



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NA
QUALIDADE FISIOLÓGICA, EM
CARACTERÍSTICAS MORFO-
AGRONÔMICAS E NOS PADRÕES
ELETROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS E
ISOENZIMAS DE SEMENTES DE MILHO**

ANDERSON SANTOS IMOLESI

1999

[Faint, illegible handwriting]

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

ANDERSON SANTOS IMOLESI

**EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NA QUALIDADE
FISIOLÓGICA, EM CARACTERÍSTICAS MORFO-AGRONÔMICAS E
NOS PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS E
ISOENZIMAS DE SEMENTES DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Imolesi, Anderson Santos

Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho / Anderson Santos Imolesi. -- Lavras : UFLA, 1999.

57 p. : il.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Qualidade fisiológica. 3. Eletroforese. 4. Proteína. 5. Isoenzima. 6. Semente. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1521

ANDERSON SANTOS IMOLES

**EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NA QUALIDADE
FISIOLÓGICA, EM CARACTERÍSTICAS MORFO-AGRONÔMICAS E
NOS PADRÕES ELETRORÉTICOS DE PROTEÍNAS E
ISOENZIMAS DE SEMENTES DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
programa de Pós-graduação em Agronomia,
área de concentração em Fitotecnia, para
obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 16 de dezembro de 1999.

Prof. Renzo Garcia Von Pinho

UFLA

Profa. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira

UFLA

Edila Von Pinho
Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

Vencido mas não derrotado

Faz parte da vida, perder. É o jogo. E olha que a vida é um jogo muito difícil.

Só que perder não significa necessariamente que você aceitou a derrota. Pode ser o contrário, que você está adquirindo os conhecimentos para buscar novamente outras vitórias.

Porque perder não é o pior; pior é não entender que você foi vencido, é não aproveitar todas as lições do aprendizado que isso proporciona.

Muitas vezes a derrota é mais rica em ensinamentos do que a vitória.

Porque ela educa, ela mostra, ela provoca, ela incomoda...

A vitória não, ela embriaga, envaidece, extasia, ilude...

Por isso as lições da derrota são perenes e a euforia das vitórias passageiras.

Quando você consegue enriquecer de verdade com tudo aquilo que os reveses lhe propiciam, sua base de conhecimento para vencer constantemente é sempre maior do que a daqueles que, tendo vencido, perdem tempo precioso nas comemorações. Se a vida lhe reservar alguma derrota, comemore.

Você pode estar recebendo um empurrão daqueles para se transformar num vitorioso de verdade.

E aproveite para se deliciar com a ilusão de quem acabou de vencer, porque a situação não demora, vai se inverter...

Pode acreditar nisso, faz parte da vida, perder.

Agora transformar isso em vitória é só para quem está disposto a ser vencido, mas nunca se sente derrotado...

Celso Machado

Aos meus pais, Fernando e Helena, pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

**Aos meus irmãos Luís, Valéria, Christianne, Fabiana, Fernanda e Iracema,
pelo estímulo, carinho, ajuda e compreensão.**

**Aos meus sobrinhos Helena, Júlio César, Taylorane, Marco Aurélio,
Tayonara, Camila, Caroline, Tayanã, Taysilon e Fabiano.**

Aos meus avós maternos Canuto e Inocência (in memoriam)

Aos meus avós paternos Ferdinando e Iracema

DEDICO

**À minha namorada Oneida em nome do amor, compreensão e companheirismo
de cada dia.**

**Ao amigo Mário Sérgio Trento, cunhados e cunhadas, pela amizade,
ajuda e compreensão.**

Ao casal José Pedro e Neide.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

À orientadora Édila Vilela de Resende Von Pinho pela dedicação, disponibilidade, companheirismo e amizade demonstrados durante o curso.

Aos professores Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira e Renzo Garcia Von Pinho pela, amizade, participação e valiosas contribuições.

Aos professores Renato Guimarães, Maria Laene pela amizade e pelos ensinamentos no decorrer deste curso.

Aos amigos Andreia, Dona Elza, Maria de Lurdes, João Almir, Renato Castro e Parede pelo convívio e amizade.

Aos amigos de curso Lilian, Ullysses, Solange, Ana Lúcia, Jairo, Kalinka, Elisa, Renata, Dinara, Ângelo, Reginaldo e Maximilian e alunos da graduação, pelo companheirismo, amizade e convívio.

Aos funcionários do setor de grandes culturas pela ajuda durante a condução do experimento.

Aos amigos Cristina, Flávia, Rogério, João Luís, Glauber, Hercules, Ceará, Max Wendel, Leonardo, Patrícia, Cláudia, João Candido, Carlota e tantos outros pela amizade e os bons momentos vivenciados no decorrer do curso.

À Associação de Pós-Graduação, por representar-nos enquanto estudantes.

A todos que estiveram presentes de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO 1: Influência da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica das sementes de milho	03
1 RESUMO	03
2 ABSTRACT	04
3 INTRODUÇÃO	05
4 REFERENCIAL TEÓRICO	06
4.1 Influência da adubação na qualidade da semente	06
5 MATERIAL E MÉTODOS	10
5.1 Produção de sementes	10
5.2 Teste de germinação	13
5.3 Testes de vigor	13
5.3.1 Envelhecimento artificial	13
5.3.2 Teste de frio	14
5.3.3 Teste de condutividade elétrica	14
5.3.4 Emergência em canteiro	14
5.3.5 Velocidade de emergência	15
5.4 Procedimento estatístico	15
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
7 CONCLUSÕES	21
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 2: Influência do nitrogênio nos marcadores morfológicos e bioquímicos de sementes de milho	25
1 RESUMO	25
2 ABSTRACT	26

3 INTRODUÇÃO	27
4 REFERENCIAL TEÓRICO	29
4.1 Identificação de cultivares	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 Avaliação das características morfológicas	36
5.1.1 Avaliação no estágio de plântulas	36
5.1.2 Avaliação das plantas no campo	37
5.2 Análise eletroforética	37
5.2.1 Extração de proteínas totais	37
5.2.2 Extração de zeínas e não-zeínas	38
5.2.3 Extração das isoenzimas	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Avaliação no estágio de plântulas	40
6.2 Avaliação no estágio de plantas	41
6.3 Eletroforese de proteínas	45
6.4 Análise de isoenzimas	47
7 CONCLUSÕES	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

IMOLESI, Anderson Santos. Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. Lavras-MG, UFLA, 1999, 57p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*.

Este trabalho teve como objetivo, verificar a influência de diferentes doses de nitrogênio, aplicadas durante o desenvolvimento da cultura do milho, sobre a qualidade fisiológica das sementes e nos marcadores morfo-agronômicos e bioquímicos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. Foram utilizadas sementes de cinco linhagens e de três híbridos, provenientes do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Lavras, UFLA, produzidas sob três doses de nitrogênio, 0, 60 e 120 kg de N/ha. A avaliação da qualidade fisiológica foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA, através do teste de germinação e testes de vigor. As características morfo-agronômicas foram avaliadas em todo o ciclo da cultura, e os marcadores bioquímicos foram avaliados através da eletroforese de proteína total, da fração zeína e da fração não-zeína, e das isoenzimas catalase, esterase e malato desidrogenase. Os resultados permitiram concluir que as cultivares responderam diferentemente, às diferentes doses de nitrogênio, quanto à qualidade fisiológica das sementes. Para algumas cultivares, com o aumento da adubação nitrogenada houve uma redução no vigor das sementes e aumento do número de plântulas anormais. Houve influência do nitrogênio sobre o número de folíolos expostos das plântulas, a data de florescimento das plantas, a altura das plantas e inserção da primeira espiga. O padrão das proteínas totais, da fração zeína e das isoenzimas esterase e malato desidrogenase não foram alterados com o aumento da adubação nitrogenada, indicando ser seguras para a certificação da pureza genética e na identificação de cultivares. Os padrões da isoenzima catalase e da fração não-zeína foram alterados em função da adubação nitrogenada.

*Comitê Orientador: Dra. Edila Vilela de Resende Von Pinho - UFLA (Orientadora), Dr. Renzo Garcia Von Pinho - UFLA e Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira - UFLA.

ABSTRACT

EFFECT OF NITROGEN FERTILIZATION ON THE PHYSIOLOGICAL QUALITY AND MORPHO-AGRONOMIC CHARACTERISTIC AND ELECTROPHORESIS PATTERNS OF PROTEIN AND ISOENZIME OF CORN SEEDS

IMOLESI, Anderson Santos Effect of Nitrogen fertilization on the physiological quality and morpho-agronomic characteristic and electrophoresis patterns of protein and isoenzyme of corn seeds. Lavras -MG, UFLA, 1999, 57p. (Dissertation - Master Program in Crop Science)

This work was designed to verify the influence of different doses of nitrogen applied during the development of corn crop, upon the physiological quality of seeds, the morpho-agronomic characteristic and biochemical markers of proteins and isoenzymes of corn seeds. Seeds of five lines and three hybrids coming from a corn breeding program of the Universidade Federal de Lavras, UFLA, produced under three doses of nitrogen 0, 60 and 120 kg of N/ha were utilized. The evaluation of the physiological quality was proceeded in the Seed Analysis Laboratory at the UFLA through the germination test and vigor test. The morphological characteristic we evaluated in all the cycle of the crop and the biochemical markers ones were evaluated trough the eletrophoresis of total protein, zein fraction and non-zein fraction and of the isoenzymes catalase, esterase and malate dehydrogenase were evaluated. The results enabled to conclude that the cultivars responded differently to the doses of nitrogen as to the physiological quality of seeds. To some cultivars, with increasing nitrogen fertilization there was a reduction in the seed vigor and increased number of abnormal plants. There was influence of nitrogen upon the number of exposed leaflets of the seedlings, the blooming date of the plants , plant height and insertion of the first ear. The pattern of total proteins, of the zein fraction and of the isoenzymes esterase and malate dehydrogenase were not changed with the increase of nitrogen fertilization, indicating to be safe to the certification of genetic purity and for identification of cultivars. The patterns of isoenzyne catalase and of the fraction non-zein were altered in terms of nitrogen fertilization .

Guidance Committee: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho - UFLA (Major Professor), Dr. Renzo Garcia Von Pinho - UFLA and Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira - UFLA.

1- INTRODUÇÃO GERAL

No sistema de produção de sementes de milho, há preocupação por parte das empresas em monitorar todas as fases do processo produtivo, por meio de programas de controle de qualidade. Esses programas consistem em uma série de atividades que buscam assegurar a qualidade das sementes, através de padrões estabelecidos, proporcionando benefícios a todos os segmentos.

A manutenção da pureza genética é prioridade nos sistemas de produção, sendo um fator importante para o sucesso da cultura com reflexos diretos na produtividade, uniformidade das plantas, na resistência à moléstias, precocidade e qualidade final do produto. A certificação da pureza genética é realizada pelas instituições produtoras de sementes dentro dos programas de controle de qualidade, principalmente, através de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas adultas. Porém, a utilização desses marcadores apresenta limitações, como a influência de fatores ambientais e condições de solo, podendo ser de pouca precisão, além de exigir muito tempo para as avaliações. Para superar essas limitações, técnicas eletroforéticas têm sido empregadas, tanto na certificação da pureza genética como na identificação de cultivares de milho.

Eletroforese de proteínas e isoenzimas podem ser utilizadas por proporcionarem maior precisão e rapidez. A identificação de cultivares e a certificação da pureza genética têm sido realizadas com base nos perfis isoenzimáticos dos coleóptilos e de proteínas, como a zeína, extraída de sementes. No entanto, alguns fatores podem interferir nos padrões de proteínas e isoenzimas, a exemplo da presença de microrganismos associados às sementes, nível de deterioração das mesmas e adubação empregada, entre outros.

Sabe-se que o nitrogênio pode interferir no teor de proteína e na qualidade fisiológica das sementes de milho, já a síntese das zeínas parece ser influenciada

✓

pela adubação nitrogenada desenvolvimento (Tsai, Huber e Warren, 1980), o que comprometeria a utilização da zeína como marcador molecular para a identificação de cultivares e certificação da pureza. O nitrogênio pode afetar ainda a qualidade fisiológica das sementes, uma vez que esse nutriente está ligado a produção de proteínas, que são fonte de energia das sementes para o desenvolvimento do embrião. No entanto, os resultados até o momento são poucos e inconsistentes, necessitando assim de mais estudos.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes doses de nitrogênio, aplicadas durante o desenvolvimento da planta de milho sobre os padrões de proteínas totais, zeínas e não-zeínas e isoenzimas de sementes, bem como, nos marcadores morfo-agronômicos em plântulas e plantas adultas de milho, assim como na qualidade fisiológica das sementes.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE MILHO

1- RESUMO

IMOLESI, Anderson Santos. Influência da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica das sementes de milho. Lavras-MG, UFLA, 1999, 57p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

Empresas produtoras de sementes têm monitorado todas as fases do processo produtivo das sementes buscando fornecer ao mercado um produto com alta qualidade. Um dos aspectos que vem recebendo atenção especial por parte das empresas produtoras de sementes é o controle da qualidade fisiológica das sementes. Um dos fatores que parece influenciar a qualidade fisiológica das sementes, é a adubação nitrogenada utilizada durante a produção. No entanto, os trabalhos existentes nessa área são poucos e os resultados inconsistentes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo, verificar o efeito da adubação nitrogenada, aplicada durante a produção das sementes, sobre a qualidade fisiológica das sementes. Sementes de cinco linhagens e de três híbridos, provenientes do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Lavras, UFLA, foram produzidas na área experimental da UFLA, sob três doses de nitrogênio, 0, 60 e 120 kg de N/ha. A avaliação da qualidade fisiológica foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA, através do teste de germinação e testes de envelhecimento acelerado, de frio, condutividade elétrica, emergência em canteiro e velocidade de emergência. Os resultados permitiram concluir que os materiais genéticos respondem diferentemente à diferentes doses de nitrogênio, quanto à qualidade fisiológica das sementes; para alguns materiais, o aumento da adubação nitrogenada propicia uma redução no vigor das sementes e o aumento do número de plântulas anormais.

CHAPTER 1

INFLUENCE OF NITROGEN FERTILIZATION ON THE PHYSIOLOGICAL QUALITY OF CORN SEEDS.

2- ABSTRACT

IMOLESI, Anderson Santos. Influence of nitrogen fertilization on the physiological quality of corn seeds. Lavras MG, UFLA, 1999, 57p. (Dissertation - Master Program in Crop Science)

Seed-producing enterprises have monitored all the phases of the productive process of seeds seeking to furnish to the market a high quality product. One of the aspects which has, been receiving special attention on the part of the seed-producing enterprises is the control of the physiological quality of seeds. One of the factors which seems to influence the physiological quality of seeds is nitrogen fertilization utilized during production. Nevertheless, the works existing in that area are few and the results inconsistent, this work aimed to verify the effect of nitrogen fertilization applied during seed production, on the physiological quality of seeds. Seeds of five lines and of three hybrids coming from the corn breeding program of the Universidade Federal de Lavras, UFLA, were produced in the experimental area at the UFLA, under three doses of nitrogen, 0, 60 and 120 kg of N/ha. The evaluation of the physiological quality was proceeded in the UFLA Seed Analysis Laboratory through the germination test and vigor test. The results allowed to conclude that the genetic material responded differently as to the physiological quality of the seeds. To some material, the increase of nitrogen fertilization provided a reduced vigor of the seeds and an increase of the number of abnormal seedlings

3- INTRODUÇÃO

Com a demanda crescente de sementes de alta qualidade, para o estabelecimento de uma agricultura mais produtiva e sustentável, cresce também o monitoramento de cada fase do processo produtivo de sementes.

A qualidade da semente, caracterizada pelos aspectos genéticos, físicos, sanitários e fisiológicos, é de fundamental importância no processo de produção de qualquer espécie vegetal, influenciando o desenvolvimento da cultura. A qualidade fisiológica das sementes compreende um conjunto de atributos que indicam a capacidade da semente de desempenhar suas funções vitais, sendo caracterizada pelo poder germinativo, vigor e longevidade (Fomasieri Filho, 1992).

Vários são os fatores que afetam a qualidade fisiológica das sementes de milho, dentre eles, merece destaque a interferência de nutrientes aplicados via adubação de plantio ou cobertura. Esse tema vem recebendo atenção cada vez maior na área de tecnologia de sementes. Os resultados obtidos até o momento são poucos e inconsistentes, necessitando de mais estudos relacionados às doses adequadas e a interferência na produção e na qualidade de sementes. A maioria dos trabalhos enfatiza o efeito da adubação sobre a produtividade, não correlacionando com a qualidade das sementes.

O nitrogênio é o nutriente que está intimamente ligado à produção de proteínas, que são fonte de energia das sementes para iniciar o desenvolvimento do embrião. Assim, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito da adubação nitrogenada sobre a qualidade fisiológica das sementes de milho.

4 – REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 - Influência da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica das sementes

A recomendação de fertilizantes para a implantação de culturas destinadas à produção de sementes é geralmente semelhante àquela utilizada para a produção de grãos (Maeda, Lago e Tella, 1986).

As condições de cultivo, a fertilidade do solo e os fertilizantes aplicados têm grande influência sobre a qualidade e quantidade de sementes produzidas (Delouche, 1971), citado por Medeiros (1985). Delouche (1972) citado por Medeiros (1985), menciona que, dentro de certos limites, as plantas têm a capacidade de compensar as deficiências ambientais, reduzindo a quantidade e não a qualidade das sementes. Por outro lado, resultados de pesquisas indicam que sementes de soja, oriundas de plantas desenvolvidas em solo, com uma boa fertilidade, apresentaram germinação e vigor superiores, quando comparadas com aquelas provenientes de plantas cultivadas no cerrado (Maeda e Mascarenhas, 1984). Resultados semelhantes foram obtidos com trigo de inverno e cevada de primavera, em que a qualidade física e fisiológica das sementes (tamanho, peso de 100 grãos e germinação) foram superiores em solos com reservas de nutrientes adequados (Kristan e Skala, 1980). Em soja, Turkiewicz (1976) observou que a ausência de calcário e doses elevadas de fósforo foram prejudiciais à germinação e ao vigor das sementes.

Além do efeito positivo sobre a produção de grãos, o nitrogênio interfere em diversas outras características da planta de milho, relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, às quais, direta ou indiretamente, afetam a produtividade da cultura (MelGar et al., 1991).

Em girassol, Sader (1987) observou a influência da adubação nitrogenada

sobre o vigor das sementes produzidas, avaliados pela primeira contagem da germinação, comprimento da raiz primária e hipocótilo, matéria seca de plântulas e no teste de envelhecimento rápido. Entretanto, os níveis de N não influenciaram a germinação, índice de velocidade de emergência e a emergência no campo. Em arroz, o mesmo autor verificou que a adubação fosfatada aumentou a germinação das sementes no campo e, conseqüentemente, o seu efeito foi aumentado com a aplicação de nitrogênio.

Cícero e Toledo (1979), avaliaram 12 cultivares de milho quanto à qualidade das sementes, por meio de testes de germinação e de vigor (primeira contagem de germinação, teste de frio e envelhecimento rápido), em dois níveis de fertilidade de solo. Os resultados mostraram não haver relação da fertilidade do solo com a germinação e o vigor das sementes.

Ahmadi, Wiebold e Beuerlein (1995), verificaram que o aumento da dose de nitrogênio de 34 para 200 kg de N/ha aumentou a resistência dos grãos de milho a moagem e reduziu a suscetibilidade à quebra de grãos moles e duros, porém não afetou essas características em grãos cerosos. Bauer e Carter (1986), verificaram que, com o retardamento da semeadura, aumento da densidade de plantas e redução do nível de nitrogênio, houve um aumento na susceptibilidade dos grãos de milho ao quebramento.

Alten e Shulte (1941), citados por Cavalcante (1978), trabalharam com a adubação de NPK nas culturas de trigo, centeio e milho, e avaliaram o vigor das sementes provenientes dos ensaios. Concluíram que a presença de fósforo, embora não tenha influenciado o vigor das sementes de trigo e centeio, mostrou efeitos significativos sobre o vigor das sementes de milho. No entanto, através da análise química das sementes, não verificaram relação entre os teores de N, P e K e o vigor. Os mesmos autores enfatizaram que o efeito dos fertilizantes pode acarretar diferenças fisiológicas em sementes, como o aumento do vigor, devido a

ação dos nutrientes sobre algumas enzimas das sementes.

Segundo Rufty Jr.; MacKown e Israel (1990), a redução da absorção do nitrogênio por plantas deficientes em fósforo pode ser consequência de vários fatores associados com a condição de estresse de fósforo. Uma possibilidade seria a redução na disponibilidade de energia (ATP) requerida para a absorção ativa de nitrato através do plasmalema das células radiculares. Outra possibilidade envolveria a regulação da absorção de nitrato.

De acordo com Lee et al. (1992), citado por Alves et al. (1996), a taxa de absorção de nitrogênio é continuamente regulada pelos níveis de nitrogênio na planta, no entanto o mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Além disso, a absorção de nitrogênio pode ser fortemente influenciada por aminoácidos ligados à rota de assimilação do nitrogênio. Após tratamentos que elevam a concentração celular de glutamina e, ou, de asparagina, a absorção líquida de nitrogênio foi suprimida em plantas de milho.

Rufty Jr.; MacKown e Israel (1990), verificaram em fumo e em soja, que a deficiência de fósforo provocou a acumulação substancial de aminoácidos livres na parte aérea e redução na translocação de nitrato das raízes para a parte aérea, além da redução na concentração de ATP em soja. Eles sugeriram que a diminuição da absorção de nitrato em plantas com baixo nível de fósforo pode ser causada pela limitada disponibilidade de ATP. Trabalho realizado por Vieira (1986), mostrou que os teores crescentes de fósforo no solo aumentaram a quantidade de P, Mg e Zn e diminuíram a porcentagem de N na semente.

Medeiros (1985), estudou o efeito da calagem e da adubação NPK na produção e na qualidade de sementes de trigo. As sementes com maiores teores de Ca apresentavam maior germinação e quando o nível de potássio nas sementes aumentou, ocorreu redução no vigor das sementes.

A magnitude das respostas das culturas de milho à aplicação do

nitrogênio, em ensaios conduzidos no Brasil, tem sido bastante variadas (Pereira, 1997). A recomendação da “dose ótima” de nitrogênio depende das condições ambientais, incluindo luz, temperatura, umidade, das características e do manejo do solo, da cultivar, da sequência de culturas, do suprimento de outros nutrientes dentre outros fatores. Os resultados de pesquisas, referentes ao efeito do nitrogênio sobre a qualidade fisiológica das sementes, são inconsistentes, havendo assim, a necessidade da realização de mais pesquisas sobre esse tema.

5- MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Análise de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizados no município de Lavras, na região sul de Minas Gerais, latitude 21° 14' S, Longitude 40° 17' W e 918,80 m de altitude.

5.1- Produção de sementes

Foram instalados, na área experimental da UFLA, três campos para a produção de sementes de três híbridos simples de milho e de suas respectivas linhagens. Cada campo de produção constou de aproximadamente 160 m². Na Tabela 1 encontra-se a descrição das linhagens e dos híbridos utilizados neste trabalho e na Tabela 2 encontram-se as características químicas e físicas dos solos onde foram produzidas as sementes.

Visando à produção de sementes com alta pureza genética, os campos foram instalados em áreas isoladas, ou seja, distantes de outras lavouras de milho em pelo menos 500 m. Foi utilizado a proporção de 3 fileiras do parental feminino, para 2 fileiras do parental masculino.

Para a produção de sementes das linhagens correspondentes aos parentais femininos, as espigas de algumas plantas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas, e os pendões com sacos de papel, antes da abertura das anteras. Quando os estilo-estigmas estavam receptivos e havia disponibilidade de grãos de pólen, foram realizadas as autofecundações. O restante das plantas do parental feminino de cada campo foi utilizado para a obtenção das sementes híbridas. Para a produção das sementes híbridas, o cruzamento entre os parentais foi garantido através do despendoamento do parental feminino.

As linhagens utilizadas neste trabalho são provenientes do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Lavras. Os híbridos utilizados foram as melhores combinações das linhagens utilizadas, de acordo com Gomes (1999).

TABELA 1. Descrição das linhagens e dos híbridos utilizados na pesquisa. Lavras-MG, 1999.

Linhagens	Ciclo	Grão	Porte
UFLA 1 (1)	Normal	Semi-duro	Alto
UFLA 2 (2)	Super-precoce	Semi-duro	Médio
UFLA 4 (3)	Precoce	Semi-duro	Alto
UFLA 5 (4)	Precoce	Duro	Baixo
UFLA 6 (5)	Precoce	Duro	Médio
Híbridos			
5/1*	Precoce	Semi-duro	Alto
1/3*	Normal	Dentado	Alto
4/2*	Super-precoce	Semi-duro	Alto

* O numerador refere-se a linhagem utilizada como parental masculino e o denominador a linhagem utilizada como parental feminino

Em cada campo de produção, as sementes foram produzidas sob diferentes doses de nitrogênio. Para isso, a área destinada para cada campo de produção foi subdividida em três áreas, sendo que, em cada área, foi utilizada, respectivamente, 0, 60 e 120 kg de N/ha, na forma de sulfato de amônio. Todos os campos receberam 80 kg de P₂O₅, na forma de superfosfato simples, e 30 kg de K₂O/ha na semeadura e 30 kg de K₂O/ha em cobertura, na forma de cloreto de potássio, quando as plantas apresentavam 7 folhas definitivas. Os campos conduzidos com 60 kg de N/ha receberam 30 kg de N/ha na semeadura e 30 kg de N/ha em cobertura, quando as plantas apresentavam 7 folhas definitivas. Os conduzidos com 120 kg de N/ha receberam 30 kg de N/ha na semeadura, 45 kg de N/ha quando as plantas apresentavam 4 a 5 folhas definitivas e 45 kg de N/ha quando as plantas apresentavam 8 folhas definitivas.

TABELA 2. Análises químicas e físicas dos solos amostrados à profundidade de 0-20 e 20-40 cm nas áreas onde foram instalados os três campos de produção de sementes. Lavras-MG, 1999.

Nutrientes	Campo 1 ¹		Campo 2 ²		Campo 3 ³		
	0-20 cm	20-40 cm	0-20 cm	20-40 cm	0-20 cm	20-40 cm	
Al (cmolc/dm ³)	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	
Ca (cmolc/dm ³)	3,90	2,00	1,80	1,40	4,00	2,40	
Mg (cmolc/dm ³)	0,20	0,70	1,10	0,90	1,30	1,10	
K (mg/dm ³)	76,00	42,00	50,00	33,00	80,00	36,00	
P (mg/dm ³)	10,00	4,00	3,00	1,00	2,00	1,00	
pH (em água)	6,30	5,20	5,90	5,40	5,80	4,70	
H + Al (cmolc/dm ³)	2,60	4,00	2,30	2,60	2,10	1,90	
S.B. (cmolc/dm ³)	4,30	2,80	3,00	2,40	5,50	3,60	
t (cmolc/dm ³)	4,30	3,00	3,00	2,40	5,50	3,60	
T (cmolc/dm ³)	6,90	6,80	5,30	5,00	7,60	5,50	
m (%)	0,00	6,70	0,00	0,00	0,00	0,00	
V (%)	62,30	41,20	56,60	48,80	72,40	65,40	
Zn (mg/dm ³)	0,90	0,10	0,40	0,20	0,70	0,30	
MO (dag/kg)	2,88	2,10	2,10	1,86	2,60	1,50	
Ca/T (%)	56,50	29,40	34,00	28,00	52,60	43,70	
Mg/T (%)	2,90	10,30	20,80	18,00	17,10	20,00	
K/T (%)	2,80	1,60	2,40	1,70	2,70	1,70	
Ca/Mg	19,50	2,90	1,60	1,60	3,10	2,20	
Ca/K	20,00	18,60	14,00	16,50	19,50	26,00	
Mg/K	1,00	6,50	8,60	10,60	6,30	11,90	
Classe textural							
Argila (%)	56,00	56,00	63,00	65,00	42,00	51,00	
Areia (%)	20,00	16,00	9,00	9,00	36,00	31,00	
Silte (%)	24,00	28,00	28,00	26,00	22,00	18,00	

¹ UFLA 5 e UFLA 2 e híbrido 4/2

² UFLA 6 e UFLA 1 e híbrido 5/1

³ UFLA 1 e UFLA 4 e híbrido 1/3

As sementes foram colhidas, manualmente, com o grau de umidade em torno de 20%, em seguida foram debulhadas, manualmente, e secadas em um secador estacionário regulado à temperatura de 40 °C e com fluxo de ar de 23 m³/min/ton até atingir o grau de umidade de 11%. O grau de umidade das

sementes foi determinado pelo método da estufa $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, utilizando duas repetições para cada tratamento, conforme as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Em seguida, as sementes foram expurgadas, classificadas e tratadas com fungicidas Thiabendazole e Captan nas dosagens de 50 e 300 g/ 100 kg de sementes, respectivamente, e posteriormente procedeu-se a avaliação da qualidade fisiológica através dos testes de germinação, envelhecimento artificial, frio, condutividade elétrica e emergência em campo.

Anteriormente à instalação dos testes, as sementes foram classificadas quanto à largura e espessura, sendo utilizadas aquelas retidas na peneira 20.

5.2- Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com 4 repetições de 50 sementes por tratamento. A semeadura foi realizada em papel toalha na forma de rolo, umedecido com água, na quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram colocadas para germinar em aparelho regulado à temperatura de 30°C . As avaliações foram feitas aos quatro e sete dias após a semeadura, de acordo com as regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

5.3- Testes de Vigor

5.3.1- Envelhecimento Artificial

O teste de vigor, pelo método de envelhecimento artificial, pelo método do gerbox adaptado, descrito por Tao (1980), foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, à temperatura de 42°C , em uma estufa incubadora, durante 96 horas. Após esse período foi realizado o teste de germinação como descrito anteriormente.

5.2.3- Teste de Frio

O teste frio foi conduzido em caixa plástica, utilizando, como substrato, mistura de areia e solo proveniente de área cultivada com milho, na proporção de 2:1 respectivamente. A umidade do substrato foi ajustada para 70% da capacidade de retenção. Foram semeadas 200 sementes em quatro repetições de 50. Após a semeadura, as sementes foram cobertas por uma camada de 3 cm do substrato e as caixas foram colocadas ao acaso em uma câmara resfriada a 10 °C por sete dias (Marcos Filho; Cícero e Silva, 1987). Após esse período, as caixas foram mantidas em câmara de crescimento, à temperatura de 25° C, por sete dias, quando foi avaliado o total de plântulas emersas.

5.2.4- Teste de Condutividade Elétrica

O teste foi conduzido com 4 repetições de 50 sementes, para cada tratamento, sendo estas previamente escolhidas para a remoção das danificadas. As sementes foram pesadas e colocadas em copos plásticos, contendo 75 ml de água deionizada, e mantidas à temperatura de 25 °C por 24 horas. No final desse período, foi determinada a condutividade elétrica através de leituras em condutivímetro Digimed modelo CD 21A. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mhos/cm/g}$ de sementes.

5.2.5- Emergência em Canteiro

O teste de emergência em canteiro foi conduzido, conjuntamente, com o de velocidade de emergência, com contagem única, das plântulas emersas, aos 21 dias após semeadura conforme recomendações de Dias e Barros (1995).

5.2.6- Velocidade de Emergência

A determinação da velocidade de emergência foi feita com a semeadura em canteiros, contendo mistura de areia e terra na proporção de 1:1. Foram utilizadas 4 repetições com parcelas de 50 sementes por tratamento. A semeadura foi realizada, manualmente, em linhas de um metro de comprimento, à profundidade de 3 cm. A velocidade de emergência foi determinada, anotando-se, diariamente, o número de plântulas que apresentavam dois folíolos completamente abertos, a partir da data do início da emergência até a completa estabilização do estande. O índice de velocidade de emergência foi determinado de acordo com Edmond e Drapala (1958).

5.3 - Procedimento estatístico

Os testes de germinação, envelhecimento artificial e o teste frio seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, e os testes de condutividade elétrica, emergência em canteiro, emergência aos 21 dias e índice de velocidade de emergência seguiram o delineamento de blocos casualizados. Em todos os testes, foram utilizadas quatro repetições e foi empregado o esquema fatorial 9 x 3 em que o primeiro fator correspondeu aos materiais genéticos avaliados e o segundo, às doses de nitrogênio, num total de 27 tratamentos.

A comparação das médias foi feita pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do "software" MSTAT.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resumos das análises de variâncias, para os dados obtidos nos testes de germinação, envelhecimento artificial e teste de frio (Tabela 3), revelaram efeito significativo para os fatores materiais genéticos (MG), doses de N e MG versus doses de N, com exceção do fator doses de nitrogênio para o teste de frio.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para os resultados dos testes de germinação (%), envelhecimento artificial (%) e teste de frio. Lavras-MG, 1999.

F.V.	GL	Quadrados médios					
		Germinação	Envelhecimento	Teste de Frio			
Materiais genéticos (MG)	8	562,521	**	384,208	**	65,648	**
Doses N	2	342,333	**	186,333	**	8,120	NS
MG vs N	16	96,771	**	127,177	**	34,745	**
Resíduo	81	9,306		30,414		6,528	
CV (%)		3,46		6,17		2,68	

**,* significativos a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Na Tabela 4, encontram-se os resumos das análises de variância para os dados obtidos nos testes de emergência em canteiro, velocidade de emergência e condutividade elétrica. Foram observadas diferenças significativas para os fatores materiais genéticos e doses de N para todos os testes e para a interação MG e doses de N, quando se utilizou o teste de condutividade elétrica.

TABELA 4. Resumo da análise de variância para os resultados dos testes de emergência em canteiro (%), velocidade de emergência e condutividade elétrica ($\mu\text{mhos/cm/g}$ de semente). Lavras-MG, 1999.

F.V.	GL	Quadrados médios		
		Emergência	Velocidade de emergência	Condutividade elétrica
Materiais genéticos (MG)	8	55,583 **	0,485 **	117,906 **
Doses N	2	61,000 *	0,275 **	58,318 **
MG vs N	16	25,208 NS	0,028 NS	12,832 **
Blocos	3	35,593 NS	0,396 **	0,814 NS
Resíduo	78	16,054	0,035	0,892
CV (%)		4,21	1,11	8,85

**,* significativos a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F, NS não significativo.

Na Tabela 5, estão apresentadas as médias dos dados obtidos nos testes de germinação, envelhecimento acelerado, teste de frio, emergência em canteiro, condutividade elétrica e velocidade de emergência.

As doses de nitrogênio utilizadas durante a produção das sementes não tiveram influência sobre a qualidade fisiológica da linhagem UFLA 4. Nas linhagens UFLA 5 e 6, o teste de condutividade elétrica detectou diferença no vigor em função da dosagem zero de nitrogênio. Em ambas as linhagens, a dosagem zero de nitrogênio foi a que propiciou maior lixiviação de eletrólitos. Provavelmente isso ocorreu porque a adubação nitrogenada interfere no conteúdo de proteína, podendo afetar a qualidade das sementes. As proteínas de reserva são hidrolisadas durante a germinação das sementes, para suprir de nitrogênio, enxofre e esqueletos de carbono o eixo embrionário e a plântula durante as fases iniciais de desenvolvimento (Tsai, Huber e Warren, 1980). Portanto, a redução da quantidade de proteína na semente pode ocasionar níveis de deterioração maiores nas sementes.

Apesar do teste de germinação em laboratório ter detectado diferenças significativas para a maioria dos materiais genéticos analisados, em resposta à

TABELA 5. Resultados médios da porcentagem de germinação (Germ.), envelhecimento artificial (Env.), Teste de frio (T. frio), condutividade elétrica (Cond.), emergência em canteiro (Emerg.) e velocidade de emergência (V.E.), de sementes provenientes de campos que receberam diferentes dosagens de adubação nitrogenada em solo. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Materiais genéticos	Doses N (kg/ha)	Germ. (%)	Env. (%)	T. frio (%)	Cond. ($\mu\text{mhoms/cm/g}$)	Emerg. (%)	V.E. (dias)
UFLA 5	0	97 A	95 A	96 A	20.11 A	98	16.80
	60	98 A	100 A	98 A	18.12 B	98	16.77
	120	95 A	97 A	98 A	14.87 C	98	16.78
4/2	0	95 A	92 A	97 A	11.40 A	97	16.86
	60	89 B	81 B	96 A	8.65 B	97	16.74
	120	89 B	84 B	90 B	10.39 A	95	16.74
UFLA 2	0	79 B	83 B	90 B	10.62 A	96	17.28
	60	91 A	88 AB	90 B	9.55 A	98	17.22
	120	82 B	92 A	97 A	9.17 A	100	17.28
UFLA 6	0	97 A	100 A	97 A	8.40 A	97	16.83
	60	96 A	95 A	97 A	6.42 B	94	16.82
	120	94 A	94 A	97 A	6.60 B	94	16.73
5/1	0	96 A	99 A	100 A	14.31 A	98	16.79
	60	88 B	91 B	89 B	8.47 B	88	16.61
	120	86 B	88 B	97 A	9.38 B	94	16.54
UFLA 1a*	0	95 A	91 A	97 A	17.26 A	97	17.05
	60	82 B	77 B	97 A	10.15 B	90	16.89
	120	75 C	80 B	96 A	11.36 B	96	16.72
UFLA 4	0	87 AB	95 A	95 A	9.11 A	94	17.33
	60	90 A	94 A	96 A	8.42 A	96	17.15
	120	84 B	91 A	96 A	8.82 A	95	16.95
1/3	0	97 A	98 A	99 A	7.76 A	95	16.78
	60	84 B	97 A	98 A	8.25 A	96	16.60
	120	94 A	95 A	97 A	8.06 A	98	16.76
UFLA 1b**	0	80 A	77 A	92 A	10.11 B	92	17.06
	60	75 B	75 A	94 A	13.32 A	87	16.94
	120	68 C	71 A	87 B	9.01 B	94	16.74

Médias seguidas da mesma letra na coluna, e para cada material genético, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

*Parental feminino do híbrido; **Parental masculino do híbrido.

dose de nitrogênio, e essa resposta ter sido diferenciada em função dos materiais genéticos utilizados, vale ressaltar que os testes de emergência e velocidade de emergência não detectaram esse mesmo comportamento. Provavelmente isto ocorreu porque as condições edafo-climáticas, durante a condução do teste de emergência, foram favoráveis à germinação das sementes.

Ainda quanto à germinação das sementes, não houve diferença para as linhagens UFLA 5 e 6. No entanto, para a linhagem UFLA 1 e híbridos 5/1 e 4/2, sementes produzidas com doses mais altas de nitrogênio, apresentaram menor germinação. Durante a avaliação do teste de germinação foi observado que, parte das plântulas provenientes de sementes produzidas sob doses mais altas de nitrogênio, apresentou a plúmula curta, não atingindo a metade da altura do coleoptilo. As avaliações do teste foram feitas seguindo as recomendações nas Regras de Análises de Sementes, em que plântulas com essas características são consideradas anormais (Brasil, 1992). Esses resultados também foram observados no teste de envelhecimento artificial para as sementes desses materiais. Nesse teste, a avaliação das plântulas também foi feita seguindo os critérios recomendados nas Regras para Análises de Sementes.

No teste de frio, foram consideradas normais as plântulas que apresentavam dois folíolos completamente abertos. Os resultados obtidos nesse teste apresentaram uma tendência dos resultados obtidos no teste de envelhecimento artificial. Ao que tudo indica, o maior desenvolvimento do coleoptilo pode afetar a exposição dos primeiros folíolos nas condições de teste de frio.

Comparando os genótipos avaliados nessa pesquisa, a linhagem UFLA 2 foi a que apresentou resposta positiva quanto à qualidade fisiológica das sementes, quando estas foram produzidas com altas doses de nitrogênio. Sementes desse genótipo, produzidas na ausência de nitrogênio, apresentaram menor germinação e menor vigor avaliado pelo teste de envelhecimento artificial e frio.

Isso indica que a influência do nitrogênio sobre a qualidade fisiológica das sementes, varia com a cultivar estudada.

Alguns autores procuram explicar os resultados de influência de nutrientes nos parâmetros agronômicos através da relação de absorção destes com outros macros e micronutrientes. Sabe-se que altos níveis de nitrogênio podem comprometer a absorção do fósforo pela planta (Mamaril e Muller, 1970). Em plantas deficientes em fósforo, a disponibilidade de energia na forma de ATP pode ser menor, com isso, a absorção ativa de nitrato pode ser afetada (Rufty Jr.; MacKown e Israel, 1990). Durante a fase inicial de desenvolvimento, a plântula utiliza, como fonte de fósforo, para a fosforilação da glicose, o fitato, porque ela ainda não absorve o fósforo do solo e a fonte de fósforo encontrada na semente é aquela absorvida pela planta durante a formação das sementes. Provavelmente isso não ocorreu porque a quantidade de fósforo utilizado no plantio e a quantidade do mesmo presente no solo (Tabela 2), foram suficientes para o desenvolvimento normal das plantas.

7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

Os materiais genéticos respondem diferentemente a diferentes doses de nitrogênio, quanto a qualidade fisiológica das sementes;

Para alguns materiais, o aumento da adubação nitrogenada propicia uma redução no vigor das sementes e aumento do número de plântulas anormais.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, M.; WIEBOLD, W.J.; BEUERLEIN, J.E. Physical characteristics of corn kernels as influenced by nitrogen fertilization. *Communications in Soil Science Plant Analysis*, New York, v 1 e 2. n. 26, p. 145-153, 1995.
- ALVES, V.M.C.; NOVAIS, R.F. de; OLIVEIRA, M.F.G.; BARROS, N.F. de. Efeito da omissão de fósforo na absorção de nitrogênio por híbridos de milho (*Zea mays* L.) *Revista Ceres*, Viçosa, v. 43, n. 248, p. 435-443, jun/ago, 1996.
- BAUER, P.J.; CARTER, P.R. Effect of seeding date, plant density, moisture availability, and soil nitrogen fertility on maize dermel breakage susceptibility. *Crop Science*, Madison, v. 26, n.6, p. 1220-1226, Nov/Dec, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CAVALCANTE, J.I.V. *Influência do nitrogênio, fósforo, potássio e zinco na germinação e vigor de sementes de arroz (Oryza sativa L.)*. Lavras: ESAL, 1978, 51p.(Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- CÍCERO, S.M.; TOLEDO, F. de T. Efeitos da fertilidade do solo sobre a produção a germinação e o vigor das sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 2, n. 1, p. 13-23, 1979.
- DIAS, M.C.L. de L.; BARROS, A.S. do R. *Avaliação da qualidade de sementes de milho*. Londrina: IAPAR, 1995. 41p. (Circular 88).
- EDMOND, J.B.; DRAPALA, W.S. The effects of temperature, sand and acerone on germination of okra seed. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, New York, v. 71, p. 428-434, June, 1958.
- FORNASIERI FILHO, D. *A cultura do milho*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.
- GOMES, M. de S. *Heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho*. Lavras: UFLA, 1999. 78p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia)

KRISTAN, F.; SKALA, J. The effect of side and nitrogen application rate of the seed quality of winter wheat and spring barley. *Rostlinna Vyroba*, [S.l.], v. 7, n.26, p. 703-713, Jan, 1980.

MAEDA, J.A.; MASCARENHAS, H.A.A. Qualidade da semente de soja produzida em solo de cerrado virgem, cerrado recuperado. *Revista Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 11, p. 1359-1364, nov,1984.

X MAEDA, J.A.; LAGO, A.A.; TELLA, R. de. Efeito de calagem e adubação com NPK na qualidade de sementes de amendoim. *Revista Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 9, p. 941-944, set, 1986.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. Avaliação da qualidade de sementes. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARMARIL, C.P.; MILLER, M.H. Effects of ammonium on the uptake of phosphorus, sulfur, and rubidium by corn. *Agronomy Journal*. Madison, v. 62, n. 6, p. 753-758, Nov/Dec, 1970

X MEDEIROS, A.C. de S. Efeitos de doses de calcário e da adubação NPK sobre a produção e a qualidade física e fisiológica de sementes de trigo (*triticum aestivum* L.) no Distrito Federal. Piracicaba: ESALQ, 1985. 158p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

X MELGAR, R.J.; SIMITH, T.J.; CRAVO, M.S.; SÁNCHEZ, P.A. Rates and dates of nitrogen fertilizer application for maize on a latossol in the central Amazonia region. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 15, n. 3, p. 289-296, set/dez, 1991.

PEREIRA, S. L. Efeito da adubação nitrogenada e molibdica sobre a produtividade, teor de nitrogênio, atividade da redutase nitrato e outras características da cultura do milho. Viçosa: UFV, 1997, 89p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).

RUFTY Jr., T.W.; MACKOWN, C.T.; ISRAEL, D.W. Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. *Plant Physiology*, Maryland, v. 94, n. 1, p. 328-333, Nov. 1990.

SADER, R. Efeitos da adubação nitrogenada na qualidade de sementes de girassol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES V. Resumos dos trabalhos técnicos. Brasília DF: ABRATES, 1987. p. 002.

- TAO, K.L.J. Vigor "referee" Test for soybean and corn. *The Newsletter of the Association of Official Seed Analyts, Mississippi*, v. 54, n. 1, p. 40-58, Apr, 1980.
- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M.; WARREN, H.L. A proposed rele of zein and glutelin as N sinks in maize. *Plant Phisiology, Maryland*, v. 66, n. 2, p. 330-333. Apr. 1980.
- TURKIEWICZ, L. Efeito da calagem e adubação fosfatada sobre a germinação e o vigor de sementes de soja (*Glycine max* L.), Piracicaba: ESALQ, 1976. 82p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- VIEIRA, R.F. Influência de teores de fósforo no solo sobre a composição química, qualidade fisiológica e desempenho no campo de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres, Viçosa*, v. 33, n. 186, p. 173-188, mar/abr, 1986.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA EM CARACTERÍSTICAS MORFO-AGRONÔMICAS E NOS PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS E ISOENZIMAS DE SEMENTES DE MILHO

1- RESUMO

IMOLESI, Anderson Santos. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. Lavras-MG, UFLA, 1999, 57p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

Este trabalho teve por objetivo verificar a influência de diferentes doses de nitrogênio, utilizadas em adubação no solo, sobre os marcadores morfológicos de plântulas, plantas adultas de milho e bioquímicos (eletroforese de proteínas e isoenzimas) de sementes de milho. Foram utilizadas sementes de cinco linhagens e de três híbridos, provenientes do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Lavras, UFLA, produzidas sob três doses de nitrogênio, 0, 60 e 120 kg de N/ha. A avaliação dos marcadores morfo-agronômicos foi feita no estágio de plântulas e plantas. Foram avaliados os padrões eletroforéticos das proteínas totais, da fração zeína, da fração não-zeína, bem como das isoenzimas catalase, esterase e malato desidrogenase. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da adubação nitrogenada afetou o número de folíolos expostos das plântulas, a data de florescimento e a altura das plantas e da inserção da primeira espiga; as diferentes doses de nitrogênio aplicadas durante a produção das sementes não afetou a cor de folha, presença de antocianina, pilosidade, cor de anteras e glumas e cor do estilo-estigma; Os padrões das proteínas totais, da fração zeína e das isoenzimas esterase e malato desidrogenase, não são alterados pelas diferentes doses de nitrogênio, indicando ser seguros para a avaliação da pureza genética; e os padrões da isoenzima catalase e da fração não-zeína são alterados em função da dose de nitrogênio utilizada.

CHAPTER 2

EFFECT OF NITROGEN FERTILIZATION UPON MORPHO- AGRONOMIC CHARACTERISTIC AND ELECTROPHORESIS PATTERNS OF PROTEIN AND ISOENZYME OF CORN SEEDS.

2- ABSTRACT

IMOLESI, Anderson Santos. Effect of nitrogen fertilization upon morpho-agronomic characteristic and electrophoresis patterns of protein and isoenzyme of corn seeds. Lavras MG, UFLA, 1999, 57p. (Dissertation – Master Program in Crop Science).

This work aims to verify the influence of different doses of nitrogen, applied utilized in soil fertilization, upon the morpho-agronomic characteristic of the corn seedlings and adult plants and biochemical markers (protein electrophoresis and isoenzymes), of corn seeds. Seeds of five lines and of three hybrids coming from the corn breeding program of the Universidade Federal of Lavras, UFLA, produced under three doses of nitrogen, 0, 60 and 120 kg of N/ha. The evaluation of the morpho-agronomic markers was performed at the seedling and plant stage. The electrophoresis patterns of total proteins in of the zein fraction and non-zein fraction and the electrophoresis patterns of the isoenzyme catalase, esterase and malate dehydrogenase. The results obtained showed that the different doses of nitrogen utilized in seed production affected the number of exposed leaflets of the seedlings, blossoming date of the plants, plant height and insertion of the first ear. The pattern of total proteins, zein fraction and of the isoenzymes esterase, malate dehydrogenase were not altered with increased nitrogen fertilization, indicating them to be safe for the certification of genetic purity and identification of cultivars. The patterns of isoenzyme catalase and non-zein fraction were altered in terms of nitrogen fertilization.

3- INTRODUÇÃO

No sistema de produção de sementes, existe uma preocupação por parte das empresas em manter as características que conferem a qualidade ao produto final, como por exemplo, a pureza genética (Silva, 1997). Para a manutenção da pureza genética são adotadas medidas rigorosas no sistema de produção das sementes. Para a cultura do milho são adotados principalmente o isolamento dos campos de produção, o despendoamento do parental feminino e a limpeza das máquinas e equipamentos utilizados em todo processo produtivo.

As empresas responsáveis pela produção de sementes híbridas de milho utilizam, para a certificação da pureza genética, as características morfoagronômicas avaliadas em plântulas e plantas adultas, que são consideradas como marcadores para a aferição da pureza genética. No entanto, a utilização de marcadores bioquímicos tem ganhado espaço nos programas de controle de qualidade das empresas produtoras de sementes, principalmente no que se refere à certificação e identificação de cultivares. Dentre as técnicas utilizadas, uma das mais empregadas é a eletroforese de proteínas e isoenzimas.

A eletroforese de proteínas e isoenzimas possuem a vantagem de gerar resultados mais rápidos que os marcadores morfológicos. A desvantagem de ambos é que eles podem ser influenciados por fatores ambientais e condições de solo. Há relatos na literatura sobre a influencia do nitrogênio no teor de proteína, na qualidade fisiológica das sementes, e na morfologia de plantas, o que, se confirmado, inviabilizaria o uso dos marcadores morfológicos e bioquímicos, para aferição da pureza genética (Ferreira, 1997; Caramet et al. 1990; Landry e Delhay, 1993)

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes doses de nitrogênio, aplicadas em adubações no solo, durante o desenvolvimento da cultura do milho, sobre as características morfoagronômicas em plântulas e plantas de milho e em padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho.

4- REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 - Identificação de Cultivares

A certificação da pureza genética e a identificação de cultivares, segundo Korányi (1989), têm grande importância na produção de sementes híbridas de milho e na manutenção de linhagens, exigindo, portanto, grande precisão na sua avaliação. Além desses aspectos, no Brasil, através da lei nº 9.456, de 28 de abril de 1997, foi instituída a lei de proteção de cultivares, que reconhece a propriedade intelectual, além de vários direitos do titular do material genético protegido. Sem a adoção de uma metodologia segura para a identificação dessas cultivares, corre-se o risco de que o produto, oriundo de anos de melhoramento genético, seja usufruído por terceiros sem que a instituição criadora tenha controle sobre esse material (Grattapaglia e Ferreira, 1996).

A identificação de cultivares nos países que adotam o sistema da ISTA-International Seed Testing Association, é feita por meio de características morfológicas, fisiológicas, citológicas e químicas (ISTA, 1996).

No Canadá, é utilizada uma combinação de testes conduzidos em laboratório e em campo. Os métodos de laboratório são baseados nas características morfológicas das sementes, como a cor, tamanho, forma, peso de 1.000 sementes, cor das sementes na presença de determinados produtos químicos e características das plântulas. Nos testes de campo, são utilizadas características das plantas, como intensidade de cor das folhas e flores, pilosidade de algumas partes das plantas, dentre outras (Pauksens, 1978; Pauksens e Dhesi, 1978; Von Pinho, 1995).

Grande parte dos melhoristas e dos profissionais das empresas produtoras de sementes e de órgãos de certificação tem efetuado a identificação de cultivares

e a certificação da pureza genética, usando características morfológicas expressadas pela semente, plântula e/ou planta (Von Pinho, 1995; McDonald Jr, 1991). Porém, McDonald Jr.(1991), enfatiza que as observações de sementes e testes conduzidos em campo são frequentemente imprecisos, devido às variações ambientais e/ou condições de estresses sofridos pela planta durante o desenvolvimento da semente. Von Pinho (1995), relata que é possível separar, através de características morfológicas, plantas do parental fêmea autofecundado, daquelas provenientes de sementes híbridas de milho e que a fase mais adequada para a avaliação da pureza genética varia com a cultivar.

Técnicas para a identificação de cultivares, segundo McDonald Jr. (1991), são necessárias e devem ser desenvolvidas. Utilizam-se eletroforeses de proteínas e isoenzimas para a certificação de cultivares de milho, apresentando vantagens significativas sobre os marcadores morfológicos, como maior rapidez. Porém, a técnica de eletroforese apresenta desvantagens como: alto custo inicial de equipamentos e produtos químicos, e a necessidade de treinamento especial para o analista (Payne, 1987; Smith e Wych, 1986). No entanto, Bonetti et al. (1995), enfatizam a necessidade da combinação das análises eletroforéticas de proteínas e isoenzimas com as características morfoagronômicas avaliadas em sementes e plântulas para uma maior precisão na certificação e identificação de cultivares.

Observação dos perfis isoenzimáticos dos coleótilos e de proteínas extraídas de sementes, como zeína, têm sido utilizadas com mais frequência para a certificação da pureza genética e identificação de cultivares.

Aproximadamente 10% do peso seco das sementes de milho consistem de proteínas. A maior parte dessas proteínas está localizada no endosperma, e divide-se em duas classes: as zeínas, que são proteínas de reserva, e não possuem atividade enzimática e as não zeínas, que incluem as albuminas, globulinas e

glutelinas, que possuem atividade enzimática e são nutricionalmente mais balanceadas que as zeínas (Wallace et al., 1990). As não zeínas estão envolvidas em processos biológicos necessários ao desenvolvimento da semente e são proteínas de membranas, enzimas, etc. (Habben, Kirleis e Larkins, 1993). As zeínas pertencem ao grupo das prolaminas e são caracterizadas pelo seu teor reduzido de lisina e triptofano (Guimarães, 1994).

As quatro frações protéicas, albuminas, globulinas, zeínas e glutelinas constituem aproximadamente 3%, 3%, 60%, e 34% , respectivamente, do total das proteínas do endosperma de sementes de milho, originadas de plantas que se desenvolvem sob níveis altos de fertilizante nitrogenado (Shneider, Earley e Deturk, 1952; Tsai, 1979).

As proteínas de reserva são hidrolisadas durante a germinação das sementes, para suprir de nitrogênio, enxofre e esqueletos de carbono o eixo embrionário e a plântula durante as fases iniciais de desenvolvimento, enquanto as proteínas restantes, albuminas, globulinas e glutelinas são responsáveis por funções de manutenção e outras funções específicas, necessárias à formação do endosperma (Tsai, Huber e Warren, 1980).

Esen (1987) cita que as zeínas se dividem em quatro frações distintas (α , β , γ e δ -zeínas), em função de diferença de solubilidade e outros critérios. A α -zeína, maior classe dentro das proteínas de reserva, é um grupo complexo de polipeptídeos de tamanho entre 19 e 22 kD. As β -zeínas são menores, pesando 14 kD; as δ -zeínas possuem 10 kD e as γ -zeínas 16 e 27 kD. As α -zeínas são solúveis em soluções alcoólicas, as β -zeínas e as δ -zeínas são solúveis em soluções alcólicas, contendo agentes redutores, e as γ -zeínas são solúveis em solventes aquosos e alcóolicos em condições redutoras (Wallace et al., 1990).

Durante o desenvolvimento das sementes de milho, ocorre o acúmulo de

proteínas de reserva (zeínas), iniciando, por volta dos quinze dias após a polinização, não ocorrendo mudança no seu padrão com o desenvolvimento e maturação da planta (Brink et al., 1989). Essas proteínas vêm sendo utilizadas como marcadores na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, por sofrerem pouca influência dos fatores ambientais, devido ao fato da presença de zeínas estar mais relacionada com as informações genéticas contidas nas células das plantas (Righeti e Bossio, 1981).

Segundo Silva (1997), a eletroforese de zeína é uma técnica segura na certificação da pureza genética e identificação de cultivares, pois seu padrão não sofre a influência de microrganismos associados às sementes.

Utilizando a técnica de focalização isoeletrica de zeína para a determinação da pureza de cultivares comerciais de milho, Brink et al. (1989) concluíram que as zeínas são mais eficientes que as isoenzimas na certificação da pureza genética. Os autores relataram, ainda, que a focalização isoeletrica da zeína serve de auxílio na certificação da pureza genética de cultivares, quando há dificuldades de interpretação dos resultados por meio dos perfis eletroforéticos de isoenzimas.

Trabalho realizado por Wilson (1985), utilizando IEF, com proteínas de reserva, permitiu a identificação de 25 linhagens de milho, utilizando 7 a 12 bandas de um total de 25 avaliadas. Entretanto, nesse mesmo trabalho não foi possível distinguir as linhagens aparentadas.

As zeínas podem ser separadas em classes de diferentes tamanhos através de eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A utilização da técnica de IEF (focalização isoeletrica), é mais adequada á sua separação, devido a melhor definição das bandas (Wilson, 1984).

Guimarães (1994), caracterizou populações de milho que apresentavam grãos opacos através da técnica SDS-PAGE; e verificou que o nível de não-zeínas

no endosperma apresentou uma correlação alta com a qualidade protéica. O autor concluiu que esse método pode ser utilizado em programas de melhoramento, como auxiliar na seleção de cultivares de milho com alta qualidade protéica.

Sabe-se que, dentre outros fatores, a adubação nitrogenada pode interferir nos resultados dos padrões de proteínas e isoenzimas, isto porque esses padrões são produtos da expressão gênica e podem sofrer influência de fatores ambientais.

A adubação é um dos fatores que mais contribui para o aumento da produtividade do milho, cuja maior exigência refere-se ao potássio e nitrogênio, seguindo-se o magnésio, cálcio, fósforo e enxofre. Nos grãos, a ordem de remoção desses nutrientes é bastante variada. O fósforo é quase todo translocado para as sementes (80%), seguindo-se pelo nitrogênio (68%), enxofre (58%), magnésio (26%), potássio (20%) e cálcio (4%) (EMBRAPA, 1993). O nitrogênio participa no metabolismo das plantas, como constituinte de moléculas de proteínas, coenzimas, ácidos nucléicos, citocromos, moléculas de clorofila, sendo considerado um dos elementos mais importantes para o aumento da produção (Ferreira, 1997; Fomasieri Filho, 1992).

Landry e Delhaye (1993), Ferreira (1997), relatam que a adubação nitrogenada influencia a qualidade dos grãos de milho, interferindo no conteúdo de proteína. Quando há um excessivo fornecimento de nitrogênio, a planta aumenta a síntese de proteínas e a formação de novos tecidos, usando a maior parte dos carboidratos na elaboração de proteínas e aminoácidos (Fomasieri Filho, 1992). A sua deficiência causa sérios distúrbios nas plantas de milho, culminando com a formação de espigas de tamanho reduzido, grãos mal formados e redução no teor de aminoácidos e proteínas (Ferreira, 1997).

Silva et al. (1993), pesquisando a influência de diferentes níveis de nitrogênio, em adubação de solo, sobre o teor de proteína dos grãos de milho, verificaram que o nitrogênio elevou significativamente o teor de proteína dos

grãos quando aplicados na dose de 120 kg/ha. Com o aumento da adubação nitrogenada, o valor biológico dos grãos foi reduzido, devido ao aumento dos teores da fração protéica zeína que é deficiente em aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano, (Fomasieri Filho, 1992)

Doehlert, Duke e Smith (1997), trabalhando com sementes de milho em meio de cultura contendo sacarose e aldose e variando a dose de N de 0; 3,6; 7,1; 14,3 e 36,5 nM, fornecidos como aminoácidos, observaram que o fornecimento do N acima de 14,3 nM aumentou três vezes a quantidade total de proteína armazenada, sete vezes a quantidade da α zeína e não afetou a quantidade da β -zeína.

O nitrogênio também pode influenciar nos padrões isoenzimáticos, Singletary et al. (1990), mostraram modificações induzidas pelo N na atividade das enzimas sacarose sintetase, aldolase, fosfoglucomutase, piruvato transaminase, glutamato oxalacetato transaminase, as quais apresentaram elevadas correlações com as modificações no amido total e com o conteúdo da α -zeína, durante o desenvolvimento das sementes. As separações das zeínas indicaram que esses peptídeos foram proporcionalmente aumentados pelo fornecimento de N, com a exceção da β -zeína, que foi relativamente estável.

Balconi et al., (1992), estudando o efeito do N no desenvolvimento do endosperma de milho, verificaram que a síntese de zeína é regulada pelos níveis de N fornecidos, principalmente o aminoácido asparagina, nos estágios iniciais de desenvolvimento do endosperma. Através da análise de focalização isoelétrica, Tsai et al. (1992) observaram aumento no nível de zeína, principalmente em decorrência do aumento quantitativo de polipeptídeos alfa e gama-zeína em resposta à adubação nitrogenada.

Diante disso, torna-se essencial pesquisar as possíveis interferências que podem sofrer as técnicas, como eletroforese de isoenzimas e proteínas e marcadores morfoagronômicos, uma vez que são produtos de expressão gênica e

têm limitações na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, não bastando, portanto, importar tecnologia e, sim, trabalhar suas reais potencialidades dentro da realidade de nosso país.

30/11/11

5 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Biotecnologia e de Análise de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizados no município de Lavras, na região sul de Minas Gerais, latitude 21° 14' S, Longitude 40° 17' W e 918,80 m de altitude.

A produção de sementes, os materiais utilizados e as áreas onde foram implantados os campos de produção de sementes foram descritos no capítulo 1, nas páginas de 10 a 15.

5.1- Avaliação das características morfoagronômicas

5.1.1- Avaliação no estágio de plântulas

As sementes híbridas das três cultivares de milho e das respectivas linhagens, produzidas sob três doses de nitrogênio (0, 60 e 120 kg de N/ha), foram semeadas em caixas plásticas contendo areia e solo na mesma proporção. Foram utilizadas 50 sementes por caixa com quatro repetições para cada tratamento e, em seguida, estas foram colocadas para germinar na presença e na ausência de luz. A avaliação foi realizada quando os dois primeiros folíolos se encontravam totalmente desenvolvidos.

As características observadas neste estágio foram: as cores da bainha da primeira folha, do coleoptilo e da nervura central da primeira folha. Todas relacionadas à presença e à intensidade de antocianina; foram avaliados, ainda, o número e a forma dos folíolos.

5.1.2- Avaliação das plantas no campo

Para a avaliação das plantas híbridas e das linhagens provenientes das sementes produzidas sob diferentes doses de nitrogênio, foi instalado um experimento sob o delineamento de blocos ao acaso com duas repetições, em esquema fatorial 9 x 3, em que o primeiro fator correspondeu aos materiais genéticos avaliados e o segundo às doses de nitrogênio, cada parcela foi constituída por duas linhas de 10 m de comprimento, para cada tratamento. A densidade foi de 5 plantas/metro, totalizando 100 plantas por parcela.

No florescimento, avaliaram-se a altura das plantas, as cores das anteras, dos estilo-estigmas e das glumas das flores masculinas e a data de florescimento.

A comparação das médias foi feita pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do "software" MSTAT.

5.2- Análise eletroforética

Para as análises eletroforéticas, foram amostradas 50 sementes de cada tratamento e trituradas num moinho refrigerado marca Tecnal modelo TE613/1, sob temperatura de 4 °C e na presença de PVP (Polivinil pirrolidone) e armazenadas à temperatura de -86 °C.

5.2.1- Extração das proteínas totais

Para a extração das proteínas totais, foi adicionado à 50 mg do triturado, 950 µL de tampão tris (62,5 mM, pH 6,8 + 2,3% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol) mais 50 µL de β-mercaptoetanol. A seguir, as amostras foram agitadas em vortex de 10 em 10 minutos durante 1 hora, centrifugadas a 6.000 x g

durante 10 minutos. Foi recolhido 300 μL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 10 μL de tampão da amostra (0,125M de Tris pH 6,8, 4% de SDS, 30% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol) e fervido, posteriormente, durante 5 minutos. Foram aplicados 40 μL do extrato protéico mais o tampão da amostra, em um gel de poliacrilamida com SDS. A corrida foi feita em uma cuba vertical com tampão de corrida contendo Tris-glicina + SDS pH 8,9, sob uma voltagem de 150 V durante 4 horas.

Após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% conforme Alfenas et al. (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

5.2.2- Extração de zeínas e não-zeínas

As proteínas totais do endosperma foram extraídas pela adição de 1000 μl de tampão de extração (12,5 mM de borato de sódio, pH 10, 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2- β -mercaptoetanol a 2%), a 50 mg do triturado. Esta mistura foi agitada durante 1 hora, à temperatura ambiente e deixada em repouso, overnight. Após, foi centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos. Do sobrenadante, foram transferidos 300 μL para outro eppendorf, e adicionaram-se 700 μL de etanol. A mistura foi agitada em vortex com posterior incubação em estufa a 37 °C durante 1 hora e, posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante, foram avaliadas as zeínas e com o pellet as não-zeínas.

Foram transferidos 200 μl do sobrenadante para outro tubo, aos quais foram adicionados 1.200 μl de acetona a -20 °C. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 14.000 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por inversão. Posteriormente o pellet foi ressuscitado em tampão da amostra contendo 0,125M de Tris pH 6,8,

4% de SDS, 30% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol e submetidos à fervura durante 5 minutos. Foram aplicados 33 μL do extrato protéico mais o tampão da amostra, em um gel de poliacrilamida com SDS.

A fração não-zeína foi obtida ressuspensando o pellet, em 50 μL de tampão da amostra. Em seguida, ferveram-se as amostras durante 5 minutos para solubilizar as proteínas e foi aplicado 25 μL da amostra em um gel de poliacrilamida com SDS.

A corrida foi realizada em uma cuba vertical, com tampão de corrida contendo Tris-glicina + SDS pH 8,9, sob uma voltagem de 150 V por 4 horas. Após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%, etanol 5% (Alfenas, 1991).

5.2.3 - Extração das isoenzimas

Amostras de 50 sementes por tratamento foram trituradas e armazenadas a -86°C . Foram utilizados 100 mg do pó das sementes maceradas em eppendorfs, aos quais foram adicionados 200 μl do tampão de extração Tris-HCl 0,2 M pH 8, e homogeneizados em vortex, posteriormente eles foram mantidos por 24 horas em geladeira. Após este período, centrifugaram-se as amostras a 14.000 rpm, a 4°C , por 30 minutos. Em seguida, foram aplicados 40 μl do sobrenadante nos géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 75 V por 1 hora e 150 V durante 4 horas.

Após as corridas, os géis foram revelados e corados para os sistemas isoenzimáticos catalase, esterase e malato desidrogenase, conforme metodologia descrita por Alfenas (1991).

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Avaliação no estágio de plântulas

As plântulas crescidas no escuro apresentaram folhas e coleótilos amarelcidos, sem a presença de antocianina. Sabe-se que as antocianinas são pigmentos flavonóides, sintetizados em vários tecidos das plantas e sementes. Vários genes estão envolvidos na síntese desses pigmentos, os quais codificam a biossíntese de enzimas para a formação de antocianina (Cocciolone e Cone, 1993).

Segundo Singh e Sarkar (1982), alguns alelos como o PL podem induzir a síntese de distribuição de antocianina sob uma baixa intensidade luminosa, enquanto outro alelo como o pL iniciam suas atividades somente quando os tecidos são expostos a uma alta intensidade luminosa. Assim, a presença de antocianina na ausência de luz depende dos alelos envolvidos.

Quanto à avaliação das plântulas desenvolvidas na presença de luz, houve efeito do nitrogênio sobre o número dos folíolos expostos para as linhagens UFLA 1a e 1b, 5 e 6 e para os híbridos 1/3 e 5/1. As plântulas provenientes de sementes produzidas nos campos que não receberam adubação nitrogenada, apresentavam dois folíolos abertos e as provenientes dos campos que receberam 60 e 120 kg de N/ha apresentavam também o terceiro folíolo exposto. O maior efeito foi observado na linhagem UFLA 6 em que as referidas plântulas não apresentavam o segundo folíolo desenrolado, quando as sementes foram produzidas na ausência do nitrogênio. Von Pinho (1995), observou que essa característica pode ser utilizada na identificação de plântulas provenientes de sementes do parental fêmea autofecundado misturadas às plântulas híbridas de algumas cultivares de milho. No entanto, os resultados do presente estudo indicam que variação na adubação nitrogenada, durante a produção das sementes,

5

poderá mascarar os resultados obtidos durante a certificação da pureza genética das sementes, quando da utilização dessa característica.

As características relacionadas à presença e à intensidade de antocianina nos tecidos das plântulas não foram influenciadas pelo nível do nitrogênio utilizado durante a produção das sementes. Apesar disso, o nível de antocianina na bainha da primeira folha, no coleoptilo e na nervura das folhas mostrou ser um bom marcador para a diferenciação de linhagens e de híbridos. Plântulas da linhagem UFLA 5, por exemplo, possuem antocianina na nervura central das folhas, na bainha da primeira folha e no coleoptilo. Já as plântulas da linhagem UFLA 2 não apresentam antocianina nos tecidos. O híbrido, resultante do cruzamento dessas duas linhagens, apresenta plântulas com antocianina no coleoptilo e na bainha da primeira folha, no entanto com uma intensidade menor que as da linhagem UFLA 5.

6.2 – Avaliação no estágio de plantas

As diferentes doses de nitrogênio utilizadas na produção das sementes não afetaram as características avaliadas das plantas, tais como, a coloração de estileto-estigmas, das anteras e das glumas das flores masculinas.

Para todos os materiais genéticos, o florescimento das plantas, provenientes de sementes produzidas com 120 kg de N/ha, foi mais precoce, quando comparado ao das plantas provenientes de sementes produzidas com 0 e 60 kg de N/ha. Pauksens e Dhesi (1978), citaram a data de emissão dos estileto-estigmas como uma característica que pode ser utilizada para a avaliação da pureza genética em sementes híbridas de milho. Von Pinho (1995), verificou precocidade no florescimento das plantas híbridas, de híbridos simples, em relação ao das plantas provenientes do parental fêmea autofecundado.

As características de altura das plantas e da inserção das espigas foram

influenciadas pela adubação nitrogenada diferenciada, utilizada na produção das sementes. O resumo da análise de variância dos dados obtidos nas avaliações de altura das plantas e inserção da primeira espiga das linhagens e dos híbridos (Tabela 3), revelou efeitos significativos para materiais genéticos (MG), e a interação entre MG x doses de N.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para os resultados médios de altura das plantas e inserção da primeira espiga. Lavras-MG, 1999.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio	
		Plantas	Espigas
Materiais genéticos (MG)	8	0,8886 **	0,2925 **
Doses N (N)	2	0,0045 NS	0,0002 NS
MG vs N	16	0,0128 *	0,0063 **
Blocos	1	0,0164 *	0,0048
Resíduo	26	0,0036	0,0015
CV (%)		4,2328	6,0400

**, * significativos a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Pode ser observado pela Tabela 4, que houve comportamento diferente das cultivares quanto as alturas de planta e de inserção da espiga, quando as sementes foram produzidas sob diferentes doses de nitrogênio. Nos híbridos 4/2 e 5/1 e na linhagem UFLA 6, essa característica não sofreu influência das diferentes doses de nitrogênio utilizadas na produção das sementes. No entanto, para as linhagens UFLA 5, 2, 4, e 1a, as plantas provenientes das sementes produzidas com doses mais altas de nitrogênio apresentaram-se mais baixas. Na linhagem UFLA 1b e seu híbrido 1/3, plantas provenientes de sementes produzidas sob adubação nitrogenada de 120 kg/ha, apresentaram-se mais altas. Entretanto foi observado, nos estádios anteriores ao florescimento, um crescimento mais rápido das plantas dessa linhagem UFLA 1b quando as sementes foram produzidas na ausência de nitrogênio. Essa diferença foi

desaparecendo nos estádios posteriores e no florescimento. As plantas provenientes de sementes que receberam 120 kg de N/ha apresentaram-se com maior altura.

A adubação nitrogenada utilizada na produção das sementes das linhagens UFLA 1b, 2, e 6 e do híbrido 1/3, não afetou a altura de inserção das espigas. Contudo, para os híbridos 4/2 e 5/1, as plantas oriundas de sementes produzidas sob a dosagem de 120 kg de N/ha apresentaram-se mais altas. Essa condição também reduziu a altura de inserção da primeira espiga para as linhagens UFLA 1a e 4, como observado também para a altura das plantas. Paschoalick (1998), observou que o aumento de doses de nitrogênio promoveu um aumento na altura de inserção de espiga. Pereira Filho (1977), avaliando a altura de espigas de plantas produzidas sob níveis de nitrogênio, observou um efeito linear da adubação nitrogenada na altura de espigas.

Dessa maneira, a altura das plantas e da inserção da primeira espiga, não seriam os marcadores morfológicos mais indicados para a avaliação da pureza genética, pois podem ser influenciadas pelas condições ambientais e de solo.



TABELA 4. Resultados médios da altura de plantas e altura de inserção da primeira espiga, de linhagens e híbridos de milho, oriundos de sementes produzidas sob diferentes doses de adubação nitrogenada aplicadas no solo. Lavras-MG, 1999.

Materiais genéticos	Doses N (kg/ha)	Altura (m)			
		Planta		Espiga	
UFLA 5	0	0,92	A	0,34	B
	60	1,01	A B	0,43	A
	120	0,88	B	0,33	B
4/2	0	1,70	A	0,83	B
	60	1,67	A	0,82	B
	120	1,75	A	0,93	A
UFLA 2	0	1,40	A	0,67	A
	60	1,31	A B	0,65	A
	120	1,21	B	0,61	A
UFLA 6	0	0,98	A	0,39	A
	60	1,03	A	0,43	A
	120	0,97	A	0,37	A
5/1	0	1,80	A	0,88	B
	60	1,89	A	0,88	B
	120	1,87	A	1,00	A
UFLA 1a*	0	1,36	A	0,62	A
	60	1,36	A	0,58	A B
	120	1,22	B	0,53	B
UFLA 4	0	1,52	A	0,70	A
	60	1,36	B	0,60	B
	120	1,26	B	0,53	B
1/3	0	1,99	B	0,92	A
	60	2,09	A B	1,00	A
	120	2,15	A	1,00	A
UFLA 1b**	0	1,16	B	0,50	A
	60	1,17	B	0,50	A
	120	1,30	A	0,53	A

Médias seguidas da mesma letra na coluna, e para cada material genético, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

*Parental feminino do híbrido; **Parental masculino do híbrido.

6.3 – Eletroforese de proteínas

Os perfis eletroforéticos referentes às proteínas totais, zeínas e não-zeínas, das sementes de milho dos materiais genéticos, produzidos sob diferentes doses de nitrogênio, estão apresentados na figura 1A, 1B e 1C respectivamente.

Para as proteínas totais e as zeínas, não foram verificadas alterações no padrão eletroforético em todos os materiais genéticos estudados, quando as sementes foram produzidas sob diferentes doses de nitrogênio (Figura 1A e 1B). Silva (1997),⁴ verificou que os padrões protéicos de zeína não foram alterados por fungos associados às sementes, indicando ser um marcador seguro para a certificação da pureza genética. Para Righeti e Bossio (1981), o padrão de zeína não é afetado pelos fatores ambientais, pois a presença das zeínas, está mais diretamente relacionada com às informações genéticas contidas nas células das plantas. As α -zeínas existem como famílias multigênicas, sendo codificadas por 75 a 150 genes (Marks, Lindel e Larkins, 1985), as β , γ e δ - zeínas são cada uma codificada por um ou dois genes (Wilson e Larkins, 1984, citados por Silva, 1998). No entanto, McGregor, Taslovitch e Martin (1961), demonstraram que a adubação nitrogenada aumentou a concentração de proteína no grão. Tsai, Huber e Warrem (1978), observaram que quando as plantas foram cultivadas sem adubação nitrogenada, o teor de zeína foi reduzido e o de lisina aumentou, o que não foi confirmado nesta pesquisa.

As zeínas são as proteínas que menos sofrem influência de fatores ambientais, por isso são utilizadas como marcadores na identificação de cultivares e certificação da pureza genética (Righeti e Bossio, 1981). Através do padrão da proteína total, foi possível diferenciar a linhagem utilizada como parental feminino do híbrido e da linhagem utilizada como parental masculino. Já os padrões das zeínas obtidos através dessa técnica, não gerou um polimorfismo suficiente que permitisse diferenciar as linhagens dos seus respectivos híbridos. Vale ressaltar

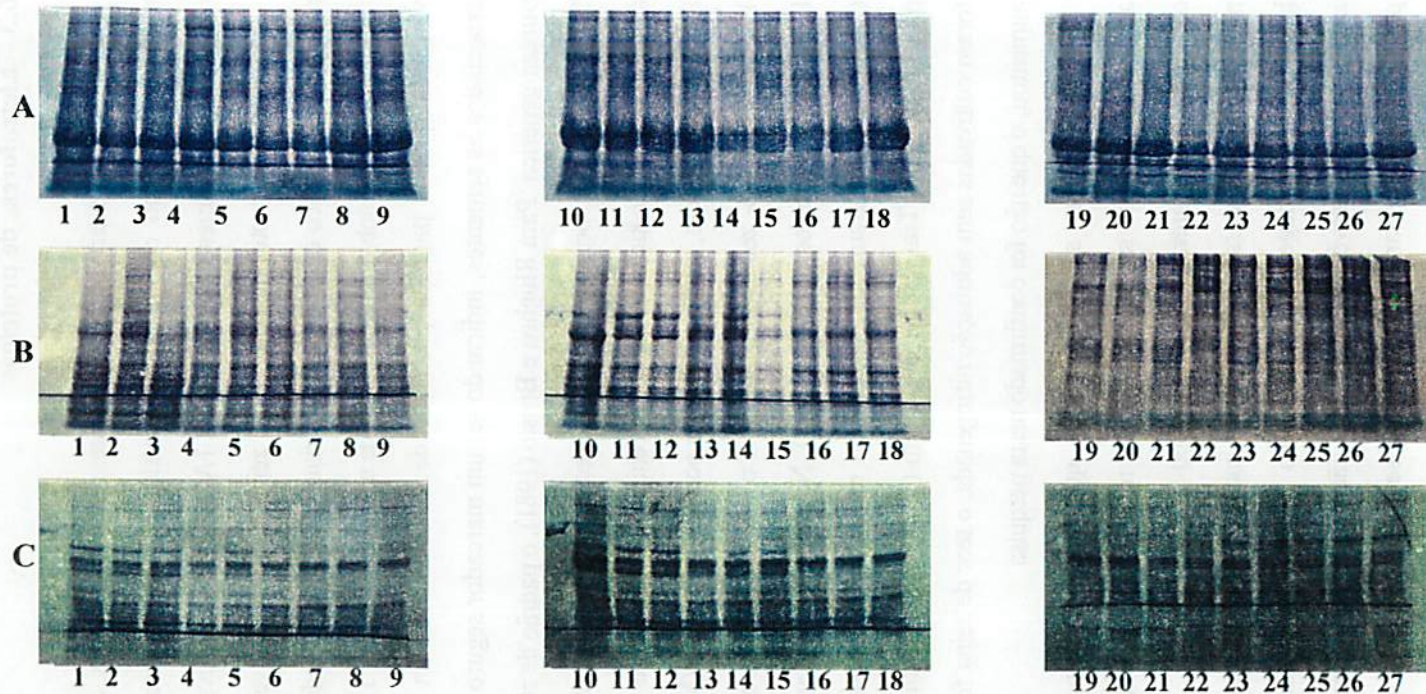


FIGURA 4 – Padrão eletroforético de zeínas (A), não-zeínas (B) e proteínas Totais (C), das sementes dos materiais genéticos UFLA 5 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (1, 2 e 3, respectivamente), 4/2 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (4, 5 e 6, respectivamente), UFLA 2 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (7, 8 e 9, respectivamente), UFLA 6 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (10, 11 e 12, respectivamente), 5/1 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (13, 14 e 15, respectivamente), UFLA 1a produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (16, 17 e 18, respectivamente), UFLA 1b produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (19, 20 e 21, respectivamente), 1/3 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (22, 23 e 24, respectivamente), UFLA 4 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (25, 26 e 27, respectivamente).

Que, provavelmente essa diferenciação não foi possível em função do método utilizado, uma vez que, segundo Wilson (1984), para a utilização dessa proteína, com essa finalidade, é necessária a utilização da técnica de focalização isoeletrica.

As não-zeínas apresentaram alteração nos perfis eletroforéticos em função das doses de nitrogênio utilizadas na produção das sementes (Figura 1C). Para as linhagens UFLA 5 (1,2 e 3), UFLA 2 (7, 8 e 9) e para os híbridos 4/2 (4, 5 e 6) e 5/1 (13, 14 e 15), as sementes provenientes de campos que receberam 60 kg de N/ha (2, 8 5 e 14 respectivamente) apresentaram um maior número de bandas e uma intensidade maior que as das sementes produzidas com 0 e 120 kg de N/ha. Verificou-se, ainda, para essas cultivares, menor intensidade de bandas em sementes produzidas com 120 kg de N/ha. As alterações observadas nos padrões das não-zeínas, função das diferentes doses de nitrogênio, poderão comprometer as avaliações durante a certificação da pureza genética em lotes de sementes de milho. As não-zeínas são uma fração bastante heterogênea e complexa (Lopes e Larkins, 1993).

Silva (1998), trabalhando com as não-zeínas, indicou que esta complexidade pode ter interferido nas avaliações de densitometria, e as análises estatísticas dessa fração apresentaram maiores valores para o coeficiente de variação. Tsai et al. (1983), trabalhando sob condições de restrição de nitrogênio, observaram que o endosperma armazenou pequena quantidade de zeína, mas as frações protéicas não-zeínas não foram afetadas.

6.4 - Análise de isoenzimas

Os perfis isoenzimáticos das sementes das cultivares utilizadas e produzidas sob diferentes doses de nitrogênio estão apresentados nas Figuras 2A, 2B e 2C.

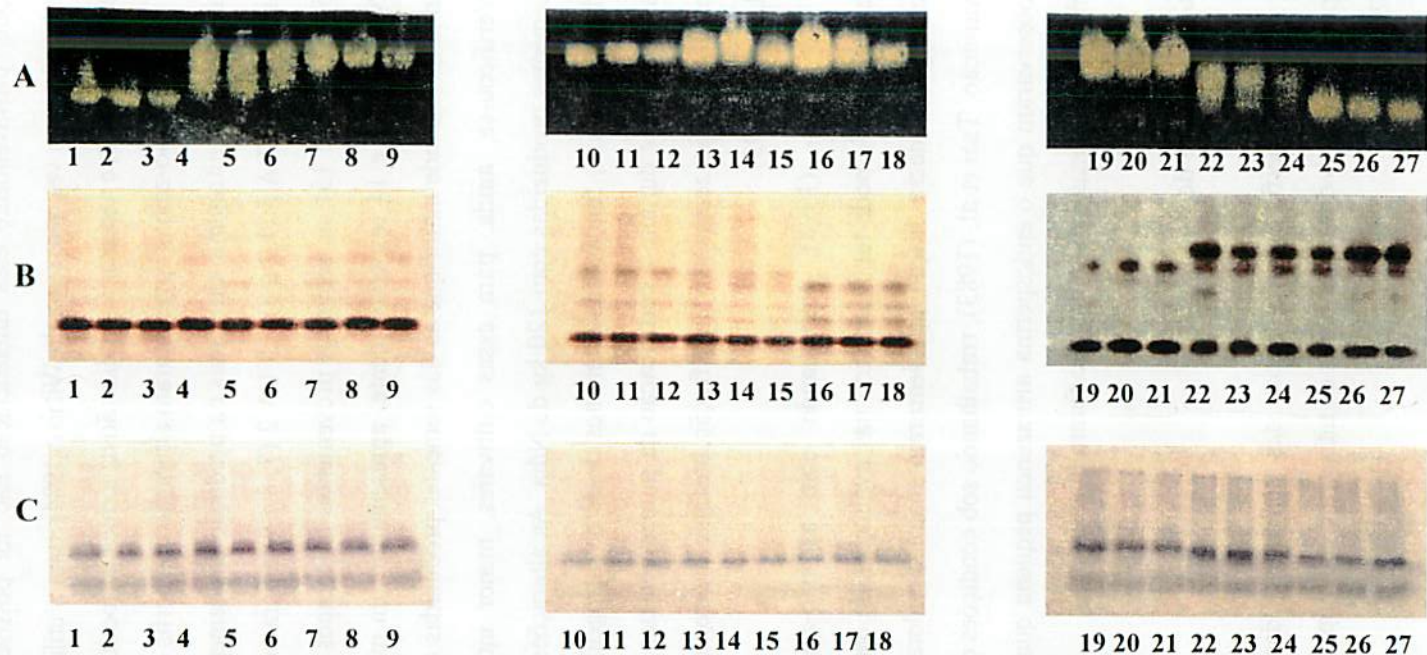


FIGURA 2 – Padrão eletroforético das isoenzimas catalase (A), esterase (B) e malato desidrogenase (C), das sementes dos materiais genéticos UFLA 5 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (1, 2 e 3, respectivamente), 4/2 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (4, 5 e 6, respectivamente), UFLA 2 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (7, 8 e 9, respectivamente), UFLA 6 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (10, 11 e 12, respectivamente), 5/1 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (13, 14 e 15, respectivamente), UFLA 1a produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (16, 17 e 18, respectivamente), UFLA 1b produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (19, 20 e 21, respectivamente), 1/3 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (22, 23 e 24, respectivamente), UFLA 4 produzidas com 0, 60 e 120 kg de N/ha (25, 26 e 27, respectivamente).

Pode-se observar através do perfil eletroforético da catalase (Figura 2A), que o híbrido 5/1 (13, 14 e 15) e a linhagem UFLA 1a (16, 17 e 18) e a UFLA 1b (19, 20 e 21), apresentaram uma redução da intensidade de bandas, à medida que aumentou-se a dose de nitrogênio utilizada na produção de sementes. Esses resultados reforçam os resultados do teste de germinação, que foram apresentados no capítulo anterior, em que as cultivares produzidas com maiores doses de nitrogênio apresentaram menor vigor. Essa redução da intensidade das bandas tem sido mostrada em sementes submetidas ao envelhecimento acelerado. Drochioiu, Cristea e Strajeru (1993), pesquisando a enzima catalase, verificou que umidade relativa alta, temperatura elevada e o aumento do tempo de envelhecimento reduziram a atividade dessa enzima. Quando a semente é envelhecida, ocorre uma maior peroxidação de lipídios e uma redução na atividade das enzimas “scavenger”, removedoras de peróxidos, como a catalase, peroxidase, superperóxido dismutase e ascorbato peroxidase (Jeng e Sung, 1994; Nkang, 1988; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991).

Através dos padrões isoenzimáticos da esterase, foi possível observar a distinção das linhagens de seu respectivo híbrido, e foi observado pelos zimogramas (Figura 2B), que as doses de nitrogênio, utilizadas na produção das sementes não alterou o número e intensidade de bandas dessa enzima. Dessa forma, sugere-se o uso desta em programas de certificação de pureza genética. Contudo, há de se considerar que a mesma está envolvida na hidrólise de ésteres e desempenha um papel importante no metabolismo de lipídeos, sendo este ponto importante no processo deteriorativo das sementes (Brandão Jr., 1996).

Pinto, Sader e Lemos (1995), citam que as doenças influenciam o metabolismo das plantas e a atividade das isoenzimas, especialmente as esterases, peroxidases, fosfatases e fenolases, causando o aparecimento de padrões ou atividades diferentes. Segundo Vieira (1996), determinadas isoenzimas

apresentam modificações em seus padrões eletroforéticos em função da associação fungo/semente. Silva (1997), observou uma diminuição da intensidade de bandas das enzimas álcool desidrogenase, peroxidase, esterase e glutamato-oxalacetato transaminase em sementes associadas com microrganismos.

A malato desidrogenase é responsável pela catalização da reação de malato à oxaloacetato no ciclo de Krebs. Satters, Abdel-Ghany e Elbagoury (1994), observaram em soja que a malato desidrogenase foi a menos afetada nos testes de envelhecimento acelerado. Gomes (1999), trabalhando com milho, obteve resultado semelhante, em que os padrões eletroforéticos desta enzima permaneceram inalterados com o envelhecimento. No presente estudo, esta enzima manteve seu padrão isoenzimático inalterado, independente da dose de nitrogênio aplicado no solo, por ocasião da produção de semente. Todavia, a referida enzima, por si só, não foi eficiente em separar as linhagens e híbridos testados (Figura 2C).

7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

O aumento da adubação nitrogenada afeta o número de folíolos expostos das plântulas, a data de florescimento e a altura das plantas e da inserção da primeira espiga;

As diferentes doses de nitrogênio aplicadas durante a produção das sementes não afeta a cor de folha, presença de antocianina, pilosidade, cor de anteras e glumas e cor do estilo-estigma;

A variação nas doses de nitrogênio não afeta os padrões das proteínas totais, da fração zeína e das isoenzimas esterase e malato desidrogenase, não são alterados com o aumento da adubação nitrogenada.

Os padrões da isoenzima catalase e da fração não-zeína são alterados em função da dose de nitrogênio utilizada.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e florestais. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- BALCONI, C.; RIZZI, E.; MOTTO, M.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R. Regulation of zein synthesis by nitrogen nutrition in cultured endosperms. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, [S.l.], v. 10, n. 66, p. 16-17, 1992.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 19, n. 3, p. 279-286, 1991.
- BONETTI, A.; MIGGIANO, A.; DINELLI, G.; LOVATO, A. Identification of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar grown in Italy by field and electrophoresis tests: a comparative study. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 23, n. 1, p. 69-84, 1995.
- BRANDÃO JÚNIOR, D.E. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1996. 110p. (Dissertação- Mestrado em Fitotecnia).
- BRINK, D. E.; PRICE, S. C.; NUGYEN, H.; FUREST, G.; MARTINEZ, C. Genetic purity assessment of commercial single cross maize hybrids: Isoelectric focusing of zeins. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 17, n.1, p. 91-98, 1989.
- COCCIOLONE, S.M.; CONE, K.C. PH.PL-BL, na anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation. *Genetics*, Princeton, v. 135, n. 3, p. 575-588, Mar, 1993.
- COOKE, R.J. The work of the ISTA biochemical working group. In: *THECHNOLOGICAL ADVANCES IN VARIETY AND SEED RESEARCH*. 1994, Wageningen. Anais... Wageningen: ISTA/ISHS, 1994. n. 3, p. 16-17.
- DROCHIOIU, G.; CRISTEA, M.; STRAJERU, S. Catalase activity of maize seeds in the process of forced aging. *Cercetari Agronomice in Moldova*, Suceava, v. 26, n. 1, p. 19-25, Jan, 1993.

DOEHLERT, D.C.; DUKE, E.R.; SMITH, L.J. Effects of nitrogen supply on expression of some genes controlling storage proteins and carbohydrate synthesis in cultured maize kernels. *Plant-Cell*, North Dakota, v. 47, n. 2, p. 195-198, Jan/Fev, 1997.

EMBRAPA- CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO
Recomendações técnicas para o cultivo do milho Brasília: 1993. 204p.

ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays*). *Journal of Cereal Science*, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 117-128, 1987.

FERREIRA, A. C. de B. Efeitos da adubação com N, Mo e Zn sobre a produção, qualidade de grãos, e concentração de nutrientes no milho. Viçosa: UFV, 1997. 74p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).

FORNASIERI FILHO, D. A cultura do milho. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

GOMES, M. de S. Heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1999. 78p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia)

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M.E. Proteção de cultivares por análise de DNA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE SEMENTES. ABRASEM . Anuário ABRASEM, Brasília, 1996. p. irr

GUIMARÃES, C.T. Caracterização de populações indígenas de milho (*Zea mays* L.) que apresentam grãos opacos. Viçosa: UFV, 1994. 69p. (Dissertação-Mestrado em genética e melhoramento de plantas).

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Rules for seed testing. Switzerland, 1996. 323p.

HABBen, J.E.; KIRLEIS, A.W.; LARKINS, B.A. The origin of lysine containing proteins, in opaque-2 maize endosperm. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 825-838, Apr, 1993.

JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydratation effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

- KORÁNYI, P. Simple purity checking of maize (*Zea mays* L.) lines and hybrids by protein monomer analysis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 17, n. 1, p. 161-168, 1989.
- LANDRY, J.; DELHAYE, S. The tryptophan contents of wheat, maize and barley grains as a function of nitrogen content. **Journal of Cereal Science**, [S.I.], v. 18, n. 2, p. 259-266, 1993.
- LOPES, M.A.; LARKINS, B. Endosperm origin, development and function. **The Plant Cell**, Rochville, v. 5, n. 10, p. 1383-1399, Oct, 1993
- MARKS, M.D.; LINDEL, J.S.; LARKINS, B.A. Nucleotide sequence analysis of zein mRNAs from maize endosperm. **Journal Biology Chemistry**, Baltimore v. 260, p. 16451-16459, Dec, 1985.
- MCDONALD Jr, M.B. Blotting of seed proteins from isoelectrically focused gels for cultivar identification. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 1, p. 33-40, 1991.
- MCGREGOR, J.M.; TASCOVITCH, L.T.; MARTIN, W.P. Effect of nitrogen fertilizer and soil type on the amino acid content of corn grain. **Agronomy Journal**, Madison, v. 53, n. 4, p. 211-214, July/Aug, 1961.
- NKANG, A. Some aspects of the biochemical basis of viability of loss in stored gukfoylia monostylis seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 16, n. 2 p. 247-260, 1988.
- PASCHOALICK, H.N. dos S. Efeito da época de aplicação do nitrogênio na produção, teor de óleo e na qualidade protéica de cultivares de milho (*Zea maiz* L.) normal e QPM. Jaboticabal: UNESP, 1998. 107p. (Dissertação-Mestrado em produção vegetal).
- PAYNE, R.C. Seed and cultivar identification. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, n. 4, p. 641-644, 1987.
- PAUKSENS, J. Determination of cultivar **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 6, n. 4, p. 579-583, 1978.
- PAUKSENS, J.; DHESI, N.S. Cultivar verification methods used in Canada. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 6, n. 4, p. 585-592, 1978.

- PEREIRA FILHO, I.A. Comportamento dos cultivares de milho (*Zea mayz* L.) "Piranão e Centralmex" em diferentes condições de ambientes, espaçamentos e níveis de nitrogênio. Lavras: ESAL, 1977. 84p. (Dissertação-Mestrado).
- PINTO, L.R.; SADER, R.; LEMOS, V.G.M. Identificação de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) através da eletroforese em gel de poliácridamida. *Revista Brasileira de sementes, Brasília*, v. 17, n. 1, p. 96-100, jan/jun, 1995.
- RIGHETTI, P.G.; BOSSIO, A.B. Applications of isoelectric focusing to the analysis of plant and food proteins. *Electrophoresis, Weinheim*, v. 2, n. 1, p. 65-75, 1981.
- SATTERS J.R., ABDEL-GHANY, A., ELBAGOURY, O., et al. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science Research, Wallingford*, v. 4, n. 1, p. 33-41, Mar, 1994.
- SHNEIDER, E.; EARLEY, B.; DETURK, E.E. Nitrogen fraction of the component parts of the corn kernel as affected by selection and soil nitrogen. *Agronomy Journal, Madison*, v. 44, n. 4, p. 161-169, Apr, 1952.
- SINGH, N.N.; SAKAR, K.R. Antocyanin pimentation in various parts of the maize plant in relation to line development and seed certification. *Seed Reseach, New Delhi*, v. 10, n. 1, p. 18-26, Jan, 1982.
- SILVA, E.A.A.da. Interferência de microorganismos nos padrões isoenzimáticos e protéicos de sementes e coleótilos de milho. Lavras: UFLA, 1997, 78p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- SILVA, R.P. da. Caracterização dos padrões protéicos do endosperma do milho e sua relação com a estrutura física do grão. Lavras: UFLA, 1998, 89p. (Dissertação-Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SILVA, P.S.L.; REGO, M.C.do; BEZERRA, N.F.; FREITAS, C.J.de. Efeitos do controle de invasoras e de níveis de nitrogênio sobre o teor de proteína dos grãos de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, v. 28, n. 5, p. 609-612, maio, 1993.

- SINGLETARY, G.W. DOEHLERT, D.C.; WILSON, C.M.; MUHITCH, M.J.; BELOW, F.E. Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. *Plant physiology*, Maryland, v. 94, n. 3, p. 858-864, Nov, 1990.
- SMITH, J.S.C.; WYCH, R.D. The identification of female selfs in hibrid maize: a comparasion using electrophoresis and morphology. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 14, n. 1, p.1-8, July, 1986.
- TSAI, C.Y. Early termination of zein accumulation in opaque-02 maize mutant. *Maydica*, Bergamo, v. 24, n. 3, p. 129-140, Mar, 1979.
- TSAI, C.Y.; DWEIKAT, I.; HUBER, D.M.; WARREN, H.L. Interrelationship of nitrogen nutrition with maize (*Zea mays*) grain yield, nitrogen use efficiency and grain quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. West Lafayette, v. 58, n. 1, p. 1-8, 1992.
- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M.; WARREM, H.L. Relationship of the kernel sink for N to maize productivity. *Crop Science*, Madison, v. 18, n. 3, p. 399-404, May/June, 1978.
- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M.; WARREN, H.L. A proposed role of zein and glutelin as N sinks in maize. *Plant Phisiology*, Maryland, v. 66, n. 2, p. 330-333. Apr. 1980.
- TSAI, C.Y.; WARREN, H.L.; HUBER, D.M.; BRESSAN, R.A. Interaction between the kernel N sink, grain yield and protein nutritional quality of maize. *Journal Science Food Agriculture*, Essex, v.34, n. 2, p.255-263. Apr. 1983.
- VIEIRA, M. das G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 1996. 118p. (Tese Doutorado em Fitotecnia)
- VON PINHO, E.V.R. Consequências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho. Piracicaba: ESALQ, 1995. 130 p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)

WALLACE, J.C.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. LARKENS, B.A. New method for extraction and quantification of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified opaque-2 maize. **Plant Physiology, Maryland**, v. 92, n. 1, p.191-196, Set, 1990.

WILSON, C.M. Isoelectric focusing of zein in agarose. **Cereal Chemistry, Sant Paul**, v.61, n. 2, p.198-200, Mar/Apr, 1984.

WILSON, C.M. Mapping of zein polypeptides after isoelectric focusing on agarose gels. **Biochemical Genetics, [S.I.]** v.23 p.115-124.1985.