



MATHEUS BORNELLI DE CASTRO

**RETARDAMENTO DA SECAGEM E
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE
MILHO**

**LAVRAS – MG
2013**

MATHEUS BORNELLI DE CASTRO

**RETARDAMENTO DA SECAGEM E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE
SEMENTES DE MILHO**

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

Orientador
Dr. Renato Mendes Guimarães

**LAVRAS – MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de
Produtos e Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Castro, Matheus Bornelli de.

Retardamento da secagem e qualidade fisiológica de sementes de milho / Matheus Bornelli de Castro. – Lavras : UFLA, 2013.

74 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. *Zea mays* L. 2. Viabilidade. 3. Temperatura. 4. Umidade. 5. Vigor. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

MATHEUS BORNELLI DE CASTRO

**RETARDAMENTO DA SECAGEM E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE
SEMENTES DE MILHO**

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

APROVADA em 20 de agosto de 2013.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa	EMBRAPA
Dr. Antônio Carlos Fraga	UFLA
Dr. Rubens José Guimarães	UFLA
Dr. José Luís Contado	UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

*A Deus,
Para glória d'Ele,*

OFEREÇO

*À minha esposa, Maráisa;
Aos meus pais, Airton e Edda;
Aos meus irmãos, Eduardo e Henrique...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha existência, que me salvou da ira vindoura por meio do sacrifício do seu único Filho Jesus Cristo;

À minha esposa Maraísa, por me completar, amar, acompanhar e me fazer feliz. Amo você!

Aos meus pais, Airton e Edda, pelas orações, pelo amor, carinho, dedicação, atenção e por serem presentes em minha vida;

Aos meus irmãos, Eduardo e Henrique, por serem meus melhores amigos;

À minha família: avós (José Eduardo e Idamar, Artaxerxes e Perolina), tios (Sidnei e Ayla, David e Geisa, Carlos e Elaine, Aldemir e Kátia), primos (Mariana, Marcello e Fernando, Bianca e Breno, e Camila), pelo carinho em todos os momentos. Obrigado!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura, em especial ao Setor de Sementes, pela oportunidade de realização desse doutorado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães, por toda atenção, dedicação, ensinamento e amizade durante 4 anos;

Aos professores do Setor de Sementes (DAG), Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Prof. Dr. João Almir Oliveira, Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho;

Aos Pesquisadores Dr. Antônio Rodrigues Vieira (EPAMIG) e a Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa (EMBRAPA);

Ao Prof. Dr. José Luis Contado, do Departamento de Alimentos, por todos os conhecimentos repassados e pela amizade;

Aos amigos sempre presentes, Rodrigo (especialmente), Diego, Nayara, Ivan, Victor, Lisiane, Wilder, Walbert, Filipe, Fabinho, Wallace, Teteu e outros

que marcaram minha passagem por Lavras. Sem vocês seria impossível, literalmente!

À Marli, secretária da Pós em Fitotecnia, pela disponibilidade, atenção e esclarecimentos;

A todos que de alguma forma me ajudaram nessa fase, mesmo que não citados, meus agradecimentos.

OBRIGADO!

“O cristianismo não é uma série de verdades no plural,
mas é a Verdade escrita com V maiúsculo.
É a verdade sobre a realidade total,
não apenas sobre assuntos religiosos.”

Francis Schaeffer

“Deus amou ao mundo de tal maneira que deu seu único Filho,
para que todo o que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.”

Jo 3.16

"Eu acredito no cristianismo como acredito que o sol nasce todo dia.
Não apenas porque o vejo, mas porque através dele eu vejo tudo ao meu redor."

C. S. Lewis

"Mas Deus prova o seu próprio amor para
conosco pelo fato de ter Cristo morrido por nós,
sendo nós ainda pecadores."

Rm 5.8

RESUMO

Sementes de milho colhidas em espiga com altos teores de água devem ser rapidamente submetidas ao processo de secagem antes do beneficiamento. Entretanto, geralmente há um retardamento na secagem ocasionado pela sobrecarga da usina de beneficiamento. Nesse período, sementes mal acondicionadas, têm a velocidade de deterioração aumentada, com consequente queda de germinação e vigor. Diante disso, objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica das sementes de milho da linhagem GNS25 submetidas ao retardamento da secagem. As sementes foram colhidas com 48,0; 40,5; 34,2; 29,4 e 23,5% de umidade e submetidas ao retardamento da secagem por 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas, sob as temperaturas de 20, 40 e 60 °C. Foram realizados os seguintes testes e determinações: teor de água, germinação, emergência, índice de velocidade de emergência, teste de frio, análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor e das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase e esterase, análise ultraestrutural e atividade respiratória. Para as análises isoenzimáticas e atividade respiratória, foram utilizados três pontos de umidade (48,0; 34,2 e 23,5%), quatro tempos de espera para secagem (0, 6, 24 e 48h) sob 20 e 60 °C (tratamentos escolhidos por representarem pontos extremos do experimento). Avaliou-se a ultraestrutura do eixo embrionário de sementes de milho por meio de microscopia eletrônica de varredura dos seguintes tratamentos: 48%-0 e 48%-48 h-60 °C; 34,2%-0 e 34,2%-48 h-60 °C; 23,5%-0 e 23,5%-48 h-60 °C. Conclui-se que não há alteração na viabilidade das sementes quando o atraso na secagem se dá a temperaturas de 20 e 40 °C por até 48 horas, com umidade de colheita abaixo de 40,5%. No ponto de colheita mais úmido (48%) ocorrem alterações na viabilidade das sementes, com incremento até 12 horas e declínio após esse período. Mesmo em temperaturas brandas (20 e 40 °C), há declínio do vigor das sementes. O retardamento da secagem sob 60 °C provoca queda acentuada na germinação e no vigor em todas as situações. Em geral, nos pontos de colheita mais úmidos, há menor atividade enzimática e expressão de proteínas resistentes ao calor, o que reflete no menor vigor das sementes, principalmente quando submetidas às altas temperaturas. Em eletromicrografias, é possível acompanhar os danos causados pelo tratamento mais extremo (48 horas a 60 °C) nas membranas das células do eixo embrionário, com ruptura e extravasamento do conteúdo citoplasmático. A atividade respiratória é maior em sementes colhidas mais úmidas, por estarem em processo de deterioração mais avançado.

Palavras-chave: *Zea mays* L.. Viabilidade. Vigor. Proteínas resistentes ao calor. Atividade enzimática. Ultraestrutura. Atividade respiratória.

ABSTRACT

Corn seeds harvested in ears with high moisture content must be dried quickly before the processing. However, generally there is a delay in the drying due to the overload of the plant. During this period under bad conditions, the seeds have an increase in the speed of deterioration, and a decrease in the germination and vigor. In front of this, it was aimed to evaluate the physiological quality of corn seeds of inbred line GNS25 submitted to drying delay. The ears were harvest with 48.0, 40.5, 34.2, 29.4, and 23.5% moisture content and submitted to drying delay for 0, 6, 12, 24, 36, and 48 hours, under 20, 40, and 60 °C. The following tests and determinations were realized: seed moisture content, germination, emergence, emergence speed index, cold test, electrophoresis analyses of heat resistant protein, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, and esterase, ultrastructural analysis and respiratory activity. For the electrophoresis and respiratory activity were used three moisture contents (48.0, 34.2, and 23.5%), four drying delay periods (0, 6, 24, and 48 h) under 20 and 60 °C (treatments chosen due to represent extreme conditions). It was evaluated the ultrastructure of embryo axis of corn seeds through electron scanning microscopy of the following treatments: 48%-0 and 48%-48 h- 60 °C, 34,2%-0 and 34,2%-48 h-60 °C; 23,5%-0 and 23,5%-48 h-60 °C. It was concluded that there is no changes on seeds viability when the drying delay happens at 20 and 40 °C for until 48 h, with moisture content below 40.5%. With 48% moisture content there are changes of seed viability, with increase until 12 h and decrease after this period. At least under soft temperatures (20 and 40 °C), there are decrease of seed vigor. The drying delay under 60 °C causes high decrease of germination and vigor in all situations. In general, in the most humid points, there are low isozyme activity and low expression of heat resistant protein, reflecting in the low vigor of seeds, mainly when submitted to high temperature. With the electron micrographs is possible to follow the damages caused by the most extreme treatments (48 h at 60 °C) in the cell membranes of embryo axis, presenting rupture and overflow of cytoplasmic content. The respiratory activity is higher in seeds harvested with high moisture content, due to advances in the deterioration process.

Keywords: *Zea mays L.*. Viability. Vigor. Heat resistant protein. Enzymatic activity. Ultrastructure. Respiratory activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A cultura do milho	14
2.2	Qualidade fisiológica de sementes	15
2.2.1	Testes de vigor	16
2.2.2	Análise isoenzimática	18
2.2.3	Análise da atividade respiratória	21
2.2.4	Análise ultraestrutural	23
2.3	Retardamento da secagem	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Local	28
3.2	Material utilizado	28
3.3	Variáveis avaliadas	29
3.4	Análise estatística	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Análise dos testes de viabilidade e vigor	34
4.2	Análise isoenzimática	43
4.3	Análise ultraestrutural	51
4.4	Atividade respiratória	58
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O milho é uma das poáceas mais cultivadas no mundo. Produz grãos de elevado valor nutritivo sendo muito empregado na alimentação humana e, principalmente, animal. No Brasil, a produção de milho na safra 2012/2013 foi de 80,25 milhões de toneladas em uma área de 15,87 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013), deixando o país como o terceiro maior produtor mundial, atrás somente dos Estados Unidos da América e da China.

A cadeia de produção agroindustrial de sementes de milho é complexa e a coordenação eficaz de todas as atividades envolvidas garante a competitividade da empresa e o fornecimento de sementes no momento certo, com qualidade satisfatória e mínimo custo (JUNQUEIRA; MORABITO, 2006). Um dos pontos de suma importância é o tempo de transporte das sementes do campo para a usina de beneficiamento.

Sementes de milho são colhidas em espiga com alto teor de água, necessitando iniciar rapidamente a secagem artificial antes do beneficiamento para evitar um consumo antecipado de reservas, o que provoca um desgaste fisiológico e conseqüentemente propicia baixos índices de germinação e vigor das sementes.

Contudo, nas usinas de beneficiamento de sementes, essa rapidez de secagem nem sempre é observada, havendo um tempo de espera até iniciar o processo de secagem por falta de estrutura ou planejamento, o que caracteriza o retardamento de secagem. Além disso, filas de caminhões com sementes com alto teor de água sob lona e a incidência de sol intenso, proporcionam um aumento da temperatura até valores extremamente altos, tornando o ambiente inadequado para armazenagem, mesmo que por poucas horas (RANGEL; SILVA; NERIS, 2003).

Sabe-se, também, que a umidade e a temperatura estão entre os fatores que mais influenciam a qualidade fisiológica da semente, tanto no campo, quanto no transporte ou durante o armazenamento, uma vez que para a maioria das espécies, a velocidade de deterioração da semente aumenta à medida que aumenta o seu grau de umidade.

As informações a respeito dos efeitos do retardamento de secagem na qualidade fisiológica de sementes ainda são raras e, por vezes, antigas. Nos trabalhos com sementes de milho são analisadas as consequências da espera pela secagem em vários períodos e com diferentes umidades de colheita, mas não investigaram variações de temperatura em que estas sementes podem estar armazenadas, nem foram avaliadas alterações isoenzimáticas ou bioquímicas.

As análises isoenzimáticas podem indicar variações na qualidade fisiológica de sementes por meio de mudanças dos perfis de proteínas e de enzimas específicas, já que com a deterioração de sementes ocorrem degradação e inativação de proteínas, causando a perda de vigor. Vale ressaltar que a alteração isoenzimática é um dos primeiros danos a acontecer em uma sequência de eventos de deterioração.

Outra forma de acompanhar os danos causados pelo retardamento da secagem é a análise ultraestrutural da semente, onde se pode obter informações valiosas sobre a condição física das células presentes em um tecido específico, o que pode ser relacionado à qualidade fisiológica dessas sementes.

A medição da atividade respiratória também se mostra promissora, sendo um método rápido, fácil e relativamente barato para a determinação do vigor de um lote de sementes.

Diante do exposto, verifica-se que pesquisas devem ser realizadas para avaliar as alterações na qualidade fisiológica, visando estabelecer um período crítico de permanência das sementes em condições adversas entre a colheita e o início do beneficiamento. Objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica de

sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas em diversos estádios de maturação e submetidas ao retardamento da secagem por até 48 horas, sob três temperaturas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do milho

No agronegócio brasileiro, em termos de área explorada, a cultura do milho é a segunda mais cultivada, atrás somente da cultura da soja. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de grãos de milho (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013). Na safra 2011/2012, a produção brasileira de milho foi de 72,98 milhões de toneladas em uma área de 15,18 milhões de hectares. Na safra 2012/2013 houve um aumento de 10,0% na produção, atingindo 80,25 milhões de toneladas produzidas, em 15,87 milhões de hectares (CONAB, 2013).

Os principais estados produtores, considerando a primeira e segunda safra, são o Mato Grosso, seguido do Paraná, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. E com a alta produtividade nacional e queda das últimas safras norte americanas, o Brasil pode se tornar o maior exportador mundial dessa commodity em 2013.

A taxa de utilização de sementes para essa cultura também é alta e significativa, com valores em torno de 90% na safra 2011/2012 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2013a). Consequentemente, o mercado de sementes é aquecido e competitivo, gerando receitas multimilionárias para as principais empresas do setor (ABRASEM, 2013b).

Com o surgimento dos híbridos na década de 1930-40 e sua viabilização para produção em escala comercial, iniciou uma inversão na atuação de instituições públicas e privadas. As sementes de milho foram os primeiros produtos certificados a serem comercializados no mercado nacional. Nas décadas de 1960-70, as instituições públicas eram as que detinham a tecnologia

da produção, desde o melhoramento genético até a distribuição para os agricultores, enquanto as empresas privadas possuíam funções como multiplicação e comercialização.

A partir da década de 1980, com a redução de recursos para a pesquisa nas instituições públicas, juntamente com a valorização da utilização de sementes, as empresas públicas, por falta de interesse competitivo, reduziram o seu campo de atuação e as empresas privadas investiram mais em, praticamente, todas as etapas da produção de sementes de milho.

Juntamente a esses aspectos, iniciou-se uma grande campanha de marketing para utilização de sementes melhoradas e, assim, os rendimentos aumentaram gradativamente. Atualmente, a cooperação entre empresas públicas, que concentram seus esforços na conservação de germoplasma e produção de sementes de milho para fins específicos (resistentes a estresses ambientais), e empresas privadas, que investem em tecnologia de produção e pesquisas de ponta, faz com que toda a cadeia produtiva se beneficie (MARTIN et al., 2007).

Nesse mercado extremamente competitivo exigem-se materiais de excelente qualidade que resultem em alta produtividade, pois o investimento em sementes, produtos fitossanitários, fertilizantes e máquinas de elevado valor aumentam o custo de produção (JUNQUEIRA; MORABITO, 2006).

2.2 Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade da semente pode ser conceituada como o somatório dos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que influenciam a capacidade de originar plantas com maior produtividade. A alta qualidade da semente reflete diretamente no resultado final da cultura, em termos de ausência de moléstias transmitidas pela semente, do alto vigor das plantas, da maior

produtividade e de uniformidade da população (BRACCINI et al., 1999; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; POPINIGIS, 1977).

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes é realizada pelo teste de germinação, porém este teste tem limitações por fornecer resultados que superestimam o potencial fisiológico das sementes, devido ao fato de ser conduzido sob condições ideais e artificiais. As condições adversas como umidade do solo, clima, competição, entre outras, podem impor uma desuniformidade entre o teste de germinação e os resultados de campo (HILHORST et al., 2001). Portanto, esse teste, aplicado isoladamente, muitas vezes não é eficiente para prever o comportamento das sementes no campo (BYRUM; COPELAND, 1995).

2.2.1 Testes de vigor

Para complementar as informações do teste de germinação criou-se o conceito de vigor. Vários testes de vigor foram desenvolvidos procurando precisar o comportamento de lotes de sementes em campo com dados obtidos em laboratório (MCDONALD JUNIOR; WILSON, 1979).

De acordo com o relato de vários pesquisadores, a introdução do termo vigor foi, primeiramente, atribuída a Nobbe, em 1876, que utilizou a palavra “triebkraft”, com significado de “força motriz” ou “energia de crescimento”, ao discorrer sobre o processo de germinação (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA, 1983).

Atualmente o vigor é definido pela AOSA (1983) como as propriedades da semente que determinam o potencial para emergência rápida e uniforme, com o crescimento de plântulas normais, sob ampla faixa de condições do ambiente. Na mesma linha de raciocínio a International Seed Testing Association - ISTA (2006) define vigor como um índice do grau de deterioração fisiológica e/ou

integridade mecânica de um lote de sementes de alta germinação, representando sua ampla habilidade de estabelecimento no ambiente.

A escolha do método de avaliação do vigor deve observar o atendimento dos quesitos de rapidez, objetividade, simplicidade, economia e reprodutibilidade, além de permitir a interseção dos dados obtidos em diferentes testes (CALIARI; SILVA, 2001).

Esses testes têm como objetivos básicos detectar diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes com alta germinação e separar lotes em diferentes níveis de vigor de maneira proporcional à emergência em campo, resistência ao transporte e potencial de armazenamento (MARCOS FILHO, 2005; PESKE; LUCCA FILHO; BARROS, 2006).

Para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho alguns testes já estão consagrados. Dentre eles podemos citar o teste de frio e o teste de emergência.

O teste de frio tem como princípio básico a exposição das sementes à baixa temperatura, alta umidade e agentes patogênicos (quando se utiliza terra procedente de áreas de cultivo da espécie), pode funcionar como instrumento de grande valor para a seleção prévia de lotes de sementes, quanto ao seu desempenho, em uma ampla faixa de condições ambientais.

Esse é considerado um teste de resistência, pois o lote de sementes que melhor resistir às condições adversas é considerado o de maior potencial fisiológico. De forma geral, se os resultados do teste de frio se aproximarem dos obtidos no teste padrão de germinação, há grande possibilidade de esse lote apresentar capacidade para germinar sob ampla variação das condições de umidade e temperatura do solo (CICERO; VIEIRA, 1994).

O teste de emergência avalia a capacidade de germinação e emergência de um lote de sementes em condições adversas, com temperatura, precipitação pluviométrica e outros fatores não controlados. Espera-se que um lote de

sementes mais vigoroso consiga emergir de forma mais rápida e uniforme do que um lote com algum déficit de qualidade fisiológica. E, como complemento podem-se calcular diversos outros índices e variáveis, como o índice de velocidade de emergência, o tempo médio de emergência e o t50, que indicam a rapidez com que um lote de sementes inicia o processo germinativo com posterior emergência de plântulas normais.

Vale ressaltar que a análise da qualidade fisiológica de sementes deve ser vista como uma atividade dinâmica, que apresente evolução constante, tanto pelo aprimoramento dos meios disponíveis para a avaliação da qualidade das sementes como pela incorporação de novos métodos (NOVEMBRE, 2001).

2.2.2 Análise isoenzimática

Outra forma de monitorar alterações na qualidade fisiológica de sementes é por meio de avaliação de variações bioquímicas nos perfis de proteínas e de enzimas específicas, já que segundo Copeland e McDonald (2001) com a deterioração de sementes ocorre a degradação e inativação de enzimas, provocando a perda de vigor.

A perda da viabilidade das sementes no processo de deterioração é precedida por redução na capacidade de sintetizar proteínas devido ao declínio de componentes como ribossomos, RNA mensageiro e alterações em nível de transcrição e tradução com o envelhecimento das sementes. Sendo assim, os testes mais sensíveis para determinar o estágio de deterioração são aqueles que medem a atividade de certas enzimas associadas com a quebra das reservas ou a biossíntese de tecidos novos (VIEIRA, 2002).

Um grande avanço na área da bioquímica, nos últimos anos, foi possível pelo uso da eletroforese de proteínas (BARROS, 1991; GOTTLIEB, 1977). A eletroforese é um processo de difusão forçada, num campo elétrico, por meio de

um meio suporte, em que uma corrente contínua é empregada para separar as isoenzimas (diferentes formas moleculares de uma mesma enzima), com base nos efeitos de peneiramento molecular e diferenças de cargas eletrostáticas (BREWER; SING, 1970; PASTEUR et al., 1988; TANKSLEY; ORTON, 1983).

O procedimento eletroforético tornou-se um poderoso instrumento na separação e identificação de enzimas, quando foi combinado, por Hunter e Markert (1957), com o uso de corantes, o que permitiu a identificação de enzimas particulares entre inúmeras que possam estar presentes em um extrato de semente (BARROS, 1991).

O monitoramento da deterioração de sementes pode ser feito por meio da avaliação de perfis de proteínas e enzimas relacionadas ao processo respiratório, à peroxidação de lipídios, à remoção de radicais livres e à resistência ao calor. Sendo assim, enzimas como álcool desidrogenase, malato desidrogenase, catalase, superóxido dismutase, peroxidase, esterase, bem como proteínas resistentes ao calor têm sido usadas frequentemente como marcadores da qualidade fisiológica (ALBUQUERQUE et al., 2009; COUTINHO et al., 2007; MUNIZ et al., 2007; SPINOLA; CÍCERO; MELO, 2000; VIDIGAL et al., 2009).

Malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH) são enzimas envolvidas no processo de respiração. A ADH reduz acetaldeído para etanol no metabolismo anaeróbico. Quando a atividade da ADH diminui, a semente fica mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído (ZHANG et al., 1994). A MDH catalisa a conversão de malato à oxalacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento do malato por meio da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Camargo et al. (2000) observaram que o envelhecimento artificial, induzido por alta temperatura e umidade relativa de 100%, em sementes de

eucalipto, proporcionaram um aumento nas atividades da malato desidrogenase e nas isoenzimas α -amilase 2 e 3, diminuição acentuada da atividade da α -amilase 1 e atividade baixa para a fosfatase ácida.

A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres. Esse grande grupo de enzimas hidrolíticas libera ácidos graxos dos lipídeos, que são usados na oxidação como fonte de energia para a germinação. Enquanto muitos desses lipídeos são provenientes de lipossomos, alguns são constituintes de membranas, cuja degradação aumenta com a deterioração. Avaliando a atividade da esterase, durante a deterioração de sementes de amendoim, Aung e McDonald (1995) observaram decréscimo na sua atividade total, com o aumento de deterioração tanto em sementes embebidas como não embebidas. Menezes (2005), estudando diferentes níveis de qualidade fisiológica de cultivares de milho observaram que padrões isoenzimáticos de esterase apresentam-se polimórficos.

As sementes também possuem um aparato bioquímico de proteção contra agentes oxidantes. Embora o oxigênio seja necessário para as reações metabólicas das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994), esse elemento possui alto poder oxidante e forma espécies altamente reativas nas células, a exemplo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (CONTRERAS-PORCIA et al., 2010; FARRANT; BRANDT; LINDSEY, 2007).

Durante a dessecação das sementes, observa-se um acúmulo desses compostos e de radicais livres nas células (NTULI et al., 2011), como produto da ruptura de plastídios e da cadeia de transporte de elétrons presente nas mitocôndrias (FERREIRA; ABREU, 2007). Esses compostos podem causar danos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando danos permanentes em enzimas, cromossomos e membranas.

Esses danos oxidativos podem ser minimizados pela ação de enzimas removedoras de radicais livres, como a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase, que integram o sistema de defesa antioxidante presente em sementes ortodoxas, como o milho (KRANNER; BIRTIC, 2005; SPANÒ et al., 2011). A superóxido dismutase realiza a dismutação do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas catalase e peroxidase, por sua vez, promovem a conversão do H_2O_2 a água e oxigênio molecular, ambos não danosos às células (MITTLER, 2002).

Dentre as alterações bioquímicas mais importantes para estudos envolvendo secagem, maturação e dessecação, estão as proteínas resistentes ao calor. Essas proteínas têm o seu maior acúmulo na fase final do processo de maturação das sementes e conferem, dentre outras coisas, tolerância à dessecação e a altas temperaturas (CHE et al., 2006; ROSA et al., 2005).

2.2.3 Análise da atividade respiratória

Dentre os vários procedimentos utilizados na determinação do vigor, uma das alternativas seria a medição da atividade respiratória das sementes em laboratório. Esse procedimento não é comum, mas pode se tornar uma importante ferramenta de auxílio à tomada de decisões sobre a qualidade de um lote de sementes (MENDES et al., 2009).

A respiração é a oxidação completa de compostos de carbono a CO_2 e água, por meio de uma série de reações, usando oxigênio comoceptor final de elétrons. Sucintamente, é a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia e compostos secundários. A energia é liberada e conservada na forma de ATP, o qual pode ser prontamente utilizado para a manutenção e o desenvolvimento da planta ou da semente (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os substratos respiratórios podem ser carboidratos como amido, sacarose, frutose, glicose e

outros açúcares; lipídios; ácidos orgânicos e proteínas (MARENCO; LOPES, 2007).

Entre os fatores do ambiente, a água é o fator que mais influencia o processo de germinação. Com a absorção de água, por embebição, ocorre a reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário.

Piña-Rodrigues, Figliolia e Peixoto (2004) relatam que a primeira atividade metabólica das sementes, logo após a reidratação, é a respiração. De quase nula, ela passa a valores elevados em relativamente pouco tempo, dependendo da espécie. A atividade e integridade das mitocôndrias de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, tornando mais eficiente a produção de Adenosina trifosfato (ATP – forma de armazenamento de energia), refletindo a elevação do consumo de oxigênio e conseqüentemente maior liberação de CO₂ (BEWLEY; BLACK, 1994).

A respiração, a atividade de enzimas e de organelas e a síntese de proteínas são eventos fundamentais para o desenvolvimento normal do processo de germinação e preparo para o crescimento subsequente do embrião. Importantes macromoléculas, como DNA e RNA, proteínas, lipídios, clorofilas, carotenoides e fitormônios, são formadas por esqueletos carbonados derivados da via respiratória. Para a síntese desses novos materiais indispensáveis ao crescimento, são necessárias também substâncias de alto poder redutor (NADH, FADH₂) e elevado conteúdo energético (ATP). Portanto, nem todo carbono contido no substrato respiratório é liberado na forma de CO₂, e nem todos os elétrons contidos nos nucleotídeos reduzidos (NADH, FADH₂) se combinarão com O₂ para produzir H₂O (MARENCO; LOPES, 2007).

A velocidade respiratória da semente é influenciada pelo seu teor de água, pela temperatura, pela permeabilidade das membranas, pela tensão de oxigênio e gás carbônico e pela luz. O aumento da atividade respiratória da semente pode ser avaliado pela quantidade de gás carbônico liberado e pela quantidade de oxigênio consumido (POPINIGIS, 1977).

Métodos para a medição da respiração estão relacionados com a perda de massa seca e/ou com trocas gasosas. No entanto, medir a variação de massa seca das sementes requer grande quantidade de material e implica na sua destruição (MARENCO; LOPES, 2007). Já os métodos baseados em trocas gasosas requerem menos materiais e não são destrutivos.

Os métodos mais utilizados, baseados em trocas gasosas, são o respirômetro de Warburg e o eletrodo de Clark, que consistem na medição manométrica do O₂ consumido, o analisador de gás infravermelho (IRGA) e os métodos físico-químicos que se baseiam na retenção de CO₂ em uma base e em sua determinação por titulometria, colorimetria ou condutivimetria (MAESTRI; ALVIM; SILVA, 1998). Além, claro, de aparelhos mais modernos com sensores eletroquímicos que fazem a leitura de forma rápida e precisa.

Algumas pesquisas relacionando atividade respiratória de sementes com germinação, lixiviação mineral, armazenamento e deterioração já foram feitas em milho (CANTRELL; HODGES; KEIM, 1972), soja (DODE et al., 2013; FERGUSON; TEKRONY; EGLI, 1990; MENDES et al., 2009), algodão (WOODSTOCK; FURMAN; LEFFLER, 1985) e girassol (DODE et al., 2012).

2.2.4 Análise ultraestrutural

Além dos testes mencionados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, a análise ultraestrutural da semente também têm se mostrado bastante promissora uma vez que por meio dessa análise a deterioração das

sementes pode ser analisada no início do processo. A avaliação da estrutura física da semente e/ou do embrião por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) também constitui uma ferramenta importante para enriquecer os resultados de pesquisas de várias áreas do conhecimento.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento da microscopia eletrônica estão intimamente associados ao progresso alcançado pela Biologia, nos últimos 100 anos. O microscópio eletrônico possibilitou a observação direta de aspectos ultra-estruturais das células até então desconhecidos. Como resultado dessas novas observações, nossa compreensão sobre a organização dos tecidos vegetais e animais foi enormemente ampliada, e muitas das nossas ideias a respeito da construção e função celulares foram radicalmente alteradas (GALLETI, 2003).

Com o auxílio da MEV, é possível obter uma imagem direta dos átomos na superfície de um material, formada por elétrons secundários e emitida da superfície de espécime irradiada pelo feixe de elétrons primários ou pelos re-espalhados (GALLETI, 2003).

O MEV destina-se basicamente ao exame de superfície das amostras, podendo-se ver superfícies internas, se fraturadas e expostas, utilizando-se, principalmente, elétrons secundários. Por meio desta técnica, podem-se visualizar estruturas de células, estrutura de tegumentos de sementes e seus embriões e pericarpos, assim como as de patógenos em sementes (ALVES, 2006).

Berjak e Pammanter (2000) discorrem sobre a importância das membranas das organelas celulares, do citoesqueleto e do núcleo esquelético para o perfeito funcionamento da célula, e completam que danos nessas estruturas durante a secagem podem levar à perda de viabilidade.

Algumas pesquisas têm correlacionado as análises ultraestruturais com qualidade de sementes e grãos de diversas espécies: café (BORÉM; MARQUES; ALVES, 2008; SAATH et al., 2010), milho (CARVALHO et al., 1999;

GUNASEKARAN et al., 1985) soja (SILVA et al., 2007) comprovando sua utilidade como um eficiente teste complementar.

2.3 Retardamento da secagem

Sementes de milho são colhidas em espiga com alto teor de água, necessitando iniciar rapidamente a secagem artificial antes do beneficiamento para evitar um consumo antecipado de reservas, o que provoca um desgaste fisiológico e conseqüentemente expressa baixos índices de germinação e vigor.

Contudo, nas usinas de beneficiamento, essa rapidez nem sempre é observada, havendo um tempo de espera até iniciar o processo de secagem por falta de estrutura ou planejamento, ou mesmo por imprevistos durante a produção, o que caracteriza o retardamento de secagem (BORBA et al., 1998; SILVA FILHO, 1997). Além disso, filas de caminhões com sementes com alto teor de água sob lona e a incidência de sol intenso, proporcionam um aumento da temperatura até valores extremamente altos, tornando o ambiente inadequado para armazenagem, mesmo que por poucas horas (RANGEL; SILVA; NERIS, 2003).

As sementes são colhidas no ponto de maturidade fisiológica (PMF), que para a maioria das cultivares de milho se dá em torno de 35%. Para Rosa et al. (2004) as sementes de milho podem ser colhidas com até 42% de umidade desde que pré-condicionadas a pré-secagem de 35 °C até atingirem valores de umidade entre 25,3 e 28,5%, o que as torna tolerantes às temperaturas altas de secagem.

Sabe-se, também, que a umidade e a temperatura estão entre os fatores que mais influenciam a qualidade fisiológica da semente, tanto no campo, quanto no transporte ou durante o armazenamento tendo influência sobre os processos biológicos nas sementes, entre eles acelerando a respiração, e sobre a

atividade biológica dos organismos associados, como insetos e fungos, aumentando a deterioração da semente (CAMARGO; CARVALHO, 2008; MARTINS; LAGO, 2008; SILVA et al., 2010). Para a maioria das espécies, a velocidade de deterioração da semente aumenta à medida que aumenta o seu grau de umidade.

Andrigueto (1975) e Valle (1978) trabalhando com sementes de trigo e com arroz, respectivamente, constataram que o retardamento da secagem afetava adversamente a qualidade das sementes e que este efeito é tanto maior quanto mais alta a umidade inicial.

As informações a respeito dos efeitos do retardamento de secagem na qualidade fisiológica de sementes ainda são raras e, por vezes, antigas. Nos trabalhos encontrados com sementes de milho foram analisadas as consequências da espera pela secagem em vários períodos e com diferentes umidades de colheita (BORBA et al., 1998; MUÑOZ; ARBOLEDA, 1976; RANGEL; SILVA; NERIS, 2003; SCARANARI, 1997; STEELE; SAUL; HUKILL, 1969), mas não estudaram variações de temperatura em que estas sementes podem ser submetidas, nem foram avaliadas alterações isoenzimáticas ou bioquímicas.

Steele, Saul e Hukill (1969) verificaram, em sementes de milho com teor de água de 25%, temperatura ambiente de 23,9 °C, e dano mecânico de 30%, um período permissível de armazenamento de cinco dias (120 horas). Muñoz e Arboleda (1976) verificaram que sementes colhidas com teores de água de 43 e 37% não tiveram prejuízos sobre a viabilidade das sementes quando retardaram o processo de secagem por períodos de 0 até 3 dias.

Scaranari (1997), estudando sementes de milho da cultivar BR 3123 colhidas com 35% de umidade e tendo sua secagem retardada de 0 a 120 horas, à temperatura ambiente, concluiu que não houve alteração na qualidade fisiológica das sementes por até 6 meses de armazenamento.

Já Borba et al. (1998), trabalhando com colheita de sementes a granel com 16 e 21% de umidade, estudaram os efeitos do retardamento da secagem por períodos entre 0 e 156 horas e concluíram que, para a germinação, a secagem pode ser retardada por um período de 156 e 85 horas, para teores de água das sementes de 16 e 21%, respectivamente. Com relação ao vigor, a redução foi linear, evidenciando que quanto maior a espera pela secagem, maiores as perdas ocasionadas.

Rangel, Silva e Neris (2003) retardaram a secagem de sementes de milho por 0, 48, 96 e 144 horas sob condições ambientais não controladas e verificaram que houve prejuízos imediatos à qualidade fisiológica das sementes, com a porcentagem de germinação sendo menor quanto maior foi o período de espera pela secagem.

Estudos semelhantes foram realizados recentemente em outras culturas, demonstrando a importância do tema. Eichelberger et al. (2003) pesquisaram os efeitos do retardamento da secagem em sementes de azevém anual e Torres (2006) estudou os efeitos sobre as sementes de sorgo sacarino, ambos constatando a influência significativa e negativa da umidade de colheita na qualidade fisiológica após o tempo de espera para a secagem.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os ensaios e avaliações foram conduzidos no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura, no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, do Departamento de Biologia, e no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Material utilizado

Foram utilizadas sementes da linhagem GNS25 do programa de melhoramento da empresa GENESEEDS RECURSOS GENÉTICOS LTDA. O campo de produção ficava localizado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG. A colheita iniciou no dia 08/02/12, no ponto em que as sementes apresentavam maior teor de água e finalizou no dia 07/03/12 no ponto mais tardio, quando as sementes estavam com menor teor de água.

As espigas foram colhidas manualmente quando as sementes apresentavam 48,0; 40,5; 34,2; 29,4 e 23,5% de umidade, sendo a umidade intermediária coincidente com o ponto de maturidade fisiológica da cultura (FESSEL et al., 2001). Os pontos de colheitas foram espaçados em uma semana, para haver uma queda significativa de umidade das sementes. Essa colheita era realizada no início da manhã, entre 6 e 7 horas, período que apresentava temperaturas amenas para não interferir nos tratamentos.

Após cada colheita, as sementes foram armazenadas em ambientes com ausência de luz e de ventilação, simulando uma caçamba de caminhão, sob três

temperaturas: 20, 40 e 60 °C por 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Salienta-se que o tempo de 0 hora foi considerado como tratamento testemunha.

Após cada período de retardamento, as espigas foram despalhadas manualmente e colocadas em secador a 35 °C até atingirem 13% de umidade. Vale ressaltar que essa temperatura é ideal para a cultura e conseqüentemente não provoca danos durante a secagem (ROSA et al., 2004). Em seguida, as sementes foram debulhadas manualmente e armazenadas em câmara fria, a 10 °C, até o início dos testes.

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA. A qualidade das sementes foi avaliada pelos seguintes testes e determinações:

3.3 Variáveis avaliadas

Teor de água

Realizada pelo método da estufa, a 105 °C por 24 horas, com duas repetições de 15 g por tratamento, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem com base no peso úmido.

Germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, semeadas em rolo de papel tipo germitest, umedecido com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato, mantidas em germinador a 25 °C, realizando-se a contagem de plântulas normais (BRASIL, 2009) no sétimo dia após a semeadura, sendo o resultado expresso em porcentagem.

Emergência

A semeadura foi realizada em canteiro contendo terra: areia (1:2 v/v), utilizando-se três repetições de 50 sementes por tratamento e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais ao 14º dia. Durante o teste de emergência, foi realizado o **índice de velocidade de emergência**, computando-se diariamente o número de plântulas emergidas (MAGUIRE, 1962).

Teste de Frio

Realizado com quatro subamostras de 50 sementes distribuídas em caixas plásticas contendo mistura de areia e terra recentemente cultivada com milho, na proporção de 2:1 e umidade ajustada para 70% da capacidade de retenção; as caixas foram mantidas a 10 °C, em câmara fria, por sete dias e, então, transferidas para câmaras de crescimento a 25 °C onde foram avaliadas as plântulas normais emergidas no sétimo dia (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999).

Análises isoenzimáticas

Realizadas com sementes colhidas com 48; 34,2 e 23,5% de umidade e submetidas ao retardamento da secagem por 0, 6, 24 e 48h sob 20 e 60 °C (tratamentos escolhidos por representarem pontos extremos do experimento).

Subamostras de 100 mg do material macerado com PVP, foram acrescidas de 250 µl do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0) e 0,1% de β-mercaptoetanol. O material foi colocado em geladeira por 12 horas e depois centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos aos 4 °C. A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontinuo (7,5% gel de separação

e 4,5% gel de concentração). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8.9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados na canaleta do gel 50 µL do sobrenadante e a corrida realizada aos 4 °C, a 150 V, por 4 horas. Ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas **esterase, malato desidrogenase, álcool desidrogenase, catalase, peroxidase e superóxido dismutase** conforme Alfenas (2006).

Proteínas resistentes ao calor

Realizou-se pelo método NATIVA-PAGE com extração de 100 mg de sementes macerados em 1 mL de tampão de extração (50 mM de Tris-HCl pH 7,5; 500 mM de NaCl; 5 mM de MgCl₂ ; 1 mM de PMSF); as amostras foram centrifugadas a 16000 xg por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante incubado em banho-Maria a 85 °C por 15 minutos e novamente centrifugado como anteriormente; o sobrenadante foi vertido em tubos novos; antes da aplicação no gel, 40 µL de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg de azul de Bromofenol; Tris-HCl pH 7,5) foram adicionados em 70µL de cada extrato, seguindo-se uma incubação em banho-Maria com água em ebulição por cinco minutos; em seguida foram aplicados 50 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador); o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, à temperatura ambiente e voltagem constante de 150V por quatro horas; após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descorados em solução de etanol 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (2006); a avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a variação de intensidade das bandas.

Análise ultraestrutural

Realizada com sementes colhidas com 48; 34,2 e 23,5% de umidade e submetidas ao retardamento da secagem por 0h (testemunha) e 48h sob 60 °C (tratamentos escolhidos por representarem pontos extremos do experimento).

As sementes de milho foram embebidas por 3 horas em água destilada e os eixos embrionários extraídos e imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificada - glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de Na 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M), por 24 horas. Em seguida foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M por três vezes, durante 10 minutos. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% por uma hora.

Após esse período, foram feitas lavagens com água destilada e desidratação em gradiente de acetona a 25%, 50%, 75%, 90% e 100%, permanecendo cerca de 10 min em cada. As amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico, onde foi eliminado todo o resíduo de acetona, para posterior montagem em stubs sob fita de carbono e revestimento com ouro.

A visualização das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo40, com posterior digitalização.

Atividade respiratória

Realizadas com sementes colhidas com 48; 34,2 e 23,5% de umidade e submetidas ao retardamento da secagem por 0, 6, 24 e 48h sob 20 e 60 °C (tratamentos escolhidos por representarem pontos extremos do experimento).

Em cada repetição, utilizaram-se 15 sementes de cada tratamento, previamente embebidas durante 30 min, colocadas em tubos tipo falcon com uma abertura na tampa vedada com boracha específica, impedindo trocas gasosas com o ambiente, mas permitindo a entrada da agulha para retirada do ar

e posterior leitura de CO₂ e O₂. O aparelho PBI – Dansensor CHECKPOINT O₂/CO₂ funciona com um leitor eletroquímico que absorve aproximadamente 15 mL da atmosfera da amostra e instantaneamente faz a leitura da quantidade de CO₂ e O₂ em porcentagem.

Esses valores foram, posteriormente, divididos pela massa de sementes presente no tubo, e pelo tempo desde o lacramento até a leitura final (8 horas). Calculando-se a respiração da massa de sementes em um determinado período de tempo.

3.4 Análise estatística

Foram realizadas as análises de variâncias, de acordo com um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5x3x6, sendo cinco pontos de colheita, três temperaturas e seis tempos de retardamento da secagem, seguidas pelas análises de regressão.

Para a atividade respiratória, foram realizadas análises de variância, de acordo com um DIC, em um fatorial 3x2x4, sendo três pontos de colheita, duas temperaturas e quatro tempos de espera pela secagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos testes de viabilidade e vigor

Na figura 1, verifica-se que a porcentagem de germinação não foi afetada quando o retardamento da secagem foi realizado em temperaturas mais amenas (20 e 40 °C) com umidades de colheita abaixo de 40,5% (Figuras 1B, 1C, 1D e 1E), ou seja, as sementes podem permanecer nessas temperaturas por até 48 horas sem prejuízos na viabilidade.

Contudo, quando as sementes foram colhidas com alta umidade (48%) ocorreram alterações na capacidade germinativa de acordo com o tempo de retardamento da secagem (Figura 1A). Até aproximadamente 12 horas, o retardamento da secagem sob temperaturas de 20 e 40 °C se mostrou benéfico, aumentando a capacidade germinativa das sementes, fato também encontrado em outros trabalhos (ROSA et al., 2004, 2005). Após esse período, houve uma tendência de queda na germinação.

Verificou-se, entretanto, perda significativa da viabilidade quando as sementes foram acondicionadas a 60 °C em todas as umidades de colheita (FIGURAS 1A, 1B, 1C, 1D E 1E). Nessa temperatura, a deterioração e a respiração são aceleradas, com conseqüente consumo de reservas, além de desnaturação de proteínas e alterações isoenzimáticas provocando reduções na qualidade fisiológica (RANGEL; SILVA; NERIS, 2003).

A linha vermelha (Figura 1) representa 70% de germinação, que é o padrão mínimo para linhagens exigido pelo Governo Federal (BRASIL, 2005). Salienta-se que, no controle interno das empresas produtoras de sementes, a exigência é maior, sendo considerado baixo 70% de germinação.

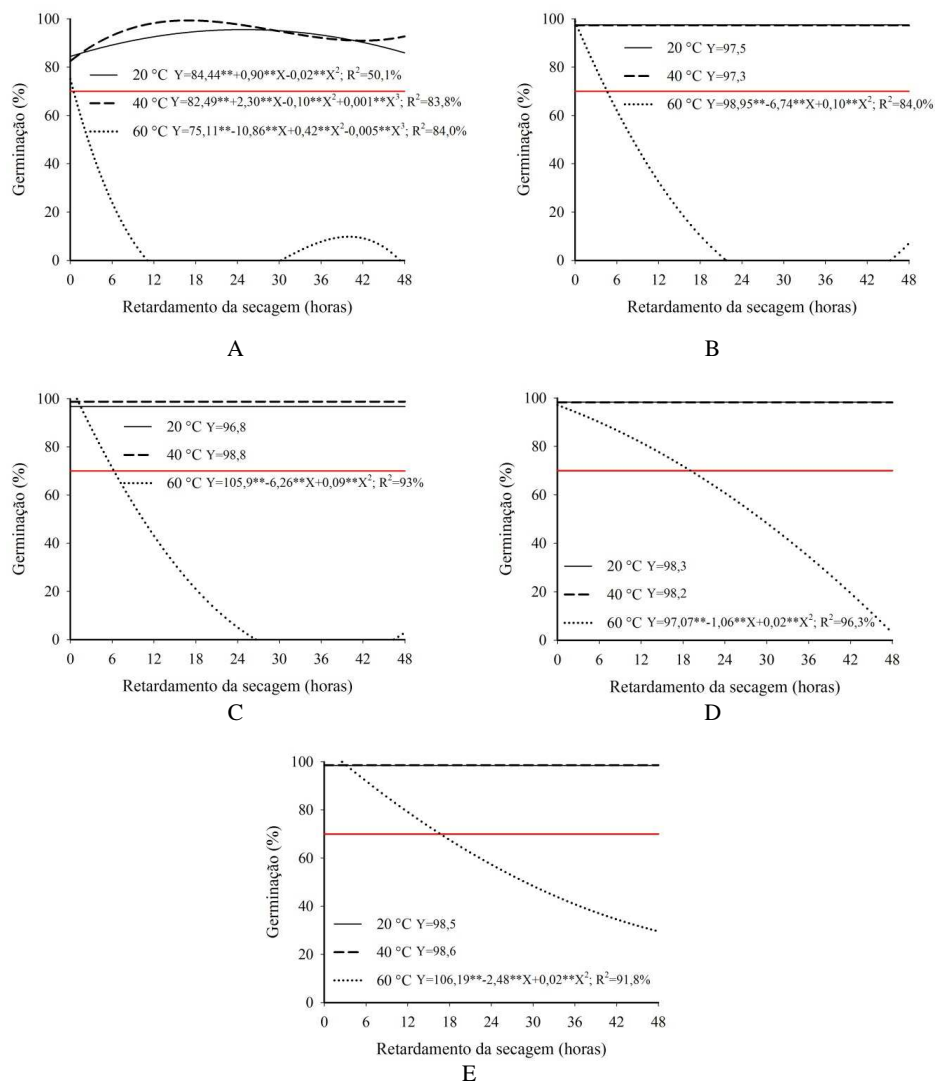


Figura 1 Porcentagem de germinação de sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48% (A), 40,5% (B), 34,2 (C), 29,4% (D) e 23,5% (E) de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem sob três temperaturas. A linha vermelha representa 70% de germinação.

No ponto de colheita mais úmido, a germinação das sementes ficou abaixo do padrão antes de 1 hora de espera pela secagem sob 60 °C (Figura 1A). Nos pontos de colheita de 40,5 e 34,2% de umidade, as sementes podem ficar sob 60 °C por até, aproximadamente, 6 horas, sem atingir valores de germinação abaixo da exigência legal (Figuras 1B e 1C). A tolerância a altas temperaturas foi encontrada somente quando a colheita foi realizada com menores graus de umidade, sendo que as sementes colhidas com 29,4 e 23,5% de umidade podem permanecer até 18 horas nessa temperatura sem atingir valores abaixo do exigido para a comercialização (Figuras 1D e 1E).

Estudos realizados com diferentes metodologias de secagem corroboram com os resultados aqui apresentados concluindo que altas temperaturas são prejudiciais às sementes de milho, principalmente quando estas se encontram com alto teor de água (EICHOL; PERES, 2008; JORGE et al., 2005; JOSÉ et al., 2005; ROSA et al., 2004, 2005). A mesma relação entre umidade das sementes e o efeito danoso de altas temperaturas pode ser verificada, também, durante o retardamento da secagem.

No teste de emergência (Figura 2), o efeito do retardamento da secagem foi semelhante ao verificado para a porcentagem de germinação. Não houve variação quando o período de espera foi sob temperaturas de 20 e 40 °C, mantendo-se acima de 95% de emergência, com exceção da colheita mais úmida (48%) (Figura 2A). Nesse ponto, observa-se um aumento do vigor das sementes quando o retardamento da secagem se deu sob 40 °C por até, aproximadamente, 12 horas e, após isso, uma tendência de queda.

A 60 °C ocorreu redução na porcentagem de emergência ao longo dos períodos de espera antes da secagem, atingindo níveis muito baixos, chegando à nulidade antes de 30 horas nos pontos mais úmidos de colheita (Figuras 2A, 2B e 2C). Nos pontos de colheita mais tardios (29,4 e 23,5% de umidade), houve

maior tolerância à alta temperatura, observando-se, entretanto, perdas significativas (Figuras 2D e 2E).

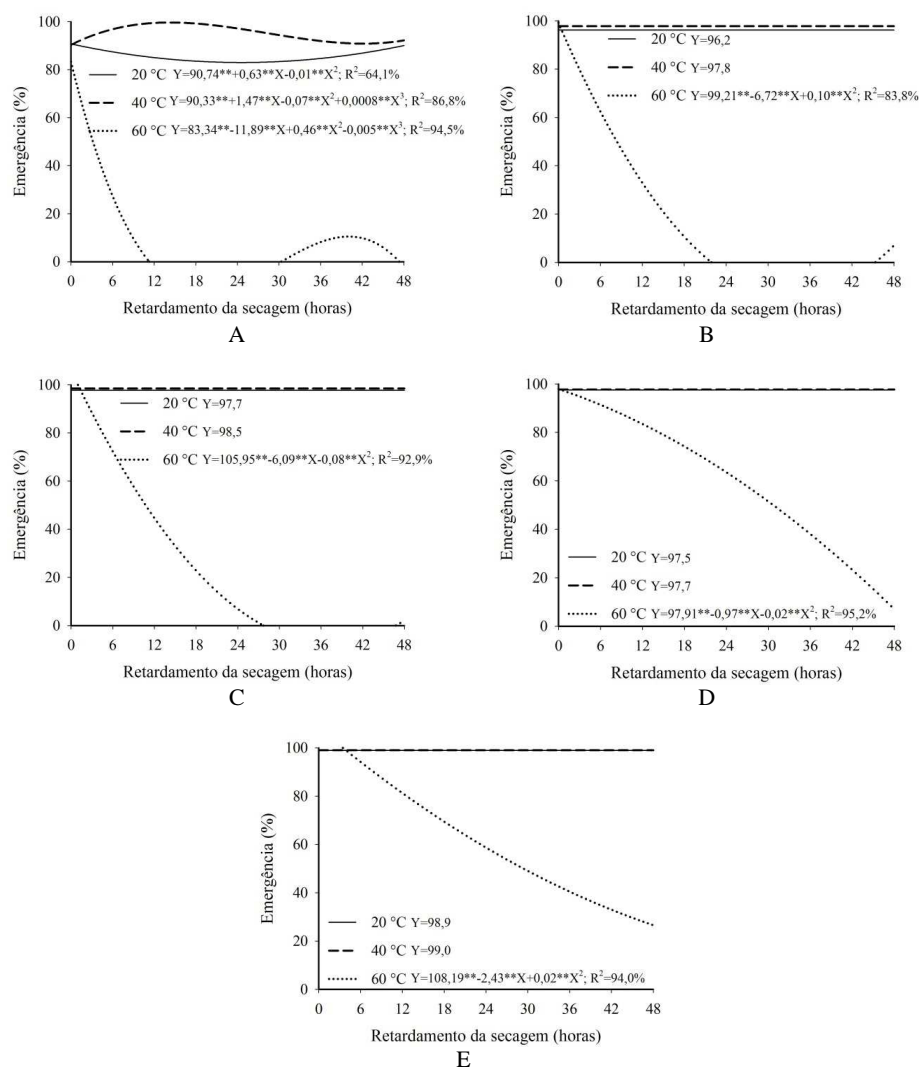


Figura 2 Porcentagem de emergência de sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48% (A), 40,5% (B), 34,2 (C), 29,4% (D) e 23,5% (E) de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem sob três temperaturas.

A mesma tendência foi observada para os índices de velocidade de emergência (Figura 3) nos quais se verificou uma perda significativa do vigor das sementes somente quando o retardamento da secagem ocorreu sob temperatura de 60 °C, com rápido declínio do índice de velocidade de emergência.

Em temperaturas mais baixas (20 e 40 °C), o índice de velocidade de emergência não foi comprometido com o retardamento da secagem, atingindo valores entre 8 e 10, aproximadamente.

Vale ressaltar a relação existente entre emergência em canteiro e o índice de velocidade de emergência (IVE). O resultado da emergência se refletiu no IVE, mostrando sementes vigorosas com emergência rápida, mesmo sob condições adversas, o que também pode ser encontrado em vários outros trabalhos (COAN et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2012; FREITAS et al., 2002; TORRES, 1998).

Já no teste de frio, a perda do vigor foi mais bem evidenciada (Figura 4). Em geral, nos três pontos de colheita mais úmidos, 48, 40,5 e 34,2% de teor de água (Figuras 4A, 4B e 4C), observou-se tendência de redução no vigor das sementes nas três temperaturas estudadas. Somente nos dois últimos pontos de colheita, com 29,4 e 23,5% de umidade (Figuras 4D e 4E), a emergência após o teste de frio se manteve constante e alta em sementes que permaneceram sob temperaturas amenas (20 e 40 °C) durante o retardamento da secagem.

Com estes resultados, evidencia-se a necessidade de rápido início da secagem artificial para evitar perdas, principalmente quando a colheita for com sementes com teor de água superior a 34,2% de umidade. Verificou-se que a emergência após o estresse por frio é tanto menor quanto maior for a umidade de colheita das sementes e maiores os períodos de retardamento da secagem.

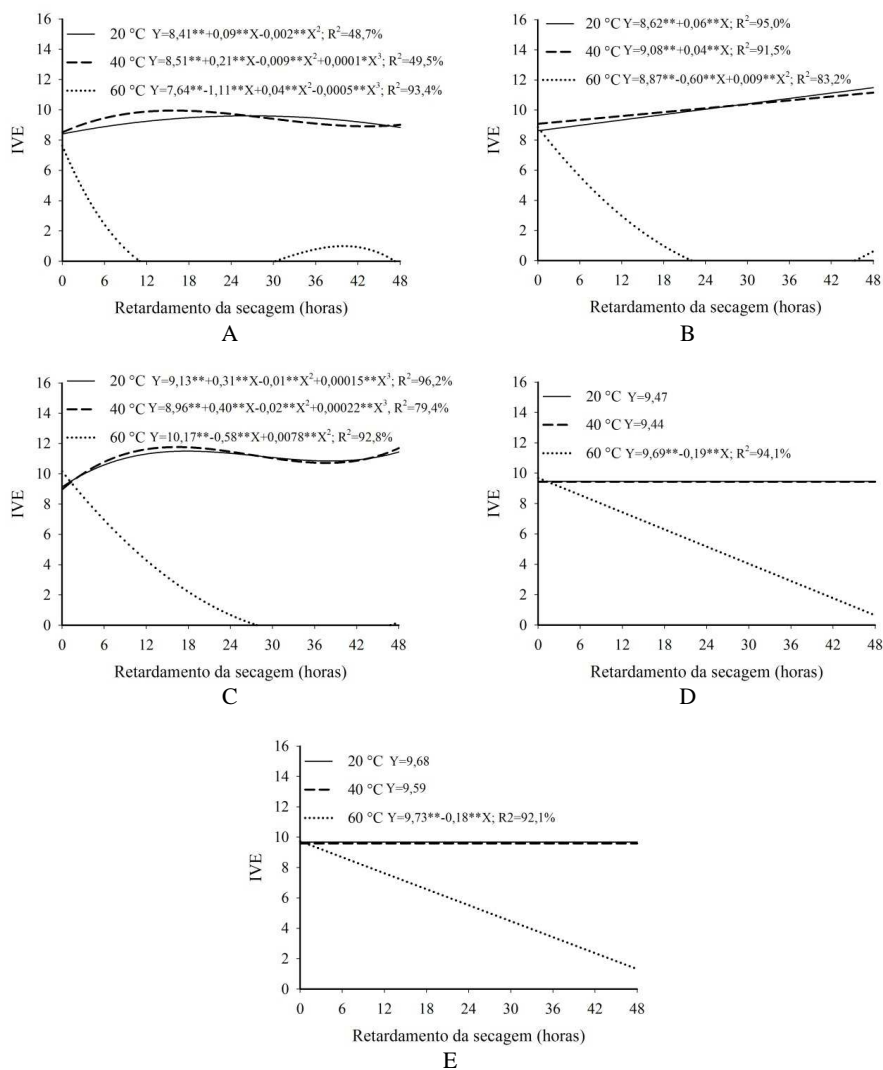


Figura 3 Índice de velocidade de emergência de sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48% (A), 40,5% (B), 34,2 (C), 29,4% (D) e 23,5% (E) de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem sob três temperaturas.

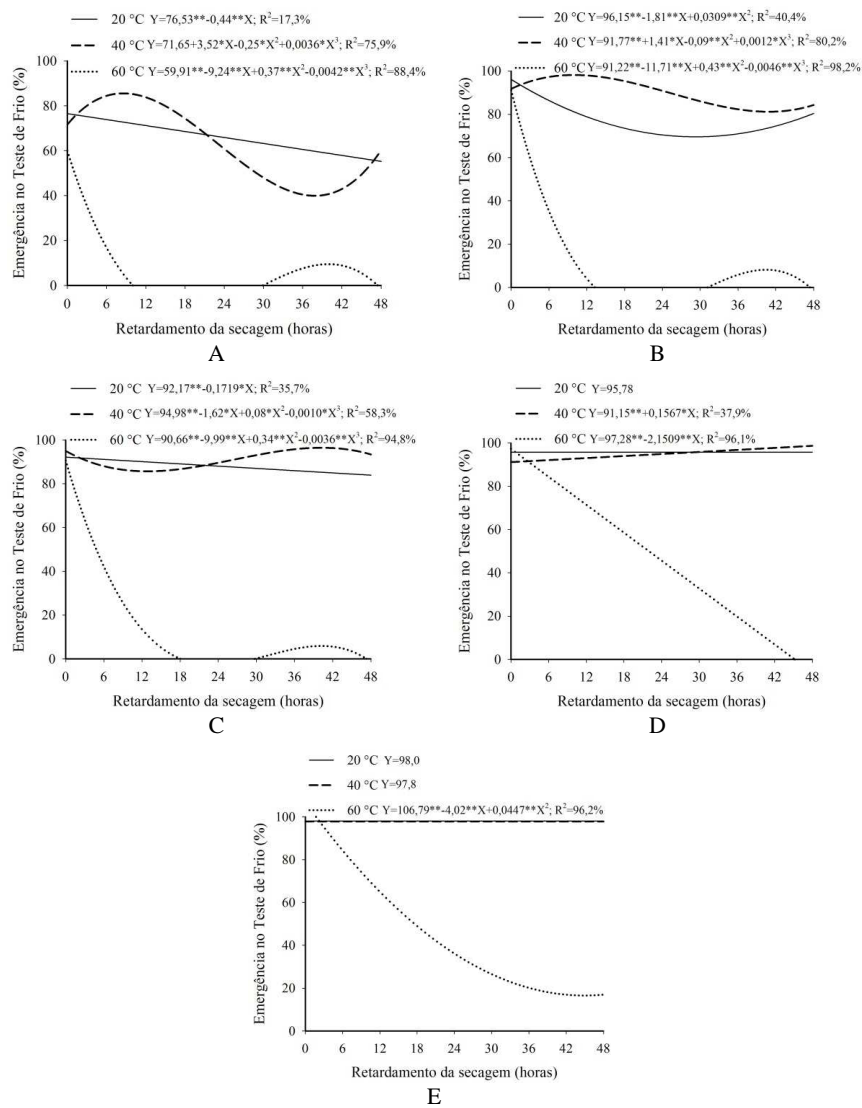


Figura 4 Teste de frio de sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48% (A), 40,5% (B), 34,2 (C), 29,4% (D) e 23,5% (E) de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem sob três temperaturas.

Muñoz e Arboleda (1976) verificaram que a viabilidade de sementes de milho colhidas com teores de água de 43 e 37% não sofre prejuízos quando houve o retardamento do processo de secagem por períodos de 0 até 3 dias. Resultado este que corrobora com esta pesquisa se a espera pela secagem tiver sido feita sob temperaturas amenas, fato não especificado no trabalho.

Já Borba et al. (1998), trabalhando com colheita de sementes a granel com 16 e 21% de umidade, estudaram os efeitos do retardamento da secagem por períodos entre 0 e 156 horas e concluíram que, para a germinação, a secagem pode ser retardada por um período de 156 e 85 horas, para teores de água das sementes de 16 e 21%, respectivamente. Com relação ao vigor, a redução foi linear, evidenciando que quanto maior a espera pela secagem, maiores são as perdas ocasionadas. Corroborando com os resultados de que quanto maior a umidade de colheita, menor a tolerância a estresses causados pelo retardamento da secagem.

Scaranari (1997), estudando sementes de milho da cultivar BR 3123 colhidas com 35% de umidade e tendo sua secagem retardada de 0 a 120 horas, à temperatura ambiente, concluiu que não houve alteração na qualidade fisiológica das sementes por até 6 meses de armazenamento. Fato devido, provavelmente, à temperatura ambiente não ter sido alta.

Em trabalhos similares com outras espécies, Eichelberger et al. (2003) e Torres (2006) trabalhando com sementes de azevém anual e sorgo granífero, respectivamente, constataram que o retardamento da secagem afetava adversamente a qualidade das sementes e que este efeito era tanto maior quanto mais altos forem a umidade inicial e o tempo de espera, corroborando claramente com os resultados obtidos nesta pesquisa.

4.2 Análise isoenzimática

Verificou-se que sementes mais vigorosas foram obtidas quando as sementes foram colhidas com menores teores de água. Esse fato provavelmente se deve ao estágio mais avançado de maturação das sementes e à sua maior tolerância a altas temperaturas, fato intrinsecamente relacionado com o acúmulo de proteínas resistentes ao calor, que acontece no final da maturação das sementes (CHE et al., 2006; ROSA et al., 2005).

Esse acúmulo foi evidenciado pela análise eletroforética das proteínas resistentes ao calor (Figura 5). A análise foi feita em três pontos de umidade de colheita, 48, 34,2 e 23,5%, sendo os pontos extremos (mais úmido e mais seco) e o intermediário, o qual corresponde ao ponto de maturidade fisiológica de sementes de milho, de acordo com Fessel et al. (2001).

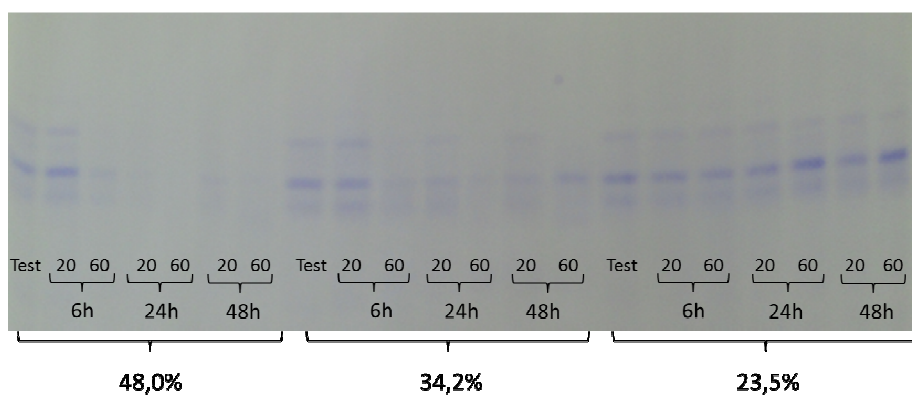


Figura 5 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48, 34,2 e 23,5% de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem por 6, 24 e 48 horas sob as temperaturas de 20 e 60 °C. Testemunha representa sementes não submetidas ao retardamento da secagem.

Verificou-se que a intensidade das bandas aumentou ao longo da maturação das sementes. Quando as sementes foram colhidas com 48% de

umidade, não há expressão dessas proteínas, com exceção dos tratamentos testemunha (0 hora) e 6 horas sob 20 °C. Este último ajuda a explicar o ganho de viabilidade com o retardamento da secagem por até 12 horas, sob temperaturas amenas, quando as sementes foram colhidas com alta umidade (48%), como visto no teste de germinação (FIGURA 1).

No ponto de maturidade fisiológica (34,2% de umidade), há uma expressão intermediária dessas proteínas, o que confere uma maior tolerância a altas temperaturas. E no ponto de colheita mais tardio (23,5% de umidade) há o máximo de expressão dessas proteínas, explicando claramente o porquê dessas sementes serem mais tolerantes ao estresse por altas temperaturas, como pode ser verificado pelos testes de viabilidade e vigor supracomentados.

Pelos resultados, pode-se afirmar que este sistema proteico pode ser considerado como atuante mecanismo de proteção celular, principalmente sob altas temperaturas. Isso explica a maior qualidade fisiológica nos pontos de colheita com menor teor de água nas sementes, com o retardamento da secagem sob 60 °C.

Rosa et al. (2005) verificaram que mediante pré-condicionamento à baixa temperatura (35 °C), há condições propícias para a síntese dessas proteínas, induzindo tolerância à secagem sob temperaturas mais elevadas. Thomann et al. (1992), estudando o efeito de secagem lenta durante o desenvolvimento de sementes de milho, verificaram acúmulo de proteínas resistentes ao calor em fase correspondente à aquisição de tolerância à dessecação.

Além disso, a análise eletroforética de outros complexos enzimáticos pode corroborar para um maior esclarecimento dessa questão. O complexo enzimático antioxidante das sementes, responsável por impedir a ação deletéria de agentes oxidantes, a exemplo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (CONTRERAS-PORCIA et al.,

2010; FARRANT; BRANDT; LINDSEY, 2007), é representado neste trabalho pelas seguintes enzimas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PO). Vale ressaltar que o sistema de defesa antioxidante é mais expressivo em sementes ortodoxas, como o milho (KRANNER; BIRTIC, 2005; SPANÒ et al., 2011).

Durante a dessecação das sementes, observa-se um acúmulo desses compostos e de radicais livres nas células (NTULI et al., 2011). A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por realizar a dismutação do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), já as enzimas catalase e peroxidase, por sua vez, promovem a conversão do H_2O_2 a água e oxigênio molecular, ambos não danosos às células (MITTLER, 2002).

As enzimas SOD (Figura 6A) e CAT (Figura 6B) apresentaram resultados bem semelhantes. No ponto de colheita mais úmido, com 48% de umidade, houve expressão, mas em menor intensidade. Nos tratamentos de 24 e 48 h sob 60 °C praticamente não houve expressão dessas enzimas, provavelmente pela desnaturação causada pela alta temperatura. Isso ajuda a explicar a perda da viabilidade e vigor acentuada nas sementes desses tratamentos.

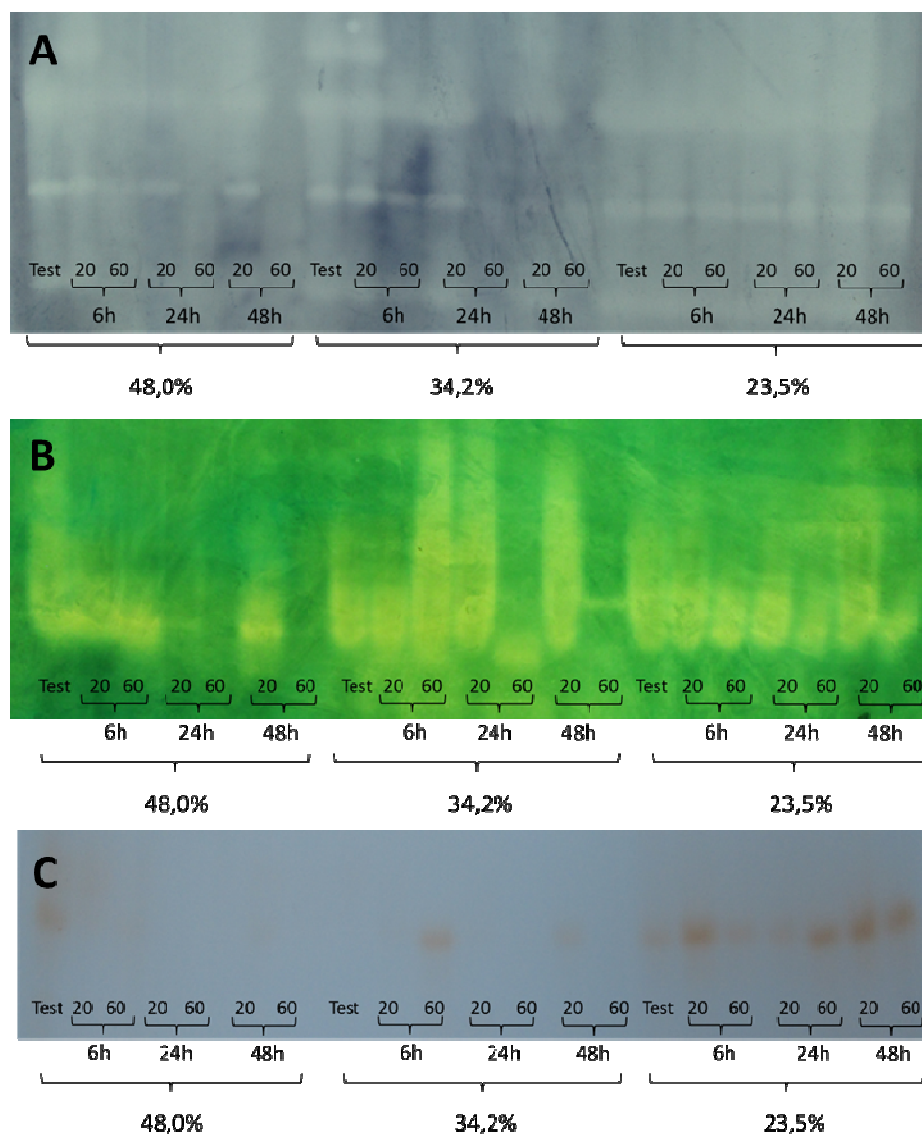


Figura 6 Padrão eletroforético das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e peroxidase (PO) (C) em sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48%, 34,2 e 23,5% de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem por 6, 24 e 48 horas sob as temperaturas de 20 e 60 °C. Testemunha representa sementes não submetidas ao retardamento da secagem.

A expressão dessas enzimas no ponto intermediário de umidade de colheita (34,2%) foi mais acentuada, devido ao estágio mais avançado de maturação dessas sementes, sendo que o aparato antioxidante está funcionando mais eficientemente se comparado ao ponto mais úmido de colheita. E os tratamentos de 24 e 48 h sob 60 °C também, praticamente, não apresentou bandas.

Já as sementes colhidas no ponto mais tardio (23,5%) apresentaram a maior intensidade de bandas das enzimas SOD e CAT, e isso em todos os tratamentos, inclusive os de maior estresse, de 24 e 48h sob 60 °C. Isso corrobora com o fato de que quanto mais tardia for a colheita, maior a tolerância a estresse por altas temperaturas verificada pelos testes de qualidade fisiológica, tanto de viabilidade quanto de vigor.

Bonome (2006) e Silva (2007) observaram um incremento da atividade da catalase em fases mais avançadas de deterioração em sementes de citrúmelo 'swingle' e seringueira, respectivamente. Já Bailly et al. (1996) e Jeng e Sung (1994) verificaram redução na atividade da catalase com o envelhecimento de sementes de amendoim e girassol. Rosa et al. (2005) verificaram que a tolerância de sementes de milho à temperatura de secagem (50 °C) também está associada à atividade da enzima catalase e pouco relacionada às atividades das enzimas peroxidase e superóxido dismutase, essas duas últimas mais relacionadas com o processo de deterioração.

Para a peroxidase (Figura 6C), a expressão foi mais contrastante. Os primeiros pontos de colheita (48 e 34,2% de umidade) praticamente não apresentaram atividades, significando a ausência dessa enzima no complexo antioxidante. Já no ponto de colheita mais seco (23,5% de umidade), a expressão foi visível e significativa, explicando a tolerância mais acentuada dessas sementes quando submetidas ao estresse.

Padrões eletroforéticos de enzimas relacionadas com o processo respiratório também são de grande valia como marcadores de qualidade fisiológica. Dentre as mais importantes estão a álcool desidrogenase (ADH) e a malato desidrogenase (MDH).

A ADH atua no metabolismo anaeróbico, em que o acetaldeído é reduzido a etanol (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005). Os produtos finais desse metabolismo fermentativo são tóxicos para as células, mas o etanol parece ser o produto do metabolismo fermentativo menos deletério comparado ao acetaldeído (ZHANG et al., 1994). Dessa forma, a álcool desidrogenase pode ser considerado um marcador de qualidade fisiológica, por sua baixa atividade representar um risco para a semente.

Verifica-se pela intensidade das bandas (Figura 7A), que no ponto de colheita mais úmido (48,0%), bem como no ponto intermediário (34,2%) houve presença das bandas em quase todos os tratamentos. Somente quando as sementes passaram por um período de retardamento de secagem maior que 24 horas a 60 °C, a expressão não foi encontrada, o que significa a ausência dessa enzima ou inativação por alta temperatura.

Esse resultado corrobora com Brandão Junior (1996), que observou uma diminuição da intensidade das bandas dessa enzima com o aumento do tempo de envelhecimento.

Já em sementes colhidas no ponto de colheita mais tardio (23,5%) observou-se a expressão em todos os tratamentos, indicando assim maior tolerância dessas sementes ao retardamento da secagem em altas temperaturas.

Em milho, essa enzima apresenta dois locos fortemente ligados (Adh1 e Adh2), os quais são muito estudados sob o aspecto de regulação da expressão gênica por terem função definida sob condições anaeróbicas (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995).

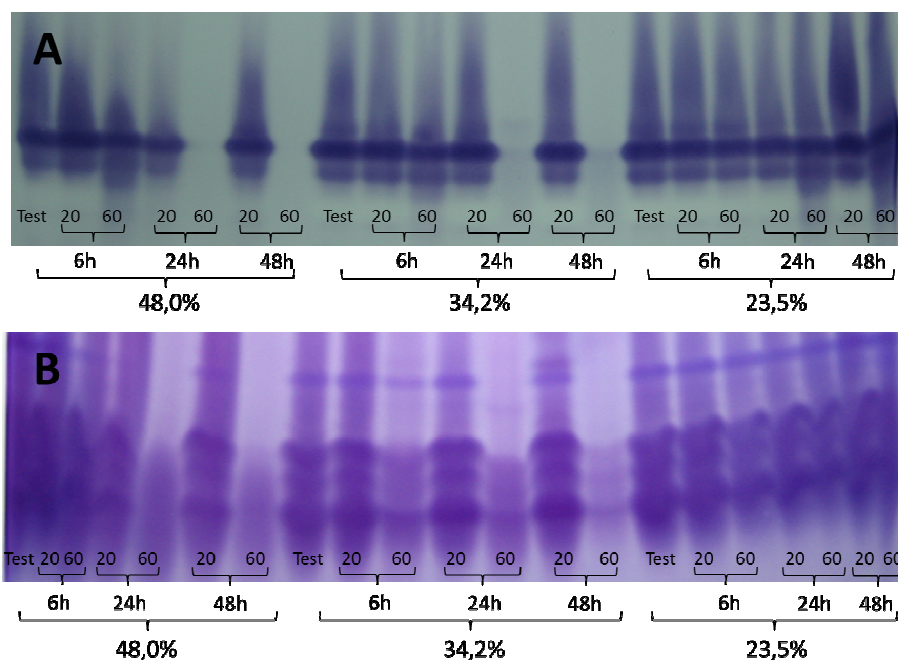


Figura 7 Padrão eletroforético das enzimas álcool desidrogenase (ADH) (A) e malato desidrogenase (MDH) (B) em sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48%, 34,2 e 23,5% de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem por 6, 24 e 48 horas sob as temperaturas de 20 e 60 °C. Testemunha representa sementes não submetidas ao retardamento da secagem.

A enzima malato desidrogenase é uma enzima do ciclo de Krebs que transforma o malato em oxaloacetato produzindo um NADH, o qual é utilizado para gerar energia. Desta forma esta enzima está ligada a geração de energia para processos metabólicos importantes como a germinação das sementes. Além disso, participa do movimento do malato por meio da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A análise da banda comum no padrão isoenzimático da MDH (Figura 7B) revelou o mesmo padrão da ADH, ou seja, não foram encontradas expressões dessa enzima quando as sementes colhidas com 48,0 e 34,2% de umidade foram submetidas ao retardamento da secagem por 24 ou 48 horas a 60 °C. Já no ponto de colheita mais tardio (23,5% de umidade), a expressão pode ser vista em todos os tratamentos, o que pode ser relacionado à qualidade fisiológica das sementes.

Brandão Junior (1996) não observou correlações entre a atividade da malato desidrogenase e a qualidade fisiológica de lotes de milho, e também Satters, Abdel-Guany e Elbagoury (1994) verificaram que essa enzima foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento em sementes de soja.

A esterase (EST) participa da hidrólise de ésteres de membrana e está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004). Muitos desses lipídios são constituintes de membranas, e sua degradação aumenta quando se aumenta a deterioração.

Pelo padrão enzimático da esterase (Figura 8) verifica-se que sementes colhidas com alta umidade (48,0 e 34,2%) submetidas ao retardamento da secagem por mais de 24 horas a 60 °C têm suas enzimas inativadas ou desnaturadas. E, sementes colhidas no ponto mais seco (23,5%) conseguem tolerar melhor esse estresse e ainda mantêm ativas suas enzimas, o que, conseqüentemente, confere maior viabilidade e vigor.

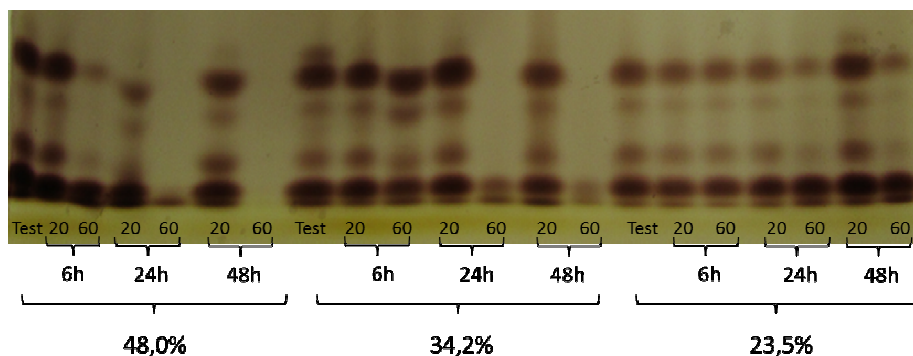


Figura 8 Padrão eletroforético da enzima esterase (EST) em sementes de milho da linhagem GNS25 colhidas com 48%, 34,2 e 23,5% de teor de água e submetidas ao retardamento de secagem por 6, 24 e 48 horas sob as temperaturas de 20 e 60 °C. Testemunha representa sementes não submetidas ao retardamento da secagem.

O resultado dessas três enzimas (ADH, MDH e EST) corrobora perfeitamente com os resultados dos testes de viabilidade e vigor realizado, onde as sementes colhidas com umidades altas toleram menos o retardamento da secagem, principalmente sob altas temperaturas. Já sementes colhidas com menores teores de água possuem maior tolerância ao estresse causado pelo retardamento da secagem, propiciando plântulas mais vigorosas.

4.3 Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural por meio da microscopia eletrônica de varredura pode ser uma interessante aliada para melhor compreensão dos danos causados pelo retardamento da secagem em sementes de milho.

Sabe-se que a manutenção da integridade das membranas celulares, entre outros eventos, é um forte indicativo de alterações da qualidade das sementes (SAATH et al., 2010).

As sementes colhidas com alto teor de água, 48,0% de umidade, apresentam células ainda não totalmente formadas, com espaços porosos,

mesmo não submetidas ao retardamento da secagem (Figura 9A). Talvez pelo fato de ainda não ter atingido o Ponto de Maturidade Fisiológico, onde detém o maior acúmulo de massa seca. Mesmo assim, a membrana está íntegra, e a turgidez é um indicativo da ausência de dano estrutural.

Quando submetidas ao retardamento da secagem por 48 horas sob 60 °C de temperatura houve rompimento da membrana celular com consequente extravasamento do citoplasma (Figura 9B), o que causou perda da viabilidade e funcionalidade celular com consequente morte da semente, o que pode ser verificado pelo teste de germinação.

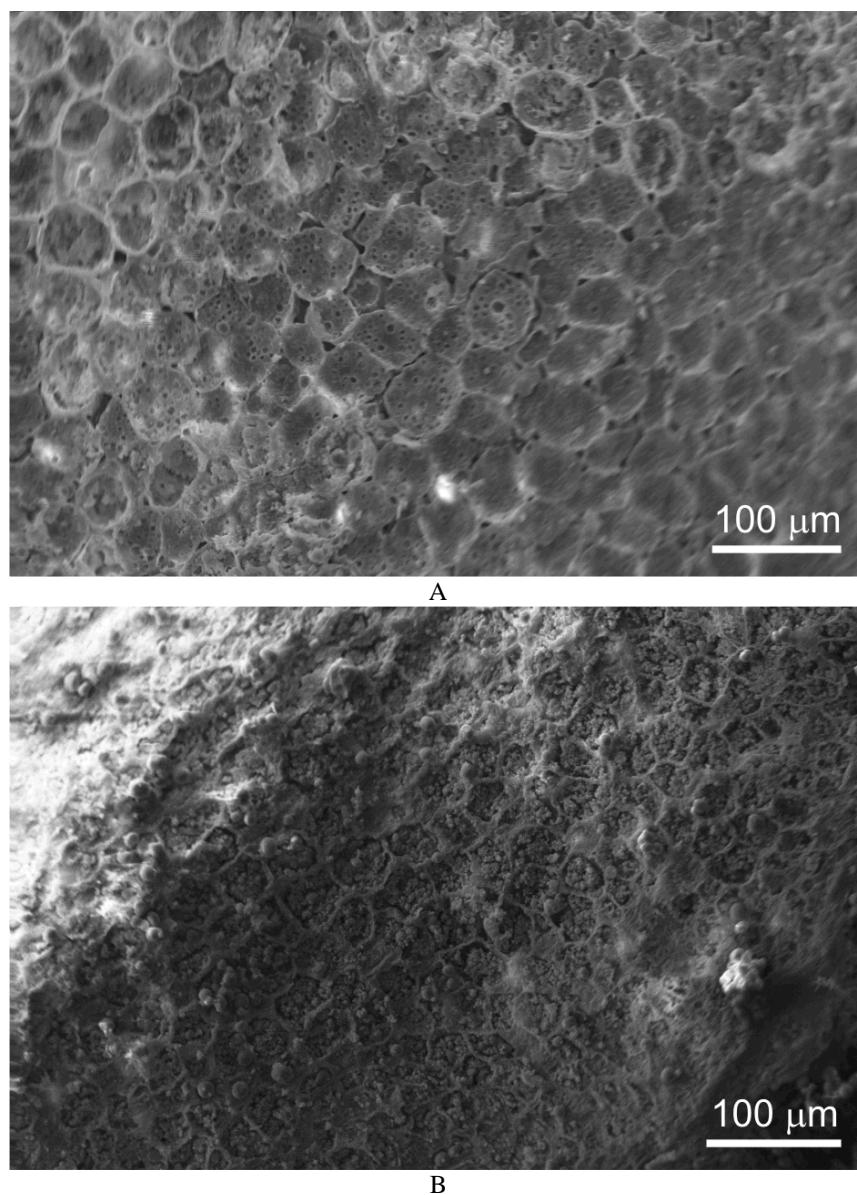


Figura 9 Imagens de embriões de sementes de milho da linhagem GNS25 obtidas por meio de eletromicrografia de varredura. A imagem A representa a testemunha (sem retardamento da secagem) e a imagem B foi obtida em sementes com retardamento da secagem por 48 horas a 60 °C, ambas colhidas com 48,0% de umidade.

Para o ponto de colheita correspondente ao ponto de maturidade fisiológica das sementes, com 34,2% de umidade (Figura 10A), as células das sementes que não foram submetidas ao retardamento da secagem estavam túrgidas e expandidas, o volume celular apresentava-se com conteúdo celular intacto e células e sem contração. Essa alta qualidade explica o alto vigor encontrado nos testes fisiológicos.

Já as sementes submetidas ao retardamento da secagem por 48 horas sob 60 °C (Figura 10B) apresentaram rupturas da membrana plasmática, com perda de material citoplasmático e perda das funções vitais, causando a morte da semente. Evento este comprovado pelo baixo desempenho nos testes de viabilidade e vigor.

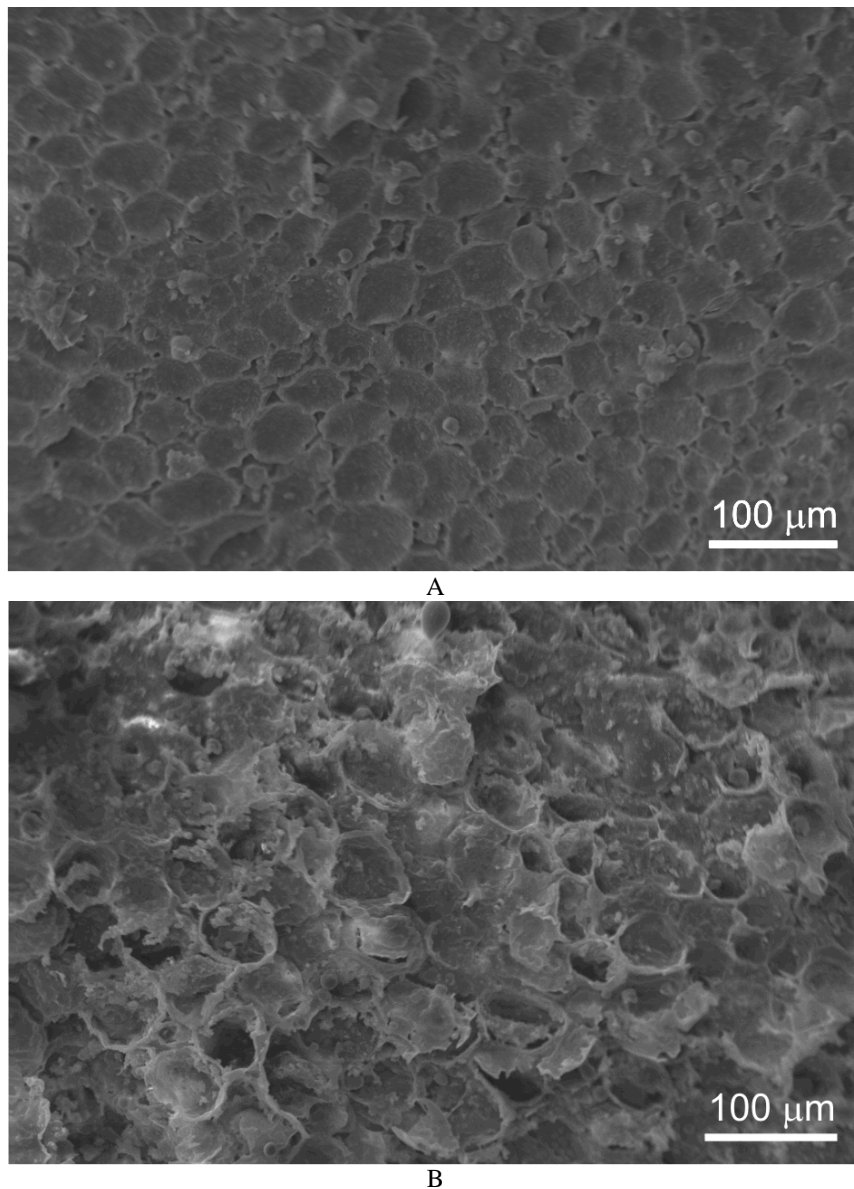


Figura 10 Imagens de embriões de sementes de milho da linhagem GNS25 obtidas por meio de eletromicrografia de varredura. A imagem A representa a testemunha (sem retardamento da secagem) e a imagem B foi obtida em sementes com retardamento da secagem por 48 horas a 60 °C, ambas colhidas com 34,2% de umidade.

O padrão observado nos primeiros pontos de colheita só foi alterado no ponto de colheita mais tardio, com 23,5% de umidade. Conforme visto nos testes fisiológicos, essas sementes apresentaram maior tolerância ao estresse por alta temperatura, e mesmo quando retardada a secagem por 48 horas sob 60 °C, ainda sim mantiveram certo grau de viabilidade e vigor.

Na figura 11A, observa-se que quando as sementes não foram submetidas ao retardamento da secagem, suas células se mantiveram túrgidas, intactas e com o material celular preenchendo todo o espaço. Mas quando submetidas ao retardamento mais drástico (48 horas a 60 °C), houve uma retração celular com a perda brusca de água pelas células (Figura 11B). Mas, vale ressaltar, que não houve rompimento nem extravasamento celular, o que demonstra que o dano causado pelas altas temperaturas é mais interno do que no nível de membrana.

Em trabalho semelhante com café, foram obtidos resultados similares, com desestruturação de membranas e extravasamento celular quando a temperatura de secagem foi de 60 °C. E à temperaturas menores, houve a manutenção do conteúdo celular com retração das células (SAATH et al., 2010).

Carvalho et al. (1999) observaram que danos internos ocasionados pelas condições adversas de temperatura e umidade de pré-colheita não causam perda de germinação e vigor de sementes de milho. Contudo, quando o dano se dá no eixo embrionário, na posição perpendicular, há prejuízo fisiológico.

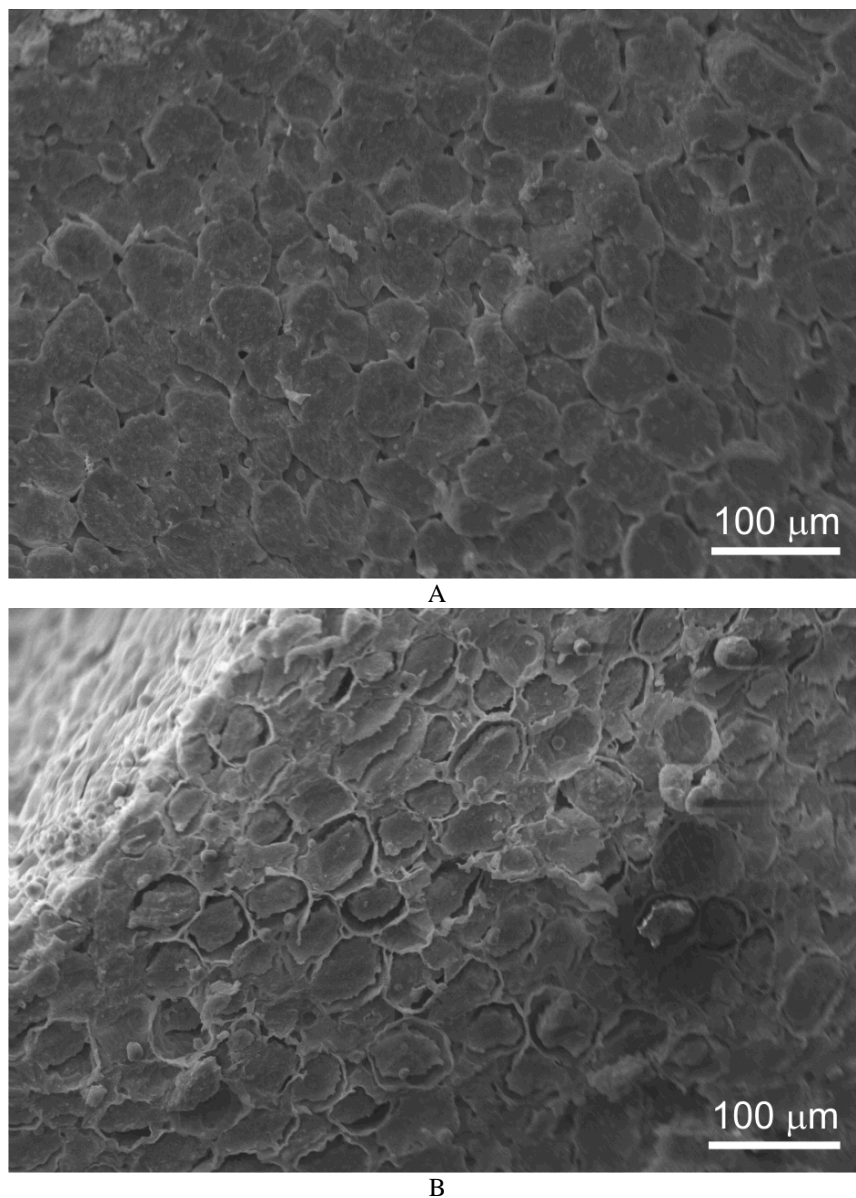


Figura 11 Imagens de embriões de sementes de milho da linhagem GNS25 obtidas por meio de eletromicrografia de varredura. A imagem A representa a testemunha (sem retardamento da secagem) e a imagem B foi obtida em sementes com retardamento da secagem por 48 horas a 60 °C, ambas colhidas com 23,5% de umidade.

4.4 Atividade respiratória

A mensuração da atividade respiratória de sementes pode ser de grande valia como um teste de vigor complementar. Sabe-se que mitocôndrias em sementes secas e no início do processo de embebição, não têm um sistema organizado de membranas, e a reorganização ocorre à medida que a hidratação prossegue e as mitocôndrias se tornam mais eficientes na fosforilação oxidativa.

O desempenho do lote pode ser visualizado como consequência do período de tempo necessário para que essas mitocôndrias fiquem mais eficientes, passem a executar funções respiratórias e o sistema de membranas se torne melhor organizado (MARCOS FILHO, 2005).

A atividade e integridade das mitocôndrias de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, o que torna mais eficiente a produção de ATP, refletindo a elevação do consumo de oxigênio e conseqüente elevação na produção de gás carbônico (BEWLEY; BLACK, 1994). Sendo assim, o lote mais vigoroso tende a respirar mais do que um lote com menor vigor, em um mesmo período de tempo (MENDES et al., 2009).

Na metodologia desta pesquisa, as sementes foram embebidas por somente 30 minutos antes de começar a avaliação da atividade respiratória, tempo este que, provavelmente, não foi suficiente para a completa reorganização das membranas, principalmente das mitocôndrias. Dessa forma, as sementes que apresentaram maior respiração foram as mais deterioradas, com menor vigor e não as mais vigorosas, como se esperava.

Esse aumento da respiração nesse estágio do processo de germinação, nas sementes mais deterioradas, deve ser relacionado ao acentuado aumento do metabolismo para recuperação de tecidos e estruturas nos locais mais comprometidos com o processo de deterioração.

Observa-se, na Figura 12, que a maior respiração foi observada em sementes que foram colhidas com 48,0% de umidade, principalmente quando submetidas ao retardamento da secagem sob altas temperaturas. E, como verificado pelos testes de viabilidade e vigor, essas sementes apresentaram pior desempenho.

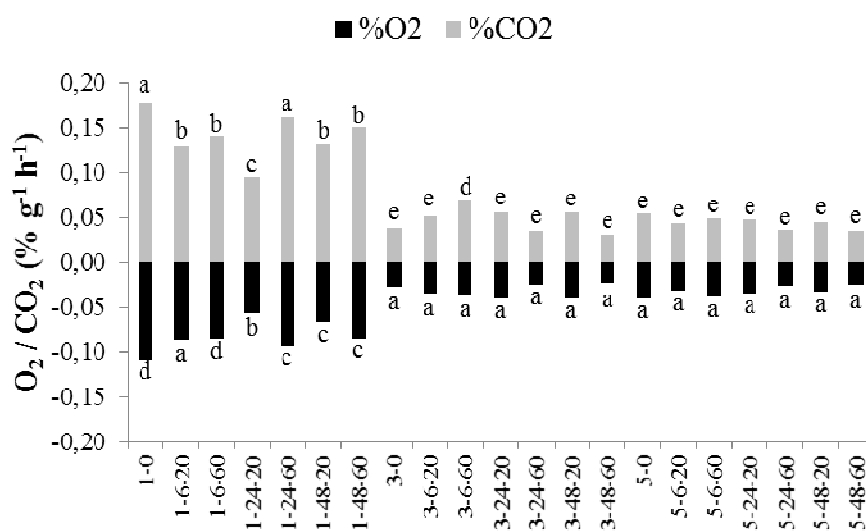


Figura 12 Respiração de sementes de milho da linhagem GNS25 submetidas ao retardamento da secagem sob diferentes períodos de tempo e temperaturas. Sendo o primeiro número referente à colheita, o segundo ao tempo de espera (em horas) e o terceiro a temperatura (em °C).

Já as sementes colhidas no ponto intermediário de umidade (34,2%) e no ponto mais seco (23,5%) apresentaram menores valores de respiração independente do tempo de espera para a secagem e da temperatura na qual foram submetidas.

Esse resultado foi semelhante ao obtido em outras pesquisas com soja (DODE et al., 2013) e girassol (DODE et al., 2012), onde as sementes menos vigorosas apresentaram maior respiração em um mesmo período de tempo.

Recomenda-se uma melhoria na metodologia deste teste, pois usando 30 minutos de embebição e oito horas de acondicionamento no tubo falcon, não se conseguiu uma boa relação entre a análise da atividade respiratória e outros testes de vigor, bem como a análise eletroforética de enzimas ligadas ao processo respiratório (FIGURA 7).

Mais pesquisas devem oferecer retaguarda para o esclarecimento de dúvidas remanescentes. Novas combinações de tempo de embebição e de permanência nos tubos para sementes de milho devem ser testadas, a fim de se definir uma metodologia mais exata, segura e capaz de identificar lotes com qualidades fisiológicas diferentes.

E pode-se considerar a avaliação do vigor de sementes de milho pela mensuração da atividade respiratória um método promissor, porque consegue discriminar os lotes, é rápido e baseado em fundamentos teóricos bem aceitos.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Por meio do presente trabalho, conseguiu-se identificar valores e tendências gerais sobre o processo de retardamento da secagem em sementes de milho. Esse processo é recorrente em empresas produtoras de sementes e deve ser levado a sério por causar prejuízos reais e significativos.

O comportamento da linhagem GNS25 em função do retardamento da secagem provavelmente se repetirá em outras linhagens ou híbridos, tomadas as devidas proporções e peculiaridades. Mas devem ser realizados estudos específicos para cada material dentro das empresas produtoras de sementes.

Com esse conhecimento mais aprofundado e específico, poderão ser obtidos valores exatos do período crítico de permanência dessas sementes em situações de estresse, principalmente sob altas temperaturas.

Esse conhecimento proporcionará menores prejuízos financeiros para as empresas sementeiras, e talvez, mudanças na logística de acordo com o material que chega à Usina de Beneficiamento de Sementes.

Recomenda-se, também, pesquisar o efeito do retardamento da secagem sob temperaturas entre 40 e 60 °C, o que pode identificar mais claramente a temperatura crítica em que há prejuízos fisiológicos para sementes de milho.

6 CONCLUSÕES

Não há perda de viabilidade das sementes de milho da linhagem GNS25 quando o atraso na secagem se dá a temperaturas de 20 e 40 °C por até 48 horas, com umidade de colheita abaixo de 40,5%.

No ponto de colheita mais úmido (48%) ocorrem alterações na viabilidade das sementes de milho, com incremento do percentual de germinação até 12 horas de retardamento da secagem sob 20 e 40 °C e declínio após esse período.

Há queda no vigor das sementes de milho nos pontos mais úmidos de colheita com o retardamento da secagem, mesmo sob temperaturas mais amenas (20 e 40 °C).

O retardamento da secagem sob 60 °C provoca queda acentuada da viabilidade e do vigor das sementes de milho da linhagem GNS25 em todas as umidades de colheita e períodos de espera.

Em geral, nos pontos de colheita mais úmidos, há menor atividade enzimática e expressão de proteínas resistentes ao calor, o que é aumentando com o avanço da maturação das sementes.

Sementes colhidas com 48 e 34,2% de umidade e submetidas ao retardamento da secagem por 48 horas sob 60 °C têm a membrana plasmática rompida e perda de conteúdo citoplasmático. Já sementes colhidas com 23,5% de umidade têm a membrana plasmática retraída, mas íntegra.

A atividade respiratória é maior em sementes colhidas mais úmidas, por estarem em processo de deterioração mais avançado.

Na linhagem GNS25, quanto mais tardia for a colheita, maior será a tolerância aos estresses fisiológicos causados pelo retardamento da secagem.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.

ALVES, E. **Introdução a microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE, 2006. 43 p.

ANDRIGUETO, J. P. **Efeitos do retardamento de secagem de sementes de trigo (*Triticum aestivum*) sobre sua qualidade fisiológica**. 1975. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1975.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/index/pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2013a.

_____. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2013/01/DADOS-VOLU%C3%87%C3%83O-DAS-EMPRESAS-DE-SEMENTES-1985-2011.-International-Seed-Federation-ISF.pdf>>. Acesso em: 3 jul. 2013b.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALISTS. **Seed vigour testing handbook**. Washington, 1983. 88 p. (Handbook on Seed Testing. Contribution, 32).

AUNG, U. T.; MCDONALD, M. B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hipogaea* L.) seed deterioration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 101-111, Jan./Apr. 1995.

BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 1, p. 104-110, May 1996.

BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas**. 1991. 256 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1991.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição especial.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BONOME, L. T. S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira (*Hevea* sp.) durante o armazenamento**. 2006. 136 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

BORBA, C. S. et al. Efeito do retardamento de secagem na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 105-108, jan. 1998.

BORÉM, F. M.; MARQUES, E. R.; ALVES, E. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. **Biosystems Engineering**, London, v. 99, n. 1, p. 62-66, Jan. 2008.

BRACCINI, A. L. et al. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja após o processo de hidratação-desidratação e envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 1053-1066, jun. 1999.

BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Padrões para produção e comercialização de sementes de milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 243, 20 dez. 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/padros_milho.pdf>. Acesso em: 2 maio 2013.

_____. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BREWER, G. J.; SING, C. F. **An introduction to isozyme techniques**. New York: Academic, 1970. 186 p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry e molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2005. 1367 p.

BYRUM, J. R.; COPELAND, L. O. Variability in vigour testing of maize (*Zea mays* L.) seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 2, p. 543-549, 1995.

CALIARI, M. F.; SILVA, W. R. da. Interpretação de dados de testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 239-251, jul. 2001.

CAMARGO, M. L. P. et al. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 113-122, 2000.

CAMARGO, R.; CARVALHO, M. L. M. Armazenamento a vácuo de semente de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 131-139, 2008.

CANTRELL, R. P.; HODGES, H. F.; KEIM, W. F. Relationship between plant respiration and seedling vigor in *Zea mays* L. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 214-216, 1972.

CARVALHO, M. L. M. et al. Caracterização de danos de estresse em pré-colheita e seus efeitos na qualidade fisiológica em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 93-100, 1999.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Campinas: Fundação Cargil, 2000. 424 p.

CHE, P. et al. Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, p. 1-14, July 2006.

CICERO, S. M.; VIEIRA, R. D. Teste de frio. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 151-164.

COAN, R. M. et al. Salinidade na emergência de plântulas de duas espécies de gramas ornamentais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 86-92, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto/2013**. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_10_43_44_boletim_portuges_agosto_2013_port.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2013.

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

CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 1815-1829, Dec. 2010.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 4th ed. New York: Chapman & Hall, 2001. 467 p.

COUTINHO, W. M. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 458-464, nov./dez. 2007.

DODE, J. S. et al. Teste de respiração em sementes de soja para avaliação da qualidade fisiológica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 193-198, fev. 2013.

_____. Teste de respiração para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 686-691, 2012.

EICHELBERGER, L. et al. Efeito do retardamento da secagem na qualidade fisiológica de sementes armazenadas de azevém anual. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 643-650, maio 2003.

EICHOL, E. D.; PERES, W. B. Monitoramento da qualidade física de secagem de sementes de milho em secadores estacionários. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 57-64, 2008.

FARRANT, J. M.; BRANDT, W.; LINDSEY, G. G. An overview of mechanisms of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. **Plant Stress**, Melbourne, v. 1, n. 1, p. 72-84, 2007.

FERGUSON, J. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Changes during early seed and axes deterioration: I, seed quality and mitochondrial respiration. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 1, p. 175-179, Jan. 1990.

FERREIRA, I. C. R. F.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, Bragança, ano 4, n. 2, p. 32-39, jul./dez. 2007.

FESSEL, S. A. et al. Maturidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 191-197, 2001.

FREITAS, R. A. et al. Storability of cotton seeds predicted by vigour test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 30, n. 2, p. 403-410, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT database results**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 28 jun. 2013.

GALLETI, S. R. Introdução á microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 33-35, jan./dez. 2003.

GOTTLIEB, L. D. Electrophoretic evidence and plant systematic. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 64, n. 2, p. 161-180, 1977.

GUNASEKARAN, S. et al. Size characterization of stress cracks in corn kernels. **Transactions of ASAE**, Saint Joseph, v. 28, p. 1668-1672, 1985.

HILHORST, H. W. M. et al. **Curso avançado em fisiologia e tecnologia de sementes**. Lavras: UFLA, 2001. 74 p.

HUNTER, R. L.; MARKERT, C. L. Histochemical demonstration of enzyme separated by zone electrophoresis in starch gel. **Science**, Washington, v. 125, p. 1294-1295, June 1957.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**. Basseldorf, 2006. 303 p.

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

JORGE, M. H. A. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho colhidas e secas em espigas. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 679-686, 2005.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 115-121, fev. 2005.

JUNQUEIRA, R. A. R.; MORABITO, R. Um modelo de otimização linear para o planejamento agregado da produção e logística de sementes de milho. **Produção**, São Carlos, v. 16, n. 3, p. 510-525, 2006.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in dessication tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 734-740, Nov. 2005.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

MAESTRI, M.; ALVIM, P. de T.; SILVA, M. A. P. **Fisiologia vegetal: exercícios práticos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 91 p. (Cadernos Didáticos, 20).

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2007. 469 p.

MARTIN, T. N. et al. Questões relevantes na produção de sementes de milho: primeira parte. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia - FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 119-138, 2007.

MARTINS, L.; LAGO, A. A. Conservação de semente de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 161-167, 2008.

MCDONALD JUNIOR, M. B.; WILSON, D. O. An assessment of the standardization and ability of the ASA-610 to rapidly predict potential soybean germination. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v. 4, n. 2, p. 1-11, 1979.

MENDES, C. R. et al. Respiratory activity for the differentiation of vigor on soybean seeds lots. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 171-176, 2009.

MENEZES, M. **Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e de proteínas resistentes ao calor**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MUNIZ, F. R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 195-204, 2007.

MUÑOZ, G. S.; ARBOLEDA, R. F. Influencia de la época de cosecha y del retardo al secamiento em la germinacion de la semilla de maiz (*Zea mays* L.). **Informativo del Maiz**, Guayaquil, n. 16, p. 15, nov. 1976.

NOVEMBRE, A. D. L. C. Avaliação da qualidade de sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 3, p. 24-28, maio/jun. 2001.

NTULI, T. M. et al. Increase drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of english oak (*Quercus robur*. L.) seeds. **Journal of Integrative Biology**, New Rochelle, v. 53, n. 4, p. 270-280, Apr. 2011.

PASTEUR, N. et al. **Practical isoenzyme genetics**. New York: E. Horwood, 1988. 215 p.

PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 2006. 470 p.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283-297.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, 1977. 289 p.

RANGEL, M. A. S.; SILVA, W. M.; NERIS, F. Retardamento de secagem e qualidade estrutural do milho. **Ensaio e Ciência**, Campo Grande, v. 7, p. 927-931, set. 2003. Edição especial.

ROSA, S. D. V. F. et al. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas Lea associadas à tolerância de sementes de milho à altas temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

_____. Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento à baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 290-310, 2004.

SAATH, R. et al. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arabica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. V. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SATTERS, J. R.; ABDEL-GUANY, A.; ELBAGOURY, O. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 33-41, Mar. 1994.

SCARANARI, C. **Retardamento da secagem de espigas e qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 1997. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1997.

SILVA, F. S. et al. Viabilidade do armazenamento de sementes em diferentes embalagens para pequenas propriedades rurais. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 8, n. 1, p. 45-56, 2010.

SILVA, P. A. et al. Análise fisiológica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e secagem de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 15-22, 2007.

SILVA, T. T. de A. **Conservação de sementes de citrumelo 'swingle' colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a tratamentos fungicidas**. 2007. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA FILHO, P. M. **Processo de secagem, desempenho da semente e qualidade industrial do trigo**. 1997. 64 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.

SPANÒ, C. et al. Responses to desiccation injury in developing wheat embryos from naturally and artificially dried grains. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 49, n. 4, p. 363-367, Apr. 2011.

SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, abr./jun. 2000.

STEELE, J. L.; SAUL, R. A.; HUKILL, W. V. Deterioration of shelled corn as measured by carbon dioxide production. **Transaction of the American Society of Agricultural Engineering**, Saint Joseph, v. 12, n. 5, p. 685-689, 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes**: developments in plant genetic and breeding: parte A. New York: Elsevier, 1983. 516 p.

THOMANN, E. B. et al. Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos: roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 607-614, 1992.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas**: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p.

TORRES, M. A. P. **Desempenho de diferentes métodos de secagem e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**. 2006. 108 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

TORRES, S. B. Comparação entre testes de vigor para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 249-253, 1998.

VALLE, I. C. **Efeitos do retardamento de secagem de sementes de arroz Bluebelle (*Oryza sativa* L.) sobre sua qualidade fisiológica**. 1978. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1978.

VIDIGAL, D. S. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 129-136, 2009.

VIEIRA, M. G. G. C. **Técnicas moleculares em sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 86 p.

WOODSTOCK, L. W.; FURMAN, K.; LEFFLER, H. R. Relationship between weathering deterioration and germination, respiratory metabolism and mineral leaching from cottonseeds. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 459-466, 1985.

ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wellingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, Mar. 1994.