



CAMILA APARECIDA LOPES

**FATORES EXTERNOS E GENOTÍPICOS NO
CRESCIMENTO DIFERENCIAL DA PLÚMULA
EM RELAÇÃO AO COMPRIMENTO DO
COLEÓPTILO DE PLÂNTULAS DE MILHO**

LAVRAS-MG

2016

CAMILA APARECIDA LOPES

**FATORES EXTERNOS E GENOTÍPICOS NO CRESCIMENTO
DIFERENCIAL DA PLÚMULA EM RELAÇÃO AO COMPRIMENTO
DO COLEÓPTILO DE PLÂNTULAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho

LAVRAS – MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lopes, Camila Aparecida.

Fatores externos e genotípicos no crescimento diferencial da
plúmula em relação ao comprimento do coleóptilo de plântulas de
milho/Camila Aparecida Lopes. – Lavras: UFLA, 2016.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Maria Laene Moreira de Carvalho.

Bibliografia.

1. *Zea mays* 2. Teste de germinação. 3. Enzimas. 4. Lignina. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CAMILA APARECIDA LOPES

**FATORES EXTERNOS E GENOTÍPICOS NO CRESCIMENTO
DIFERENCIAL DA PLÚMULA EM RELAÇÃO AO COMPRIMENTO
DO COLEÓPTILO DE PLÂNTULAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de abril de 2016.

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr. José Maurício de Pereira	MAPA
Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho

Orientadora

LAVRAS – MG

2016

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes e que, com perfeição contemplam todos os significados das palavras pai e mãe: ao meu pai Jair e a minha mãe Benedita de Fátima.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por tudo.

Aos meus pais Jair e Benedita de Fátima, e ao meu irmão Guilherme, pelo amor, carinho, educação, orações e apoio incondicional.

Ao Fernando, pelo amor, apoio e companheirismo.

A toda minha família pela torcida e incentivo.

A Professora Maria Laene, pela orientação, ensinamentos, profissionalismo, exemplo e paciência.

Aos professores Renato, João Almir, Édila e Heloísa do setor de sementes, pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência.

Ao professor Renato Lima do Departamento de Ciências Exatas e a professora Marines Pires do Departamento de Biologia pela atenção, disponibilidade e ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia por minha formação e pela oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro para realização do projeto.

A empresa Dow AgroSciences, pela concessão das sementes e informações necessárias a execução do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Sementes, pela convivência.

Ao grupo de orientados da professora Laene, a Michelle e ao João Antônio, por todo o auxílio e dedicação na execução dos experimentos, além da amizade, companheirismo e aprendizado.

A Flávia, Luma, Thaís, Kili, Roberta, Édila, Dayliane, Ana e Thiago, pela amizade sincera e bons momentos.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais essa conquista.

Muito obrigada!

RESUMO

A avaliação do potencial fisiológico de lotes no processo de certificação é realizada usualmente pelo teste de germinação, pela distinção de plântulas normais obtidas ao final do teste. No entanto, em alguns testes, são observados atrasos no crescimento das estruturas da parte aérea de plântulas, o que leva a considera-las plântulas anormais. Situação que afeta negativamente os resultados do teste, mas não refleti necessariamente, o comportamento do lote no campo. Foi objetivo, com este trabalho, investigar o efeito do genótipo, da água, da luz, da temperatura e do tratamento químico sobre o crescimento diferencial da plúmula em relação ao comprimento do coleóptilo de plântulas de milho. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes e no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Sementes de dois híbridos simples e dos seus recíprocos com característica de crescimento lento da parte aérea foram avaliadas pelos testes de germinação em papel e areia, análise histológica do pericarpo, análise histoquímica de lignina na parede do coleóptilo e expressão das enzimas α -amilase, β -amilase e endo- β -mananase. Existem diferenças entre genótipos de milho no que se refere ao crescimento inicial da plúmula em relação ao coleóptilo, principalmente na ausência de luz no teste de germinação. Essas diferenças não são observadas aos sete dias após a semeadura. A disponibilidade hídrica, a temperatura na faixa ideal e o tratamento químico com inseticida Deltametrina não afetam a resposta dos híbridos em relação ao crescimento diferencial da plúmula. A espessura do pericarpo, a presença de lignina e diferenças na atividade das enzimas de diferentes genótipos não está relacionada às variações de comprimento plúmula/coleóptilo, durante o teste de germinação de sementes de milho.

Palavras-chave: *Zea mays L.*, teste de germinação, lignina, enzimas.

ABSTRACT

The physiological potential evaluation of lots in the certification process is usually performed by the germination test, by the normal seedlings distinction obtained at the final test. However, in some tests, delays are observed in the growth of shoots' structures seedlings, which leads to consider them abnormal seedlings. This situation adversely affects the test results, but does not necessarily reflect the lot's behavior in the field. It was goal in this study to investigate the effect of genotype, water, light, temperature and chemical treatment on the plumule differential growth in relation length of the maize seedling coleoptile. The experiments were conducted at the Seed Analysis Laboratory and Plant Anatomy Laboratory at the Federal University of Lavras. Two simple hybrid seeds and their reciprocal with slow growth characteristic of the shoot were evaluated by germination on paper and sand, pericarp histologic analysis, lignin histochemistry analysis on the coleoptile wall and expression of α -amylase, β -amylase and endo- β -mannanase. There are differences between maize genotypes as regards the plumule initial growth in relation to the coleoptile, especially in the absence of light on germination test. These differences are not observed at the seven days after sowing. The water availability, the optimal temperature range and chemical treatment with Deltamethrin not affect the response of the hybrid in relation to differential growth of plumule. The pericarp thickness, lignin presence and differences in the enzymes activity of different genotypes are not related to changes in length plumule/coleoptile during maize seed germination test.

Keywords: *Zea mays L.*. Germination test. Lignin. Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplos de plântulas de milho aos cinco dias de avaliação do teste de germinação.....	30
Figura 2	Pericarpo de sementes de híbridos simples de milho e seus recíprocos.....	61
Figura 3	Teste histoquímico em plântulas de milho para observação da presença de lignina.....	62
Figura 4	Perfis enzimáticos para α -amilase em sementes secas, sementes embebidas e em plântulas com quatro dias de crescimento de híbridos simples de milho e seus recíprocos	64
Figura 5	Perfis enzimáticos para β -amilase em sementes secas, sementes embebidas e em plântulas com quatro dias de crescimento de híbridos simples de milho e seus recíprocos	64
Figura 6	Perfis enzimáticos para enzima endo- β -mananase de cinco padrões comerciais de <i>Aspergillus niger</i> (P1 à P5) e de dois híbridos simples de milho e seus recíprocos (H1 à H4).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagens de plântulas normais de milho avaliadas aos 4 dias após a semeadura.....	31
Tabela 2A	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura.....	32
Tabela 2B	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento do fator água.....	33
Tabela 3A	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura.....	34
Tabela 3B	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento do fator luz.....	35
Tabela 4	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura.....	36
Tabela 5	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura.....	36
Tabela 6	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 5 dias após a semeadura.....	37
Tabela 7	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura.....	38
Tabela 8A	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura.....	39

Tabela 8B	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores água e luz.....	40
Tabela 9	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 6 dias após a semeadura.....	41
Tabela 10A	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura.....	42
Tabela 10B	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura para o desdobramento do fator água.....	43
Tabela 11	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura.....	44
Tabela 12	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias.....	44
Tabela 13	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 7 dias após a semeadura para o desdobramento do fator híbrido....	45
Tabela 14A	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 7 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura.....	47
Tabela 14B	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 7 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores água e luz.....	48
Tabela 15	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 4 dias após a semeadura.....	51
Tabela 16	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura.....	52

Tabela 17	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura.....	53
Tabela 18	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 5 dias após a semeadura.....	53
Tabela 19	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura.....	54
Tabela 20	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura.....	55
Tabela 21	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 6 dias após a semeadura.....	55
Tabela 22	Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores luz e tratamento químico.....	56
Tabela 23	Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 7 dias após a semeadura.....	57
Tabela 24	Porcentagens de plântulas normais avaliadas ao longo de sete dias após a semeadura no teste de germinação em areia	59
Tabela 25	Espessura do pericarpo de sementes de híbridos simples de milho e seus recíprocos.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	A cultura do milho	16
2.2	O processo de germinação	17
2.2.1	Fatores externos	18
2.2.2	Fatores internos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Efeito da água, temperatura e luz na germinação	23
3.2	Tratamento químico das sementes e seu efeito na germinação e no crescimento diferencial entre plúmula e coleótilo	25
3.3	Germinação em substrato areia (TGA)	26
3.4	Análise histológica para avaliação do pericarpo	27
3.5	Análise histoquímica para avaliação de lignina na parede do coleótilo	28
3.6	Enzimas α-amilase e β-amilase	28
3.7	Enzima endo-β-mananase	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Efeito da água, temperatura e luz na germinação	31
4.2	Tratamento químico das sementes e seu efeito na germinação e no crescimento diferencial entre plúmula e coleótilo	50
4.3	Germinação em substrato areia	58
4.4	Análise histológica para avaliação do pericarpo	59
4.5	Análise histoquímica para avaliação da deposição de lignina na parede do coleótilo	61
4.6	Enzimas α-amilase e β-amilase	63
4.7	Enzima endo-β-mananase	66
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Um requisito essencial para o estabelecimento dos cultivos e a obtenção de elevados rendimentos no campo é o uso de sementes de boa qualidade. A qualidade fisiológica de sementes pode ser influenciada pelo genótipo e, desta forma, em programas de melhoramento, deve ser considerada a seleção para essa característica. Avaliações da qualidade de sementes por meio de critérios que permitam a seleção de materiais com alta qualidade fisiológica é fundamental em programas de controle de qualidade e melhoramento.

A maneira oficial de se avaliar a qualidade fisiológica das sementes é pelo teste de germinação. O percentual de germinação é determinado pelo número de plântulas normais resultantes das sementes avaliadas, após um determinado período e sob as condições ideais de germinação para a espécie em questão. Portanto, no momento da avaliação as plântulas devem conter todas as estruturas de desenvolvimento tal que, seja possível ao analista julgar a possibilidade daquela plântula continuar seu desenvolvimento e se transformar em uma planta.

Dentre as várias causas que fazem com que uma plântula de milho seja considerada anormal, destaca-se o tamanho da plúmula em relação ao comprimento do coleóptilo. Se ela for inferior à metade do comprimento do coleóptilo por ocasião da avaliação, deve ser considerada plântula anormal, o que afeta negativamente os resultados de germinação, além de impedir que o lote alcance o padrão mínimo de germinação para a comercialização.

Existem evidências de que a velocidade de crescimento da plúmula e do coleóptilo pode variar em alguns casos e que esse controle da velocidade de crescimento das estruturas é regulado geneticamente e também influenciado por condições do ambiente de germinação. Tornam-se, então, necessários estudos

para elucidar e aprimorar os conhecimentos sobre o processo germinativo das sementes de diferentes materiais genéticos.

Foi objetivo, com este trabalho, investigar o efeito do genótipo, da água, da luz, da temperatura e do tratamento químico sobre o crescimento diferencial da plúmula em relação ao comprimento do coleóptilo de plântulas de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do milho

O milho ocupa a terceira posição em área plantada em todo o mundo e a segunda posição no Brasil, perdendo apenas para soja. A cultura do milho, no país, é uma das mais importantes atividades no contexto do agronegócio, considerando tanto o consumo interno quanto as exportações.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2015) no Brasil 27,5% da área cultivada com grãos corresponde ao milho. Para safra de 2015/2016 é esperada uma produção de 83,5 milhões de toneladas (CONAB, 2015). A taxa de utilização de sementes de milho é de aproximadamente 84% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2014), valor considerado alto quando comparado ao observado em outras espécies. Essa quantidade utilizada se deve ao uso de sementes híbridas que apresentam alto valor agregado, resultando em maiores produtividades.

Nos últimos anos houve aumento da utilização de sementes de híbridos simples de milho, correspondendo a 60% do mercado dessa cultura no Brasil. A utilização de sementes de híbridos simples leva a um investimento cada vez maior em alta tecnologia e também à necessidade de programas eficientes de controle de qualidade na produção de sementes (OLIVEIRA et al., 2013). Avaliações da qualidade fisiológica de sementes por meio de critérios que permitam a seleção de materiais com alta qualidade fisiológica é fundamental em programas de controle de qualidade e de melhoramento.

A maneira usual de se avaliar a qualidade fisiológica das sementes dentro do processo de certificação é pelo teste de germinação. Nos testes de germinação em laboratório, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), as sementes são consideradas germinadas quando demonstram

sua aptidão para produzir plântula normal sob as condições ideais, ou seja, suas estruturas essenciais precisam estar em estado suficiente de desenvolvimento, que permitam a identificação de plântulas anormais que não teriam possibilidade de produzir plantas normais. No caso do milho são consideradas plântulas anormais segundo Brasil (2009), plântulas com as seguintes características: com qualquer uma das suas estruturas essenciais ausentes ou tão danificadas que não possa ocorrer desenvolvimento proporcional; com desenvolvimento fraco, ou com distúrbios fisiológicos, ou com estruturas deformadas desproporcionais; com qualquer uma de suas estruturas essenciais muito infectadas, como resultado de uma infecção primária (da própria semente), que comprometa o seu desenvolvimento normal; se o coleóptilo apresentar-se fundido por mais de um terço do comprimento do ápice, fortemente curvado, com ápice danificado ou ausente; se a primeira folha não tiver emergido em tempo de avaliação; se a folha se projetar abaixo do coleóptilo e se o tamanho da plúmula for inferior à metade do comprimento do coleóptilo.

Em alguns materiais, tem-se observado que as plântulas apresentam atrasos no crescimento das estruturas da parte aérea, mais especificamente da plúmula, o que leva a classificá-las como plântulas anormais, situação que afeta negativamente os resultados do teste. Esses resultados, no entanto, nem sempre refletem o comportamento dos lotes de sementes no campo.

2.2 O processo de germinação

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado fisiologicamente, como a retomada do crescimento do eixo embrionário, com o consequente rompimento do tegumento pela radícula. Entretanto, para os tecnólogos de sementes, a germinação é reconhecida como tal, desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que se possam avaliar as suas

estruturas e a sua possibilidade de sobrevivência (LABOURIAU, 1983). Fatores externos e/ou internos às sementes podem influenciar a germinação, sendo que cada fator pode atuar por si ou em interação com os demais (NASSIF et al., 1998).

2.2.1 Fatores externos

Os principais fatores externos que influenciam a germinação das sementes são água, temperatura, luz e oxigênio.

A água esta envolvida direta ou indiretamente em todas as etapas do processo germinativo, o que a torna um fator imprescindível neste processo. Sua participação é fundamental para a ativação enzimática, solubilização e transporte de reservas e como reagente em si, principalmente na digestão hidrolítica das substâncias de reserva armazenadas na semente. A absorção de água pelas sementes contribui para amolecer o tegumento, intensificar a atividade respiratória, favorecer as trocas gasosas e induzir a atividade e síntese de enzimas e hormônios. A entrada de água nas sementes promove o aumento do volume do embrião e dos tecidos de reserva, resultando na ruptura do tegumento e na protrusão da raiz primária (COSTA; MARCHI, 2008; MARCOS FILHO, 2005). Na literatura estudos com sementes de milho evidenciam que a quantidade de água necessária para a germinação varia com o tipo de material utilizado, híbrido ou linhagem (KAPPES et al., 2010; MOTERLE et al., 2006). Além da germinação, a água também influencia no crescimento e alongamento das folhas mais jovens das plântulas (ACEVEDO et al., 1971).

A temperatura é outro fator importante no processo de germinação, esta afeta a germinação total, a velocidade de germinação, a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas. A germinação ocorre em determinada faixa de temperatura, variável conforme a espécie. Sendo assim, existem temperaturas mais apropriadas para a germinação, e também temperaturas limitantes

(COSTA; MARCHI, 2008; MORAES, 2007). A faixa de 20 a 30 °C mostra-se adequada para a germinação de sementes de *Zea mays* L. (BRASIL, 2009). Os pesquisadores Sbrussi e Zucarelli (2014) observaram que temperaturas abaixo de 16 °C retardam a germinação das sementes de milho, assim como temperaturas entre 37 °C e 40 °C fazem com que as sementes percam drasticamente seu poder germinativo. Outros autores como Karcz e Burdach (2007), Kurtyka et al. (2011) e Mozambani e Bicudo (2009) demonstram em suas pesquisas que a temperatura interfere não só na germinação, como também, no desenvolvimento das plântulas, crescimento e alongamento do coleóptilo e conseqüentemente no desenvolvimento da plúmula.

Para que a germinação possa se completar, as sementes podem também requerer luz e nutrientes. Para o início do processo de germinação, os sinais do ambiente são traduzidos em sinais internos na semente. Os sinais externos, ambientais, percebidos pelas sementes desencadeiam sinais internos em nível molecular, que podem induzir a ativação ou a inativação de compostos e/ou reações metabólicas diversas (CASTRO; HILHORST, 2004; COSTA; MARCHI, 2008). Sementes de milho são classificadas como fotoblásticas neutras, ou seja, são insensíveis à luz. Na literatura o trabalho de Lima et al. (2010) comprova isto. Entretanto, existem relatos da presença de luz influenciar no desenvolvimento das plântulas de milho, como por exemplo, no comprimento do coleóptilo (MOZAMBANI; BICUDO, 2009; PARVEZ et al., 1997; WANG; LINO, 1997).

Além dos fatores descritos, segundo Marcos Filho (2015) outro fator que pode exercer efeitos diretos ou indiretos sobre a germinação das sementes é o tratamento químico. O tratamento químico é utilizado como ferramenta de proteção à semente. No Brasil, 85% das sementes de milho são tratadas com inseticidas (JULIATTI, 2010). Em trabalhos como os de Bittencourt et al. (2000) e Vazquez et al. (2014) foram encontradas evidências de que o tratamento químico das sementes não reduz a germinação de sementes híbridas

de milho. E também trabalhos contrários, como o desenvolvido por Fessel et al. (2003), no qual o tratamento químico das sementes provocou efeito negativo sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas de milho.

Diante do exposto, o estudo dos fatores externos que possam influenciar a germinação e o desenvolvimento de plântulas é muito importante para auxiliar no esclarecimento dos aspectos que levam ao crescimento diferencial da plúmula em relação ao coleóptilo de plântulas de milho.

2.2.2 Fatores internos

Dentre os fatores internos que exercem maior influência sobre o processo de germinação e o desenvolvimento de plântulas, destaca-se o fator genético.

Durante o desenvolvimento da semente, juntamente com a formação do embrião e do endosperma ocorre o crescimento das paredes do ovário que revestirão a semente, constituindo no pericarpo. O pericarpo é, portanto, um tecido materno independente da fertilização. O pericarpo tem sido associado à velocidade de secagem de sementes de milho (JOSÉ et al., 2005). Porém, segundo Kramer e Kozlowski (1972), a germinação pode ocorrer de forma mais lenta devido a alguma resistência mecânica dos tecidos externos ao embrião. Embora na literatura a resistência do pericarpo não seja citada como um fator de interferência na germinação de sementes de milho sabe-se que a espessura do pericarpo varia entre linhagens e híbridos e também entre híbridos recíprocos (JOSÉ et al., 2005; TRACY; GALINAT, 1987). Para algumas espécies florestais e algumas variedades de tomate, por exemplo, a espessura do pericarpo é fator limitante para germinação.

As camadas de células que compõem o pericarpo são constituídas de hemicelulose, celulose e lignina (PAES, 2006). A lignina é um polímero natural

associado à qualidade das sementes (LEWIS; YAMAMOTO, 1990). Acreditava-se que a lignina era um constituinte apenas das células da parede secundária (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Entretanto, em resultados de pesquisas evidenciou-se que a lignina está presente também em células da parede primária, nas quais os tecidos ainda estão em crescimento, porém, em pequenas quantidades (WALTER, 1992). Segundo Burton e Fincher (2014), a composição da parede celular em sementes de cereais e outras espécies de gramíneas diferem de paredes celulares de sementes de outras espécies. Nos tecidos maternos que circundam o embrião e o endosperma, as paredes celulares contêm níveis elevados de celulose e em muitos casos são fortemente lignificados. Outros autores como Chesson et al. (1997), Hohl et al (1995) e Musel et al. (1997), relataram em suas pesquisas a presença de lignina também em plântulas de milho, principalmente na parede do coleóptilo. Chesson et al. (1997) e Musel et al. (1997) associam a lignina com o controle do crescimento potencial do coleóptilo.

Outro fator genético que deve ser observado é a heterose ou vigor híbrido das sementes de milho. Os autores Gomes et al. (2000), José et al. (2005), Hoecker et al. (2006) e Oliveira et al. (2013), observaram que a qualidade fisiológica de sementes de milho é influenciada pelo genótipo e que a heterose influencia na germinação. Nesses trabalhos, foi constatado que as plantas híbridas apresentam maior eficiência nos sistemas enzimáticos do que as linhagens, o que explica maior vigor híbrido.

Segundo Bewley e Black (1985), as modificações metabólicas que ocorrem na germinação são resultados da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência, a exemplo das enzimas α -amilase e β -amilase. A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho (LI et al., 2007). Essa enzima catalisa a conversão de amido em açúcares, utilizados no crescimento do embrião (HENNING et al., 2010). Assim, genótipos com maior expressão da

enzima α -amilase tem mais facilidade de disponibilizar carboidratos para o embrião, resultando em maior velocidade de germinação e vigor (OLIVEIRA et al., 2013). Essa enzima tem maior expressão em sementes embebidas. Já a enzima β -amilase, se expressa em sementes secas, pois esta enzima é sintetizada durante o processo de desenvolvimento da semente e sua liberação e ativação durante a germinação é acompanhada da expressão de outras enzimas (SOPANEN; LAURIÈRE, 1989). A enzima β -amilase é uma α -1,4-D-glucano maltohidrolase (EC 3.2.1.2.) que catalisa a liberação de maltose e dextrinas a partir das extremidades não redutoras do amido (SPIER, 2005).

A atividade das enzimas pode estar relacionada não só a germinação, mas também ao crescimento e desenvolvimento das plântulas. Um grupo importante de enzimas com essa característica é o das mananases. Estas enzimas desempenham funções importantes na germinação e também no metabolismo da parede celular durante o crescimento e desenvolvimento das plântulas (WANG et al., 2015). A enzima endo- β -mananase embora não citada na literatura em sementes de milho, é muito investigada em sementes de tomate, café e alface, devido a sua relação com a hidrólise da parede celular, mobilização de reservas e consequente “enfraquecimento” do endosperma (LISBOA et al., 2006).

Assim, vários são os fatores genotípicos que podem influenciar no crescimento da plúmula e do coleótilo de plântulas de milho e consequentemente interferir nos resultados de um teste de germinação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia, ambos na Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras em Minas Gerais.

Para realização dos experimentos foram utilizadas sementes de dois híbridos simples e seus recíprocos com característica de germinação lenta da parte aérea cedidas pela empresa Dow AgroSciences. Sendo o híbrido 1 simples (Linhagem A x Linhagem B) e o híbrido 4 seu recíproco (Linhagem B x A) e o híbrido 2 simples (Linhagem A' x Linhagem C) e o híbrido 3 seu recíproco (Linhagem C x Linhagem A'). As linhagens A e A' são do mesmo material genético, entretanto possuem transgenes diferentes.

As sementes dos quatro híbridos classificadas na peneira 22, foram produzidas na mesma época sob as mesmas condições edafoclimáticas, na cidade de Ribeirão Preto no estado de São Paulo.

A pesquisa envolveu o estudo de fatores externos (água, temperatura, luz e tratamento químico) e do genótipo na germinação e crescimento das plântulas de milho.

3.1 Efeito da água, temperatura e luz na germinação

As sementes dos quatro híbridos foram semeadas em substrato papel toalha tipo Germitest umedecido em um volume de água destilada em quantidade equivalente a 2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do papel.

No laboratório de Análise de Sementes foram utilizadas quatro BODs, sendo cada uma regulada com as temperaturas de 20, 25, 30 °C e alternância 20-30 °C.

Dentro de cada BOD as sementes foram submetidas a dois tratamentos, sendo um o escuro e o outro, 12 horas de escuro e 12 horas de luz. As avaliações dos tratamentos onde as sementes germinaram apenas no escuro foram realizadas sob luz verde.

O esquema fatorial utilizado foi o $4 \times 3 \times 4 \times 2$ (4 híbridos, 3 volumes de água, 4 temperaturas e 2 formas de iluminação) e o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. O experimento foi realizado com quatro repetições de 25 sementes por tratamento.

As avaliações foram realizadas aos quatro, cinco, seis e sete dias. Em todas as avaliações foram analisados o número de plântulas normais; plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleótilo e plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleótilo. Na última contagem, aos sete dias, além das análises descritas acima se avaliou também o número de plântulas anormais, independente da anormalidade.

Foi verificada a normalidade dos dados deste experimento e a homogeneidade de variância entre os tratamentos. Devido ao fato dos dados não atenderem a distribuição normal, com exceção dos dados da variável plântula normal, foi necessária a transformação de dados. Aos dados foi adicionada uma constante de valor igual a 3 (LÚCIO et al., 2011; YAKAMURA, 1999) e em seguida foi realizada a transformação Box-Cox (BOX; COX, 1964). Após a transformação, os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias, com nível de significância de 5%, pelo teste de Scott- Knott, com auxílio do software SISVAR® (FERREIRA, 2011).

3.2 Tratamento químico das sementes e seu efeito na germinação e no crescimento diferencial entre plúmula e coleóptilo

Considerando os resultados do primeiro teste de germinação, foi realizado outro teste de germinação para avaliar o tratamento químico usual da empresa (nome técnico Deltametrina e marca comercial K-obiol, dosagem 8 ml/100 kg de sementes) e sua interferência na germinação dos quatro híbridos, além do efeito deste tratamento químico com os demais fatores significativos observados no primeiro experimento para plântulas com crescimento da plúmula diferencial em relação ao coleóptilo.

As sementes tratadas e as sementes não tratadas dos quatro híbridos foram semeadas em papel Germitest umedecido em um volume de água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel, na forma de rolo. Estes rolos foram mantidos na temperatura de 25 °C. Dentro das BODs as sementes foram submetidas a dois tratamentos, sendo um dos tratamentos o escuro e o outro, 12 horas de escuro e 12 horas de luz. As avaliações dos tratamentos onde as sementes germinaram apenas no escuro foram realizadas sob luz verde.

O esquema fatorial utilizado foi o 4x2x2 (4 híbridos, sementes tratadas e sementes não tratadas e 2 formas de iluminação). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes por tratamento.

As avaliações foram realizadas aos quatro, cinco, seis e sete dias. Em todas as avaliações foram analisados o número de plântulas normais; plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo e plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo. Na última contagem, aos sete dias, além das

análises descritas acima se avaliou também o número de plântulas anormais, independente da anormalidade.

Foi verificada a normalidade dos dados deste experimento e a homogeneidade de variância entre os tratamentos. Devido ao fato dos dados não atenderem a distribuição normal, com exceção dos dados da variável plântula normal, foi necessária a transformação de dados. Aos dados foi adicionada uma constante de valor igual a 3 (LÚCIO et al., 2011; YAKAMURA, 1999) e em seguida foi realizada a transformação Box-Cox (BOX; COX, 1964). Após a transformação, os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias, com nível de significância de 5%, pelo teste de Scott- Knott, com auxílio do software SISVAR® (FERREIRA, 2011).

3.3 Germinação em substrato areia (TGA)

O experimento foi conduzido em cabines de germinação com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. As sementes dos quatro híbridos foram semeadas em bandejas contendo areia peneirada, lavada e esterilizada, com quantidade de água equivalente a 60% da capacidade de campo.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes por tratamento.

As avaliações foram realizadas aos três, cinco e sete dias. Nestas avaliações foi observado o número de plântulas normais; plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo e plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo. Na última contagem, aos sete dias,

além das análises descritas acima se avaliou também o número de plântulas anormais, independente da anormalidade.

Os dados foram submetidos à verificação da normalidade e a homogeneidade de variância entre os tratamentos. Em seguida, foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias, com nível de significância de 5%, pelo teste de Scott- Knott, com auxílio do software SISVAR®.

3.4 Análise histológica para avaliação do pericarpo

Antes da avaliação da espessura do pericarpo, sementes dos quatro híbridos foram colocadas em água por 24 horas para facilitar os cortes.

Para a avaliação da espessura do pericarpo foram realizadas secções transversais na região mediana de cada semente, em micrótopo de mesa. Cada secção tinha aproximadamente 20 micrometros de espessura, sendo utilizadas cinco repetições para cada material. O corante utilizado para a confecção das laminas foi o Saflablau 1% (0,9% Astra + 0,1% Safran), utilizando-se três gotas em cada repetição por 60 segundos.

Por meio de um microscópio estereoscópio, com uma câmera fotográfica adaptada, foram obtidas as imagens dos pericarpos das sementes. Estas imagens foram analisadas e a espessura do pericarpo medida com auxílio do programa Image J.

As medidas obtidas foram submetidas à análise de variância e a comparação de médias, com nível de significância de 5%, pelo teste de Scott-Knott, com o auxílio do software SISVAR®.

3.5 Análise histoquímica para avaliação de lignina na parede do coleóptilo

Plântulas com quatro dias de desenvolvimento, dos quatro híbridos, foram utilizadas para a determinação da deposição de lignina na parede primária do coleóptilo.

Foram obtidas secções transversais da região de transição entre o coleóptilo e a plúmula das plântulas em micrótomo de mesa. As secções transversais foram coradas com solução de fluroglucina (1 g/ 100 ml) por 5 minutos. Como padrão, uma secção sem corante foi utilizada. Foram utilizadas cinco repetições de uma secção para cada material.

As lâminas foram visualizadas em microscópio estereoscópio adaptado com uma câmera fotográfica, onde foram feitas as fotomicrografias.

A avaliação da deposição de lignina na parede primária do coleóptilo foi analisada visualmente, por meio das imagens obtidas. A cor vermelha presente na parede do material indica a presença de lignina.

3.6 Enzimas α -amilase e β -amilase

Foram utilizadas sementes embebidas por 72 horas, sementes secas e plântulas com quatro dias de desenvolvimento dos quatro híbridos.

Dez sementes embebidas, dez sementes secas e dez plântulas de cada material foram trituradas a frio, em cadinho, com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -81 °C até o momento das análises.

Para a extração da enzima α e β -amilase foram adicionados 200 μ l de tampão de extração Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 a 0,1 g do pó obtido. O homogeneizado foi mantido por 12 horas em geladeira a 5 °C, sendo que após este período, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm a 4 °C, por 30 minutos. Volumes de 50 μ l do extrato proteico foram aplicados em cada

canaleta, nos géis de poliacrilamida 7,5% (gel separador – contendo amido) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-Glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 5 horas. A revelação dos géis foi realizada de acordo com os protocolos contidos em Alfenas et al. (2006).

A avaliação dos géis foi realizada visualmente, em transiluminador, sendo considerada a variação de intensidade das bandas.

3.7 Enzima endo- β -mananase

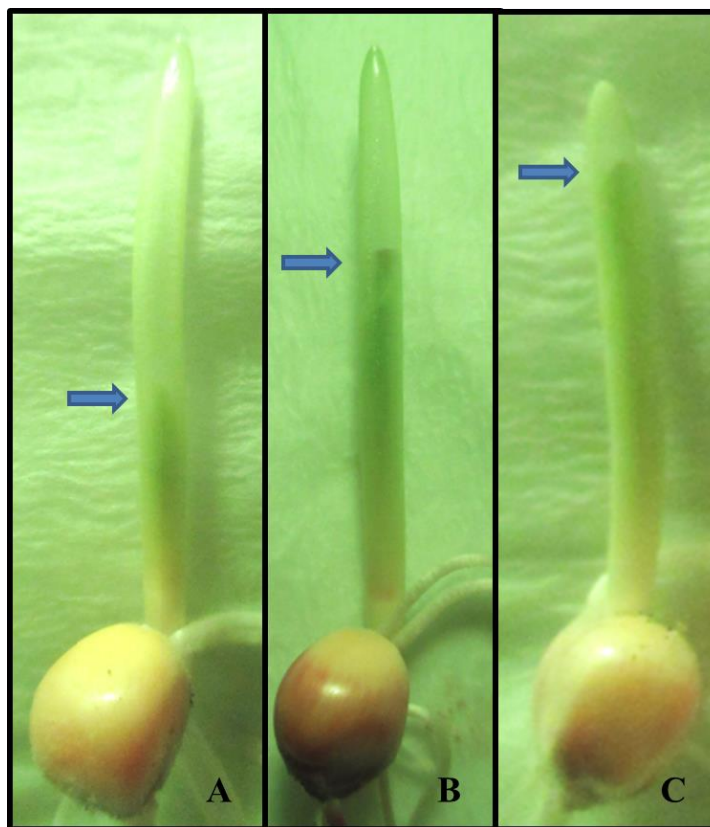
Foram utilizadas sementes embebidas por 5 horas dos quatro híbridos. Quinze sementes de cada material foram trituradas a frio, em cadinho, na presença de nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Para a extração da endo- β -mananase, em microtubo com 100 mg de pó de cada amostra foram adicionados 300 μl de tampão de extração (0,1 M HEPES/ 0,5 M NaCl e ácido ascórbico (5 mg de ácido ascórbico por ml de tampão, pH 8,0). Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm e 2 μl do sobrenadante aplicados em gel contendo 6 ml de LBG (Locust Bean Gum), 0,24 g de agarose e 24 ml de tampão pH 5,0 (1 M ácido cítrico/ 0,4 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. Cada amostra do material foi aplicada no gel em triplicata. O gel foi incubado por 21 h e revelado segundo metodologia proposta por Silva et al. (2004). A curva padrão foi realizada com a endo- β -mananase comercial de *Aspergillus niger*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 estão representados os tipos de plântulas de milho observadas nas avaliações da germinação. O desenvolvimento lento da plúmula em relação ao coleóptilo foi observado na plântula A, onde o crescimento da plúmula foi inferior a 50% em relação ao comprimento do coleóptilo.

Figura 1 Exemplos de plântulas de milho aos cinco dias de avaliação do teste de germinação



A) Plântula anormal com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo; B) Plântula normal com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo; C) Plântula normal.

4.1 Efeito da água, temperatura e luz na germinação

O efeito da água, temperatura e luz foi observado em diferentes dias após a semeadura.

- **Avaliação aos quatro dias**

Para a variável plântula normal houve interação dupla significativa para híbrido x temperatura. Germinações inferiores foram observadas a temperatura de 20° C para os híbridos 2 e 3 (Tabela 1). Segundo Zucarelli et al. (2011), as temperaturas abaixo da ótima recomendada para germinação de sementes de milho tornam o processo de embebição mais lento. Em temperaturas mais baixas pode ocorrer dificuldades na reorganização das membranas celulares e conseqüentemente atrasos na germinação (Carvalho et al., 2009), sendo este fato influenciado pela qualidade fisiológica e pelo genótipo (Grzybowski et al., 2015). Guan et al. (2009) também relatam que temperaturas mais baixas afetam as funções fisiológicas das plantas, além de atrasar ou impedir o processo de germinação.

Tabela 1 Porcentagens de plântulas normais de milho avaliadas aos 4 dias após a semeadura

Híbrido	Temperatura			
	20-30° C	20° C	25° C	30° C
1	98 a A	95 a A	99 a A	99 a A
2	96 a A	87 b B	96 a A	98 a A
3	96 a A	85 b B	96 a A	97 a A
4	98 a A	92 a B	98 a A	97 a A

CV(%) = 4,45

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Os dados referentes às anormalidades de crescimento diferencial da plúmula em relação ao coleóptilo encontram-se nas tabelas 2A; 2B; 3A e 3B.

Foram observadas duas interações triplas significativas entre os fatores: híbrido x temperatura x água e híbrido x temperatura x luz.

Na temperatura de 30 °C houve maior ocorrência de plântulas com crescimento da plúmula inferior a 50% em relação ao coleóptilo (Tabela 2A). Resultados que contrariam os encontrados por Deng et al. (2015) e Zucarelli et al. (2008), nos quais a temperatura de 30°C foi a mais favorável para germinação e desenvolvimento de plântulas de milho. Entretanto, Sbrussi e Zucarelli (2014) afirmam que as temperaturas mais altas favorecem o maior número de plântulas anormais. Segundo Dousseau et al. (2008), temperaturas elevadas podem ser prejudiciais à germinação, provavelmente por causarem desnaturação de proteínas essenciais ao processo germinativo.

Tabela 2A Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura

		Temperatura			
Híbrido	Água	20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	2,0	0 a B	0 a B	0 a B	4 a A
2	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 b A
3	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 b A
4	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 b A
1	2,5	0 a A	0 a A	0 a A	0 b A
2	2,5	0 a A	0 a A	0 a A	0 b A
3	2,5	0 a B	0 a B	0 a B	4 a A
4	2,5	0 a B	0 a B	0 a B	4 a A
1	3,0	0 b A	0 a A	0 b A	0 b A
2	3,0	0 b A	0 a A	0 b A	0 b A
3	3,0	3 a A	0 a B	0 b B	0 b B
4	3,0	3 a A	0 a B	2 a B	4 a A

CV (%) = 1,78

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

O volume de água de 3,0 vezes o peso do papel também propiciou maior frequência de plântulas com o crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleótilo. Esta anormalidade foi observada principalmente quando se utilizou sementes do híbrido 4 (Tabela 2B).

Tabela 2B Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleótilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento do fator água

Híbrido	Temperatura	Água		
		2,0	2,5	3,0
1	20-30 °C	0 a	0 a	0 a
1	20 °C	0 a	0 a	0 a
1	25 °C	0 a	0 a	0 a
1	30 °C	4 a	0 b	0 b
2	20-30 °C	0 a	0 a	0 a
2	20 °C	0 a	0 a	0 a
2	25 °C	0 a	0 a	0 a
2	30 °C	0 a	0 a	0 a
3	20-30 °C	0 b	0 b	3 a
3	20 °C	0 a	0 a	0 a
3	25 °C	0 a	0 a	0 a
3	30 °C	0 b	4 a	0 b
4	20-30 °C	0 b	0 b	3 a
4	20 °C	0 a	0 a	0 a
4	25 °C	0 a	0 a	2 a
4	30 °C	0 b	4 a	4 a

CV (%) = 1,78

As médias seguidas da mesma letra nas mesmas combinações na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados apresentados na tabela 3A, observou-se em sementes do híbrido 4, submetidas as temperaturas mais altas de 30 °C e variação de

20-30 °C a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleóptilo.

Tabela 3A Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura

Híbrido	Luz/Escuro	Temperatura			
		20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	Luz	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
2	Luz	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
3	Luz	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
4	Luz	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
1	Escuro	0 b A	0 a A	0 a A	0 b A
2	Escuro	0 b A	0 a A	0 a A	0 b A
3	Escuro	0 b A	0 a A	0 a A	0 b A
4	Escuro	4 a A	0 a B	0 a B	4 a A

CV(%) = 1,78

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha nas mesmas combinações não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A porcentagem deste tipo de anormalidade também foi maior quando as plântulas se desenvolveram na condição de ausência de luz (Tabela 3B). Resultado semelhante foi obtido por Lima et al. (2010) que relataram em sua pesquisa que plântulas de milho desenvolvidas no escuro apresentam mesocótilo e coleóptilo alongados e folhas primárias enroladas no interior do coleóptilo.

Tabela 3B Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura para o desdobramento do fator luz

Híbrido	Temperatura	Luz	Escuro
1	20-30 °C	0 a	0 a
1	20 °C	0 a	0 a
1	25 °C	0 a	0 a
1	30 °C	0 a	0 a
2	20-30 °C	0 a	0 a
2	20 °C	0 a	0 a
2	25 °C	0 a	0 a
2	30 °C	0 a	0 a
3	20-30 °C	0 a	0 a
3	20 °C	0 a	0 a
3	25 °C	0 a	0 a
3	30 °C	0 a	0 a
4	20-30 °C	0 b	4 a
4	20 °C	0 a	0 a
4	25 °C	0 a	0 a
4	30 °C	0 b	4 a

CV (%) = 1,78

As médias seguidas da mesma letra nas mesmas combinações na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.

Na análise de variância, para a variável plântula com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao coleóptilo foram significativas duas interações duplas: híbrido x temperatura e híbrido x luz.

O híbrido 3 foi o que apresentou a menor porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao coleóptilo. As temperaturas mais altas de 30 °C e variação de 20-30 °C proporcionaram uma maior porcentagem deste tipo de plântulas (Tabela 4). O estresse ocasionado por temperaturas mais altas podem causar danos irreversíveis no desenvolvimento das plântulas.

Tabela 4 Percentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura

Híbrido	Temperatura			
	20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	4 a A	0 a B	4 a A	4 a A
2	4 a A	0 a B	0 b B	4 a A
3	0 b B	0 a B	0 b B	5 a A
4	4 a B	0 a C	6 a A	6 a A

CV(%) = 2,87

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott em nível de 5% de probabilidade.

Na ausência de luz, o híbrido 3 foi o que apresentou a menor porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo. Na presença de luz, a maior porcentagem de plântulas com esta característica foi observada no híbrido 4 (Tabela 5).

Tabela 5 Percentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura

Híbrido	Luz	Escuro
1	0 b B	5 a A
2	0 b B	4 a A
3	0 b A	0 b A
4	4 a A	4 a A

CV (%) = 2,87

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott em nível de 5% de probabilidade.

- **Avaliação aos cinco dias**

Aos cinco dias, na análise de variância houve interação dupla significativa: híbrido x temperatura para a variável plântula normal.

Observa-se na tabela 6 que o híbrido 2 apresentou a menor porcentagem de plântulas normais quando submetido as temperaturas de 20 °C e 25 °C. Já os híbridos 1, 3 e 4 apresentaram as mesmas porcentagens de plântulas normais nas quatro temperaturas. Segundo Vaz-de-Melo et al. (2012) a temperatura de 20 °C exerce efeito negativo sobre a germinação e o crescimento de plântulas de milho.

Tabela 6 Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 5 dias após a semeadura

Híbrido	Temperatura			
	20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	99 a A	98 a A	97 a A	99 a A
2	98 a A	94 b B	94 b B	98 a A
3	99 a A	99 a A	97 a A	99 a A
4	98 a A	98 a A	98 a A	99 a A

CV(%) = 2,94

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para a variável plântula com crescimento da plúmula menor que 50% do coleóptilo, apenas para o fator híbrido houve diferença significativa, indicando a influência do genótipo no crescimento desigual.

A maior porcentagem de plântulas com o crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleóptilo aos cinco dias foi observada para o híbrido 4 (Tabela 7). Segundo Mertz et al. (2009) e Nerling et al. (2013) a qualidade fisiológica de sementes é herdada geneticamente de seus pais, portanto, diferentes

híbridos de uma mesma espécie podem apresentar variação de vigor, germinação e emergência em uma mesma condição de produção e processamento.

Tabela 7 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura

Híbrido	Média
1	0 b
2	0 b
3	0 b
4	2 a
CV (%) = 1,51	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott em nível de 5% de probabilidade.

Na análise de variância para a variável plântula com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo, a interação quadrupla: híbrido x temperatura x água x luz/escuro foi significativa.

Pelos resultados apresentados na tabela 8A, na maioria das combinações dos fatores, a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo foi observada para o híbrido 4. Não foi possível apontar qual a temperatura ou volume de água tem o maior efeito sobre a porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo, uma vez que essa porcentagem variou bastante aos 5 dias. No entanto, na tabela 8B observa-se que na ausência de luz houve maior ocorrência deste tipo de plântulas. Segundo Parvez et al. (1997) a taxa de crescimento de coleóptilos de milho no escuro é mais elevada que na luz.

Tabela 8A Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura

Híbrido	Água	Luz/Escuro	Temperatura			
			20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	2,0	Escuro	0 a B	4 a A	5 a A	3 a A
2	2,0	Escuro	0 a B	0 b B	3 b A	4 a A
3	2,0	Escuro	2 a A	2 b A	2 b A	0 b A
4	2,0	Escuro	2 a B	7 a A	7 a A	0 b B
1	2,0	Luz	2 a A	0 b A	2 b A	0 a A
2	2,0	Luz	0 a B	3 a A	0 b B	0 a B
3	2,0	Luz	0 a A	0 b A	0 b A	0 a A
4	2,0	Luz	2 a B	0 b B	4 a A	0 a B
1	2,5	Escuro	2 b A	3 a A	2 b A	3 a A
2	2,5	Escuro	6 a A	4 a A	4 a A	0 b B
3	2,5	Escuro	2 b A	2 b A	0 b A	0 b A
4	2,5	Escuro	5 a A	3 a A	5 a A	0 b B
1	2,5	Luz	0 a B	0 b B	3 a A	0 a B
2	2,5	Luz	0 a B	2 b B	4 a A	0 a B
3	2,5	Luz	0 a A	0 b A	2 b A	0 a A
4	2,5	Luz	0 a B	3 a A	0 b B	0 a B
1	3,0	Escuro	2 b B	0 b B	4 b A	2 a B
2	3,0	Escuro	0 b B	4 a A	3 b A	0 a B
3	3,0	Escuro	2 b A	3 a A	2 c A	2 a A
4	3,0	Escuro	3 a B	3 a B	8 a A	2 a B
1	3,0	Luz	0 a A	0 b A	0 b A	0 a A
2	3,0	Luz	0 a A	2 b A	2 b A	0 a A
3	3,0	Luz	0 a A	2 b A	0 b A	0 a A
4	3,0	Luz	0 a B	3 a A	3 a A	0 a B

CV (%) = 1,43

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha nas mesmas combinações não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8B Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores água e luz

Híbrido	Temperatura	Luz/ Escuro	Água		
			2,0	2,5	3,0
1	20-30 °C	Escuro	0 a A	2 a A	2 a A
1	20-30 °C	Luz	2 a A	0 a A	0 a A
1	20 °C	Escuro	4 a A	3 a A	0 b A
1	20 °C	Luz	0 a B	0 a B	0 a A
1	25 °C	Escuro	5 a A	2 b A	4 a A
1	25 °C	Luz	2 a B	3 a A	0 a B
1	30 °C	Escuro	3 a A	3 a A	2 a A
1	30 °C	Luz	0 a B	0 a B	0 a A
2	20-30 °C	Escuro	0 b A	6 a A	0 b A
2	20-30 °C	Luz	0 a A	0 a B	0 a A
2	20 °C	Escuro	0 b B	4 a A	4 a A
2	20 °C	Luz	3 a A	2 a B	2 a B
2	25 °C	Escuro	3 a A	4 a A	3 a A
2	25 °C	Luz	0 a B	4 a A	2 b A
2	30 °C	Escuro	4 a A	0 b A	0 b A
2	30 °C	Luz	0 a B	0 a A	0 a A
3	20-30 °C	Escuro	2 a A	2 a A	2 a A
3	20-30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
3	20 °C	Escuro	2 a A	2 a A	3 a A
3	20 °C	Luz	0 a A	0 a A	2 a A
3	25 °C	Escuro	2 a A	0 a A	2 a A
3	25 °C	Luz	0 a A	2 a A	0 a A
3	30 °C	Escuro	0 a A	0 a A	2 a A
3	30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
4	20-30 °C	Escuro	2 b A	5 a A	3 a A
4	20-30 °C	Luz	2 a A	0 a B	0 a B
4	20 °C	Escuro	7 a A	3 b A	3 b A
4	20 °C	Luz	0 a B	3 a A	3 a A
4	25 °C	Escuro	7 a A	5 a A	8 a A
4	25 °C	Luz	4 a B	0 b B	3 a B
4	30 °C	Escuro	0 a A	0 a A	2 a A
4	30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A

CV(%) = 1,43

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna nas mesmas combinações não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

- **Avaliação aos seis dias**

Aos seis dias, para a variável plântula normal houve interação significativa dupla: híbrido x luz.

Observa-se na tabela 9, na presença de luz, para os híbridos 2 e 3 menor porcentagem de plântulas normais que para os demais híbridos, porém, na ausência de luz esta porcentagem foi a mesma para todos eles.

Tabela 9 Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 6 dias após a semeadura

Híbrido	Escuro	Luz
1	99 a A	99 a A
2	99 a A	97 b B
3	98 a A	97 b A
4	99 a A	99 a A
CV(%) = 2,47		

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5 % de probabilidade.

Para a variável plântula com crescimento da plúmula menor que 50% houve interação tripla significativa para híbrido x temperatura x água.

Pelos resultados da tabela 10A, o híbrido 4 foi o que apresentou a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleóptilo. A temperatura de 25 °C e variação de temperatura de 20-30 °C foram as que proporcionam maior porcentagem deste tipo de plântulas. Resultado este diferente do encontrado por Lipchinsky et al. (2013) que relatam que quedas bruscas de temperatura causam um alongamento instantâneo da parede celular do coleóptilo.

Observa-se na tabela 10B, que o volume de água igual a 3,0 vezes o peso do papel também influenciou na maior ocorrência de plântulas com

crescimento da plúmula menor que 50% para os híbridos 3 e 4. Resultado este contrário ao encontrado pelos pesquisadores Vaz-de-Melo et al. (2012) que relatam que o menor volume de água é o que tem efeito negativo sobre o crescimento das plântulas de milho. Segundo Kappes et al. (2010) a necessidade de água é variável dependendo do tipo de material de milho utilizado, ou seja, cada híbrido apresenta uma necessidade diferente em relação ao volume de água para o desenvolvimento das plântulas.

Tabela 10A Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleótilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura

Híbrido	Água	Temperatura			
		20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
2	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
3	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
4	2,0	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
1	2,5	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
2	2,5	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
3	2,5	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
4	2,5	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
1	3,0	0 b A	0 a A	0 b A	0 a A
2	3,0	0 b A	0 a A	0 b A	0 a A
3	3,0	3 a A	0 a B	0 b B	0 a B
4	3,0	3 a A	0 a B	2 a A	0 a B

CV(%) = 2,33

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha na mesma combinação não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10B Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura para o desdobramento do fator água

Híbrido	Temperatura	Água		
		2,0	2,5	3,0
1	20-30 °C	0 a	0 a	0 a
1	20 °C	0 a	0 a	0 a
1	25 °C	0 a	0 a	0 a
1	30 °C	0 a	0 a	0 a
2	20-30 °C	0 a	0 a	0 a
2	20 °C	0 a	0 a	0 a
2	25 °C	0 a	0 a	0 a
2	30 °C	0 a	0 a	0 a
3	20-30 °C	0 b	0 b	3 a
3	20 °C	0 a	0 a	0 a
3	25 °C	0 a	0 a	0 a
3	30 °C	0 a	0 a	0 a
4	20-30 °C	0 b	0 b	3 a
4	20 °C	0 a	0 a	0 a
4	25 °C	0 b	0 b	2 a
4	30 °C	0 a	0 a	0 a

CV(%) = 2,33

As médias seguidas da mesma letra na mesma combinação na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para variável plântula com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo foram significativas às interações duplas: temperatura x luz e híbrido x temperatura.

A maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo aos seis dias ocorreu na temperatura de 20 °C e na condição de ausência de luz (Tabela 11). Sbrussi e Zucarelli (2014) trabalharam com diferentes lotes de sementes de milho e para todos os lotes as

temperaturas abaixo de 20 °C causaram ausência de plântulas normais, devido ao atraso na germinação dos lotes. Zucarrelli et al. (2008) também observaram que a temperatura de 20 °C reduziu o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de milho, quando comparado com o desenvolvimento das plântulas a 30 °C.

Tabela 11 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura

Luz/ Escuro	Temperatura			
	20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
Escuro	0 a B	3 a A	0 a B	0 a B
Luz	0 a A	1 b A	0 a A	0 a A
CV(%) = 1,96				

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo também foi observada quando foram utilizadas sementes do híbrido 4 (Tabela 12).

Tabela 12 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias

Híbrido	Temperatura			
	20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	0 a A	1 c A	0 a A	0 a A
2	0 a B	2 b A	0 a B	0 a B
3	0 a A	0 c A	0 a A	0 a A
4	0 a B	3 a A	1 a B	0 a B
CV(%) = 1,96				

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

- **Avaliação aos sete dias**

Para variável plântula normal foi significativa à interação quadrupla: híbrido x temperatura x água x luz.

Observa-se na tabela 13 que a porcentagem de plântulas normais foi igual para todos os híbridos na maioria das combinações dos fatores. Apenas em duas combinações a menor porcentagem de plântulas normais foi observada para o híbrido 2 em relação aos demais híbridos e para os híbridos 3 e 4 em apenas uma combinação.

Tabela 13 Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 7 dias após a semeadura para o desdobramento do fator híbrido

Híbrido	Água	Luz/Escuro	Temperatura			
			20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	2,0	Escuro	100 a	99 a	98 a	100 a
2	2,0	Escuro	97 a	97 a	100 a	98 a
3	2,0	Escuro	100 a	98 a	97 a	99 a
4	2,0	Escuro	100 a	100 a	100 a	98 a
1	2,0	Luz	100 a	99 a	100 a	95 b
2	2,0	Luz	98 a	96 a	97 a	99 a
3	2,0	Luz	97 a	98 a	100 a	99 a
4	2,0	Luz	99 a	99 a	100 a	98 a
1	2,5	Escuro	100 a	99 a	98 a	99 a
2	2,5	Escuro	97 a	99 a	100 a	100 a
3	2,5	Escuro	100 a	100 a	97 a	98 a
4	2,5	Escuro	100 a	99 a	100 a	100 a
1	2,5	Luz	100 a	99 a	100 a	98 a
2	2,5	Luz	95 b	99 a	100 a	99 a
3	2,5	Luz	98 a	97 a	98 a	100 a
4	2,5	Luz	100 a	99 a	100 a	100 a

Continuação.

1	3,0	Escuro	100 a	97 a	99 a	100 a
2	3,0	Escuro	98 a	99 a	99 a	100 a
3	3,0	Escuro	98 a	97 a	98 a	99 a
4	3,0	Escuro	98 a	99 a	99 a	99 a
1	3,0	Luz	97 a	100 a	100 a	100 a
2	3,0	Luz	99 a	100 a	99 a	95 b
3	3,0	Luz	99 a	95 b	97 a	98 a
4	3,0	Luz	99 a	100 a	99 a	100 a

CV(%) = 2,29

As médias seguidas da mesma letra na mesma combinação na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Aos sete dias de avaliação não foram encontradas em nenhum dos tratamentos plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleóptilo.

Em relação a variável plântula com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo houve interação quadrupla significativa para híbrido x temperatura x água x luz.

Na maioria das combinações dos fatores avaliados, a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo foi verificada para o híbrido 4. Seguido pelos híbridos 2 e 3 que apresentam maior porcentagem desse tipo de plântulas que o híbrido 1 (Tabela 14A). Não foi possível concluir qual temperatura proporcionou a maior porcentagem de plântulas com essa característica, uma vez que a presença dessas plântulas foi observada em todas as temperaturas. Em relação à água, os volumes iguais a 2,0 e 3,0 vezes o peso do papel foram os que proporcionaram a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em

relação ao comprimento do coleóptilo (Tabela 14B). Segundo Westgate e Boyer (1985) o crescimento e expansão de órgão como raízes, caules e folhas são inibidos por potenciais baixos de água. Fato este também observado por Ávila et al. (2007) que relata a redução no comprimento de plântulas de milho quando a disponibilidade de água foi reduzida. No entanto, de acordo com Yap (1981), o excesso de água também é prejudicial ao desenvolvimento de plântulas de milho.

A ausência de luz também proporcionou maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo.

Tabela 14A Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 7 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores híbrido e temperatura

Híbrido	Água	Luz/Escuro	Temperatura			
			20-30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	2,0	Escuro	0 a A	0 b A	0 a A	2 c A
2	2,0	Escuro	0 a A	0 b A	0 a A	2 c A
3	2,0	Escuro	0 a B	0 b B	1 a B	8 a A
4	2,0	Escuro	0 a B	5 a A	0 a B	4 b A
1	2,0	Luz	0 a A	0 b A	0 b A	0 a A
2	2,0	Luz	0 a B	3 a A	0 b B	0 a B
3	2,0	Luz	0 a A	0 b A	0 b A	0 a A
4	2,0	Luz	0 a B	0 b B	3 a A	0 a B
1	2,5	Escuro	0 a B	3 a A	0 b B	0 a B
2	2,5	Escuro	0 a B	0 b B	3 a A	0 a B
3	2,5	Escuro	0 a A	0 b A	0 b A	0 a A
4	2,5	Escuro	1 a B	0 b B	5 a A	0 a B
1	2,5	Luz	0 a A	0 b A	0 a A	0 a A
2	2,5	Luz	0 a A	0 b A	0 a A	0 a A
3	2,5	Luz	0 a A	1 b A	1 a A	0 a A
4	2,5	Luz	0 a B	3 a A	0 a B	0 a B

Continuação.						
1	3,0	Escuro	0 a A	0 a A	0 c A	0 a A
2	3,0	Escuro	0 a A	0 a A	2 b A	0 a A
3	3,0	Escuro	0 a B	0 a B	5 a A	1 a B
4	3,0	Escuro	1 a B	1 a B	8 a A	1 a B
1	3,0	Luz	0 a A	0 b A	0 b A	0 a A
2	3,0	Luz	0 a A	1 b A	0 b A	0 a A
3	3,0	Luz	0 a A	2 a A	0 b A	0 a A
4	3,0	Luz	0 a B	1 b B	3 a A	0 a B

CV(%) = 1,07

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha na mesma combinação não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14B Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 7 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores água e luz

Híbrido	Temperatura	Luz/Escuro	Água		
			2,0	2,5	3,0
1	20-30 °C	Escuro	0 a A	0 a A	0 a A
1	20-30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
1	20 °C	Escuro	0 b A	3 a A	0 b A
1	20 °C	Luz	0 a A	0 a B	0 a A
1	25 °C	Escuro	0 a A	0 a A	0 a A
1	25 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
1	30 °C	Escuro	2 a A	0 b A	0 b A
1	30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
2	20-30 °C	Escuro	0 a A	0 a A	0 a A
2	20-30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
2	20 °C	Escuro	0 a B	0 a A	0 a A
2	20 °C	Luz	3 a A	0 b A	1 b A

Continuação.

2	25 °C	Escuro	0 b A	3 a A	2 a A
2	25 °C	Luz	0 a A	0 a B	0 a A
2	30 °C	Escuro	2 a A	0 b A	0 b A
2	30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
3	20-30 °C	Escuro	0 a A	0 a A	0 a A
3	20-30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
3	20 °C	Escuro	0 a A	0 a A	0 a A
3	20 °C	Luz	0 b A	1 b A	2 a A
3	25 °C	Escuro	1 b A	0 b A	5 a A
3	25 °C	Luz	0 a A	1 a A	0 a B
3	30 °C	Escuro	8 a A	0 b A	1 b A
3	30 °C	Luz	0 a B	0 a A	0 a A
4	20-30 °C	Escuro	0 a A	1 a A	1 a A
4	20-30 °C	Luz	0 a A	0 a A	0 a A
4	20 °C	Escuro	5 a A	0 b B	1 b A
4	20 °C	Luz	0 b B	3 a A	1 a A
4	25 °C	Escuro	0 b B	5 b A	8 a A
4	25 °C	Luz	3 a A	0 b B	3 a B
4	30 °C	Escuro	4 a A	0 a A	1 a A
4	30 °C	Luz	0 a B	0 a A	0 a A

CV(%) = 1,07

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna na mesma combinação não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Pela análise dos dados no primeiro experimento foi possível concluir que o crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleóptilo, inicialmente, aos quatro dias, ocorreu na associação da temperatura mais alta de 30 °C, com o volume de água igual a 3,0 vezes o peso do papel e ausência de luz, principalmente em relação ao híbrido 4. Ainda aos quatro dias, o

crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo foi observado principalmente em temperaturas mais elevadas, de 30 °C e na variação de 20-30 °C.

Aos cinco dias foi possível observar que a anormalidade da plúmula em relação ao coleóptilo ocorre independente da condição de luz, temperatura e disponibilidade hídrica, somente para o híbrido 4. Um crescimento diferencial da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo foi observado em todos os híbridos avaliados, com maior incidência nos híbridos 3 e 4 na condição de ausência de luz.

Aos seis dias de avaliação apenas os híbridos 3 e 4, com temperaturas de 20-30 °C e 25 °C apresentam plúmulas com crescimento menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo. Para plântulas com plúmula entre 50 e 75% do comprimento do coleóptilo, nota-se ainda a tendência de ocorrência para o híbrido 4 na condição de ausência de luz.

Aos sete dias de avaliação não foi observado o crescimento diferencial da plúmula menor que 50%, mas para plântulas com plúmulas entre 50 e 75% em relação ao coleóptilo foi observado maior incidência para o híbrido 4, seguido do 3, na condição de ausência de luz.

4.2 Tratamento químico das sementes e seu efeito na germinação e no crescimento diferencial entre plúmula e coleóptilo

O efeito do tratamento químico das sementes e da luz foi observado em diferentes dias após a semeadura.

- **Avaliação aos quatro dias**

Aos quatro dias, na análise de variância para a variável plântula normal, apenas o fator híbrido foi significativo, indicando que o tratamento químico não afetou a germinação.

A maior porcentagem de plântulas normais foi observada para o híbrido 1, seguido pelo híbrido 4. Os híbridos 2 e 3 apresentaram a menor porcentagem de plântulas normais (Tabela 15).

Tabela 15 Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 4 dias após a semeadura

Híbrido	Média
1	97 a
2	90 c
3	91 c
4	94 b
CV(%) = 4,68%	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para a variável plântula com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleótilo, o fator híbrido foi significativo. Assim como no primeiro teste de germinação realizado, aos quatro dias, a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleótilo foi observada para o híbrido 4 (Tabela 16).

Tabela 16 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura

Híbrido	Média
1	0 b
2	0 b
3	0 b
4	3 a
CV(%) = 1,76	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para variável plântula com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo houve interação dupla significativa para luz x tratamento químico das sementes.

Quando se utilizou sementes tratadas, a ausência de luz proporcionou maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao coleóptilo do que a presença de luz. Entretanto, para sementes não tratadas esta porcentagem foi a mesma independente da luz (Tabela 17). Em resultados encontrados pelos pesquisadores Vazquez et al. (2014) existem evidências de que o tratamento químico das sementes de híbridos de milho não reduziu expressivamente a germinação e não causou maior porcentagem de plântulas anormais pela aplicação dos produtos. Entretanto, segundo Deurner et al. (2014) a redução da germinação e do vigor de sementes de milho, condicionadas pelos inseticidas e fungicidas utilizados no tratamento de sementes, varia em função do produto e do tempo em que as sementes permanecem armazenadas.

Tabela 17 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao coleóptilo avaliadas aos 4 dias após a semeadura

Luz/Escuro	Semente não tratada	Semente tratada
Luz	3 a A	2 b A
Escuro	3 a A	4 a A
CV(%) = 1,68		

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

- **Avaliação aos cinco dias**

Foi significativo aos cinco dias na análise de variância o fator híbrido. Assim como aos quatro dias, os híbridos 1 e 4 foram os que apresentam a maior porcentagem de plântulas normais (Tabela 18).

Tabela 18 Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 5 dias após a semeadura

Híbrido	Média
1	99 a
2	94 b
3	96 b
4	98 a
CV(%) = 3,32	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para a variável plântula com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo, foi significativo na análise de variância, o fator híbrido. Assim como nas demais avaliações, o híbrido 4 foi o que apresenta a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao coleóptilo (Tabela 19).

Tabela 19 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a sementeira

Híbrido	Média
1	0 b
2	0 b
3	0 b
4	2 a
CV(%) = 0,91	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para variável plântula com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo houve interação dupla significativa para híbrido x luz.

No escuro os híbridos 1 e 4 foram os que apresentam a maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo. Na presença de luz o híbrido 4 foi o que apresenta a maior porcentagem deste tipo de plântulas.

Observa-se ainda que no escuro ocorreu maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo do que na presença de luz, exceto para o híbrido 4 que apresentou a mesma porcentagem de plântulas com estas características independente da iluminação (Tabela 20). Resultado semelhante foi encontrado por Brancalion et al. (2008), trabalhando com *Heliocarpus popayanensis* L., que observaram que apesar da luz não ser necessária para a germinação das sementes dessa espécie, a porcentagem de plântulas normais dos testes conduzidos no escuro foi significativamente inferior à dos conduzidos com luz. As sementes que germinavam no escuro originavam plântulas cujos cotilédones permaneceram no interior do tegumento e tinham o hipocótilo estiolado.

Tabela 20 Percentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 5 dias após a semeadura

Híbrido	Escuro	Luz
1	7 a A	0 b B
2	3 b A	0 b B
3	3 b A	0 b B
4	6 a A	4 a A
CV(%) = 1,70		

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5%.

- **Avaliação aos seis dias**

Aos seis dias de avaliação, na análise de variância para a variável plântula normal houve interação dupla significativa para híbrido x luz.

Na ausência de luz todos os híbridos apresentaram a mesma porcentagem de plântulas normais. Quando os híbridos estavam na condição de presença de luz, a menor porcentagem de plântulas normais foi observada para o híbrido 2 (Tabela 21).

Tabela 21 Percentagens de plântulas normais avaliadas aos 6 dias após a semeadura

Híbrido	Escuro	Luz
1	97 a A	100 a A
2	98 a A	94 b B
3	95 a A	97 a A
4	97 a A	99 a A
CV(%) = 3,27		

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Nesta avaliação não foram observadas plântulas com crescimento da plúmula menor que 50%. No entanto, foram encontradas plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo. Na análise de variância, para esta variável houve interação tripla significativa para híbrido x luz x tratamento químico de sementes.

A maior porcentagem de plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo foi observada para o híbrido 4, na condição de ausência de luz, quando as sementes estão tratadas. Nos demais tratamentos, todos os híbridos apresentam a mesma porcentagem deste tipo de plântula (Tabela 22). Salgado e Ximenes (2013) também observaram que para alguns híbridos de milho o tratamento das sementes influenciou na germinação e no desenvolvimento de plântulas.

Tabela 22 Porcentagens de plântulas com crescimento da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo avaliadas aos 6 dias após a semeadura para o desdobramento dos fatores luz e tratamento químico

Híbrido	Tratamento de Sementes	Luz	Escuro
1	Não tratada	0 b A	2 a A
1	Tratada	0 a A	0 a A
2	Não Tratada	0 a A	1 a A
2	Tratada	0 a A	0 a A
3	Não Tratada	0 b A	2 a A
3	Tratada	0 a A	0 a A
4	Não Tratada	2 a A	1 a B
4	Tratada	2 b A	5 a A
CV(%) = 1,19			

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna na mesma combinação não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

- **Avaliação aos sete dias**

Aos sete dias de avaliação, para a variável plântula normal houve interação dupla significativa para híbridos x luz.

Na condição de presença de luz, a menor porcentagem de plântulas normais foi observada para o híbrido 2 (Tabela 23). No entanto, na condição de ausência de luz, todos os híbridos apresentaram a mesma porcentagem de plântulas normais.

Quando o fator estudado foi a iluminação, observa-se que na ausência de luz os híbridos 1 e 3 apresentaram uma menor porcentagem de plântulas normais do que quando os mesmos foram colocados em condição de presença de luz. Já para os híbridos 2 e 4 independentemente da iluminação utilizada a porcentagem de plântulas normais foi a mesma.

Tabela 23 Porcentagens de plântulas normais avaliadas aos 7 dias após a semeadura

Híbrido	Luz	Escuro
1	100 a A	97 a B
2	96 b A	98 a A
3	98 a A	96 a B
4	99 a A	97 a A
CV(%) = 2,89		

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Aos sete dias de avaliação não foram observadas a presença de plântulas com crescimento da plúmula menor que 50% em relação ao comprimento do coleóptilo e plântulas com crescimento da plúmula entre 50% e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo.

Pela análise dos dados no segundo experimento foi possível detectar aos quatro e cinco dias de avaliação anormalidades apenas para o híbrido 4. O tratamento químico não afetou o percentual de plântulas anormais. No entanto, foi observado crescimento diferencial da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo para todos os híbridos na ausência de luz, com maior incidência para o híbrido 4.

Aos seis dias as plântulas providas de sementes não tratadas de todos os híbridos apresentaram crescimento diferencial da plúmula entre 50 e 75% em relação ao comprimento do coleóptilo na condição de ausência de luz. Já para o híbrido 4 a incidência ocorreu tanto na luz como no escuro, para sementes tratadas e não tratadas. Aos sete dias não se observou mais o crescimento diferencial da plúmula e coleóptilo.

De acordo com Brasil (2009), Regras para Análise de Sementes, no teste de germinação para sementes de milho, são estabelecidas de 4 a 7 dias após a semeadura a avaliação de plântulas normais. Devido aos resultados observados neste experimento é recomendável, no caso de híbridos com características de crescimento diferencial, a avaliação aos sete dias, a fim de não inviabilizar a liberação desses materiais para a comercialização. Vale ressaltar que grande parte das empresas de sementes realiza contagem única aos cinco dias o que pode afetar os resultados do teste.

4.3 Germinação em substrato areia

No teste de germinação em substrato areia, aos três dias após a semeadura a menor porcentagem de plântulas normais foi observada para o híbrido 3. No entanto, aos cinco e aos sete dias não houve diferença entre porcentagem de plântulas normais para os híbridos (Tabela 24). Em substrato areia a emergência de 100% das plântulas ocorreu aos sete dias. Neste teste não

foi observada a presença de plântulas com crescimento anormal da plúmula em relação ao coleóptilo. Fato este que concorda com a hipótese de que mesmo estes materiais apresentando atrasos no desenvolvimento da parte aérea, esses resultados não refletem o comportamento destes híbridos no campo, que apesar do atraso no crescimento, produzem alto estande. Conceição et al. (2012) também não conseguiram diferenciar lotes de sementes de milho por meio do teste de germinação em areia. Segundo Ludwig et al. (2009), a emergência rápida e uniforme das plântulas em campo é de extrema importância para a cultura do milho, justificando o uso de sementes de alta qualidade.

Tabela 24 Porcentagens de plântulas normais avaliadas ao longo de sete dias após a semeadura no teste de germinação em areia

Híbridos	3 dias	5 dias	7 dias
1	16 a	100 a	100 a
2	12 a	96 a	100 a
3	4 b	100 a	100 a
4	16 a	100 a	100 a
CV(%) =	38,50	5,12	2,25

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados deste teste observa-se que é necessário verificar o melhor substrato para o teste de germinação, principalmente para materiais com características de crescimento diferencial.

4.4 Análise histológica para avaliação do pericarpo

Pelos resultados apresentados na tabela 25 existe diferença entre a espessura do pericarpo dos híbridos, e a maior espessura é observada nas sementes do híbrido 1 (Figura 2). O resultado encontrado por José et al. (2005) corrobora com os resultados

encontrados neste experimento, uma vez que trabalhando com híbridos recíprocos de milho, os autores também verificaram diferença entre as estruturas dos pericarpos. Assim como Cardoso (2001), avaliando híbridos de milho doce, detectou alterações no desempenho quando ocorreram mudanças na posição dos genitores maternos e paternos, evidenciando a importância do efeito recíproco para a espessura do pericarpo. Segundo Tracy e Galinat (1987) a espessura e a densidade das paredes das células no pericarpo são variáveis entre genótipos de milho, afetando a qualidade das sementes e o processo de germinação.

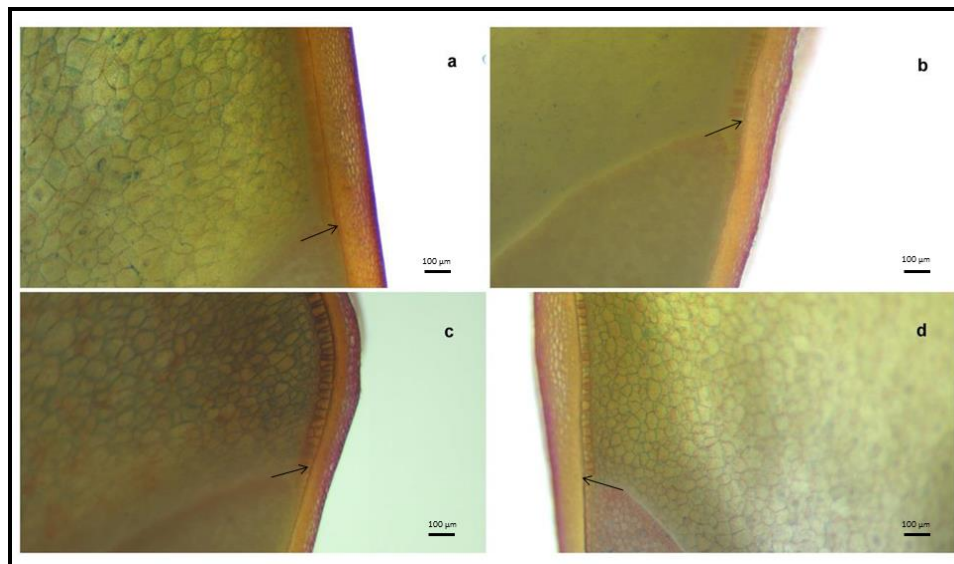
Sabe-se que o pericarpo pode exercer certa resistência à germinação de algumas sementes e conseqüentemente atraso no desenvolvimento de plântulas. Mesmo não existindo relatos sobre este fato para sementes de milho na literatura, esta hipótese foi levantada, pois, os híbridos trabalhados apresentavam comportamento diferencial dos demais materiais de milho comercializados atualmente. Porém, o híbrido que apresentou a maior espessura do pericarpo, não apresentou germinação baixa e também não foi o híbrido que apresentou crescimento lento da parte aérea. Não foi observada diferença na espessura do pericarpo do híbrido 4 que pudesse explicar sua maior susceptibilidade ao crescimento diferencial da plúmula em relação ao coleóptilo. Sendo assim, a hipótese não foi confirmada pelos resultados obtidos no experimento e verificou-se que o pericarpo de milho não exerceu resistência a germinação mesmo nestes materiais.

Tabela 25 Espessura do pericarpo de sementes de híbridos simples de milho e seus recíprocos

Híbrido	Espessura do pericarpo (μm)
1	203,12 a
2	132,79 b
3	138,13 b
4	148,62 b
CV (%) = 10,65	

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Figura 2 Pericarpo de sementes de híbridos simples de milho e seus recíprocos



A) Híbrido 1; B) Híbrido 2; C) Híbrido 3; D) Híbrido 4. Magnitude de 4x.

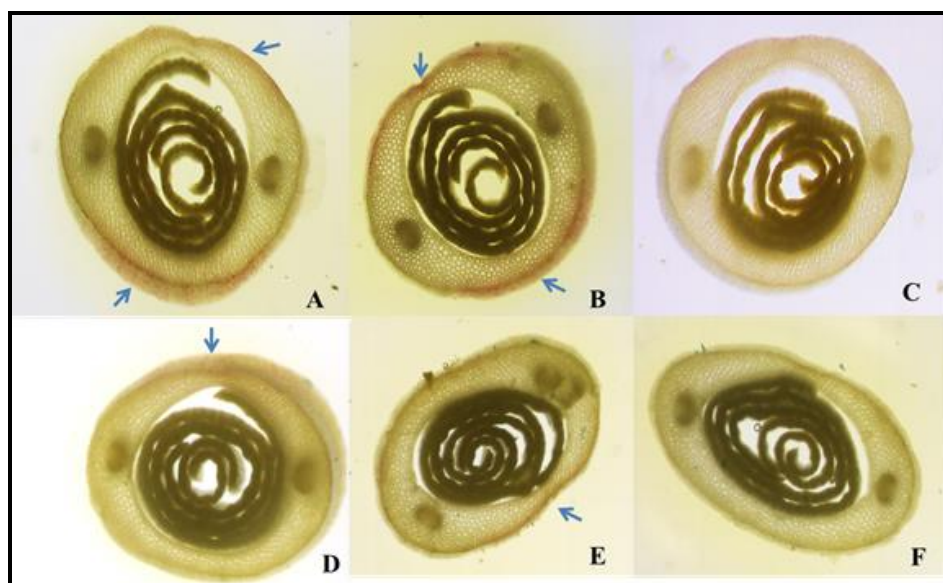
4.5 Análise histoquímica para a avaliação de lignina na parede do coleóptilo

Os testes histoquímicos permitem a visualização da distribuição da lignina no tecido sem promover sua destruição (GURGEL et al., 2011). O corante fluroglucina torna a lignina avermelhada.

No teste histoquímico observa-se que os quatro híbridos apresentaram uma pequena quantidade de lignina na parede celular do coleóptilo (Figura 3). Os pesquisadores Musel et al. (1997) também observaram a presença de lignina na parede celular do coleóptilo de plântulas de milho e relacionaram a presença dela como potencial regulador de crescimento do coleóptilo. Entretanto, Hohl et al. (1995) que também pesquisaram sobre a deposição de lignina na parede celular dos coleóptilos de plântulas de milho, concluíram que o alongamento do coleóptilo não era afetado pela lignificação da parede. Segundo Wilkins (1972) algumas paredes celulares em gramíneas são lignificadas e o conteúdo de tecido

lignificado é variável. Ferreira et al. (2011) também observou presença de lignina nos 10 genótipos de milho estudados em seu trabalho, porém em células da região medular e da região do córtex do colmo.

Figura 3 Teste histoquímico em plântulas de milho para observação da presença de lignina



A) Híbrido 1, com corante; B) Híbrido 4, com corante; C) Híbrido testemunha (1 e 4), sem corante; D) Híbrido 2, com corante; E) Híbrido 3, com corante; F) Híbrido testemunha (2 e 3) sem corante. Magnitude 2x.

No presente trabalho, apesar da constatação da presença de lignina na parede do coleóptilo dos híbridos estudados, não foi possível afirmar que a presença de lignina seja responsável pelo crescimento diferencial da plúmula em relação ao coleóptilo de plântulas de milho, pois ela estava presente em todos os híbridos.

4.6 Enzimas α -amilase e β -amilase

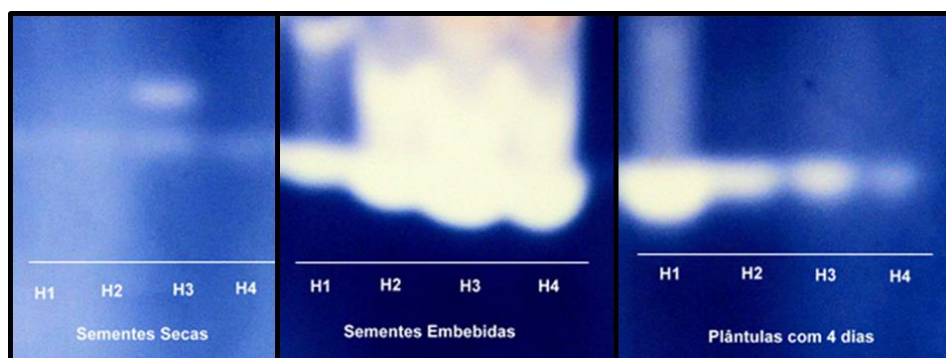
Através de bandas acromáticas em fundo azulado, devido a reação do iodo com o amido, a expressão das enzimas α -amilase e β -amilase podem ser evidenciadas (TIMÓTEO et al., 2010).

Observa-se na figura 4 que em sementes secas a expressão da enzima α -amilase foi pequena para todos os híbridos. No entanto, observa-se grande expressão dessa enzima em sementes embebidas, uma vez que a α -amilase, não está pré-existente em sementes secas e aumenta com o avanço no processo germinativo. Segundo Silva-Neta et al. (2015) a atividade da α -amilase é mais elevada após a protrusão radicular porque aumenta as reservas disponíveis para promover o crescimento das plântulas.

Sementes embebidas do híbrido 1 foram as que apresentaram menor expressão da α -amilase e sementes embebidas dos híbridos 3 e 4 foram as que apresentam a maior expressão desta enzima. Segundo Oliveira et al. (2013), genótipos com maior expressão da enzima α -amilase, tem mais facilidade de disponibilizar carboidratos para o embrião resultando em maior velocidade de germinação e vigor. No entanto, no presente trabalho, o híbrido 4 apesar de ter apresentado a maior atividade da enzima α -amilase foi também o híbrido que apresentou maior porcentagem de plântulas com desenvolvimento lento da parte aérea. Oliveira et al. (2013) observaram expressão diferenciada das enzimas amilases em sementes de linhagens de milho com diferentes níveis de qualidade fisiológica, sendo que a maior expressão destas enzimas não ocorreram necessariamente em sementes da linhagem de melhor qualidade.

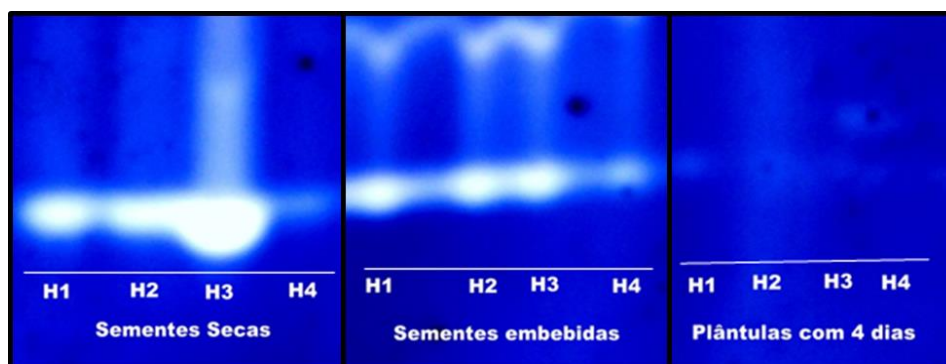
Em plântulas com quatro dias de desenvolvimento a expressão da enzima α -amilase foi menor que em sementes embebidas. Nas plântulas do híbrido 1 ocorreu a maior expressão desta enzima e nas plântulas do híbrido 4 a menor expressão.

Figura 4 Perfis enzimáticos para α -amilase em sementes secas, sementes embebidas e em plântulas com quatro dias de crescimento de híbridos simples de milho e seus recíprocos



A maior expressão da enzima β -amilase ocorreu nas sementes secas (Figura 5) onde esta enzima já estava pré-existente. Segundo Oliveira et al. (2013) esta enzima é sintetizada durante o desenvolvimento das sementes.

Figura 5 Perfis enzimáticos para β -amilase em sementes secas, sementes embebidas e em plântulas com quatro dias de crescimento de híbridos simples de milho e seus recíprocos



Nas sementes secas do híbrido 3 a expressão desta enzima foi maior do que nos demais híbridos. Já nas sementes do híbrido 4, mesmo quando estas estavam secas a expressão desta enzima foi pequena.

Nas sementes embebidas a expressão da β -amilase foi menor que em sementes secas, porém a enzima ainda estava presente. Nas sementes embebidas dos híbridos 1, 2 e 3 a expressão desta foi maior do que no híbrido 4. Resultado que concorda com o obtido por Ferreira et al. (2015), que relata que a expressão de isoenzimas tem polimorfismo diferente dependendo do híbrido. Não se observou expressão da enzima β -amilase em plântulas com quatro dias de desenvolvimento.

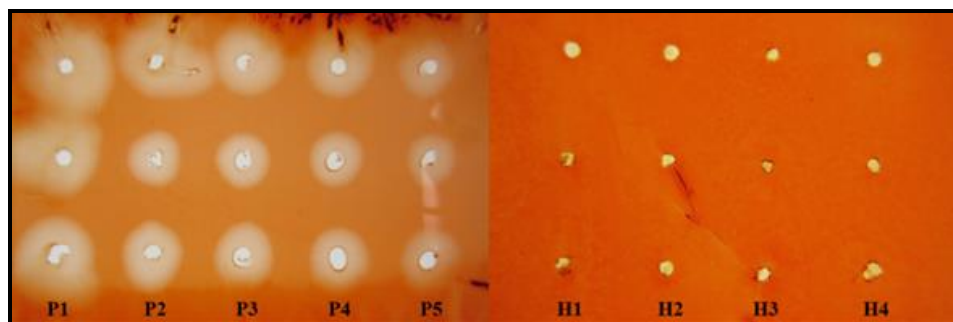
A germinação começa com a embebição e logo em seu início há um aumento crescente na taxa de respiração. Para sustentar a respiração é necessária a produção de energia que na semente é fornecida com base na hidrólise de reservas. A degradação do amido, principal reserva das sementes de milho é resultado da atividade de várias enzimas de hidrólise a exemplo das amilases (BEWLEY; BLACK, 1985). Neste momento observa-se o importante papel da enzima β -amilase que é pré-existente na semente de milho, auxiliando na hidrólise do amido imediatamente após a embebição, até que a α -amilase, enzima considerada a mais importante para a hidrólise do amido seja sintetizada de novo. Segundo Molina-Cano et al. (2001) e Santos et al. (2010) antes da germinação, a β -amilase já esta presente em quantidades maiores nas sementes de milho, quando comparada à α -amilase. Depois de uma diminuição inicial, a quantidade de β -amilase tem aumentos consideráveis no segundo e terceiro dia de germinação. Estes fatos podem ser observados neste trabalho por meio das figuras 4 e 5, onde a β -amilase tem maior expressão em sementes secas e nas primeiras horas de embebição, enquanto a α -amilase tem expressão aumentada em fases mais tardias.

Pela análise dos resultados obtidos neste experimento, não foi possível associar a expressão enzimática destas enzimas com o crescimento diferencial da plúmula em relação ao coleóptilo.

4.7 Enzima endo- β -mananase

Não houve atividade da enzima endo- β -mananase nas sementes de milho dos quatro híbridos trabalhados (Figura 6). Apesar desta enzima, estar envolvida na germinação e desenvolvimento de plântulas de algumas espécies, ela não se expressou em sementes de milho. Este resultado descarta a hipótese de a enzima endo- β -mananase estar relacionada ao crescimento diferencial da parte aérea de alguns materiais de milho.

Figura 6 Perfis enzimáticos para enzima endo- β -mananase de cinco padrões comerciais de *Aspergillus niger* (P1 à P5) e de dois híbridos simples de milho e seus recíprocos (H1 à H4)



5 CONCLUSÕES

Existem diferenças entre genótipos de milho no que se refere ao crescimento inicial da plúmula em relação ao coleóptilo, principalmente na ausência de luz, no teste de germinação. Essas diferenças não são observadas aos sete dias após semeadura.

A disponibilidade hídrica, a temperatura na faixa ideal e o tratamento químico com inseticida Deltametrina não afetam a resposta dos híbridos em relação ao crescimento diferencial da plúmula.

A espessura do pericarpo, a presença de lignina ou diferenças na atividade das enzimas de diferentes genótipos não estão relacionadas às variações de comprimento plúmula/coleóptilo, durante o teste de germinação de sementes de milho.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, E. et al. Immediate and subsequent growth response of maize leaves to changes in water status. **Plant Physiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 631-636, 1971.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 574 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Semente é tecnologia**. 2014. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wpcontent/uploads/2014/04/Mat%C3%A9ria-Semente-%C3%A9-Tecnologia>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

ÁVILA, M. R. et al. Teste de comprimento de plântulas sob estresse hídrico na avaliação do potencial fisiológico das sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 117-124, 2007.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1985. 367 p.

BITTENCOURT, S. R. M. et al. Desempenho de sementes de milho tratadas com inseticidas sistêmicos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 86-93, 2000.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformation. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

BRANCALION, P. H. S. et al. Efeito da luz e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Heliocarpus popayanensis* L. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 2, p. 225-232, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BURTON, R. A.; FINCHER, G. B. Evolution and development of cell walls in cereal grains. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2014.

CARDOSO, E. T. **Genética de caracteres agronômicos e de qualidade em milho doce**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Plantas de Lavoura) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARVALHO, L. F. et al. Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 9-17, 2009.

CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

CHESSON, A. et al. Characterisation of lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls of the maize internode. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 73, n. 1, p. 10-16, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: primeiro levantamento da safra 2015/2016**. Brasília, 2015. 104 p.

CONCEIÇÃO, P. M. et al. Estimativa do vigor de sementes de milho através da avaliação do sistema radicular de plântulas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 600-606, abr. 2012.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 18, n. 1/3, p. 39-50, 2008.

DENG, B. et al. The effects of temperature on the germination behavior of white, yellow, red and purple maize plant seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 37, n. 174, p. 1-11, Aug. 2015.

DEUNER, C. et al. Physiological performance during storage of corn seed treated with insecticides and fungicide. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 204-212, 2014.

DOUSSEAU, S. et al. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 438-443, mar./abr. 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, G. D. G. et al. Caracterização morfo-anatômica do colmo de genótipos de milho. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, n. 230, p. 237-246, 2011.

FERREIRA, T. F. et al. Isoenzyme activity in maize hybrid seeds harvested with different moisture contents and treated. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 139-146, 2015.

FESSEL, S. A. et al. Efeito do tratamento químico sobre a conservação de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 25-28, 2003.

GOMES, M. S. et al. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.

GRZYBOWSKI, C. R. S. et al. Teste de estresse na avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 590-596, 2015.

GUAN, Y. et al. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. **Seed Science Center**, Ames, v. 10, n. 6, p. 427-433, 2009.

GURGEL, M. M. et al. Rachis lignification of *Couroupita guianensis* Aubl. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 18, n. 3, p. 259-265, 2011.

HENNING, F. A. et al. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 727-734, 2010.

HOECKER, N. et al. Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 3, p. 421-429, 2006.

HOHL, M. et al. The cryptic-growth response of maize coleoptiles and its relationship to H₂O₂-dependent cell wall stiffening. **Physiology Plant**, Washington, v. 94, p. 491-498, 1995.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Características físicas do pericarpo de sementes de milho associadas com tolerância à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 125-131, 2005.

JULIATTI, F. C. Avanços no tratamento químico de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 54-55, 2010.

KAPPES, C. et al. Germinação, vigor de sementes e crescimento de plântulas de milho sob condições de déficit hídrico. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 11, n. 2, p. 125-134, 2010.

KARCZ, W.; BURDACH, Z. Effect of temperature on growth, proton extrusion and membrane potencial in maize (*Zea mays* L.) coleoptile segments. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 52, n. 2, p. 141-150, 2007.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.

KURTYKA, R. et al. Temperature dependence of growth in maize seedlings and excised coleoptile segments. **Polish Journal of Environmental Studies**, London, v. 20, n. 5, p. 1221-1225, 2011.

LABORIAL, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 179 p.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-496, 1990.

LI, L. et al. Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 67, n. 4, p. 630-639, 2007.

LIMA, O. R. F. et al. Influência da luz na germinação do milho. **Arte e Ciência**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 1-8, jul. 2010.

LIPCHINSKY, A. et al. Elastic properties of the growth-controlling outer cell walls of maize coleoptile epidermis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, n. 7, p. 2183-2191, 2013.

LISBOA, C. G. S. et al. Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgate* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 2, p. 269-280, 2006.

LÚCIO, A. D. et al. Transformação box-cox em experimentos com pimentão em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 38-42, jan./mar. 2011.

LUDWIG, M. P. et al. Desempenho de sementes e plantas de milho híbrido originadas de lotes de sementes com alta e baixa qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 1, p. 83-92, 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 445 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2015. 660 p.

MERTZ, L. M. et al. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 23-29, 2009.

MOLINA-CANO, J. L. et al. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. *Triumph I*. Genotype by environment interaction of hordein content. **Journal of Cereal Science**, London, v. 34, n. 3, p. 285-294, Nov. 2001.

MORAES, J. V. **Morfologia e germinação de sementes de *Poecilanthe parviflora Benth* (FABACEAE – FABOIDEAE)**. 2007. 88 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MOTERLE, L. M. et al. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de cultivares de milho-pipoca submetidas ao estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 169-176, 2006.

MOZAMBANI, A. E.; BICUDO, S. J. Efeito da temperatura e da luz no desenvolvimento de plântulas de milho. **Nucleus**, Ituverava, v. 6, n. 1, p. 211-222, 2009.

MUSEL, G. et al. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. **Planta**, Berlin, v. 201, n. 2, p. 146-156, June 1997.

NASSIF, S. M. L. et al. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes**. Piracicaba: IPEF, 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

NERLING, D. et al. Genetic diversity for physiological quality of seeds from corn (*Zea mays L.*) intervarietal crossbreeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 449-456, 2013.

OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, jan./fev. 2013.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular Técnica, 75).

PARVEZ, M. N. et al. White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 99, n. 1, p. 39-48, 1997.

SALGADO, F. H. M.; XIMENES, P. A. Germinação de sementes de milho tratadas com inseticidas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2013.

SANTOS, I. J. et al. Expressão da alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 67-73, 2010.

SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELLI, C. Germinação de sementes de milho com diferentes níveis de vigor em resposta à diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 215-226, 2014.

SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potencial and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea Arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.

SILVA-NETA, I. C. et al. Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.

SOPANEN, T.; LAURIÈRE, C. Release and activity of bound β -amylase in a germinating barley grain. **Plant Physiology**, Washington, v. 89, n. 1, p. 244-249, 1989.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TIMÓTEO, T. S. et al. Condicionamento, qualidade de sementes e sincronismo do florescimento em campo de produção de sementes híbridas do milho híbrido GNZ 2004. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 719-726, 2010.

TRACY, W. F.; GALINAT, W. C. Thickness and cell layer number of the pericarp of sweet corn and some of its relatives. **Horticultural Science**, London, v. 22, n. 4, p. 645-647, 1987.

VAZ-DE-MELO, A. et al. Germinação e vigor de sementes de milho-pipoca submetidas ao estresse térmico e hídrico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 687-695, 2012.

VAZQUEZ, G. H. et al. Tratamento químico de sementes de milho e o teste de condutividade elétrica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 773-781, 2014.

WALTER, M. H. Regulation of lignification in defense. In: BOLLER, T.; MEINS, F. (Ed.). **Genes involved in plant defense**. Wien: Springer, 1992. p. 327-352.

WANG, X.; LINO, M. Blue-light-induced shrinking of protoplasts from maize coleoptiles and its relationship to coleoptile growth. **Plant Physiology**, Washington, v. 114, p. 1009-1020, 1997.

WANG, Y. et al. Biochemical characterization of the novel endo- β -mannanase AtMan5-2 from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Shannon, v. 241, p. 151-163, Oct. 2015.

WESTGATE, M. E.; BOYER, J. S. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. **Planta**, Berlin, v. 164, n. 4, p. 540-549, 1985.

WILKINS, R. J. The potential digestibility of cellulose in grasses and its relationship with chemical and anatomical parameters. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 78, p. 457-464, 1972.

YAKAMURA, K. Transformation using $(x + 0,5)$ to stabilize the variance of populations. **Journal Researches on Population Ecology**, New York, v. 42, p. 229-234, 1999.

YAP, S. K. Collection, germination and storage of dipterocarp seeds. **Malaysian Forester**, Selangor, v. 44, n. 2/3, p. 281-300, 1981.

ZUCARELLI, C. et al. Métodos e temperaturas de hidratação na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 684-692, 2011.

ZUCARELLI, C. et al. Potencial fisiológico de sementes de milho hidratadas pelo método do substrato de papel toalha. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 122-129, 2008.