

## **GERMINABILIDADE E TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE MILHO COLHIDAS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

<sup>1</sup> MARIA APARECIDA VILELA DE RESENDE FARIA, <sup>2</sup> RENZO GARCIA VON PINHO,

<sup>2</sup> ÉDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO, <sup>2</sup> RENATO MENDES GUIMARÃES, <sup>3</sup>

FABRÍCIO ELIAS DE OLIVEIRA FREITAS

<sup>1</sup> Eng. Agrônoma, DSc., Professora do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros/UNIMONTES. Av. Reinaldo Viana 2630, Bico da Pedra. CEP: 39440-000 Janaúba- MG. E-mail: aparecida.faria@unimontes.br

<sup>2</sup> Eng. Agrônomo, DSc., Professor do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. E-mail: renzo@ufla.br; edila@ufla.br; renatomg@ufla.br

<sup>3</sup> Estudante de graduação da UFLA, bolsista do PIBIC- CNPq

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3 n.2, p. 276-289, 2004*

**RESUMO** - Visando obter subsídios adicionais às tomadas de decisões a respeito da época de colheita e secagem de sementes de milho em espigas, foram estudados aspectos bioquímicos e fisiológicos de sementes de milho, colhidas em diferentes estádios de linha de leite e submetidas à secagem artificial. Os trabalhos foram realizados no laboratório de sementes da UFLA, em parceria com a Monsanto do Brasil SA. Foram utilizadas sementes dos híbridos AG-9090, AG-9010, DKB-350 e DKB-747, produzidas no outono/inverno de 2000, nos municípios de Iraí de Minas, MG, Campo Florido, MG, Miguelópolis, SP e Guaiá, SP, respectivamente. Em cada campo, foram demarcados quatro faixas onde foram colhidas 100 espigas por estádio de linha de leite (LL): 25% (LL2), 50% (LL3), 75% (LL4) e 100% (LL5) do endosperma endurecido. As espigas foram amostradas para determinação do teor de água e, em seguida, despalhadas e secadas em temperatura inicial de 35°C até atingir 20% de teor de água e 42°C até 12% de teor de água. Foram realizados testes de germinação, condutividade elétrica, teste de frio sem solo, envelhecimento acelerado, análises eletroforéticas de  $\alpha$ -amilase e de proteínas resistentes ao calor. As sementes foram avaliadas antes e após a secagem artificial. Concluiu-se que a germinabilidade de sementes de milho aumenta com a perda de água no campo e, é obtida integralmente após uma secagem moderada das sementes, colhidas a partir do estádio três de linha de leite (LL3). Nesta fase, as sementes já adquiriram tolerância à dessecação e se apresentam com alta qualidade fisiológica.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, sementes,  $\alpha$ -amilase, qualidade fisiológica, linha de leite.

## **GERMINABILITY AND DESICCATION TOLERANCE IN CORN SEEDS HARVESTED AT DIFFERENT MATURATION STAGES.**

**ABSTRACT** – Aiming at obtaining additional subsidies to decision-making concerning harvest time and corn seeds drying on ears, biochemical and physiological aspects of seeds harvested at different milk line stages and submitted to artificial drying were studied. The experiments were accomplished at UFLA Seed Laboratory in association with Monsanto do Brasil S.A. Seeds of the hybrids AG-9090, AG-9010, DKB-350 and DKB-747, produced in the 2000 winter in the towns of Iraí de Minas, MG, Campo

Florida, MG, Miguelópolis, SP and Guaíra, SP were utilized, respectively. In each field, four rows were demarcated and 100 ears per milk line stage (ML) were harvested at 25% (ML2), 50% (ML3), 75% (ML4) and 100% (ML5) of hardened endosperm. The ears were sampled to determine the seed moisture content. After straw removal, ears were dried at initial temperature of 35°C till they reached 20% of moisture content and 42°C up to 12% of water content. Germination, electric conductivity and accelerated aging tests and cold test without soil, as well as electrophoresis of  $\alpha$ -amylase and heat resistant proteins analyses were carried out. These analysis were done for freshly harvested or dried seeds. We concluded that the germinability of corn seeds increases with water loss in the field. It is fully obtained after a moderate drying of the seeds harvested from milk line stage 3 (ML3). In this phase seeds have already achieved desiccation tolerance and have a high physiological quality.

**Key words:** *Zea mays*, seeds,  $\alpha$ -amylase, physiological quality, milk line stage

Grande parte da colheita de sementes de milho tem sido realizada em espigas. Esse método possibilita a retirada das sementes do campo em estádios próximos à maturidade fisiológica, propiciando sua melhor qualidade devido ao menor período de exposição a condições ambientais adversas. A colheita em espigas é também vantajosa por permitir maior aproveitamento das áreas de plantio, que serão desocupadas mais cedo, além de propiciar melhor planejamento do processo de secagem. Porém, como as sementes são colhidas com altos teores de água, são necessários estudos para a determinação do momento adequado de colheita para os genótipos de interesse, indicando quando estas poderão ser retiradas do campo sem prejuízo de suas qualidades fisiológicas. Assim, o monitoramento dos estágios finais de maturação permite conhecer o comportamento dos genótipos nessa fase do desenvolvimento.

Sabe-se que sementes ortodoxas, como as de milho, passam por uma redução natural do teor de água no final do processo de desenvolvimento, ficando num estado seco quiescente, o que possibilita o seu armazenamento e sobrevivência nas várias condições ambientais. Essa dessecção

tem um papel importante em terminar o programa de desenvolvimento e preparar a semente para eventos germinativos após reidratação. Tem sido demonstrado que essas sementes não germinam e também não apresentam síntese de enzimas essenciais à germinação, se não passarem pela secagem natural que ocorre na pós-maturação ou se não forem submetidas à secagem artificial em determinado estádio do seu desenvolvimento (Bewley, 1979; Kermode e Bewley, 1989).

A dessecção de sementes em desenvolvimento, impõe prematuramente ou durante os estádios finais de desenvolvimento, induz a produção de enzimas requeridas para a mobilização de reservas, como é o caso da  $\alpha$ -amilase responsável pela hidrólise de amido em cereais. A capacidade da camada de aleurona produzir  $\alpha$ -amilase, não é normalmente adquirida até o início da secagem de maturação, mas pode ser induzida por dessecção prematura (Bewley e Black, 1994).

A tolerância à dessecção é adquirida na fase de acúmulo de reservas e pode ser induzida por meio de secagem lenta artificial, em determinados estádios de desenvolvimento (Vertucci e Farrant, 1995). À medida que perdem

água, lentamente adquirem tolerância à secagem em temperaturas mais elevadas. Diversas mudanças bioquímicas ocorrem nas células das sementes para prepará-las para tolerar a perda de água de seus tecidos. Dentre essas mudanças, está a síntese de determinadas proteínas na fase final de maturação, conhecidas como "LEA" (*Late Embriogenesis Abundant*) proteínas (Bewley e Black, 1994), cuja detecção e acúmulo nas fases finais do desenvolvimento de sementes têm sido correlacionados com aquisição de tolerância à dessecação em várias espécies (Blackmam *et al.*, 1991; Thomman *et al.*, 1992; Kermode, 1997).

O padrão de acúmulo, a ocorrência abundante e as características físicas de resistência à desnaturação e hidrofilicidade das LEA proteínas sugerem seu papel na tolerância à dessecação, protegendo os componentes celulares da falta de água, promovendo ajustamento osmótico ou substituindo a água (Han *et al.* 1997).

O início da tolerância à dessecação durante a maturação é importante, pois indica a época mais precoce em que as sementes podem ser colhidas e submetidas à secagem artificial. A capacidade das sementes ortodoxas suportarem a redução do teor de água geralmente é também dependente da taxa de secagem, a qual tem mostrado afetar a sobrevivência das sementes (Pammerer e Berjak, 1999). Dessa forma, discute-se a importância da secagem na maturação em relação ao vigor das sementes. Alguns autores têm encontrado que a armazenabilidade de sementes aumenta durante a fase de secagem na maturação (Sanhewe e Ellis, 1996; Kermode, 1995).

No momento da colheita, além do teor de água, o estádio de maturação também é importante para a sensibilidade das sementes à temperatura de secagem. Segundo Herter e Burris (1989), com a progressiva perda de umidade no campo, as sementes de milho tornam-se mais tolerantes a temperaturas de secagem acima de 40°C.

Durante o processo de maturação de sementes de milho, ocorre a progressiva solidificação do endosperma leitoso, devido à conversão da sacarose em amido, começando no ápice e terminando na base da semente. Nesse período, a linha de leite é uma camada externamente visível na face oposta ao embrião, que limita as matrizes sólida e líquida do endosperma e é um marcador interessante para o acompanhamento do processo de maturação de sementes de milho.

Dessa forma, o comportamento de sementes de milho colhidas com altos teores de água e submetidas à secagem artificial em vários estágios de maturação pode ser melhor conhecido por meio de estudos de efeitos de secagem na germinabilidade, vigor e por meio de parâmetros bioquímicos. Estes fornecerão subsídios adicionais às tomadas de decisões a respeito da época de colheita e secagem de sementes de milho em espigas.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar a germinabilidade e a tolerância à dessecação de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de linha de leite e submetidas à secagem artificial.

## Material e Métodos

Ostrabalhos foram realizados no laboratório de análise de sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em parceria com a empresa Monsanto do Brasil Ltda, que forneceu as sementes dos híbridos AG-9010, AG-9090, DKB-350 e DKB-747 (tabela 1), produzidas no outono/inverno de 2000, nos municípios de Iraí de Minas, MG, Campo Florido, MG, Miguelópolis, SP e Guáira , SP, respectivamente.

Em cada campo de produção, foram demarcadas quatro faixas nas linhas do parental feminino com aproximadamente 3000 plantas, que constituíram quatro repetições de campo,

**TABELA 1.** Características dos híbridos utilizados. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Híbrido	Tipo	Ciclo	Tipos e cores do grão	Florescimento (dias)
AG- 9090	Simples	Precoce	Semidentado amarelo	61
AG- 9010	Simples	Super-precoce	Duro alaranjado	53
DKB-350	Triplo	Precoce	Semiduro -alaranjado	66
DKB-747	Duplo	Precoce	Semiduro amarelo laranja	62

onde foram colhidas 100 espigas para cada estádio de linha de leite (LL).

Os estádios da linha de leite foram identificados por meio da inspeção visual, com base na amostragem de seis sementes retiradas da parte mediana de cinco espigas, obtidas de plantas em competição completa e sadias. Cada semente foi cortada longitudinalmente e de uma das metades foi retirada toda a parte leitosa e o embrião. Pela comparação com a metade intacta, estimou-se a porcentagem de endosperma solidificado.

A colheita das sementes foi iniciada no estádio 2 de linha de leite (LL-2), de acordo com a metodologia proposta por Hunter et al. (1991):

LL-2 - 25% do comprimento da semente preenchido com endosperma solidificado; linha de leite localizada no quarto superior do comprimento da semente.

LL-3 - 50% do endosperma sólido; linha de leite localizada na metade do comprimento da semente.

LL-4 - 75% do comprimento da semente com endosperma solidificado; linha de leite localizada no quarto inferior da semente.

LL-5 - Endosperma completamente sólido; linha de leite ausente.

As espigas colhidas manualmente nos campos de produção de sementes foram transportadas até o laboratório de análise de sementes da UFLA embaladas em lona

isolante térmica, onde foram imediatamente amostradas para determinação de teor de água. Em seguida, 10 espigas de cada repetição foram despalhadas e debulhadas manualmente para realização da avaliação da qualidade fisiológica por meio dos testes de germinação, teste de frio, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, atividade de  $\alpha$ -amilase e determinação de proteínas resistentes ao calor, sendo que para esta, os eixos embrionários das sementes foram extraídos e congelados até o momento da realização das análises.

As espigas restantes de cada repetição foram despalhadas e levadas aos secadores experimentais de pequena escala, construídos com base no modelo descrito por Navratil e Burris (1982). As sementes foram secadas em temperatura inicial de 35°C até atingir 20% de teor de água, seguida de temperatura de 42°C até 12% de teor de água, segundo proposta de Rosa (2000). Em seguida, foram debulhadas a mão, acondicionadas em sacos de papel e estocadas em câmara fria e seca (10°C e 40% UR) até a realização das avaliações, após a secagem.

A determinação do teor de água foi efetuada pelo método da estufa a 105±3°C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras de 50g para cada tratamento, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análises de Sementes (RAS) (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem.

O teste de germinação foi montado com 400 sementes (quatro sub-amostras de 25 por repetição do campo), semeadas em papel toalha tipo Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e colocadas para germinar à temperatura de 25°C. Foram realizadas duas contagens, sendo a primeira no quarto dia e a última no sétimo dia após a semeadura, segundo prescrições da RAS (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

O teste de frio sem solo foi realizado conforme metodologia proposta por Loeffler *et al.* (1985), com quatro repetições de 25 sementes distribuídas em papel toalha, umedecidos com quantidade de água equivalente a três vezes o seu peso. Após a semeadura, os rolos foram colocados no interior de sacos plásticos vedados com fita adesiva e mantidos em câmara regulada a 10°C durante sete dias. Ao final desse prazo, os rolos foram retirados dos sacos plásticos e transferidos para germinador a 25°C, onde permaneceram por cinco dias, quando se efetuou a contagem das plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

No teste de envelhecimento acelerado, as sementes foram acondicionadas sobre tela suspensa, acoplada em caixa acrílica do tipo gerbox, contendo 40ml de água e foram mantidas a 42°C por 96 horas. Após esse período, quatro subamostras de 25 sementes, por repetição de campo, foram submetidas ao teste de germinação. A avaliação foi realizada no sétimo dia após a semeadura, computando-se o número de plântulas normais.

O teste de condutividade elétrica em massa foi realizado com quatro subamostras de 25 sementes que foram pesadas e colocadas

em copos plásticos, contendo 75ml de água deionizada, com valor de condutividade inferior a 3 $\mu$ mhos/cm/g. As leituras de condutividade foram realizadas após 24 horas de embebição a 25°C e os resultados expressos em  $\mu$ mhos/cm/g de semente.

Para a determinação da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, 25 sementes de cada repetição, correspondente a cada linha de leite foram colocadas para germinar como no teste padrão de germinação. Após 70 horas, as plântulas e sementes foram retiradas (Rood & Larsen, 1988), liofilizadas, trituradas a frio em moinho refrigerado e armazenadas em freezer a -81°C, até o momento das análises. A extração da enzima foi processada pela adição de 200 $\mu$ l de tampão de extração Tris-HCl, 0,2Mol.L<sup>(-1)</sup>, pH 8,0, a 100mg do pó relativo a cada tratamento. O homogeneinado foi mantido por 12 horas a 5°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 16000xg a 4°C, por 60 minutos. Volumes de 40 $\mu$ l do extrato protéico foram aplicados em géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador- contendo amido) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-Glicina pH 8,9.

As corridas eletroforéticas foram efetuadas a 12mA no gel concentrador e 24mA no gel separador. Os géis foram revelados para o sistema  $\alpha$ -amilase, em solução tampão de acetato de sódio 50mMol.L<sup>(-1)</sup>, pH 5,6 e solução de iodo 10mMol.L<sup>(-1)</sup>, contendo 14mMol.L<sup>(-1)</sup> de iodeto de potássio, segundo Alfenas (1998). Após o tratamento com iodo, foram observadas bandas claras em fundo azulado (revelação negativa), devido à sua reação com a amilose.

Para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor (tipo LEA), eixos

embrionários de 12 sementes foram extraídos em cada estádio de linha de leite, antes e após secagem das sementes de cada híbrido, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Eles foram mantidos a -81°C até o momento da extração protéica.

Para facilitar a extração de eixos embrionários de sementes após a secagem artificial, elas foram embebidas em água por um período de cinco horas. No momento da extração protéica, 12 eixos embrionários de sementes em cada estádio de linha de leite foram moídos por um minuto e quinze segundos em mortar sobre gelo, na presença de solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração) e transferidos para microtubos de capacidade de 1500µL. Os homogeneizados foram centrifugados a 16000xg, por 30 minutos a 4° C, e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 70µL de extrato + 40 µL de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20mL de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por cinco minutos (adaptado de Blackman et al., 1991). Foram aplicados 50µL no gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150V e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05% (Alfenas et al., 1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

Utilizando o programa Sisvar (Ferreira 2000), foram realizadas análises de variância para os testes de avaliação da qualidade fisiológica para cada híbrido. O delineamento experimental para todas as avaliações foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial de dois (antes e após secagem) x quatro (estádios de linha de leite), com quatro repetições. Para as comparações de médias, foi utilizado o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Os teores de água em que foram colhidas as sementes nos quatro estádios de linha de leite, para os quatro híbridos, variaram de 48,5% a 55,1% na LL-2, 41,1 a 50,1% na LL-3; 35,5 a 42,0% na LL-4 e 27,3 a 32,0% na LL-5 (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Foram observadas diferenças significativas para a interação secagem x estádios de linha de leite para todos os testes realizados, para os quatro híbridos.

Antes das sementes serem submetidas à secagem artificial, à medida que o teor de água delas diminuiu pela secagem natural, a porcentagem de germinação aumentou. A germinação das sementes de todos os híbridos foi reduzida quando elas apresentavam teores de água acima de 35% ou não haviam atingido o estádio 5 de linha de leite (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Considerando todos os híbridos, a porcentagem de germinação no estádio LL-5 ficou acima de 75%. Esse fato comprova que a perda de água natural ocorrida no campo prepara as sementes para a germinação quando elas forem reidratadas. Sementes colhidas nos estádios de linha de leite 2, 3 e 4, as quais não apresentaram germinação ou ela foi inexpressiva, encontravam-se

**TABELA 2.** Resultados médios de teores de água, dos testes germinação e vigor de sementes do híbrido AG9090 colhidas nos quatro estádios de linha de leite, no inverno de 2000, obtidos antes e após secagem das sementes.

Estádios	Teor de água	AG 9090							
		Germinação (%)		Cond. Elétrica. ( $\mu\text{mhos}/\text{cm/g}$ )		Teste de Frio (%)		Env. Acelerado (%)	
		Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem
LL-2	55,10 A	0,0 B	96,0 B	9,06 A	24,15 A	2,0 D	84,0 B	10,0 C	96,0 A
LL-3	50,10 B	0,0 B	98,0 B	6,90 AB	16,21 B	39,0 C	87,0 B	49,0 B	98,0 A
LL-4	42,00 C	2,0 B	100,0 A	5,50 BC	9,19 C	63,0 B	98,0 A	96,0 A	99,0 A
LL-5	28,30 D	98,0 A	100,0 A	4,08 C	4,93 D	89,0 A	98,0 A	100,0 A	100,0 A

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

**TABELA 3.** Resultados médios de teores de água, dos testes de germinação e vigor de sementes do híbrido DKB-350 colhidas nos quatro estádios de linha de leite, no inverno de 2000, obtidos antes e após secagem das sementes.

Estádios	Teor de água	DKB-350							
		Germinação (%)		Cond. Elétrica. ( $\mu\text{mhos}/\text{cm/g}$ )		Teste de Frio (%)		Env. Acelerado (%)	
		Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem
LL-2	52,30 A	4,0 B	98,0 A	9,44 A	16,36 A	18,0 C	86,0 B	4,0 D	96,0 A
LL-3	48,50 B	6,0 B	100,0 A	7,45 B	9,03 B	30,0 B	95,0 A	22,0 C	99,0 A
LL-4	35,50 C	8,0 B	100,0 A	5,82 B	6,86 C	67,0 A	95,0 A	84,0 B	99,0 A
LL-5	27,30 D	78,0 A	100,0 A	4,21 C	4,31 D	76,0 A	97,0 A	99,0 A	100,0 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

completamente embebidas, sem contudo estarem mortas. Provavelmente, o aparato necessário ao processo de germinação não se encontrava ainda adequadamente ativado, pois, segundo Kermode *et al.* (1986) e Bewley *et al.* (1989), a redução de água das sementes induz a uma mudança do programa de desenvolvimento para o de germinação e crescimento.

Quando se realizou a secagem artificial das sementes para 12%, observou-se que a porcentagem de germinação das sementes, independente do estádio de linha de leite na colheita, foi superior a 95% (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Para os híbridos DKB-350, DKB-747 e AG9010, não houve diferença estatística nos valores de germinação das sementes nos diferentes estádios

**TABELA 4.** Resultados médios de teores de água, dos testes de germinação e vigor de sementes do híbrido DKB-747 colhidas nos quatro estádios de linha de leite, no inverno de 2000, obtidos antes e após secagem.

Estádios	Teor de água	DKB-747							
		Germinação (%)		Cond. Elétrica. ( $\mu$ mhos/cm/g)		Teste de Frio (%)		Env. Acelerado (%)	
		Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem
LL-2	48,50 A	4,0 C	99,0 A	7,06 A	12,69 A	58,0 B	98,0 A	1,0 C	91,0 B
LL-3	41,10 B	5,0 C	100,0 A	4,77 B	8,11 B	37,0 B	99,0 A	78,0 B	97,0 AB
LL-4	36,20 C	19,0 B	100,0 A	4,34 B	5,81 C	78,0 A	99,0 A	92,0 AB	98,0 A
LL-5	30,30 D	88,0 A	100,0 A	3,54 B	5,37 C	86,0 A	97,0 A	99,0 A	99,0 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

**TABELA 5.** Resultados médios de teores de água, dos testes de germinação e vigor de sementes do híbrido AG-9010 colhidas nos quatro estádios de linha de leite, no inverno de 2000, obtidos antes e após secagem.

Estádios	Teor de água	AG-9010							
		Germinação (%)		Cond. Elétrica. ( $\mu$ mhos/cm/g)		Teste de Frio (%)		Env. Acelerado (%)	
		Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem
LL-2	52,10 A	3,0 C	97,0 A	7,92 A	21,13 A	30,0 C	81,0 B	36,0 C	85,0 B
LL-3	41,30 B	19,0 B	99,0 A	6,93 AB	13,49 B	74,0 B	99,0 A	60,0 B	99,0 A
LL-4	37,30 C	65,0 A	100,0 A	4,81 BC	9,24 C	92,0 A	99,0 A	96,0 A	98,0 A
LL-5	32,00 D	75,0 A	100,0 A	4,50 C	7,96 C	97,0 A	98,0 A	98,0 A	97,0 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

de linhas de leite, o que ocorreu para o híbrido AG-9090, o qual foi colhido com teores de água de 55,10% e 50,10%, respectivamente na LL-2 e LL-3. Apesar da diferença, a média de germinação de sementes do AG9090 na LL-2 foi de 96%.

Observa-se que as sementes colhidas com altos teores de água e submetidas à secagem

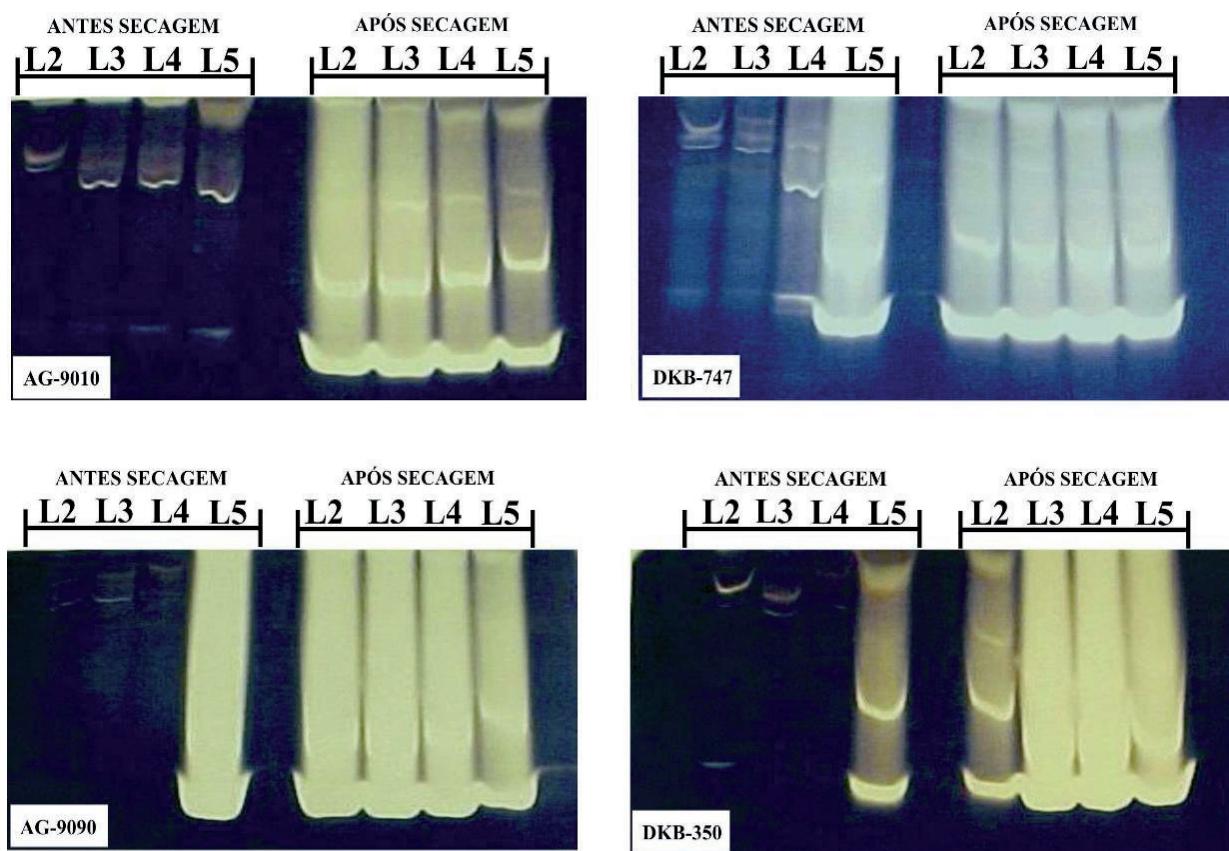
inicial em temperaturas moderadas são passíveis de germinar quando reidratadas e que o teor de água no momento da colheita é importante para determinar a capacidade de germinar das sementes.

Os padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase (Figura 1), reforçaram os resultados obtidos nos testes de germinação. Nas sementes

antes da secagem artificial, houve aumento da atividade dessa enzima à medida que ocorreu a diminuição do teor de água. Após a secagem, os padrões de atividade da  $\alpha$ -amilase foram semelhantes, independente dos estádios de linha de leite, nos híbridos.

A secagem no campo e a artificial proporcionaram aumento na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, favorecendo o processo de germinação das sementes. Segundo Oishi e Bewley (1990), a secagem prematura de sementes de milho ou logo após a maturidade fisiológica causa o declínio

de ácido abscísico e permite que a camada de aleurona torne-se sensível ao ácido giberélico, produzindo as enzimas  $\alpha$ -amilase. Essas enzimas são secretadas no amido contido no endosperma, onde a degradação hidrolítica ocorre e a glicose formada é então transportada para as partes da plântula em crescimento (Guimarães, 1999). De acordo com Armstrong *et al.* (1982), sementes de trigo devem atingir um teor de água de 25% para que ocorra a síntese de  $\alpha$ -amilase. Para os híbridos DKB-747, AG-9090 e DKB-350, a intensa atividade da  $\alpha$ -amilase pode ser detectada



**FIGURA 1.** Padrão eletroforético da enzima  $\alpha$ -amilase em plântulas dos híbridos AG-9010, DKB-747, AG-9090 e DKB-350, cujas sementes foram colhidas nos diferentes estádios de linha de leite, antes e após secagem. (L2, L3, L4 E L5 são estádios com 25%, 50% 75% e 100% de endosperma endurecido, respectivamente).

a partir dos teores de água médios de 30,3%, 28,3% e 27,3%, respectivamente.

Nos testes de envelhecimento acelerado, realizados antes da secagem, foram observados valores percentuais superiores aos observados nos testes de germinação (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Provavelmente, as condições em que são realizados os testes de envelhecimento (temperatura de 42°C e alta umidade) tenham provocado a lixiviação e reduzido o conteúdo de ácido abscísico, produzindo um efeito semelhante ao da secagem. Esse efeito aumentou com a diminuição do teor de água das sementes. Outra possibilidade é a de que o estresse do teste tenha provocado aumento de ácido giberélico, induzindo a produção de  $\alpha$ -amilase. Sementes no estádio LL-5 apresentaram valores acima de 99% de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado, para todos os híbridos. Resultados semelhantes foram encontrados no teste de frio realizado nas sementes antes da secagem. Nesse caso, a diminuição do conteúdo de ácido abscísico pode ser atribuída à baixa temperatura (10°C) utilizada nesse teste.

Após a secagem, o vigor medido pelo teste de envelhecimento acelerado foi superior a 85%, o qual não diferiu estatisticamente entre as sementes colhidas nos diferentes estádios de linha de leite, para os híbridos AG-9090 e DKB-350 (Tabelas 2 e 3). Por outro lado, as sementes dos híbridos DKB-747 e AG-9010 colhidas na LL-2, apresentaram vigor mais baixo que as colhidas nas demais linhas de leite (Tabelas 4 e 5).

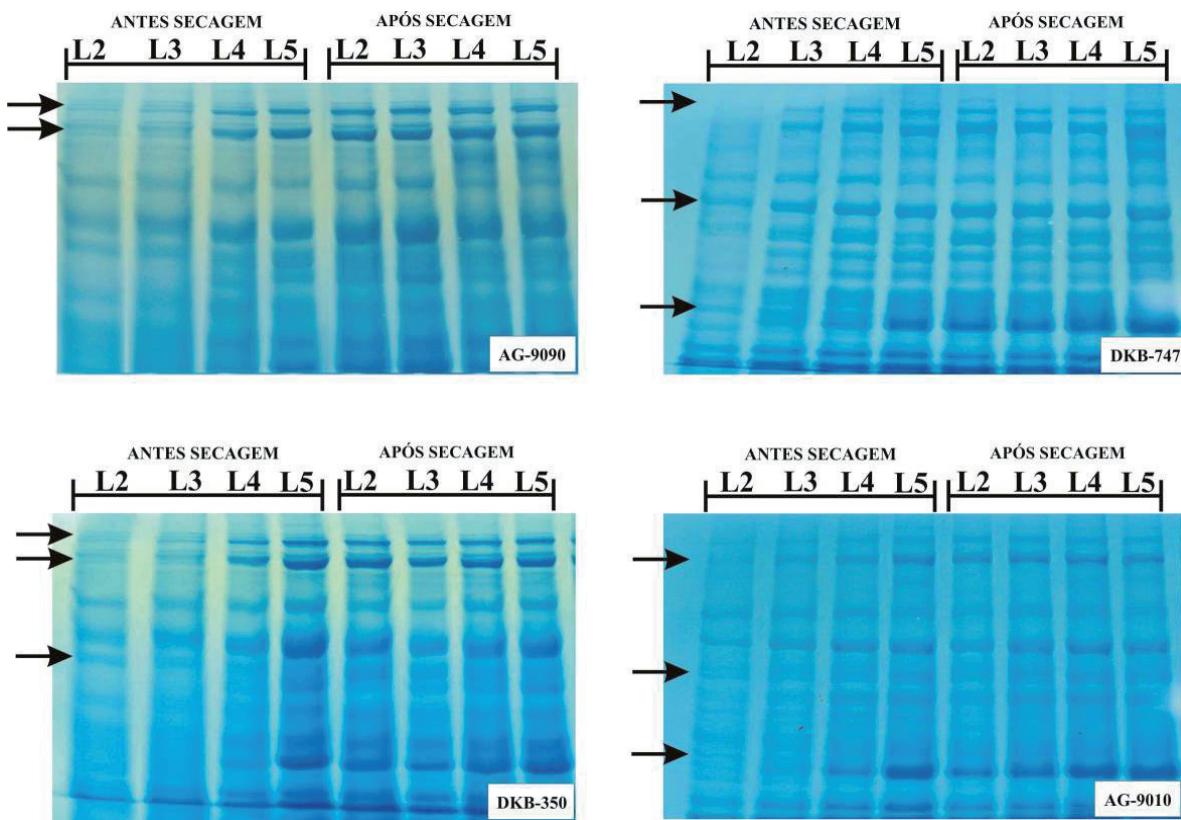
Sementes após a secagem, submetidas ao teste de frio, também apresentaram valores de vigor acima de 83%, sendo que as colhidas no

estádio LL-2, apresentaram-se com menor vigor quando comparadas às colhidas nas demais linhas de leite, para todos os híbridos. Por meio desses testes, foi observado que, após a secagem, as sementes colhidas a partir do estádio LL-3 apresentaram-se com alto vigor.

Vários autores observaram alta qualidade fisiológica em sementes de milho colhidas antecipadamente em relação ao máximo acúmulo de matéria seca (Vieira *et al.*, 1995; Borba *et al.*, 1995; Tekrony e Hunter, 1995; Ajayi e Fakorede, 2000).

Nos testes de condutividade elétrica (Tabelas 2, 3, 4 e 5) pode-se observar tendência de valores menores em sementes não submetidas à secagem. Esses valores variaram de 3,54  $\mu\text{mhos}/\text{cm/g}$  em sementes não secadas, colhidas na LL-5 a 9,44  $\mu\text{mhos}/\text{cm/g}$  nas colhidas na LL-2, e nas secadas, de 4,31  $\mu\text{mhos}/\text{cm/g}$  nas colhidas na LL-5 a 24,15  $\mu\text{mhos}/\text{cm/g}$  nas colhidas na LL-2. No entanto, em ambos os casos, à medida que os estádios de linha de leite avançaram, houve redução nos valores de condutividade. Esse padrão de variação nos valores de condutividade elétrica também foi encontrado por Powell (1986) e Fagioli e Vieira (2000). Com o avanço dos estádios de maturação, vai ocorrendo o desenvolvimento e organização estrutural das membranas celulares, o que explica a redução nos valores de condutividade elétrica.

Como os mecanismos de proteção de membranas para a tolerância à dessecação, como proteínas tipo Lea e açúcares são acumulados nas fases finais da maturação, as sementes em estádios mais avançados são mais tolerantes, apresentando membranas mais estruturadas. A secagem natural ou artificial promove um certo



**FIGURA 2.** Padrões eletroforéticos para proteínas tolerantes ao calor, extraídas de eixos embrionários das sementes de milho. Os híbridos AG-9090, DKB-747, DKB-350 e AG-9010, foram colhidas em diferentes estádios de linha de leite e avaliados antes e após a secagem artificial. (L2, L3, L4 e L5 indicam estádios com 25%, 50% 75% e 100% de endosperma endurecido, respectivamente; setas indicam bandas diferentes ou ausentes).

tipo de estruturação de membranas. Porém, a secagem natural parece ser menos danosa para o sistema de membranas do que a artificial (Rosa *et al.*, 2000).

Os perfis eletroforéticos de proteínas do tipo LEA são apresentados na Figura 2. Analisando os padrões de bandas apresentados, ficam evidentes as alterações no perfil das proteínas, principalmente relacionadas à intensidade das bandas. Observa-se menor intensidade de bandas nos estádios iniciais de

linha de leite até LL-3, nas sementes de todos os híbridos, quando não submetidas à secagem. Porém, o padrão de bandas foi o mesmo para as sementes colhidas nos quatro estádios de linha de leite, após a secagem. Essas diferenças nas proteínas tipo LEA reforçam o comportamento fisiológico observado nos testes de germinação e vigor, indicando o aumento de tolerância a dessecação a partir do estádio LL-3, quando o padrão eletroforético dessa proteína se torna coincidente com os padrões após a secagem.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Blackman *et al.* (1991) e Black *et al.* (1999), que apresentaram evidências de que diversas proteínas LEA são acumuladas durante a secagem de maturação e que suas propriedades físicas de estabilidade e hidrofilicidade e sua abundância lhe sugerem um importante papel na tolerância à dessecação em organismos que toleram a perda de água, como é o caso de sementes ortodoxas.

Ficou evidenciado também o fato de a secagem induzir o aparecimento de bandas dessa proteína em sementes colhidas com altos teores de água. Isto corrobora com os resultados observados por Herter e Burris (1989), que sugeriram que a secagem inicial de sementes de milho a baixas temperaturas acelera o processo de maturação que, normalmente, ocorreria no campo com a desidratação natural, permitindo que os mecanismos de tolerância à dessecação se tornem ativos.

### Conclusões

A germinabilidade de sementes de milho aumenta com a perda de água natural no campo e é obtida integralmente por meio de uma secagem a temperatura inicial moderada para sementes colhidas a partir do estádio de linha de leite 3 (LL-3).

Sementes colhidas a partir do estádio de linha de leite 3 (LL-3) apresentam alta qualidade fisiológica.

O provável final da fase de aquisição de tolerância à dessecação em sementes de milho ocorre a partir do estádio 3 de linha de leite (LL-3).

### Literatura Citada

- AJAYI, S. A.; FAKOREDE, M. A. B. Physiological maturity effects on seed quality, seedling vigour and mature plant characteristics of maize in a tropical environment. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 28, p. 301-319, 2000
- ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- ARMSTRONG, C.; BLACK, M.; CHAPMAN, J. M.; NORMAN, H. E.; ANGOLD, R. The induction of sensitivity to gibberellin in aleurone tissue of developing wheat grains. I. The effect of dehydration. *Planta*, Berlin, v. 154, n. 6, p. 573-577, 1982.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v. 30, p. 195-238, 1979.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds - Physiology of development and germination*. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BEWLEY, J. D.; KERMODE, A. R.; MISRA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA syntheses. *Annals of Botany*, London, v. 63, n. 1, p. 3-17, Jan. 1989.
- BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; CÔME, D. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 120, p. 463-471, 1999.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C.

- Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, p. 868-874, 1991.
- BORBA, C. B.; ANDRADE, R. V. de; AZEVEDO, J. T. de. Maturidade fisiológica de sementes do híbrido simples fêmea do milho BR201 (*Zea mays* L) produzidas no inverno. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 129-132, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- FAGIOLI, M.; VIEIRA, R. D. Avaliação do desenvolvimento de sementes de milho (milk line) pelo teste de condutividade elétrica e lixiviação de nutrientes da solução de embebição. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. **A inovação tecnológica e a competitividade no contexto dos mercados globalizados: resumos**. Sete Lagoas: ABMS, Emprapa Milho e Sorgo, Universidade Federal de Uberlândia, 2000. p. 284.
- FERREIRA, D. F. **Sistema de análise estatística – SISVAR**. Lavras: DCE, UFLA, 2000. CD-ROM.
- GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1999, 132 p. (Curso de Especialização Pós-Graduação “Latu Sensu” por Tutoria à Distância).
- HAN, B.; HUGHES, W. D.; GALAU, G. A.; BEWLEY, J. D.; KERMODE, A. R. Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. seeds. **Planta**, Berlin, v. 201, p. 27-35, 1997.
- HERTER, U. BURRIS, J. S. Preconditioning reduces the susceptibility to drying injury in corn seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 69, p. 775-789, 1989.
- 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.
- KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J. L.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 273-332.
- KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research**, Oxon, v. 7, p. 75-95, 1997.
- KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D.; DASGUPTA, J.; MISRA, S. The transition from seed development to germination: a key role for desiccation? **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1113-1119, 1986.
- KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. Development seeds of *Ricinus communis* L. when detached and maintained in a atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 90, p. 702-707, 1989.
- LOEFFLER, N. L.; MEIER, J. L.; BURRIS, J. S. Comparison of two cold test procedures for use in mayse drying studies. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 13, p. 653-658, 1985.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 159-161, 1982.
- OISHI, M.Y.; BEWLEY, J. D. Distinction between the responses of developing maize

- kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability,  **$\alpha$ -amylase activity, and abscisic acid content.** Plant Physiology, Rockville, v. 94, n. 2, p. 592-598, Oct.1990.
- PAMMENTER, N. W. BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Oxon, v. 9, p. 13-37, 1999.
- POWELL, A. A. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v. 10, n. 2, p. 81-100, 1986.
- ROOD, S. B.; LARSEN, K. M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 39, n. 199, p. 223-233, 1988.
- ROSA, S. D. V. F.da. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura.** 2000. 121 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ROSA, S. D. V. F.; PINHO, E. V. R. von; VIEIRA, M. G. G. C. Eficácia do teste de condutividade elétrica para uso em estudos de danos de secagem em sementes de milho (*Zea mays*). **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 54-63, 2000.
- SANHEWE, A. J.; ELLIS, R. H. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. I. Ability to germinate and to tolerate desiccation. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, p. 949-958, 1996.
- SEYEDIN, N.; BURRIS, J.S. Physiological studies on the effects of drying temperatures on corn seed quality. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.64, n.2, p. 497-504, 1984.
- TEKRONY, D. M.; HUNTER, J. L. Effect of seed maturation and genotype on seed vigor in maize. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 857-862, 1995.
- THOMANN, E. B.; SOLLINGER, J.; WHITE, C.; RIVIN, C. J. Accumulation of group3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. Roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 607-614, 1992.
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Aquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J. L.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination.** New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.
- VIEIRA, R. D.; MINOHARA, L.; CARVALHO, N. M.; BERGAMASCHI, M. C. M. Relationship of black layer and milk line development on maize seed maturity. **Siencia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n.1, p. 142-147, 1995.