

# QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE ALFA-AMILASE EM SEMENTES DE MILHO PRODUZIDAS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO E HÍDRICO

RAFAEL PARREIRA DINIZ<sup>1</sup>, IOLANDA VILELA VON PINHO<sup>1</sup>, BRUNO DA COSTA PANIAGO<sup>1</sup>,  
EDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO<sup>1</sup>, HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS<sup>1</sup>,  
RENZO GARCIA VON PINHO<sup>1</sup> e CARLA MASSIMO CALDEIRA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG.

E-mail: rafadiniz\_rpd@yahoo.com.br, iolandavpinho@hotmail.com, costapaniago@gmail.com, edila@dag.ufla.br, heloisasantos@dag.ufla.br, renzo@dag.ufla.br, carla.caldeira@dag.ufla.br

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.17, n.1, p. 37-48, 2018*

**RESUMO** - Durante o processo de produção de sementes, estresses abióticos como salinidade do solo e déficit hídrico são fatores determinantes e que influenciam no estabelecimento e desenvolvimento uniforme do estande em campo. Nesse sentido, cultivares tolerantes a altas concentrações salinas nestas fases são fundamentais nos programas de melhoramento. Diante disto, objetivou-se com a presente pesquisa verificar a influência da produção de sementes sob condições de estresse hídrico e salino na germinação e no vigor, assim como na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de milho. Para isso, foram conduzidos dois experimentos para a produção de sementes de milho, um em condições de estresse salino e o outro sob condições de déficit hídrico. Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos completos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas. As sementes colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, determinados pela linha de leite (LL), foram submetidas a análises fisiológicas e de vigor, bem como determinou-se a expressão da enzima  $\alpha$ -amilase por eletroforese. Diante dos resultados foi possível concluir que a germinação e o vigor das sementes produzidas em solos com condutividade de 3 dS m<sup>-1</sup> não são afetados pela salinidade, e o desenvolvimento das plantas em condições de estresse hídrico e salino não afetou a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes colhidas na LL5.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., eletroforese, estádios de desenvolvimento.

## PHYSIOLOGICAL QUALITY AND ALPHA-AMYLASE EXPRESSION OF MAIZE SEEDS IN CONDITIONS OF SALT AND WATER STRESS

**ABSTRACT** - During seed production process, abiotic stresses such as soil salinity and drought are determining factors that influence the establishment and development of uniform stand on the field. Thus, tolerant cultivars to high salt concentrations in these phases are critical in breeding programs. This way, we aimed to investigate seeds production in conditions of water and salt stress on maize seeds germination and vigor as well as the  $\alpha$ -amylase enzyme activity. Two experiments were performed for maize seeds production in salt stress conditions and drought. The experiments were conducted in a randomized complete block design in a split-plot arrangement. Seeds harvested at different development stages, determined by milk line (ML), were submitted to vigor and physiological analysis as well as the expression determination of  $\alpha$ -amylase enzyme by electrophoreses. With the results it was concluded that both, the seeds germination and vigor produced in soil with conductivity 3 dS m<sup>-1</sup>, are not affected by salinity, and the plants development in water and salt stress conditions did not affect the activity of  $\alpha$ -amylase enzyme in seeds harvested in ML5 maturity stage.

**Keywords:** *Zea mays* L., electrophoresis, development stages.

Durante o processo de produção, os principais estresses abióticos como salinidade elevada, a seca, frio e calor influenciam negativamente a sobrevivência, a produção de biomassa e rendimento de culturas de alimentos básicos em até 70% (Thakur et al., 2010). O estresse em plantas é definido por fatores abióticos (salinidade, calor, água, etc.) ou bióticos (insetos, microrganismos, etc.), e limita a cinética da fotossíntese e reduz a capacidade da planta de converter energia química em biomassa (Mantri et al., 2012).

Em culturas agrícolas, a baixa produtividade, na maior parte dos casos, é atribuída a vários estresses abióticos. As perdas nas colheitas por causa de várias agressões ambientais é uma importante área de preocupação para lidar com as necessidades alimentares crescentes (Shanker & Venkateswarlu, 2011).

A influência do déficit hídrico, como fator abiótico, sobre o desenvolvimento de plantas de milho tem sido amplamente investigada. Alterações morfológicas no crescimento, produtividade de grãos, teor de clorofila, fotossíntese, entre outros, são passíveis de ocorrer (Anjum et al., 2011). Também tem sido observado que o déficit hídrico após a polinização reduz o acúmulo de amido no endosperma, além da alteração na atividade enzimática nas sementes (Ober et al., 1991). Com relação à qualidade fisiológica, o déficit hídrico não influencia no vigor das sementes, assim como na germinação das sementes de milho (Galbiatti et al., 2004). No entanto, mais pesquisas são necessárias para verificar a influência do estresse hídrico sobre a qualidade fisiológicas das sementes de híbridos e linhagens.

Os efeitos adversos do excesso de minerais como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  sobre as plantas é definido como estresse salino (Munns, 2005). Portanto, é sabido que a salinidade também é um dos estresses abióticos que

mais limita o crescimento e a produtividade das plantas em todo o mundo (Vaidyanathan et al., 2003).

A influência da salinidade do solo sobre o desenvolvimento de plantas também é discutida na área científica em diversas publicações para diferentes culturas (Parihar et al., 2014). O excesso de sais pode perturbar as funções fisiológicas e bioquímicas das plantas, causando estresse osmótico, o que resulta em distúrbios das relações hídricas, alterações na absorção e utilização de nutrientes essenciais, além do acúmulo de íons tóxicos. Entretanto, as respostas das plantas à salinidade são complexas e de difícil compreensão por envolverem vários genes e diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos (Hasegawa et al., 2000). Além disso, as plantas podem se comportar de forma variada em relação aos limites de tolerância à salinidade, e dentro de uma mesma espécie pode haver variações entre genótipos nos quais os efeitos variam entre as fases de desenvolvimento (Neves et al., 2008).

O milho é uma cultura moderadamente sensível à salinidade, apresentando salinidade limiar da água de  $1,1 \text{ dS m}^{-1}$  e do solo de  $2,7 \text{ dS m}^{-1}$  (Ayers & Westcot, 1999).

De acordo com Wang et al. (2001), a redução na área foliar em plantas sob estresse salino pode provocar redução na absorção de luz e na eficiência de uso da radiação, em condições de campo. Por outro lado, as plantas sob estresse salino podem apresentar taxas de fotossíntese médias superiores àquelas de plantas irrigadas com água de baixa salinidade, em função do menor sombreamento das folhas inferiores da planta, causado pela redução da área foliar, decorrente da salinidade no solo (Távora et al., 2000).

O milho é o principal cereal produzido no Brasil, cultivado em uma área com mais de 15,4 milhões de hectares, com produção de aproximadamente 83,5 milhões de toneladas de grãos e produtividade média

de 5,4 mil quilos por hectare (Acompanhamento..., 2016).

Pesquisas que visam avaliar os efeitos dos estresses hídrico e salino na germinação e no vigor de sementes de milho em condições controladas são comuns (Hoque et al., 2014). Todavia, estudos visando avaliar os efeitos desses estresses na produção de sementes em nível de campo são escassos.

Diante do exposto, objetivou-se com a presente pesquisa verificar a influência da produção de sementes sob condições de estresse hídrico e salino na germinação e no vigor, assim como na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de milho.

### Material e Métodos

Para atender os objetivos propostos, dois experimentos de campo foram conduzidos na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo um destinado à aplicação de estresse salino e outro referente ao desenvolvimento das plantas sobre restrição hídrica. Os testes para mensurar a qualidade fisiológica das sementes produzidas nos dois experimentos foram realizados no Laboratório Central de Sementes da UFLA.

Dois genótipos foram selecionados para a avaliação, o híbrido simples GNZ 2004, e seu parental, a linhagem LE57.

#### Experimento 1 - Estresse salino

Para a instalação desse experimento, a área experimental foi preparada de forma convencional, com uma aração e duas gradagens. Posteriormente, os sulcos de plantio foram realizados com auxílio de uma máquina semeadora, espaçados em 0,80 m entre linhas. No sulco de plantio foram aplicados 300 kg

ha<sup>-1</sup> da formulação 08-28-16 (N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O), conforme determinado pela análise de solo.

As sementes do híbrido simples GNZ 2004 e da linhagem LE57 foram semeadas em novembro de 2005, em experimentos independentes. O experimento de avaliação do híbrido simples GNZ 2004 foi instalado sob o delineamento de blocos completos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. O fator estresse salino foi avaliado na parcela (com estresse ou não) e o fator estágio de desenvolvimento das sementes foi avaliado na subparcela (quatro estádios de maturação das sementes baseados na linha de leite - LL, sendo eles: LL2, LL3, LL4 e LL5). Cada subparcela foi composta por quatro linhas de cinco metros. Para a avaliação da linhagem LE57, foi adotada a mesma condução experimental. Após a germinação das sementes, foi feito o desbaste, de modo a garantir um estande de 66.667 plantas ha<sup>-1</sup>. Os demais tratamentos culturais foram os mesmos recomendados para o sistema de cultivo de milho na região Sul de Minas Gerais e de acordo com as necessidades da cultura.

Para induzir o estresse salino nas plantas, amostras de solo foram coletadas previamente à instalação dos experimentos. Posteriormente, foi calculada a quantidade de cloreto de sódio (NaCl) a ser aplicada em cada subparcela por meio da seguinte fórmula:

$$[\%Na] = \frac{[Na^+] \times 100}{T}$$

Na qual  $[\%Na]$  refere-se à porcentagem de saturação por sódio;  $Na^+$  é referente à concentração de sódio necessária para ocupar 60% das cargas no solo  $[cmolc\ dm^{-3}]$ ;  $T$  é referente à Capacidade de Troca Catiônica do Solo (CTC).

Para alcançar a condutividade de 3 dS m<sup>-1</sup>, condição estressante para as plantas de milho, a concen-

tração necessária de sódio foi de 60%, o que resultou na aplicação de 2.702,0 mg de NaCl kg<sup>-1</sup> de solo, considerando para isso a profundidade de alcance das raízes de 0,20 m. Nas subparcelas destinadas ao estresse salino, aplicou-se a quantidade total de 8,650 kg de NaCl, distribuídos em duas aplicações, uma imediatamente após a semeadura com a quantidade de 3,460 kg de NaCl (40% do total) e a outra no florescimento das plantas, com 5,190 kg de NaCl.

A condutividade elétrica do solo foi determinada conforme a metodologia proposta por Raij et al. (2001) para extrato de saturação 1:5 (10 cm<sup>3</sup> de terra fina seca ao ar para 50 mL de água). É importante salientar que amostragens de solo foram realizadas durante o desenvolvimento das plantas.

Durante o estágio de florescimento, foram feitas autofecundações manuais visando a produção de sementes híbridas (híbrido GNZ 2004) e sementes da linhagem LE57. A colheita das sementes foi realizada nos estádios de desenvolvimento de linha de leite 2, 3, 4 e 5 (LL2, LL3, LL4 e LL5), conforme a metodologia proposta por Hunter et al. (1991).

## Experimento 2 - Estresse hídrico

Para a indução do estresse hídrico, sementes do híbrido simples GNZ 2004 e da linhagem LE57 foram plantadas em vasos com volume de 30 litros, contendo substrato composto por areia e terra na proporção de 1:1. Os vasos foram alocados na área experimental do Departamento de Agricultura da UFLA, separados em dois experimentos independentes, um para o híbrido GNZ 2004 e outro para a linhagem LE57, conforme feito anteriormente para indução do estresse salino.

Oitenta vasos foram cultivados em condições de estresse hídrico (40 referentes à linhagem LE57 e

40 ao híbrido GNZ 2004) e oitenta cultivados sem estresse hídrico (40 para linhagem e 40 para o híbrido). Nos vasos contendo as plantas submetidas ao estresse hídrico a capacidade de retenção de água do solo foi mantida em 40% após a fertilização dos óvulos. Naqueles vasos contendo as plantas não submetidas ao estresse hídrico a capacidade de retenção de água no solo foi mantida em 70% durante todo o desenvolvimento da planta. A colheita das sementes foi realizada nos estádios de desenvolvimento LL3 e LL5.

Os dois experimentos independentes foram instalados sob o delineamento de blocos completos casualizados, com quatro repetições, sob o esquema de parcelas subdivididas, com o fator estresse (com ou sem) alocado nas parcelas e o fator épocas de colheita (dois estádios de maturação das sementes baseados na linha de leite - LL, sendo eles: LL3 e LL5) avaliado nas subparcelas. Cada subparcela foi composta por 10 vasos, com uma planta por vaso.

Durante a fase de florescimento, autofecundações foram realizadas manualmente para a produção de sementes. A colheita das espigas e a separação das sementes do sabugo foram realizadas manualmente. Em seguida, as sementes foram submetidas aos testes de germinação e de envelhecimento acelerado, com quatro repetições, para avaliação da qualidade fisiológica (Regras..., 2009). É importante salientar que, em razão do estresse hídrico aplicado, poucas sementes foram produzidas pelas plantas, de modo que a mensuração da qualidade fisiológica foi avaliada somente em dois estádios de maturação das sementes.

## Atividade da enzima alfa-amilase

Para a extração da enzima  $\alpha$ -amilase, nove sementes de cada tratamento foram semeadas em

papel Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 mL g de papel<sup>-1</sup>. As sementes semeadas foram acondicionadas em um germinador regulado para 25 °C, por um período de 70 horas. Decorrido esse período, as sementes iniciaram o processo de germinação, de modo que a plúmula e as raízes das plântulas foram descartadas e o restante foi triturado em mortar sobre gelo, na presença de N-líquido, conforme protocolo descrito por Roveri José (2003). Para a extração da enzima, 200 mg do pó das sementes germinadas foram ressuspensos em 600 µL do tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 + 0,4% de PVP (polivinil pirrolidone)). Todas as amostras foram acomodadas sobre gelo e submetidas a temperatura de ±5 °C por um período de aproximadamente 12 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 60 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 40 µL do sobrenadante de cada tratamento foi aplicada em géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador contendo 5% de amido solúvel). A separação das moléculas por eletroforese foi realizada a 75 volts, durante uma hora, no gel concentrador, e a 150 volts, por 3 horas e 30 minutos, no gel separador. Para o campo elétrico foi utilizado o tampão gel eletrodo, uma solução de Tris-glicina pH 8,9. A revelação para detecção da atividade da enzima foi conduzida segundo a metodologia descrita por Alfenas et al. (1991).

A avaliação da atividade da  $\alpha$ -amilase foi qualitativa, evidenciada pelas intensidades das bandas acromáticas em fundo azulado por causa da reação do iodo com a amilase, tratando-se de uma revelação negativa. Dessa forma, o amido foi hidrolisado nos locais em que a enzima esteve presente.

## **Análise dos dados**

A análise dos dados relativos à qualidade fisiológica das sementes foi realizada em sob o delineamento de blocos completos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas (2x4) para as condições de estresse salino e (2x2) para as condições de estresse hídrico, cujos fatores foram condições de estresse e estádios de desenvolvimento.

Após a obtenção dos dados foram realizadas análises preliminares para verificar pressuposições da análise de variância, sendo em seguida realizadas as análises de variância. Diante do atendimento dos pressupostos, os dados foram submetidos às análises individuais para cada característica. Foram obtidas informações da significância, os efeitos, assim como as estimativas das médias de cada tratamento. O teste de Scott & Knott (1974) foi utilizado para agrupar as médias, com probabilidade de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do pacote *eas-yanova* (Arnhold, 2013) implementado no software R (R Core Team, 2014).

## **Resultados e Discussão**

### **Estresse salino**

Por meio dos resultados da análise de variância para a avaliação das sementes produzidas pelo híbrido simples GNZ 2004 foi observada significância somente para a fonte de variação estádio de desenvolvimento de linha de leite para os testes de germinação e envelhecimento acelerado (dados não mostrados). Para as sementes produzidas pela linhagem LE57, a análise de variância revelou significância para o estádio de desenvolvimento de linha de leite para os resultados do teste de germinação

e para a interação da linha de leite com o tipo de estresse para o teste de envelhecimento acelerado (dados não mostrados).

O percentual médio de germinação das sementes, tanto produzidas pelo híbrido quanto produzidas pela linhagem, em condições de desenvolvimento normais ou em estresse salino não diferiu entre si (Tabela 1). Os maiores valores percentuais da germinação de sementes produzidas pelo híbrido e pela linhagem foram observados para sementes co-

lhidas no estágio LL5, com valores de 99% e 98%, respectivamente.

Com relação ao teste de envelhecimento acelerado, o desenvolvimento de plantas da linhagem LE57 em solo salino reduziu o vigor das sementes colhidas na LL2 quando comparado ao vigor de sementes produzidas em condições normais de solo (Tabela 2). Sementes da linhagem LE57 produzidas em condições normais de solo apresentaram alto vigor em todos os estádios de colheita, com estimativas acima de 87%.

**Tabela 1** - Porcentagem média da germinação de sementes produzidas pelo híbrido GNZ 2004 e pela linhagem LE57, em condições (Com) ou não (Sem) de estresse salino, colhidas em diferentes estádios de linha de leite.

Linha de Leite	Híbrido GNZ 2004			Linhagem LE57		
	Com	Sem	Média	Com	Sem	Média
LL5	99 a A*	99 a A	99 a	99 a A	97 a A	98 a
LL4	80 b A	70 b A	75 b	51 b A	50 b A	50 b
LL3	26 c A	30 c A	28 c	14 c A	19 c A	17 c
LL2	14 c A	18 c A	16 d	7 c A	9 c A	8 d
Média	55 A	54 A		43 A	44 A	

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 2** - Porcentagem de média de vigor, avaliado pelo teste de envelhecimento acelerado de sementes produzidas pelo híbrido GNZ 2004 e pela linhagem LE57, produzidas pela condição de estresse salino (Com) ou não (Sem), colhidas em diferentes estádios de linha de leite.

Linha de Leite	Híbrido GNZ 2004			Linhagem LE57		
	Com	Sem	Média	Com	Sem	Média
LL5	99 a A*	98 a A	99 a	97 a A	95 a A	96 a
LL4	91 ab A	91 ab A	91 b	91 a A	87 a A	89 ab
LL3	96 a A	93 ab A	95 ab	93 a A	90 a A	91 ab
LL2	84 b A	85 b A	85 c	74 b B	90 a A	82 b
Média	92 A	92 A		89 A	90 A	

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### Estresse hídrico

No teste de germinação para as sementes produzidas pelo híbrido quanto às sementes produzidas pela linhagem, em condições ou não de estresse hídrico, foram observados maiores valores de germinação quando elas foram colhidas na LL5 (Tabela 3). Para as sementes produzidas pelo híbrido simples, colhidas na LL3, foram observados maiores valores de germinação em sementes produzidas sob condições de estresse hídrico, com estimativa média de 77%.

No teste de envelhecimento acelerado, menores valores de vigor foram observados em sementes produzidas sob condições normais de disponibilidade de água e colhidas na LL3, tanto para o híbrido quanto para a linhagem (Tabela 3). Já no estágio LL5 não houve influência do estresse hídrico sobre o vigor das sementes avaliadas por meio deste teste.

### Atividade da enzima $\alpha$ -amilase

O perfil eletroforético da enzima  $\alpha$ -amilase reforçou os resultados obtidos nos testes de germinação. Observou-se maior atividade em sementes colhidas no estágio de maturação LL5 para a linhagem, independentemente da condição de produção das

sementes (Figura 1). Nas sementes produzidas pelo híbrido e pela linhagem, colhidas nos estádios LL2 e LL3, foi verificada baixa atividade da  $\alpha$ -amilase, independentemente das condições de estresse durante o processo de produção. No estágio LL4, em condições de estresse salino, houve aumento da atividade dessa enzima em sementes produzidas pela linhagem.

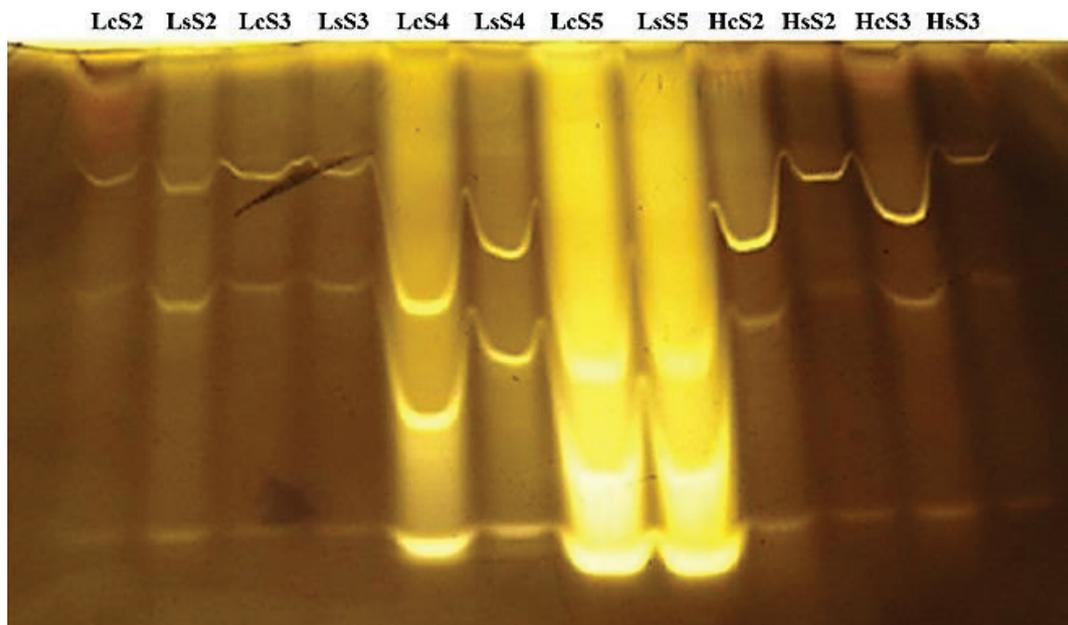
Em condições de estresse hídrico, foi verificado o aumento da expressão da enzima nas sementes do híbrido colhidas no estágio LL3 quando comparada à atividade dessa enzima em sementes produzidas em condições normais de disponibilidade hídrica (Figura 2). Enquanto a linhagem no mesmo estágio LL3 apresentou maior atividade enzimática sem o estresse hídrico, a maior atividade da  $\alpha$ -amilase em sementes produzidas pelo híbrido e pela linhagem foi verificada no estágio de linha de leite 5, independentemente das condições de produção delas.

A produção de sementes no Brasil, geralmente, ocorre em condições normais para o desenvolvimento das plantas. Todavia, algumas plantas podem se desenvolver em condições de estresse quando os sais atingem níveis comprometedores para o seu crescimento e desenvolvimento (Gheyi, 2000). A salinização pode ser causada pelo excesso de aplicação de fertilizantes no solo que induz o sistema radicular ao estresse osmótico (Ayers & Westcot, 1999), e os sais

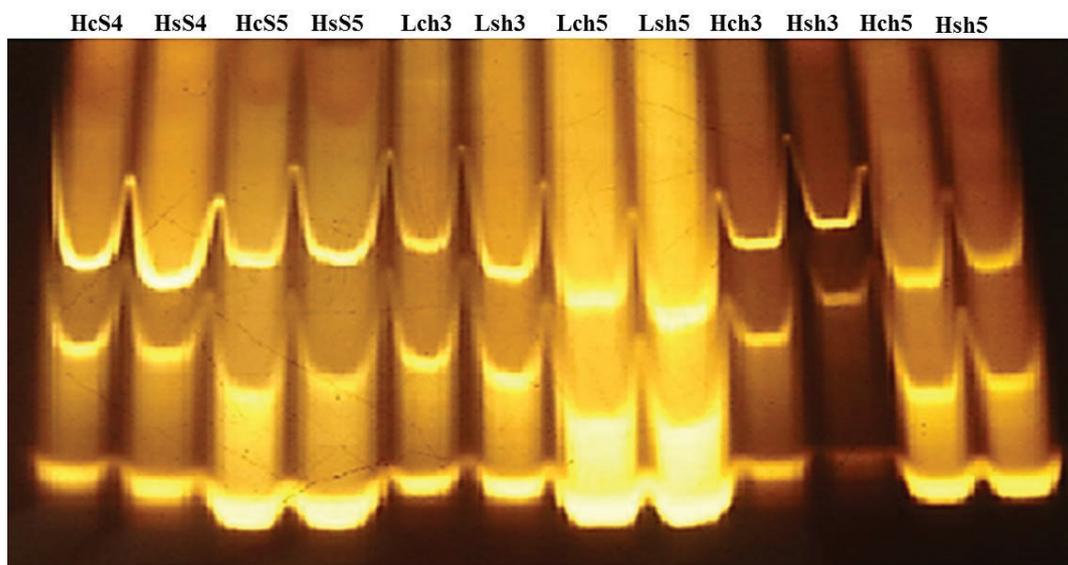
**Tabela 3** - Porcentagem média da germinação (TG) e envelhecimento acelerado (EA) de sementes produzidas pelo híbrido GNZ 2004 e pela linhagem LE57, produzidas sob condição de estresse hídrico (Com) ou não (Sem) e colhidas em diferentes estádios de linha de leite.

Linha de Leite	TG				EA			
	Híbrido		Linhagem		Híbrido		Linhagem	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
LL5	99 aA	99 aA	94 aA	92 aA	100 aA	100 aA	99 aA	99 aA
LL3	77 bA	65 bB	35 bA	48 bA	97 aA	66 bB	93 aA	76 bB

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 1** - Perfil eletroforético da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de milho produzidas pelo híbrido simples GNZ 2004 (H) e pela linhagem LE57 (L), produzidas em condições (c) ou não (s) de estresse salino (S) e colhidas nos estádios de desenvolvimento LL2 (2), LL3 (3), LL4 (4) e LL5 (5).



**Figura 2** - Perfil eletroforético da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de milho produzidas pelo híbrido simples GNZ 2004 (H) e pela linhagem LE57 (L) em condições (c) ou não (s) de estresse salino (S) ou hídrico (h), colhidas nos estádios de desenvolvimento (linhas de leite) LL3 (3), LL4 (4) e LL5 (5).

atingem níveis comprometedores para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Gheyi, 2000). Sendo assim, foi verificado que a germinação das sementes produzidas em solos com condutividade de até 3 dS m<sup>-1</sup> não é afetada.

O processo de maturação de sementes consiste em uma série de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas, em que é possível avaliar esse processo e estabelecer bases para a determinação segura do momento de colheita (Marcos Filho, 2005). Carvalho e Nakagawa (2000) relatam que sementes ainda não maduras podem germinar, contudo não resultam em plântulas vigorosas, como as que seriam obtidas de sementes colhidas no ponto de maturidade fisiológica.

Desse modo, é esperada maior percentagem de germinação para as sementes colhidas em estádios mais avançados de maturação, em função de todas as etapas ter sido concluídas. Para a linhagem LE57, quando as sementes foram produzidas sob condições normais de desenvolvimento das plantas, uma maior taxa de germinação também foi verificada por Andrade et al. (2013) no estágio de desenvolvimento LL5, observando redução gradativa em estádios mais precoces de desenvolvimento, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa. Para as sementes produzidas pelo híbrido simples GNZ 2004, também foram observados maiores percentuais de germinação no estágio LL5.

Embora não comparado, é notório salientar que as sementes produzidas pelo híbrido simples GNZ 2004 nos estádios de desenvolvimento LL2, LL3 e LL4 obtiveram maiores percentuais de germinação em relação às sementes produzidas pela linhagem LE57. No estágio LL2 houve um aumento de 100% no percentual de germinação. Isso pode ser decorrente da expressão da heterose sobre a qualidade fisiológica das sementes. Sementes híbridas de milho apresentaram qualidade fisiológica superior quando

comparadas às sementes das linhagens genitoras (Gomes et al., 2000).

Por meio do teste de envelhecimento acelerado, verificou-se que somente no estágio de desenvolvimento LL2 a produção de sementes da linhagem LE57 em condição de estresse salino afetou o vigor daquelas sementes. Pode-se inferir que o estresse influenciou na estruturação da membrana no estágio inicial de maturação das sementes. Farias (2008) demonstrou que o aumento da salinidade pode induzir a deficiência de cálcio, e, conforme relatado por Epstein e Bloom (2006), esse nutriente é essencial para a integridade da membrana plasmática das células vegetais, e sua deficiência pode levar à perda da integridade da membrana, afetando desta forma a absorção de íons, principalmente o potássio. O teste de envelhecimento acelerado é importante por permitir inferir sobre o potencial de armazenamento das sementes.

Os percentuais de germinação observados após o teste de envelhecimento acelerado das sementes para os estádios de maturação LL2 e LL3 são de maiores magnitudes quando comparados com os reportados por Andrade et al. (2013) para a linhagem LE57.

Pode-se observar que o estresse aplicado nas plantas não influenciou a taxa de germinação e vigor das sementes na LL5. Resultados semelhantes foram reportados por Galbiatti et al. (2004). Todavia, para cultivares de milho doce, foi observado que a deficiência hídrica moderada reduziu a taxa de germinação das sementes, mas não influenciou no vigor (Chotena et al., 1980). Galbiatti et al. (2004) sugerem que plantas sob condições de estresse reduzem a produção total de sementes, porém a qualidade fisiológica das sementes produzidas não é afetada.

A colheita de sementes de híbridos de milho pode ser iniciada a partir do estágio LL3 de maturação das sementes em condições normais do processo

de produção (Faria et al., 2002). No estudo atual, as sementes produzidas pelo híbrido GNZ 2004 e pela linhagem LE57 colhidas no estágio de desenvolvimento LL3 apresentaram baixo percentual de germinação, independentemente das condições de produção delas. Isso evidencia que para esses genótipos a colheita das sementes deve ser realizada em estádios mais avançados de maturação. De acordo com Fessel et al. (2001), sementes da linhagem e do híbrido devem ser colhidas a partir do estágio de desenvolvimento LL5.

A enzima  $\alpha$ -amilase está associada à hidrólise do amido presente no endosperma em glicose, a qual fornece energia para o crescimento da plântula (Kaneko et al., 2002). Desse modo, ela é considerada uma enzima importante para o processo de germinação, além de estar relacionada com a qualidade fisiológica das sementes (Oliveira et al., 2013). Por meio dos resultados obtidos neste estudo foi verificado que nos estádios de desenvolvimento LL3 e LL4 o estresse hídrico e salino no processo de produção das sementes promoveu um aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase.

Os estresses hídrico e salino afetam diretamente o desenvolvimento das plantas. Mas as alterações na morfologia, fisiologia e aparato bioquímico são relativas ao período de exposição das plantas ao estresse (Munns, 2005). Esses estresses aplicados por algumas semanas podem reduzir o crescimento radicular e o tamanho das folhas, além de causar a morte das folhas mais velhas. Por períodos superiores a um mês, eles reduzem o crescimento das plantas, alteram o período de florescimento, causam a morte de folhas mais novas, além de reduzirem o número de sementes produzidas. Mas quando se trata da qualidade fisiológica das sementes, pode-se verificar que o desenvolvimento das plantas em condições de estresse hídrico ou salino pode influenciar

a germinação e o vigor das sementes, dependendo do estágio de maturação. Todavia, em estádios de maturação mais avançados, a exemplo da LL5, não há influência desses estresses na qualidade fisiológica das sementes. Ele foi verificado para a atividade da  $\alpha$ -amilase.

### Conclusões

A germinação e o vigor das sementes produzidas em solos com condutividade elétrica de  $3 \text{ dS m}^{-1}$  não são afetados pela salinidade.

O estresse hídrico não influencia na germinação e no vigor das sementes colhidas no estágio de maturação LL5, tanto as produzidas pelo híbrido simples GNZ 2004 quanto pela linhagem LE57.

O desenvolvimento das plantas em condições de estresse hídrico e salino não afeta a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes colhidas no estágio de maturação LL5.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-Fapemig, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto.

### Referências

- ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA [DE] GRÃOS: safra 2015/16. Brasília, DF: Conab, v. 3, n. 6, mar. 2016.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, MG, 1991. 242 p.

- ANDRADE, T.; VON PINHO, E. V.; VON PINHO, R. G.; OLIVEIRA, G. E.; ANDRADE, V.; FERNANDES, J. S. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 3630-3642, 2013.  
DOI: [10.4238/2013.September.13.7](https://doi.org/10.4238/2013.September.13.7).
- ANJUM, S.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEIN, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, 2011.
- ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 488-492, 2013.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. 2. ed. Campina Grande: UFPB, 1999. 153 p. (Estudos FAO. Irrigação e Drenagem, 29).
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.
- CHOTENA, M.; MAKUS, D. J.; SIMPSON, W. R. Effect of water stress on production and quality of sweet corn seed. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Virginia, v. 105, n. 3, p. 289-293, 1980.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2006. 403 p.
- FARIA, M. A. V. de R.; PINHO, R. G. V.; PINHO, E. V. de V.; GUIMARÃES, R. M.; FREITAS, F. E. de O. Qualidade fisiológica de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de “linha de leite”. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2002.  
DOI: [10.18512/1980-6477/rbms.v1n1p93-104](https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v1n1p93-104).
- FARIAS, S. G. G. **Estresse osmótico na germinação, crescimento e nutrição mineral de glicirídia (*Gliciridia sepium* (Jacq.))**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2008.
- FESSEL, S. A.; MENDONÇA, E. A.; CARVALHO, R. V. Maturação fisiológica em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 191-197, 2001.
- GALBIATTI, J. A.; BORGES, M. J.; BUENO, L. F.; GARCIA, A.; VIEIRA, R. D. Efeito de diferentes períodos de irrigação no desenvolvimento, produção e qualidade de sementes na cultura do milho (*Zea mays* L.). **Engenharia Agrícola**, v. 24, n. 2, p. 301-308, 2004.  
DOI: [10.1590/S0100-69162004000200008](https://doi.org/10.1590/S0100-69162004000200008).
- GHEYI, H. R. Problema de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T. S.; ASSIS, R. N.; ROMERO, R. E.; SILVA, J. R. C. (Ed.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza: UFC, 2000. p. 329-346.
- GOMES, M. de S.; PINHO, E. V. de R. V.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, M. das G. G. C. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000. DOI: [10.17801/0101-3122/rbs.v22n1p7-17](https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v22n1p7-17).
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HOQUE, M. M. I.; JUN, Z.; GUOYING, W. Impact of salinity stress on seed germination indices of maize (*Zea mays* L.) genotypes. **Kragujevac Journal Science**, v. 36, p. 155-166, 2014.
- HUNTER, J. L.; TEKRONY, D. M.; MILES, D. F.; EGLI, D. B. Corn seed maturity indicators and their relationship to uptake of carbon-14 assimilate. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1309-1313, 1991.  
DOI: [10.2135/cropsci1991.0011183X003100050045x](https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100050045x).
- KANEKO, M.; ITOH, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is

- caused by gibberellin synthesized in epithelium. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 128, n. 4, p. 1264-1270, 2002.
- MANTRI, N.; PATADE, V.; PENNA, S.; FORD, R.; PANG, E. Abiotic stress responses in plants: present and future. In: AHMAD, P.; PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability**. New York: Springer, 2012. p. 1-19.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ. 2005. 495 p.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, n. 3, p. 645-663, 2005.
- NEVES, A. L. R.; GUIMARÃES, F. V. A.; LACERDA, C. F. de; SILVA, F. B. da; SILVA, F. L. B. da. Tamanho e composição mineral de sementes de feijão-de-corda irrigado com água salina. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 4, p. 569-574, 2008.
- OBER, E. S.; SETTER, T. L.; MADISON, J. T.; THOMPSON, J. F.; SHAPIRO, P. S. Influence of water deficit on maize endosperm development. **Plant Physiology**, v. 97, n. 1, p. 154-164, 1991.
- OLIVEIRA, G. E.; PINHO, R. G. V.; PINHO, E. V. de R. V.; ANDRADE, T. de; SANTOS, C. D. dos; VEIGA, A. D. Qualidade fisiológica e expressão das enzimas amilases em sementes de milho. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, 2013.  
DOI: [10.1590/S1413-70542013000100005](https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000100005).
- PARIHAR, P.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2014.  
DOI: [10.1007/s11356-014-3739-1](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1).
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 13 out. 2017.
- RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.
- REGRAS para análise de sementes. Brasília, DF: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Departamento Nacional de Defesa Vegetal, Coordenação de Laboratório Vegetal, 2009. 395 p.
- ROVERI JOSÉ, S. C. B. **Tolerância a alta temperatura de secagem de sementes de milho**. 2003. 149 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n.3, p. 507-512, Sept. 1974.
- SHANKER, A. K.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic stress in plants: mechanisms and adaptations**. Rijeka: In Tech, 2011.
- TÁVORA, F. J. A. F.; CARVALHO, W. P.; PINHO, J. L. N.; PITOMBEIRA, J. B. Densidade de plantio na cultura do feijão-de-corda. I. Área foliar, interceptação da luz e características de florescimento. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 31, n. 1/2, p. 11-19, 2000.
- THAKUR, P.; KUMAR, S.; MALIK, J. A.; BERGER, J. D.; NAYYAR, H. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 3, p. 429-443, 2010. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2009.09.004](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.09.004).
- VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.): differential response in salt-tolerance and sensitive varieties. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 6, p. 1411-1418, 2003. DOI: [10.1016/j.plantsci.2003.08.005](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.08.005).
- WANG, D.; SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 267-277, 2001. DOI: [10.1016/S0378-4290\(00\)00154-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00154-4).