.ufla.br); [carla.caldeira@dag.ufla.br](mailto:carla.caldeira@dag.ufla.br)

**RESUMO:** Durante a germinação de sementes a concentração salina é um fator determinante e que influencia o estabelecimento e desenvolvimento uniforme do estande em campo. Cultivares tolerantes a altas concentrações salinas nestas fases são fundamentais nos programas de melhoramento. Assim, objetivou-se verificar a qualidade fisiológica e padrão da enzima alfa-amilase em sementes de milho submetidas a diferentes níveis de estresse salino. As soluções salinas foram preparadas utilizando-se como soluto o NaCl em diferentes concentrações. As sementes de três híbridos de milho foram postas para germinar a 25°C. Realizou-se então, a primeira contagem de germinação aos quatro dias e contagem final do teste de germinação no oitavo dia após a semeadura. Também se avaliou a expressão da enzima alfa-amilase. As sementes dos três híbridos apresentam menor porcentagem de germinação em condições de maior concentração de salinidade. O híbrido H3 apresenta a maior tolerância a salinidade e o híbrido H1 é o mais suscetível durante a germinação. A expressão da enzima alfa-amilase varia com o aumento da concentração salina, para cada material genético.

**Termos de indexação:** qualidade fisiológica, alfa-amilase, cloreto de sódio.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje um país estratégico pois, é o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador mundial de grãos de milho. No entanto, há regiões nas quais a falta de chuva, o aumento da evapotranspiração, e solos que tenham deficiências

naturais de drenagem interna, impossibilitam a lixiviação dos sais para horizontes mais profundos do solo, levando ao aumento da concentração de solutos nas camadas mais superficiais do solo afetando a sua salinidade, que é responsável por grandes problemas na germinação de sementes.

Nas regiões áridas e semiáridas, onde o potencial para exploração agrícola é limitado em razão de seus regimes pluviométricos, o uso da irrigação tem contribuído para o aumento da produtividade agrícola. Entretanto o uso inadequado da água salina tem feito com que haja excesso de sais no solo, resultando na perda da capacidade produtiva dos solos. A concentração de sais solúveis ou salinidade é um fator limitante ao desenvolvimento de algumas culturas (Bernardo, 1996).

Dessa forma, objetivou-se verificar o efeito de diferentes concentrações salinas na qualidade fisiológica e padrão de expressão da enzima alfa-amilase em sementes híbridas de milho.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Materiais e Teor de água

Foram utilizadas sementes de três híbridos de milho (H1, H2, H3), produzidas na safra de 2013, na mesma área, sob o mesmo sistema de irrigação e com o mesmo genitor masculino.

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C por 24 horas utilizando-se duas repetições de 50 sementes de cada tratamento. Os resultados dos pesos secos das sementes foram expressos em porcentagem.

#### Teste de germinação sob condições de estresse salino e primeira contagem de germinação

Realizou-se o teste de germinação com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, tendo como substrato papel germitest, na forma de rolo, umedecido com as soluções descritas na **tabela 1**, na proporção de 2,5 vezes seu peso. Os rolos com mesmo tratamento foram mantidos a 25°C.

Foram contabilizadas as plântulas normais ao quarto dia após a semeadura, com o objetivo de se avaliar o vigor das sementes híbridas utilizadas. As sementes que não germinaram foram mantidas para serem avaliadas na contagem final do teste de germinação aos oito dias após a semeadura. O resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais aos quatro dias.

**Tabela 1** - Concentrações, quantidade, condutividade e potencial osmótico das soluções utilizadas nas sementes híbridas de milho submetidas ao estresse salino.

Concentração de NaCl (mol.m <sup>-3</sup> )	Quantidade de NaCl (g/L)	Condutividade Elétrica (μS cm <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	Potencial osmótico (Mpa)
0	0	0,08	0
25	1,46	0,42	-0,2
50	2,93	2,41	-0,4
75	4,39	5,04	-0,6
100	5,85	9,53	-0,8

### Atividade da enzima alfa-amilase

Foram separadas duas amostras de 10 sementes referentes a cada tratamento juntamente com as sementes utilizadas para o teste de vigor e germinação sob condições de estresse salino. Essas sementes foram retiradas ao terceiro dia após a semeadura. O endosperma foi retirado, macerado e armazenado à temperatura de -86°C.

Para a extração da enzima foi adicionado o tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8 + 0,1% de β-mercaptoetanol) na proporção de 250μL por 100mg de pó das sementes. O material foi homogeneizado, mantido em geladeira durante a noite, centrifugado a 14000 rpm por 30min a 4°C. Foram aplicados 60 μL do sobrenadante no gel.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador + 1% de amido solúvel) e 4,5% (gel concentrador). A corrida foi efetuada a 150 V por 5h. No final da corrida, os géis foram revelados para a enzima alfa-amilase (α-AMI) conforme Alfenas et al. (2006). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH

8,9. A avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador.

### Procedimentos estatísticos

O delineamento experimental utilizado foi o DIC, esquema fatorial (3X5), sendo três híbridos de milho (H1, H2, H3) e cinco diferentes níveis de salinidade (0, 25, 50, 75, 100 mol.m<sup>-3</sup>). Os dados previamente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias, foram submetidos à análise de variância e as medias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (SISVAR<sup>®</sup>) (Ferreira, 2000). A avaliação dos padrões enzimáticos foi feita de acordo com a intensidade das bandas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada diferenças significativas entre as sementes híbridas de milho e entre as concentrações salinas, assim como para a interação dos fatores avaliados (p <0,05). O teor de água médio das sementes no momento dos testes foi de 12,3% com variação máxima de 1%.

### Primeira contagem de germinação

O híbrido H1 apresentou uma redução constante da germinação na primeira contagem em função do aumento da concentração de NaCl e mantendo um padrão de queda no vigor até a concentração de 50 mol.m<sup>-3</sup> e observa-se uma queda brusca na quantidade de plântulas germinadas aos 4 dias nas concentrações de 75 e 100mol.m<sup>-3</sup>. No híbrido H2 observou-se uma queda maior quando submetida a concentração de 25 mol.m<sup>-3</sup> em relação a concentração de 0 mol.m<sup>-3</sup>, entretanto não houve mudança significativa quando submetidas a 25 mol.m<sup>-3</sup> em relação a 50 mol.m<sup>-3</sup> voltando a ter uma queda no vigor quando submetido a concentração de 75 mol.m<sup>-3</sup> e continuou caindo na concentração de 100 mol.m<sup>-3</sup>. A semente híbrida H3 teve uma queda continua diretamente proporcional ao aumento da concentração salina, diferindo entre si a cada concentração na qual foi submetida.

Analisando cada concentração salina em função dos diferentes híbridos de milho observou-se que a concentração de 0 mol.m<sup>-3</sup> não teve diferença significativa entre os três híbridos (**Tabela 2**).

Nas concentrações de 25 e 50 mol.m<sup>-3</sup> os híbridos H2 e H3 tiveram maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem. Na concentração de 75 mol.m<sup>-3</sup> todos os híbridos foram diferentes significativamente entre si. O híbrido H2 obteve um melhor desempenho, seguido do H3 e por ultimo o H1. O híbrido H2 obteve maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem na concentração de 100 mol.m<sup>-3</sup> enquanto os híbridos H3 e H1 não diferenciaram entre si.

**Tabela 2** - Porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação de três híbridos de milho, submetidas a 5 níveis de concentração salina.

Concentração (mol.m <sup>-3</sup> )	Híbridos		
	H1	H2	H3
0	65aA	70aA	71aA
25	47bB	57aB	55aB
50	28bC	44aB	39aC
75	9cD	31aC	22bD
100	6bD	19aD	6bE
CV(%)	16,4		

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

### Germinação sob condições de estresse salino

Nas concentrações de 0 e 25 mol.m<sup>-3</sup> não houve diferença significativa na porcentagem de germinação entre H1, H2 e H3. Nas concentrações 50 mol.m<sup>-3</sup> de NaCl podemos observar que H2 e H3 tiveram uma maior porcentagem de germinação que H1, e por consequência uma maior tolerância a salinidade. Na concentração de 75 mol.m<sup>-3</sup> todos os híbridos diferiram significativamente entre si, sendo o maior desempenho o do híbrido H2 seguido do H3 e por ultimo do H1. Na concentração de 100 mol.m<sup>-3</sup> a semente híbrida H3 teve uma porcentagem de germinação maior do que H1 e H2 (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Porcentagem de germinação de três sementes híbridas de milho, submetidas a cinco níveis de concentração salina.

Concentração (mol.m <sup>-3</sup> )	Híbridos		
	H1	H2	H3
0	98aA	100aA	96aA
25	94aA	96aA	92aA
50	80bB	85aB	86aA
75	52cC	80aB	76bB
100	42cD	64bC	72aB

CV (%) 9,6

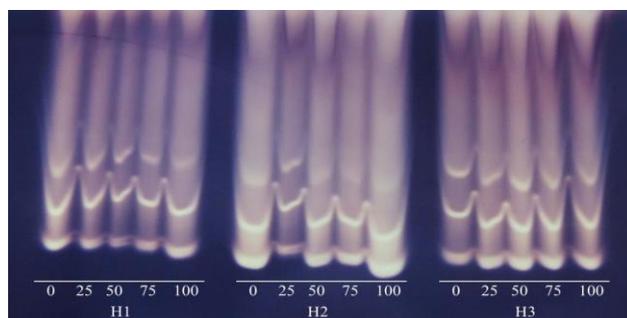
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, e maiúscula na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observou-se que existe variação com relação à sensibilidade das sementes híbridas em função do aumento da salinidade, sendo H2 e H3 sempre melhores que H1, e H2 e H3 diferindo entre si em concentrações acima de 50 mol.m<sup>-3</sup>. H3 é sensível na concentração de 75 mol.m<sup>-3</sup> e mais tolerante na concentração de 100 mol.m<sup>-3</sup> quando comparada a H2. Tanto H2 quanto H3 podem ser utilizados na produção de sementes de milho até a concentração de 50 mol.m<sup>-3</sup>, uma vez que são capazes de atingir a porcentagem mínima de germinação (85%) exigida pelo MAPA.

Em estudos de tolerância de cultivares de milho, Carpici et al. (2009) relataram variação das respostas de diferentes cultivares de milho em relação a presença de NaCl, com decréscimo da germinação em função do incremento de NaCl. Uma das explicações mais aceitas para inibição do crescimento da plântula pelo sal é o desvio de energia do crescimento para a manutenção, isto é, a redução na matéria seca pode refletir o custo metabólico de energia, associado à adaptação a salinidade e redução no ganho de carbono (Richardson & McCree, 1985).

### Padrão da enzima alfa-amilase

Os padrões isoenzimáticos da alfa-amilase em sementes híbridas de milho submetidas a diferentes concentrações de estresse salino estão representados na **figura 1**.



**Figura 1.** Padrão de expressão da enzima alfa-amilase em função das três sementes híbridas de milho, sob cinco níveis de estresse salino.

Para o nível controle (0 mol.m<sup>-3</sup>), observa-se baixa expressão da enzima alfa-amilase para os

híbridos H1 e H3. O mesmo não se observa para o híbrido H2, onde há a menor expressão da alfa-amilase no tratamento a 25 mol.m<sup>-3</sup> de NaCl.

Para padronizar todas as amostras, as sementes foram coletadas após três dias de embebição em todos os tratamentos. Uma vez que a variação na retirada das amostras pode mascarar os resultados obtidos.

Oliveira et al (2013) trabalhando com expressão da enzima alfa-amilase em sementes de milho ressaltam que além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar envolvidos no controle do caráter qualidade de sementes. Tal afirmação justifica a baixa atividade dessa enzima em sementes dos híbridos considerados de alta qualidade fisiológica, a exemplo do que se observa para o híbrido H3. No entanto, quando observa-se para a análise de vigor, pelo teste de primeira contagem de germinação, o híbrido H2 obteve valores superiores e quando se compara com a atividade da enzima alfa-amilase, este híbrido também apresenta maiores expressões para todos os tratamentos avaliados.

Segundo Xie et al (2007) é por meio da embebição que as enzimas responsáveis pela degradação do amido em sementes de milho são "sintetizadas de novo", através da ativação pela giberelina liberada na camada de aleurona, a qual é sintetizada no momento da embebição dessas sementes.

Abreu et al (2014) afirmam que com a restrição de água na semente de milho tem-se o retardamento do processo de embebição, devido a uma menor disponibilidade de água. Sendo assim tem-se maior acúmulo da enzima alfa-amilase quando se tem o aumento desta restrição. Sendo assim tem-se então maior acúmulo da enzima alfa-amilase quando se tem o aumento deste restrição. Fato este observado no presente trabalho para os três híbridos em diferentes níveis de salinidade, que também gera uma restrição de água, uma vez que se trata de materiais genéticos diferentes e que tem respostas a ativação desta enzima diferenciados.

Ressalta-se ainda que a alfa-amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho. As alfa-amilases constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas -1,4 do amido,

glicogênio e outros carboidratos (Franco et al., 2002). Essa enzima juntamente com a enzima beta amilase estão altamente relacionadas à qualidade de sementes. Por isso, o estudo da expressão dessas enzimas é importante para o conhecimento do comportamento genético, podendo assim auxiliar em programas de melhoramento genético de milho, voltado para qualidade de sementes (Oliveira et al, 2013).

### CONCLUSÕES

As sementes dos três híbridos testados apresentam menor porcentagem de germinação quando colocadas em condições de maior concentração de salinidade.

O híbrido H3 é o que apresenta maior tolerância a salinidade e o híbrido H1 é o mais suscetível durante o processo germinativo.

A expressão da enzima alfa-amilase varia com o aumento da concentração salina, para cada material genético testado.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal do nível superior. (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

### REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. *Journal of Seed Science*, v. 36, n.1, p. 40-47, 2014.
- ALFENAS, A. C. **Eletrforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627p.
- BERNARDO, S. **Manual de irrigação**. 6. ed. Viçosa: UFV, 1996. 596 p.
- CARPICI, E. B.; CELIK, N.; BAYRAM, G. Effects of salt stress on germination of some maize ( *Zea mays* L.) cultivars. *African Journal Biotechnology*, Nairobi, v. 8, p. 4918-4922, 2009.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL



DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anuais...**São Carlos, 2000. p 255-258.

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

OLIVEIRA, G. E.; VON PINHO, R. G.; ANDRADE, T.; VON PINHO, E.V.R.; SANTOS, C.D.; VEIGA, A.D. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**. v.37, n.1, 2013.

RICHARDSON, S.G.; McCREE, K.J. Carbon balance of sorghum exposed to salt and water stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.79, p.1015-1020, 1985.



# XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,  
mercados e segurança alimentar"

---