



**RAFAELA APARECIDA DE CARVALHO**

**FENOTIPAGEM PARA TOLERÂNCIA À DETERIORAÇÃO  
DE SEMENTES DE MILHO APÓS A COLHEITA EM  
ESPIGAS**

**LAVRAS-MG  
2024**

**RAFAELA APARECIDA DE CARVALHO**

**FENOTIPAGEM PARA TOLERÂNCIA À DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE  
MILHO APÓS A COLHEITA EM ESPIGAS**

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.

Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Prof. Dra. Heloísa Oliveira dos Santos  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2024**

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

Carvalho, Rafaela Aparecida de.

Fenotipagem para tolerância à deterioração de sementes de  
milho após a colheita em espigas / Rafaela Aparecida de Carvalho. -  
2024.

83 p. : il.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Coorientador(a): Heloísa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. deterioração. 3. proteínas. I. Von Pinho, Édila  
Vilela de Resende. II. Santos, Heloísa Oliveira dos. III. Título.

**RAFAELA APARECIDA DE CARVALHO**

**FENOTIPAGEM PARA TOLERÂNCIA À DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE  
MILHO APÓS A COLHEITA EM ESPIGAS**

**PHENOTYPING FOR TOLERANCE TO DETERIORATION OF CORN SEEDS  
AFTER HARVESTING ON THE COB**

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 22 de março de 2024.  
Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires UFLA  
Dra. Thaísa Fernanda Oliveira UFV  
Dr. Delacyr da Silva Brandão Júnior UFMG  
Prof. Dra. Heloísa Oliveira dos Santos UFLA

Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Prof. Dra. Heloísa Oliveira dos Santos  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2024**

*A Deus, à Nossa Senhora Aparecida e à Santa Teresinha,  
por estar sempre presente iluminando e abençoando  
meus passos, meus caminhos, minha vida.  
E por possibilitarem a conquista deste título.*

*Ofereço*

*Aos meus pais Vicente e Fátima e à minha irmã Larissa,  
por todo o amor e carinho.*

*A todos os meus familiares e amigos.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, à Nossa Senhora Aparecida e à Santa Teresinha, por iluminarem minha caminhada, meus pensamentos, decisões e por me permitirem mais essa conquista. No meio das dificuldades, incertezas, nunca perdi a fé. E sempre acreditei que tudo acontece na hora certa.

Aos meus amados pais Vicente e Fátima, por todo o amor, cuidado, orações, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, por não medirem esforços para que esse sonho se tornasse realidade, e por sempre acreditarem que por meio dos estudos podemos alcançar nossos sonhos.

À minha amada irmã Larissa, por todo o amor, carinho, paciência, cumplicidade e companheirismo. Você é meu maior presente. Obrigada por sempre estar ao meu lado, independentemente da situação.

Gratidão Pai, Mãe e Irmã! Vocês foram essenciais nessa trajetória. Vocês que são meu alicerce, minha base, as pessoas que eu mais amo nessa vida, que não mediram esforços para ajudarem na condução do experimento, até aos domingos vocês estiveram comigo no campo. Por todo o apoio em casa, principalmente nos dias em que a ansiedade e estresse estavam tomando conta do meu coração. Por sempre acreditarem que eu conseguiria. Essa conquista é nossa. Amo muito vocês.

À minha bisá Bina (*in memoriam*), que lá do céu está muito feliz pelas minhas conquistas. Ao meu avô Heitor (*in memoriam*). À minha amada Vó Lita (*in memoriam*), que sempre esteve tão presente na minha vida, proporcionando lembranças que jamais serão esquecidas, e que hoje mora junto de Deus. Tenho certeza que lá do céu está muito orgulhosa e feliz pelas minhas conquistas.

Aos meus amados avós Evaristo e Lázara, por todo o amor, carinho e orações. Por serem tão especiais na minha vida, e por sempre me incentivarem nos meus estudos.

Aos meus queridos afilhados Willian, Otávio e Glenda, por serem tão especiais na minha vida. Amo vocês!

A todos os meus familiares, padrinhos, tios, primos, cunhado. Vocês são muito importantes na minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura da Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, em especial ao Setor de Sementes, que me abraçou durante toda a minha trajetória, me proporcionando crescimento pessoal e profissional. Gratidão por todas as oportunidades e por todos os momentos que vivi nesta instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À empresa Bayer e Monsanto pelo financiamento da pesquisa e pela oportunidade da bolsa de estudos e, em especial, ao Plínio Cristofolletti, e aos demais que estiveram diretamente envolvidos nessa parceria entre a Bayer/Monsanto e a UFLA.

À minha orientadora Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por todos os ensinamentos, dedicação, amizade, paciência e orações. Por sempre acreditar no meu potencial. Pelos inúmeros conselhos para o meu crescimento pessoal e profissional. Por ser uma orientadora tão presente e disposta a orientar da melhor forma possível, seja no campo, no laboratório e nas inúmeras reuniões. Sou muito grata por você ter me acolhido no meu doutorado e contribuir para a minha formação.

À minha coorientadora Dra. Heloísa Oliveira dos Santos, por todo o apoio e amizade. Pela enorme ajuda nas análises enzimáticas e também nas análises estatísticas. Obrigada por toda a contribuição na minha vida acadêmica.

Ao meu orientador da graduação e mestrado Dr. João Almir Oliveira, pela amizade, incentivo e conhecimentos transmitidos. Grata por ter me acolhido no início da minha vida acadêmica e pela contribuição na minha formação.

Aos demais professores do setor de sementes e do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, muito obrigada por todas contribuições, auxílios e ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dra. Heloísa Oliveira dos Santos, Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires, Dra. Thaísa Fernanda Oliveira, Dr. Delacyr da Silva Brandão Júnior, pela disponibilidade e por terem aceitado o convite.

À Dra. Marcela Carlota Nery e à Dra. Flaviane de Oliveira Ribeiro, por se colocarem à disposição para contribuírem com esse trabalho.

À Marli, por toda a ajuda e disponibilidade. À Jaque, por toda a amizade e pela disponibilidade em ajudar nas minhas análises. Aos demais servidores e funcionários do setor de sementes: Geraldo, Rafa, Rose e Vivi, por toda a disponibilidade e atenção durante todos esses anos. Ao Sr. Itamar, por toda a ajuda no campo e na usina de beneficiamento. Aos servidores e funcionários do setor de olericultura, em especial à técnica Stéfani e ao Valdeci, por toda a ajuda e atenção. Aos funcionários do transporte e DAG, que foram essenciais na condução do campo.

A todos os meus amigos do setor de sementes, que sempre estiveram tão presentes no meu dia a dia. Vocês foram essenciais nessa etapa da minha vida. A amizade deixa tudo mais leve, em especial à Dani, Ana Maria, Pedro Ceará, Thiago, José Victor, Maíra, Paulinha, Rafael, Gilvânia, Nicolas, Laís. Obrigada por todos os momentos compartilhados, por toda a ajuda e pela amizade. Espero ter deixado as melhores lembranças na vida de cada um de vocês.

À Ana Maria, pela amizade e por todos os momentos que compartilhamos. Pela parceria na condução do experimento e obtenção dos resultados.

À Dra. Dayliane Andrade Bernardes, pela amizade e por toda a disponibilidade nas análises, e ao Dr. Wilson Vicente Souza Pereira, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos meus amigos que me acompanharam durante toda a minha graduação e mestrado, que se fazem presente em minha vida, independentemente da distância e do tempo, em especial, Dani, Rafaela, Maiara, Flavinha, Inara, Reberth, Victor, Vinicinho, Ewerton, Rodolfo, Thaísa, Thiago e Priscila, obrigada por todos os momentos compartilhados e pela amizade.

Ao Programa de Mentoria da Bayer pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, em especial à minha mentora Bruna Carvalho, por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos demais amigos, pela amizade, confiança e torcida.

Enfim, a todos que fizeram parte da minha trajetória e que de alguma forma contribuíram para a realização de mais essa etapa em minha vida. Sinceros agradecimentos, pois vocês fazem parte da minha história.

Finalizo essa etapa da minha vida com a sensação de dever cumprido. Foram anos intensos e ainda enfrentamos uma pandemia no meio do percurso. Só tenho a agradecer pela oportunidade de viver e alcançar nossos sonhos. Grata pelos 12 anos que tive o privilégio de estudar em uma universidade pública e de qualidade. Fica o sentimento de gratidão!

Finalizo meus agradecimentos com a frase que marcou minha vida acadêmica desde a recepção de calouros. “Não importa sua condição o que importa é sua decisão.”

Muito Obrigada!

*“Nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.”*  
*(Cora Coralina)*

## RESUMO

Os desafios enfrentados na indústria sementeira de milho para garantir a produção e a comercialização de sementes com alta qualidade são muitos. Um deles é o escoamento das sementes colhidas em espigas, dos campos de produção até o processamento destas, sem perda de qualidade. Sementes de milho, colhidas em espigas, estão sujeitas à deterioração, em função de altos teores de água, muitas vezes associados ao aumento da temperatura da massa de sementes. No processo de deterioração há mudanças, em carboidratos, lipídios, proteínas e compostos antioxidantes, que influenciam a qualidade fisiológica de sementes. Neste processo, tem sido observada variabilidade genética para a tolerância à deterioração das sementes. Assim, há necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de metodologias seguras para a seleção de materiais genéticos quanto a tolerância das sementes à deterioração nesta etapa do processo de produção. Nesta pesquisa foram propostas adequações do teste de deterioração controlada para a fenotipagem de genótipos de milho para a característica de tolerância das sementes à deterioração, após a colheita em espigas. Também foi avaliada a expressão de proteínas em sementes submetidas ou não à deterioração controlada. Para isso foram utilizados materiais genéticos do programa de melhoramento de milho da UFLA e da Empresa Bayer, que apresentassem variabilidade genética para esta característica. Foram avaliadas as seguintes variáveis do teste de deterioração controlada: teor de água das sementes durante o processo de deterioração (25% e 35%), secagem das sementes após o processo de deterioração (com ou sem secagem), tempo de exposição das sementes no processo de deterioração (48 e 72 horas) e a desinfestação de sementes com hipoclorito de sódio 1%. Em parte do material genético foi avaliada em sementes, a expressão das enzimas envolvidas no processo de respiração (Malato Desidrogenase, Álcool Desidrogenase, Piruvato descarboxilase), das envolvidas nos sistemas oxidativos (superóxido dismutase, catalase, peroxidase) e ainda, da esterase, alfa amilase e de proteínas resistentes ao calor. Concluiu-se que por meio do teste de deterioração controlada, em sementes com teor de água de 25%, acondicionadas por 48 horas a 42 °C, e sem desinfestação com hipoclorito, foi possível classificar os genótipos de milho quanto a tolerância das sementes à deterioração, após três dias da sementeira. Houve menor expressão das enzimas piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, esterase, alfa amilase e de proteínas resistentes ao calor, em sementes de milho submetidas ao processo de deterioração controlada, expressões estas, associadas à menor qualidade fisiológica em sementes deterioradas. Foi observada também, a influência do genótipo sobre a expressão de algumas proteínas avaliadas nesta pesquisa.

Palavras-chave: *Zea Mays*; deterioração; metodologia; enzimas.

## ABSTRACT

The challenges faced in the corn seeding industry to ensure the production and commercialization of high-quality seeds are many. One of these challenges is the flow of seeds collected from cobs, from the production fields to their processing, without loss of quality. Corn seeds, harvested on the cob, are subject to deterioration due to high water content, often associated with increased temperature of the seed mass. In the deterioration process there are changes in carbohydrates, lipids, proteins and antioxidant compounds, which influence the physiological quality of seeds. In this process, genetic variability has been observed for tolerance to seed deterioration. Therefore, there is a need for research to develop safe methodologies for the selection of genetic materials regarding seed tolerance to deterioration, at this stage of the production process. In this research, adaptations of the controlled deterioration test were proposed for the phenotyping of corn genotypes for the characteristic of seed tolerance to deterioration, after harvesting on the cob. The expression of proteins in seeds subjected or not to controlled deterioration was also evaluated. For this purpose, genetic materials from the UFLA and Bayer Company corn breeding program were used, which presented genetic variability for this characteristic. The following variables of the controlled deterioration test were evaluated: water content of the seeds during the deterioration process (25% and 35%), drying of the seeds after the deterioration process (with or without drying), exposure time of the seeds in the deterioration process (48 and 72 hours) and seed disinfestation with 1% sodium hypochlorite. In part of the genetic material, the expression of enzymes involved in the respiration process (Malate Dehydrogenase, Alcohol Dehydrogenase, Pyruvate decarboxylase), those involved in oxidative systems (superoxide dismutase, catalase, peroxidase) and also esterase, was evaluated in seeds. alpha amylase and heat resistant proteins. It was concluded that through the controlled deterioration test, on seeds with a water content of 25%, stored for 48 hours at 42°C, and without disinfestation with hypochlorite, it was possible to classify the corn genotypes in terms of seed tolerance to deterioration, three days after sowing. There was lower expression of the enzyme's pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, esterase, alpha amylase and heat-resistant proteins in corn seeds subjected to the controlled deterioration process, expressions associated with lower physiological quality in deteriorated seeds. The influence of the genotype on the expression of some proteins evaluated in this research was also observed.

Keywords: Zea Mays; deterioration; methodology; enzymes.

## **INDICADORES DE IMPACTOS**

As sementes colhidas em espigas se apresentam com altos teores de água e por isso estão mais propensas à deterioração nas condições às quais são expostas após a colheita, no transporte, até que sejam processadas nas Usinas de Beneficiamento. Nesta pesquisa foram adaptadas metodologias do teste de deterioração controlada para a seleção de genótipos de milho quanto a tolerância à deterioração de sementes após a colheita em espigas. Com os resultados obtidos foi possível avançar nos conhecimentos técnico- científicos e no desenvolvimento de tecnologias aplicáveis em processos de seleção em programas de melhoramento de milho e em programas de controle de qualidade interno em empresas produtoras de sementes. Estes resultados impactam no aumento da produção de sementes de milho de melhor qualidade fisiológica e da produtividade de grãos em nível de agricultor. Isso propicia a produção de grãos de forma mais sustentável, com maior produção em menor área, com benefícios diretos para os agricultores, com aumento de renda. Isto impacta na melhoria da qualidade de vida dos agricultores e da população que se beneficia da cultura do milho, por meio do consumo de produtos in natura ou industrializados. Por meio do exposto ficam caracterizados os impactos sociais, tecnológicos, econômicos e sociais da pesquisa desenvolvida.

## **IMPACT INDICATORS**

Seeds harvested on the cob have a high water content and are therefore more prone to deterioration in the conditions to which they are exposed after harvest, during transportation and until they are processed in the processing plants. This research adapted methodologies from the controlled deterioration test to select maize genotypes for their tolerance to seed deterioration after harvesting into ears. With the results obtained, it was possible to advance technical-scientific knowledge and the development of technologies applicable to selection processes in maize breeding programs and internal quality control programs in seed production companies. These results have had an impact on increasing the production of maize seeds of better physiological quality and grain productivity at farmer level. This leads to more sustainable grain production, with greater production in a smaller area, with direct benefits for farmers and increased income. This has an impact on improving the quality of life of farmers and the population that benefits from maize cultivation, through the consumption of fresh or processed products. The above characterizes the social, technological, economic, and social impacts of the research carried out.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Considerações sobre a cultura e colheita de sementes de milho .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Deterioração em sementes.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Teste de deterioração controlada para a fenotipagem dos genótipos de milho quanto a tolerância das sementes à deterioração.....</b>	<b>20</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
	<b>CAPÍTULO 2 ADEQUAÇÃO DO TESTE DE DETERIORAÇÃO CONTROLADA PARA A SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO COM SEMENTES TOLERANTES À DETERIORAÇÃO, APÓS A COLHEITA EM ESPIGA .....</b>	<b>29</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Local de realização dos experimentos.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Seleção dos materiais genéticos utilizados para a fenotipagem.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3</b>	<b>Produção de sementes de linhagens e híbridos de milho, materiais genéticos UFLA .....</b>	<b>35</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises laboratoriais .....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Teor de água.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Determinação do teor de água para a realização do teste de deterioração controlada.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Avaliação da secagem das sementes após o processo de deterioração controlada.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Determinação do período ao qual as sementes foram expostas ao processo de deterioração controlada .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Avaliação do uso do hipoclorito a 1% para desinfestação das sementes durante a condução do teste de deterioração controlada .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Teste de deterioração controlada, para a fenotipagem de genótipos da Bayer, para a característica de tolerância à deterioração de sementes pós colheita .</b>	<b>39</b>
<b>2.4.7</b>	<b>Germinação .....</b>	<b>39</b>

2.4.8	Análise de imagem de plântulas .....	40
2.4.9	Análise estatística.....	40
2.4.10	Análises de proteínas pela técnica de eletroforese .....	41
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
3.1	Avaliação do teor de água das sementes de milho no teste de deterioração controlada.....	44
3.2	Avaliação da secagem das sementes após o processo de deterioração controlada.....	47
3.3	Avaliação do período de exposição à deterioração, no teste de deterioração controlada.....	50
3.4	Avaliação da desinfestação das sementes, com hipoclorito de sódio 1%, no teste de deterioração controlada .....	53
3.5	Teste de deterioração controlada para a fenotipagem dos genótipos da Empresa Bayer.....	56
3.6	Expressão de Proteínas.....	62
4	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

Na cultura do milho tem sido observada crescente adoção de novas tecnologias com reflexos diretos na produtividade e produção de grãos, o que torna esta cultura de grande valor comercial e um dos cereais mais cultivados no Brasil e no mundo. No Brasil, esta cultura tem papel socioeconômico importante no agronegócio, uma vez que é cultivado em várias regiões, gera empregos e rendas além de apresentar múltiplas formas de utilização, seja para o consumo humano e animal ou na indústria.

O aumento da produtividade de grãos de milho está diretamente associado aos avanços científicos e tecnológicos alcançados em programas de melhoramento genético e na área de produção e tecnologia de sementes. Vale salientar, que em programas mais avançados de melhoramento de plantas, a qualidade das sementes tem sido uma das características também priorizadas durante os processos de seleção para o desenvolvimento de novas cultivares.

Neste contexto, a interface entre estas áreas do conhecimento é inquestionável. Associar o desenvolvimento de cultivares com características de interesse e as tecnologias desenvolvidas na área de produção e tecnologia de sementes é fundamental para garantir a produção e a comercialização de sementes de alta qualidade, fator determinante para garantir altas produtividades. No entanto, a obtenção de sementes com alta qualidade requer um planejamento criterioso em todas as etapas do processo de produção. A colheita é considerada uma das etapas mais importantes deste processo, por influenciar sobremaneira a qualidade de sementes, o que demanda o desenvolvimento de tecnologias avançadas.

Uma das tecnologias utilizadas em programas de controle de qualidade é a colheita de sementes de milho em espigas, uma vez que possui importantes vantagens em relação à colheita a granel, destacando-se a melhor qualidade das sementes uma vez que estas são colhidas próximas ao ponto de maturidade fisiológica. Este tipo de colheita também permite melhor viabilização das estruturas de beneficiamento e secagem, além de liberar as áreas mais cedo para as próximas culturas. No entanto, no momento da colheita, as sementes se encontram com altos teores de água o que as predispõe à maior deterioração até o processamento nas unidades de beneficiamento.

A deterioração de sementes envolve uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas que são influenciadas pela produção de espécies reativas de oxigênio, as quais estão associadas

à permeabilidade da membrana, degradação mitocondrial, peroxidação lipídica, dentre outros (Jhanji *et al.*, 2024).

As espécies reativas de oxigênio são formas ativadas ou reduzidas de oxigênio atmosférico, como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (Choudhury *et al.*, 2017). Sabe-se que o acúmulo das espécies reativas de oxigênio pode causar danos oxidativos às biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e DNA, o que compromete a integridade celular, culminando com a deterioração das sementes.

Entretanto, o controle da ação das espécies reativas de oxigênio pode ser feito por meio de um mecanismo de defesa, conhecido como sistema antioxidante (Santos *et al.*, 2017). Entre as enzimas antioxidantes podem ser citadas a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, dentre outras (Choudhury *et al.*, 2017; Nath *et al.*, 2018). Além destas, outras enzimas também podem estar associadas à deterioração de sementes como as enzimas da respiração como a piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase e malato desidrogenase (Ferreira *et al.*, 2007; Kluge *et al.*, 2017), esterase (Oliveira *et al.*, 2020), proteínas resistentes ao calor (Andrade, 2015) assim como as enzimas envolvidas no processo de germinação das sementes, a exemplo da alfa amilase (Diniz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020).

Apesar da complexidade do processo de deterioração em sementes, por meio de algumas pesquisas tem sido observada variabilidade genética para esta característica, que deve ser explorada em programas de melhoramento. Sabe-se que o desenvolvimento de novas cultivares nas empresas é um processo dinâmico e, por isso, há necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de metodologias seguras para a seleção de materiais genéticos quanto a tolerância à deterioração, na etapa de produção de sementes.

Um método rápido que possui potencial para a seleção de genótipos quanto a tolerância à deterioração é o teste de deterioração controlada, no qual as sementes são submetidas a altas temperaturas associadas aos altos teores de água.

Assim, objetivou-se nesta pesquisa, a adequação do teste de deterioração controlada para a fenotipagem de genótipos de milho quanto a tolerância das sementes à deterioração, após a colheita em espigas. Também foi avaliada a expressão de proteínas em sementes submetidas aos diferentes tratamentos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações sobre a cultura e colheita de sementes de milho

O milho é um dos cereais mais produzidos no Brasil e no mundo, sendo uma das culturas de maior relevância para o agronegócio. Utilizado na alimentação humana, animal e na indústria (Môro; Fritsche-Neto, 2017), apresenta alto valor nutritivo (Eiras *et al.*, 2014).

Nos últimos anos tem se observado mudanças importantes no cenário produtivo desta cultura, associadas a adoção de novas tecnologias, aumento da área plantada e adoção de práticas de manejos eficientes (Artuzo *et al.*, 2019), o que tem contribuído para a aumento da produtividade e produção de grãos de milho. Sabe-se que o aumento da produtividade está associado ao desenvolvimento de cultivares utilizando-se de técnicas avançadas para conferir características de interesse da indústria e dos agricultores. Estas características são veiculadas por meio das sementes, consideradas o principal insumo do agronegócio, o que demanda a obtenção de sementes com alta qualidade.

No entanto, a produção e a comercialização de sementes com alta qualidade tem sido um desafio para a indústria sementeira. Profissionais das empresas produtoras de sementes têm investido em programas de controle de qualidade interno por meio dos quais monitoram todas as etapas do processo produtivo com o objetivo de produzir e comercializar sementes com alta qualidade.

A interação entre profissionais que atuam em programas de melhoramento e os da área de produção é fundamental para alcançar este objetivo, uma vez que a qualidade de sementes de milho é influenciada sobremaneira pelo genótipo. Por meio de diferentes pesquisas, tem sido verificado variabilidade genética para tolerância aos fatores abióticos (Dutra *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2021; Silva Neta *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2019; Von Pinho, 2021). Contudo, são demandadas pesquisas relacionadas a tolerância à deterioração, ao considerar as condições de acondicionamento das sementes após a colheita em espigas até o processamento na usina de beneficiamento.

A colheita das sementes, etapa importante do processo de produção, influencia a qualidade das sementes, uma vez que está associada ao processo de deterioração das sementes, característica esta influenciada pelo genótipo. A maioria das sementes de milho é colhida em espigas e exige planejamento criterioso, no qual devem ser considerados vários fatores, desde a instalação dos campos de produção, a definição do momento da colheita, as condições de transporte até o processamento final (Mantovani *et al.*, 2015).

A predominância da colheita de sementes de milho em espigas se justifica pela possibilidade de ela ocorrer mais próxima ao ponto de maturidade fisiológica das sementes, quando poderá estar associada à menor deterioração e aos maiores valores de germinação e vigor (Vidigal *et al.*, 2009; Fiabane; Lazaretti, 2023). Além de reduzir os riscos de deterioração no campo, a antecipação da colheita permite maximizar o uso das áreas agrícolas (Fiabane; Lazaretti, 2023). Além disso, a colheita em espigas permite maior viabilidade das estruturas de secagem, de unidades de beneficiamento uma vez que é possível colher as sementes num intervalo maior de teores de águas, quando comparada a colheita à granel.

Ressalta-se que o teor de água das sementes de milho quando atingem o ponto de maturidade fisiológica é alto e varia com as cultivares. No ponto de maturidade fisiológica as sementes se desligam da planta e alcançam o máximo de matéria seca (Kumar *et al.*, 2012).

Segundo Schuh *et al.* (2013) a colheita deve ser realizada quando as sementes atingem teores de água entre 35 e 40%, quando foi observada melhor qualidade fisiológica. O atraso da colheita a partir do ponto de maturidade fisiológica pode prejudicar a qualidade das sementes, pois as mesmas podem estar expostas a condições desfavoráveis do campo (Fiabane; Lazaretti, 2023). Faria (2007) verificou que os teores de água de sementes de milho na LL5 (linha de leite 5), quando o endosperma está completamente sólido, com ausência da linha de leite, o teor de água variou de 27,3% e 32%.

Os resultados de pesquisas nas quais foram avaliados, momento de colheitas de sementes de milho com diferentes teores de água são variáveis. Isto pode ser explicado em funções dos diferentes genótipos utilizados nestas pesquisas.

Sabe-se que após a colheita em espigas, as sementes são transportadas e muitas das vezes os caminhões são considerados armazéns móveis, até a descarga em usinas de beneficiamento (Nascimento *et al.*, 2016). Esse tempo de espera das sementes dentro do caminhão pode ocasionar aumento de temperatura, com isso, causando deterioração e perdas na qualidade das sementes. A qualidade pode ser afetada por fatores como umidade, temperatura, dentre outros (Marcos Filho, 2015).

Assim, a colheita deve ser planejada juntamente com o escoamento da produção, para garantir alta qualidade das sementes (Nascimento *et al.*, 2016), considerando-se também o tempo de espera das sementes dentro do caminhão, antes do processamento.

De acordo com Andrade (2015), em sementes de milho com teores de água acima de 19% é recomendado que o período entre a colheita, transporte e processamento em UBS seja inferior a dois dias para manter a qualidade das mesmas. Os principais fatores que afetam a qualidade das sementes antes e após a colheita são umidade relativa do ar, teor de água e

temperatura (Nakagawa; Carvalho 2012). O aumento da temperatura na massa dos grãos, juntamente com o teor de água, intensifica o processo de deterioração das mesmas (Andrade *et al.*, 2015). Também deve ser considerado que o tempo de espera ao qual as sementes são submetidas durante o transporte e o início dos processos de beneficiamento pode causar perdas da qualidade das mesmas, devido ao aumento da temperatura e a consequente deterioração (Smaniotto *et al.*, 2014).

## 2.2 Deterioração em sementes

O processo de deterioração em sementes envolve diversas mudanças degenerativas de origem física, fisiológica e bioquímica e é influenciado por fatores bióticos e abióticos, com consequente redução da velocidade e uniformidade de germinação e emergência de plântulas, potencial de armazenamento até a perda da viabilidade (Costa, 2012).

Com a deterioração ocorrem alterações em vários processos, a exemplo da atividade mitocondrial, redução das reservas de armazenamento, desnaturação de proteínas, diminuição dos níveis de açúcares, aumento dos ácidos graxos livres, redução da síntese de proteína e RNA e também redução de atividades enzimáticas. Para Sharma *et al.* (2012) a deterioração em sementes também está associada a produção de espécies reativas de oxigênio e à integridade das membranas celulares.

As espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidas em vários compartimentos celulares como: mitocôndrias, cloroplastos, membranas celulares e subcelulares (Kumar *et al.*, 2015; Mittler, 2017; Tiwari; Yadav, 2019; Jhanji *et al.*, 2024). Estas podem danificar organelas, tecidos e provocar perda da viabilidade das sementes (Pukacka; Ratajczak, 2005; Tiwari; Yadav, 2019).

Um dos principais efeitos tóxicos ocasionados pelo EROs é a peroxidação dos lipídeos (Garg; Manchada, 2009; Choudhury *et al.*, 2017). A peroxidação lipídica interfere na permeabilidade de membrana, com a consequente perda de viabilidade das sementes (Ratajczak, Kalembra, 2018) e ainda pode causar danos em proteínas e no material genético (Fernandez *et al.*, 2021).

A produção de EROs pode ser evitada ou controlada por um sistema antioxidante presente em células (Garg; Manchada, 2009), sendo que estes incluem compostos enzimáticos e não enzimáticos (Kim *et al.*, 2010; Kaur; Sharma; Das, 2020; Tanveer; Shabala, 2018). Dentre as principais enzimas que se destacam no processo antioxidante estão: catalase, superóxido dismutase, peroxidase, dentre outras (Choudhury *et al.*, 2017). Já o sistema não enzimático é

composto pelo ácido ascórbico, glutathiona, tocoferóis,  $\beta$ -caroteno e polifenóis (Gill; Tuteja, 2010; Tiwari; Yadav, 2019).

Dentre as enzimas antioxidantes a superóxido dismutase age na primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) e transforma o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Gill, Tuteja, 2010; Dutra *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019; Paul; Roychoudhury, 2017). Estas reações acontecem principalmente no citosol, cloroplasto e mitocôndria. Já a catalase tem potencial de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Gill, Tuteja *et al.*, 2013; Silva Neta *et al.*, 2020). A catalase tem a função de remover as EROs e também em condições estressantes consumir o peróxido de hidrogênio (Mallick; Mohn, 2000), e atua principalmente nos peroxissomos (Choudhary; Kumar; Kaur, 2019; Paul; Roychoudhury, 2017). Em condições de estresses pode ocorrer maior atividade da enzima catalase, indicando maior tolerância a estresses (Akçay *et al.*, 2010).

No processo de deterioração das sementes ocorrem também alterações relacionadas a atividade das enzimas respiratórias, tanto daquelas da rota aeróbica, quanto da anaeróbica, com redução da germinação e vigor (Marini *et al.*, 2013; Copeland; McDonald, 2001). Segundo Taiz e Zeiger (2009) no processo de deterioração das sementes, a atividade da enzima malato desidrogenase é reduzida.

Neste contexto, fica claro que o processo de deterioração de sementes envolve mudanças nas concentrações de várias substâncias incluindo carboidratos, lipídios, enzimas, proteínas de armazenamento e compostos antioxidantes. Isto resulta na perda de função e na redução da capacidade das sementes de realizar metabólicos essenciais para a germinação e o crescimento das plântulas. Compreender os aspectos bioquímicos da deterioração de sementes de milho é fundamental para desenvolver estratégias eficazes que minimizem os efeitos negativos da deterioração e garantam a qualidade das sementes.

O processo deteriorativo em sementes pode ser iniciado a partir do momento em que as sementes alcançam a maturidade fisiológica. Após, acontece progressivamente a deterioração natural, dependendo da condição fisiológica, condições ambientais, ação de microrganismos, pragas e estresses sobretudo do genótipo (Costa, 2012; Fernandez *et al.*, 2021).

Assim, é importante que a colheita seja realizada o mais próximo possível do ponto de maturidade fisiológica das sementes, para evitar que estas fiquem expostas às condições adversas no campo. Isso justifica a predominância da colheita de sementes em espigas no Brasil. No entanto, é comum a colheita de sementes com altos teores de água, o que pode também aumentar a predisposição destas à deterioração em função do aumento da temperatura da massa

após a colheita, durante o transporte, até que as mesmas sejam processadas nas unidades de beneficiamento de sementes.

Tão importante quanto adotar métodos de colheita seguros é conhecer a influência do genótipo sobre a tolerância à deterioração nas condições descritas acima. Com estas informações é possível estudar metodologias de testes fisiológicos para fenotipar materiais genéticos, para a característica de tolerância à deterioração e fazer uso das mesmas em processos de seleção em programas de melhoramento.

### **2.3 Teste de deterioração controlada para a fenotipagem dos genótipos de milho quanto a tolerância das sementes à deterioração**

Em programas de melhoramento, tem-se utilizado métodos de fenotipagem como uma ferramenta para selecionar cultivares com características de interesse. Estes podem ser utilizados em diferentes níveis a exemplos de moléculas, plântulas, plantas e em diferentes condições controladas ou em campo (Lobos *et al.*, 2017).

O teste de deterioração controlada é um método rápido e promissor, eficiente para ser utilizado na seleção de materiais genéticos para a característica de tolerância à deterioração. Em diferentes espécies o teste de deterioração controlada tem se mostrado eficiente (Silva *et al.*, 2015), para a classificação em relação ao vigor, de diferentes espécies.

Esse teste apresenta características semelhantes ao teste de envelhecimento acelerado, porém, durante o período de envelhecimento, apresenta um melhor controle da umidade e temperatura (Hampton; Tekrony, 1995; Zucareli *et al.*, 2011). O controle do teor de água das sementes deve ser realizado de forma criteriosa, para garantir um bom desempenho do teste (Marcos Filho; Novembre, 2009). Essa uniformização no teor de água antes da realização do teste permite que as sementes entrem em equilíbrio, sendo que esta uniformização acontece antes de as sementes iniciarem o processo de deterioração (Torres *et al.*, 2012). Esse ajuste do teor de água deve ser realizado de forma minuciosa, pois se realizado inadequadamente pode apresentar um resultado não desejado. Com isso as mesmas são expostas a um estresse mais rigoroso do que acontece no teste de envelhecimento acelerado (Fernandez *et al.*, 2021). Essa exposição das sementes a temperatura e teor de água elevados pode ocasionar redução no vigor das sementes (Fernandez *et al.*, 2021). Esse teste tem como princípio, por meio do aumento de temperatura e teor de água, acelerar o processo de deterioração. Porém, a eficiência deste teste para diferentes espécies depende de uma padronização (Zucareli *et al.*, 2011).

No teste de deterioração controlada, antes do início do período de deterioração em alta temperatura, as sementes são submetidas ao mesmo nível de teor de água (Matthews, 1981; Hampton e Tekrony, 1995). Após a realização da deterioração controlada para averiguar os níveis de vigor das sementes, é utilizado o porcentual de germinação (Krzyzanowski, 1999).

Para Zucareli *et al.* (2011) a avaliação do vigor das sementes de milho pelo teste de deterioração com combinações de 24 h-45 °C, 48 h-45 °C e 16 h-45 °C e o teor de água 15, 20 e 25%, respectivamente, se mostraram apropriados para a espécie, correlacionando positivamente com a velocidade e emergência de plântula. Já Dutra *et al.* (2015) utilizaram o teor de água de 25% e as sementes foram submetidas à deterioração por 48 horas a 42 °C, com o objetivo de selecionar genótipos de milho para a característica de tolerância a altas temperaturas durante o processo de germinação.

Padilha *et al.* (2001) verificam que o teste de deterioração controlada em sementes de milho com 15 e 20%, por 24 horas a 40 °C foi eficiente para classificar lotes de média e alta qualidade. Também verificaram correlação positiva entre os resultados obtidos no teste de emergência de plântulas e o de deterioração controlada em sementes com teor de 25% de água, por 48 horas de deterioração. Já Marinho *et al.* (2021), verificaram que em sementes de milho doce as combinações de 8 horas a 40 °C e 8 horas a 45 °C com o teor de água de 20%, permitiram distinguir os materiais na primeira contagem e germinação após as sementes serem submetidas ao teste de deterioração controlada.

O teste de deterioração controlada tem sido utilizado para a avaliação do vigor de várias espécies. Em sementes de crambe, o teste pode ser realizado a 18% no teor de água a 45 °C por 24 horas avaliando-se a germinação no quinto dia após a semeadura (Leão-Araújo *et al.*, 2017). Em sementes de coentro a combinação mais indicada é 21% no teor de água, a 45 °C por 24 horas (Torres *et al.*, 2012). Em sementes de repolho, o teor de água indicado é de 20%, com a combinação de 45 °C/24horas (Bernardes *et al.*, 2015). Já nas sementes de beterraba recomenda-se 22% no teor de água, a 25 horas por 45 °C (Silva; Vieira, 2010). Já nas sementes de canola, o teor de água indicado é de 18%, com a combinação de 45 °C por 24 horas (Silva *et al.*, 2023). Para Leão-Araújo *et al.* (2017), as espécies e até mesmo as cultivares, expressam resultados diferentes quando se utilizam procedimentos recomendados para outras espécies.

Diante do exposto, entende-se que o teste de deterioração controlada possa ser avaliado para fenotipagem de materiais genéticos com tolerância à deterioração de sementes. Associado a utilização do teste para este fim é importante a viabilização da avaliação dos resultados de fenotipagem de forma rápida e precisa. Sabe-se que, cada vez mais, tem-se buscado o uso de tecnologias que demandem menor tempo de execução e mais precisão dos resultados (Kumar;

Ashok, 2021). O uso da análise de imagem por meio do sistema GroundEye, pode ser considerado uma ferramenta para a avaliação mais precisa, menos subjetiva e com possível padronização (Andrade *et al.*, 2023) e sem interferência humana nos resultados (Bej *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2020).

É considerada uma técnica promissora na área de sementes (Pinheiro *et al.*, 2022) e tem se mostrado bastante eficiente para avaliações referentes a qualidade fisiológica e física de sementes (Medeiros; Pereira; Silva, 2018; Pinto *et al.*, 2015). Além disso, a utilização da análise de imagem aumenta a confiabilidade dos resultados, pois pode reduzir o erro humano e as imagens podem ser arquivadas para serem avaliadas posteriormente (Alvarenga; Marcos Filho; Gomes Júnior, 2012).

Para Andriazzi *et al.* (2020) o uso do aparelho Groundeye para a análise de sementes de milho foi promissor para a avaliar o potencial fisiológico das sementes. Ferreira *et al.* (2020) selecionaram sementes crioulas em relação aos caracteres quantitativos, por meio do Groundeye. Já Marques *et al.* (2019) diferenciaram espécies e estádios de inflorescência de sempre viva. De Jesus *et al.* (2023) ao avaliarem a coloração do tegumento e características morfológicas de sementes de feijão fava, verificaram que a análise de imagem é uma técnica promissora para as análises de características fenotípicas. Andrade *et al.* (2023) verificaram que a utilização da análise de imagem foi considerada uma técnica eficiente para avaliar a qualidade dos revestimentos no tratamento de sementes de soja.

Catão *et al.* (2017) ao avaliarem sementes e mudas de milho pipoca submetidas a baixas temperaturas, evidenciaram a eficácia do software Groundeye. Já Silva *et al.* (2021) verificaram que a fenotipagem realizada pela análise de imagem foi eficiente para discriminar genótipos de goiabeira. Lima *et al.* (2023) classificaram lotes de sementes de algodão, por meio de características de plântulas de algodão utilizando-se da análise de imagem.

Von Pinho (2021) verificou que a análise de imagem, por meio do sistema Groundeye, realizada aos cinco dias após a semeadura, em linhagens de milho contrastantes, para a característica de tolerância ao déficit hídrico, é uma técnica eficiente para fenotipagem, por demandar menor mão de obra e menor tempo, comparada aos métodos convencionais.

Assim, viabilizar métodos pra a fenotipagem de materiais genéticos com características de interesse, de forma segura e rápida é fundamental em processos de seleção em programas de melhoramento de milho.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. de *et al.* Capacidade de combinação e heterose de genótipos de milho sob estresse hídrico durante a germinação de sementes e emergência de plântulas. **Crop Science**, v. 1, p. 33-43, 2019.
- AKCAY, C. U.; ERCAN, O.; KAVAS, M. *et al.* Danos oxidativos induzidos pela seca e respostas antioxidantes em mudas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Regulamento de Crescimento de Plantas**, v. 61, p. 21–28, 2010.
- ALVARENGA, R. O.; MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação do vigor de sementes de milho super doce por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 488-494, set. 2012.
- ANDRADE, D.; BERNARDES de *et al.* Ferramentas de inteligência artificial e escala diagramática para avaliação da qualidade de revestimento em sementes de soja tratadas. **Computação Neural e Aplicações**, p. 1-6, 2023.
- ANDRADE, J. C. de *et al.* **Qualidade do milho safrinha em função do tempo de transporte após a colheita**. 2015. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2015.
- ANDRIAZZI, C. V. G. *et al.* Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho pelo sistema GroundEye L800®. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 14, 2020.
- ARTUZO, F. D. *et al.* O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 515-540, 2019.
- BERNARDES, P. M. *et al.* Testes de deterioração controlada e de envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de repolho. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 51-58, 2015.
- BEJ, G. *et al.* Extração de características DUS baseadas na aparência do caule, flor e semente de quiabo usando processamento de imagem. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE INTELIGÊNCIA COMPUTACIONAL, CIÊNCIA DE DADOS E COMPUTAÇÃO EM NUVEM: IEM-ICDC, 2021, Singapura. **Anais [...]**. Singapura: Springer Nature, 2022. p. 209-223.
- CATÃO, H. C. R. M.; CAIXETA, F. Alterações fisiológicas, isoenzimáticas e análise de imagens de sementes de pipoca submetidas a baixas temperaturas. **Journal of Seed Science**, v. 234-243, 2017.
- CHOUDHARY, A.; KUMAR, A.; KAUR, N. ROS and oxidative burst: Roots in plant development. **Plant Diversity, Beijing**, v. 42, n. 1, p. 33-43, 28 out. 2019.
- CHOUDHURY, F. K. *et al.* Espécies reativas de oxigênio, estresse abiótico e combinação de estresse. **O Diário da Planta**, v. 5, p. 856-867, 2017.

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

COSTA, C. J. **Deterioração e armazenamento de sementes de hortaliças**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012.

DE JESUS, D. S. *et al.* Phaseolus lunatus L.: análise de imagens do fenótipo de sementes de leguminosas. **Recursos Genéticos e Evolução das Culturas**, p. 1-11, 2023.

DINIZ, R. P.; VON PINHO, I. V.; PANIAGO, B. D. C.; VON PINHO, E. V. D. R.; DOS SANTOS, H.; VON PINHO, R. G.; CALDEIRA, C. M. Qualidade fisiológica e expressão de alfa-amilase em sementes de milho produzidas em condições de estresse salino e hídrico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 17, n. 1, p. 37-48, 2018.

DUTRA, S. M. F. *et al.* Genes related to high temperature tolerance during maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18047-18058, 2015.

EIRAS, D. de L.; BIAGGIONI, M. A. M. Perda de matéria seca em grãos de milho submetidos a sistemas de secagem natural e artificial. **Energia na Agricultura**, p. 228-235, 2014.

FARIA, M. A. V. de R. **Maturação de sementes de milho: aspectos físicos, bioquímicos e fisiológicos**. 2007. 129 p. Tese (Doutorado em Agronomia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

FERNANDEZ, L. G.; JESUS, T. S. R.; SANTOS, P. C.; JESUS, R.; SANTOS, P. (Org.) **Ricinus communis L.:** sementes, envelhecimento e estresse oxidativo. Salvador: EDUFBA, 2021.

FERREIRA, L. A. *et al.* Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 80-89, 2007.

FERREIRA, O. J. M. *et al.* Tecnologia de análise de imagens para a seleção de sementes crioulas de milho. **Global Science and Technology**, v. 13, n. 2, 2020.

FIABANE, R.; LAZARETTI, N. S. Efeitos da antecipação da colheita sobre a qualidade fisiológica de semente de milho. **Revista Cultivando o Saber**, p. 120-133, 2023.

GARG, N.; MANCHADA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, London, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2009.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. Controlled deterioration test. *In*: HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. Zurich: International Seed Testing Association, 1995. p.70-78.

JHANJI, S. *et al.* Explorando o ajuste fino entre fitohormônios e cascata de sinalização de ROS na regulação da dormência de sementes, germinação e desenvolvimento de plântulas. **Fisiologia e Bioquímica Vegetal**, p. 108352, 2024.

KALEMBA, E. M.; RATAJCZAK, E. O efeito de um nível duplo de glutathione nos parâmetros que afetam a germinabilidade de sementes recalcitrantes de *Acer saccharinum* durante a secagem. **Jornal de Fisiologia Vegetal**, v. 223, p. 72-83, 2018.

KAUR, G.; SHARMA, S.; DAS, N. Comparação da atividade da catalase em diferentes órgãos de cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas em condições de campo e purificação por partição trifásica. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 1-11, 2020.

KIM, M. D. *et al.* Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the CuZnSOD, APX and NDPK2 genes. **Physiologia Plantarum**, v. 140, n. 2, p. 153-162, 2010.

KLUGE, E. R. *et al.* Expression of catalase, alcohol dehydrogenase, and malate dehydrogenase in rot grains upon fungicide use on maize hybrids grown at different spacings. **Genet. Mol. Res.**, v. 16, n. 2, 2017.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. [S.l.]: Abrates, 1999.

KUMAR, P.; RAI, P.; CHATURVEDI, A. K.; KHETARPAL, S.; PAL, M. Alto CO<sub>2</sub> atmosférico atrasa a senescência das folhas e a maturidade da cultura do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). **Jornal Indiano de Fisiologia Vegetal**, v. 17, n. 3-4, p. 254-258, 2012.

KUMAR, S. P. J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. do N. A morte da semente: Funções duplas de espécies reativas de oxigênio na fisiologia das sementes. **Ana. Robô**, v. 116, 663-668, 2015.

KUMAR, P.; ASHOK, G. Projeto e fabricação de robô inteligente para semeadura de sementes. **Materiais Hoje: procedimentos**, v. 354-358, 2021.

LEÃO-ARAÚJO, E. F. *et al.* Controlled deterioration test and use of the Seed Vigor Imaging System (SVIS®) to evaluate the physiological potential of crambe seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 4, p. 393-400, 2017.

LIMA, J. M. E. *et al.* Efeito dos resíduos de deslincamento e neutralizantes na qualidade fisiológica de sementes de algodão armazenadas determinada por análise de imagens de fenotipagem. **Journal of Seed Science**, v. 45, 2023.

LIU, B.; SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A. Mechanisms of silicon-mediated amelioration of salt stress in plants. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 307, 2019.

LOBOS, G. A. *et al.* Fenotipagem e fenômica de plantas para melhoramento de plantas. **Fronteiras na Ciência das Plantas**, v. 8, p. 2181, 2017.

- MANTOVANI, E. C.; PIMENTEL, M. A. G. Colheita. *In*: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Eds.). **Milho do plantio a colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 323-351.
- MARINHO, J. de L. *et al.* Teste de deterioração controlada para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho doce. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 949-962, 2021.
- MARCOS FILHO, J. Teste de vigor de sementes: uma visão geral da perspectiva do passado, presente e futuro. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 363-374, ago. 2015.
- MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. L. C. Avaliação do Potencial Fisiológico de sementes de hortaliças. *In*: NASCIMENTO, W. M. (Ed.). **Tecnologia de Sementes de Hortaliças**. Brasília: Embrapa Meio Ambiente, 2020. V. 2, N. 3, 2020
- MARQUES, E. R. *et al.* Distinção de espécies e estádios de maturação de sementes de *Comanthera* spp. por análise de imagem e citometria de fluxo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 13-21, 2019.
- MARINI, P. *et al.* Indicativos da perda de qualidade de sementes de arroz sob diferentes temperaturas através da atividade enzimática e respiratória. **Interciência**, v. 38, n. 1, p. 54-59, 2013.
- MATTHEWS, S. Evaluation of techniques for germination and vigor studies. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, p. 543-51, 1981.
- MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D.; SILVA, J. A. Processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 13, n. 3, p. e5540, 2018.
- MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n.1, p.11-19, 2017.
- MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. Milho: do plantio à colheita. (Eds.). GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. G. Viçosa: UFV, 2015. P. 207-223.
- NAKAGAWA, J.; CARVALHO, N. M. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, 2012. p. 524-590.
- NASCIMENTO, Q. *et al.* Perdas quantitativas no transporte curto de grãos de milho (*Zea Mays* L.) em função de aspectos gerais de pós-colheita no norte do estado de Mato Grosso. **Navus-Revista de Gestão e Tecnologia**, v. 6, n. 1, p. 60-71, 2016.
- NATH, M. *et al.* Aumento do conteúdo de nitrogênio e fósforo mediado por micróbios para melhoramento de culturas. *In*: **Melhoramento de culturas através da biotecnologia microbiana**. [S.l.], Elsevier, 2018. p. 293-304.
- OLIVEIRA, T. L. de *et al.* Alterações bioquímicas e qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos químicos e tempos de armazenamento. **Journal of Seed Science**, v. 42, 2020.

PADILHA, L. *et al.* Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 198-204, 2001.

PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties. **Plant Gene**, v. 11, n. 2, p. 124-132, 2017.

PINHEIRO, R. de M.; GADOTTI, G.; BERNARDY, R. *et al.* Processamento de imagens como ferramenta importante para inteligência artificial no setor de sementes. **Rev Agrar Acad.**, v. 5, p. 89-101, 2022.

PINTO, C. A. G. *et al.* Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. **Revista de Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2015.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **J. Plant Physiol**, v. 162, p. 873-885, 2005.

SANTOS, R. F.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Mudanças morfológicas e fisiológicas durante a maturação das sementes de quiabo avaliadas através da análise de imagem. **Scientia Agricola**, v. 77, n. 3, p. 1-9, 2020.

SANTOS, M. C. *et al.* Atividade enzimática e expressão gênica relacionada à tolerância ao estresse hídrico em sementes e mudas de milho. **Revista Biociências**, v. e37079, p. 1981-3163, 2021.

SCHUH, G. C. *et al.* Secagem de linhagens de milho colhido em espiga para seleção de plantas-mãe na produção de sementes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 8-14, 2013.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 26 p, 2012.

SILVA, C. C. A. da *et al.* Fenotipagem digital em linhagens de goiaba: caracterização de sementes. **Revista Funcional de Melhoramento de Plantas**, v. 2, 2021.

SILVA, A. B. C. *et al.* Controlled deterioration test for evaluation of sunn hemp seed vigor. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p. 249-253, 2015.

SILVA, I. J. *et al.* Vigor de sementes de canola pelo teste de deterioração controlada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 44, n. 3, p. 1113-1126, 2023.

SILVA, J. B. da; VIEIRA, R. D. Deterioração controlada em sementes de beterraba. **Revista Brasileira de Sementes**, p. 69-76, 2010.

SILVA NETA, I. C. *et al.* Expressão gênica e controle genético para tolerância ao frio durante a germinação de sementes de milho. **Biologia vegetal BMC**, v. 1-14, 2020.

SMANIOTTO, T. A. de S. *et al.* Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 446-453, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TANVEER, M.; SHABALA, S. Visando Mecanismos Reguladores Redox para Tolerância ao Estresse Salinitário em Culturas. *In*: KUMAR, V.; WANI, S.; SUPRASANNA, P.; Tran, LS. (Eds) **Respostas à Salinidade e Tolerância em Plantas**. Cham: Springer, 2018. V. 1.

TIWARI, Y. K.; YADAV, S. K. Tolerância ao estresse por altas temperaturas em milho (*Zea mays* L.): Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Journal of Plant Biology**, v. 93-102, 2019.

TORRES, S. B. *et al.* Deterioração controlada em sementes de coentro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 319-326, 2012.

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

VON PINHO, I. V. **Fenotipagem e expressão gênica para tolerância ao déficit hídrico em milho**. 2021. 114 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

ZUCARELI, C. *et al.* Teste de deterioração controlada na avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 732-742, 2011.

## **CAPÍTULO 2 ADEQUAÇÃO DO TESTE DE DETERIORAÇÃO CONTROLADA PARA A SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO COM SEMENTES TOLERANTES À DETERIORAÇÃO, APÓS A COLHEITA EM ESPIGA**

### **RESUMO**

A colheita de sementes de milho em espigas com teores de água elevados é predominante no Brasil. Entretanto, são mais suscetíveis à deterioração devido ao aumento da temperatura da massa de sementes, muitas vezes associadas à presença de patógenos. Neste processo tem sido observada variabilidade genética para a tolerância à deterioração das sementes. Assim, foi proposta a adequação do teste de deterioração controlada para a classificação de genótipos de milho quanto à tolerância das sementes à deterioração, após a colheita em espigas. Para isso foram utilizados materiais genéticos do programa de melhoramento de milho da UFLA e da Bayer, que pudessem apresentar variabilidade genética para esta característica, foram avaliadas as seguintes variáveis do teste de deterioração controlada: teor de água das sementes durante o processo de deterioração (25% e 35%), secagem das sementes após o processo de deterioração (com ou sem secagem), tempo de exposição das sementes no processo de deterioração (48 e 72 horas) e a desinfestação de sementes com hipoclorito de sódio 1%. Em parte do material genético, foi avaliada, em sementes, a expressão das enzimas envolvidas no processo de respiração (Malato Desidrogenase, Álcool Desidrogenase, Piruvato descarboxilase), das envolvidas nos sistemas oxidativos (Superóxido Dismutase, Catalase, Peroxidase), e também da Esterase, Alfa Amilase e de proteínas resistentes ao calor. Concluiu-se que, por meio do teste de deterioração controlada, em sementes com teor de água de 25%, acondicionadas por 48 horas a 42 °C, e sem desinfestação com hipoclorito, foi possível classificar os genótipos de milho quanto a tolerância das sementes à deterioração, após três dias da semeadura. Também houve menor expressão das enzimas Piruvato Descarboxilase, Álcool Desidrogenase, Malato Desidrogenase, Superóxido Dismutase, Catalase, Peroxidase, Esterase, Alfa Amilase e de proteínas resistentes ao calor, em sementes de milho submetidas ao processo de deterioração controlada, expressões estas associadas à menor qualidade fisiológica em sementes deterioradas. Foi observado também, a influência do genótipo sobre a expressão de algumas proteínas avaliadas nesta pesquisa.

Palavra-chave: Zea mays; deterioração; metodologia; ezimas.

## ABSTRACT

The harvesting of corn seeds from ears with high water content is predominant in Brazil. However, they are more susceptible to deterioration due to increased temperature of the seed mass, often associated with the presence of pathogens. In this process, genetic variability has been observed for tolerance to seed deterioration. Thus, the suitability of the controlled deterioration test for the classification of corn genotypes was proposed in terms of seed tolerance to deterioration after harvesting on the cob. For this, genetic materials from the UFLA and Bayer corn breeding program that could present genetic variability for this characteristic were used. The following variables from the controlled deterioration test were evaluated: water content of the seeds during the deterioration process (25% and 35%), drying of seeds after the deterioration process (with or without drying), exposure time of seeds during the deterioration process (48 and 72 hours) and seed disinfestation with 1% sodium hypochlorite. In part of the genetic material, the expression of enzymes involved in the respiration process (Malate Dehydrogenase, Alcohol Dehydrogenase, Pyruvate decarboxylase), those involved in oxidative systems (Superoxide Dismutase, Catalase, Peroxidase) and Esterase, was evaluated in seeds. Alpha Amylase and heat resistant proteins. It was concluded that through the controlled deterioration test, on seeds with a water content of 25%, stored for 48 hours at 42°C, and without disinfestation with hypochlorite, it was possible to classify the corn genotypes in terms of seed tolerance to deterioration, three days after sowing. There was also lower expression of the enzymes Pyruvate Decarboxylase, Alcohol Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase, Superoxide Dismutase, Catalase, Peroxidase, Esterase, Alpha Amylase and heat-resistant proteins, in corn seeds subjected to the controlled deterioration process, expressions associated with lower quality physiological in deteriorated seeds. The influence of the genotype on the expression of some proteins evaluated in this research was also observed.

Keyword: *Zea mays*; deterioration; methodology; enzymes.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o mercado de sementes de milho representa cerca de 50% em relação as demais espécies, em função dos valores agregados a ela, sendo que a semente é o veículo de tecnologias geradas. Entretanto, os desafios enfrentados na indústria sementeira de milho, para garantir a produção e a comercialização de sementes com alta qualidade ainda são muitos.

Um desses desafios é garantir a colheita de sementes nas melhores condições possíveis e evitar que as mesmas fiquem expostas às condições adversas no campo. Isso justifica a predominância da colheita de sementes de milho em espigas.

A colheita de sementes de milho em espigas pode ser realizada próxima ao ponto de maturidade fisiológica das sementes, quando as mesmas podem apresentar menor deterioração e os maiores valores de germinação e vigor (Vidigal *et al.*, 2009; Fiabane; Lazaretti, 2023), nas condições as quais foram produzidas. A colheita exige um planejamento criterioso no qual devem ser considerados vários fatores, desde a instalação dos campos de produção à definição do momento da colheita, as condições de transporte até o processamento final (Mantovani *et al.*, 2015).

Após a colheita as sementes são transportadas em caminhões que são considerados armazéns móveis, até o processamento pós-colheita (Nascimento *et al.*, 2016). Da colheita ao processamento pode ocorrer aumento de temperatura da massa de sementes e, como consequência, a deterioração e perda de qualidade destas. Sabe-se que a deterioração é influenciada por fatores como umidade, temperatura, genótipo, dentre outras (Marcos Filho, 2015).

As alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a deterioração das sementes são influenciados pelas espécies reativas de oxigênio, as quais estão associadas à permeabilidade da membrana, degradação mitocondrial, peroxidação lipídica, dentre outros (Jhanji *et al.*, 2024).

As espécies reativas de oxigênio são formas ativadas ou reduzidas de oxigênio atmosférico, como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (Choudhury *et al.*, 2017). Estão são encontradas nas mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e membranas plasmáticas. (Singh *et al.*, 2019; Dmitrieva *et al.*, 2020). Sob condições de estresses ocorre uma maior produção das espécies reativas de oxigênio (Huang *et al.*, 2024).

Entretanto, o controle da ação das espécies reativas de oxigênio, pode ser feito por meio de um mecanismo de defesa conhecido como sistema antioxidante. Dentre as enzimas antioxidantes podem ser citadas a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, dentre outras

(Choudhury *et al.*, 2017; Nath *et al.*, 2018). As enzimas da respiração como a piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase e malato desidrogenase, também podem estar associadas à deterioração das sementes (Ferreira *et al.*, 2007; Kluge *et al.*, 2017), assim como a esterase (Oliveira *et al.*, 2020), proteínas resistentes ao calor (Andrade *et al.*, 2015) e enzimas envolvidas no processo de germinação das sementes, a exemplo da alfa amilase (Diniz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020).

O processo de deterioração em sementes de milho é complexo e envolve interação entre fatores moleculares, físicos e genéticos. Por meio de pesquisas tem sido observado variabilidade genética para a característica de deterioração de sementes. Assim, é fundamental desenvolver metodologias de fenotipagem as quais possam ser utilizadas em programas de melhoramento, para a seleção de genótipos tolerantes à deterioração. Esta fenotipagem pode ser realizada em nível molecular, por meio de características de plântulas, plantas e em diferentes condições controladas ou em campo (Lobos *et al.*, 2017).

A fenotipagem realizada em nível molecular e em estádios de plântulas apresenta vantagens, uma vez que podem ser realizadas repetidas vezes durante o ano, devido a menor demanda de espaço e tempo (Meeks *et al.*, 2013; Pace *et al.*, 2014). Neste contexto, o teste de deterioração controlada foi proposto para a fenotipagem de genótipos de milho para a característica de tolerância às altas temperaturas durante o processo de germinação das sementes (Dutra *et al.*, 2015).

Em diferentes espécies, o teste de deterioração controlada tem se mostrado eficiente para a classificação de lotes de sementes em relação ao vigor (Silva *et al.*, 2015). Neste teste, antes do início do período de deterioração sob altas temperaturas, o teor de água das sementes é ajustado e único em todas as amostras (Matthews, 1981; Hampton; Tekrony, 1995). Após a realização da deterioração controlada, as mesmas são submetidas ao teste de germinação para posterior avaliação das características de plântulas (Krzyzanowski; França Neto, 1999).

A análise de imagem por meio do sistema GroundEye pode ser utilizada como uma ferramenta, para a avaliação das características de plântulas. Apresenta vantagens consideráveis pela precisão, menor subjetividade durante a avaliação e com possível padronização (Andrade *et al.*, 2023). Von Pinho (2021) verificou que a análise de imagem, realizada aos cinco dias após a semeadura, em linhagens de milho, é uma técnica eficiente para fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico, por demandar menor mão de obra e menor tempo, comparada aos métodos convencionais.

A utilização de metodologias seguras para a fenotipagem de materiais genéticos que apresentem sementes tolerantes à deterioração após a colheita em espigas utilizando-se de ferramentas avançadas, constitui um desafio nas empresas produtoras de sementes.

Assim, o objetivo neste trabalho foi propor a adequação do teste de deterioração controlada para a fenotipagem de genótipos de milho quanto a tolerância das sementes à deterioração, após a colheita em espigas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização dos experimentos**

Os experimentos de campo foram conduzidos na área experimental do setor de Olericultura do Departamento de Agricultura, da Escola de Ciências Agrárias de Lavras - ESAL, da Universidade Federal de Lavras. O setor de olericultura está localizado no município de Lavras, cujas coordenadas geográficas são: latitude 21°13'18" S, longitude 44°58'11" W e altitude de 914 metros. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Central de Pesquisas em Sementes, localizada no setor de sementes, do Departamento de Agricultura da ESAL/UFLA.

### **2.2 Seleção dos materiais genéticos utilizados para a fenotipagem**

A seleção de genótipos utilizados nesta pesquisa foi realizada a partir dos resultados obtidos por Dutra *et al.* (2015), em pesquisa relacionada à classificação de genótipos de milho para a característica de tolerância as altas temperaturas durante o processo de germinação das sementes. Foram utilizadas sementes de duas linhagens, classificadas como tolerantes, 2 T e 5 T e três não tolerantes (NT), 1 NT, 3 NT e 4 NT e as sementes dos híbridos meios irmãos, oriundos dos cruzamentos 4 NT como parental masculino e 1 NT, 2 T, 3 NT e 5 T como parentais femininos.

Após a adequação da metodologia de fenotipagem para a característica de tolerância das sementes à deterioração pós-colheita em espigas com os materiais genéticos supracitados, foram utilizadas sementes dos genótipos da empresa Bayer, UJRM-8419; UKGRAO-1583; UKGRAO-1383; U1R1M-5047 e IR2M-0080. As sementes dos materiais genéticos da Bayer foram produzidas em campos de produção da empresa e a seleção destes materiais foi feita por profissionais da empresa Bayer.

### 2.3 Produção de sementes de linhagens e híbridos de milho, materiais genéticos UFLA

A produção de sementes das linhagens e híbridos foi realizada sob as mesmas condições edafoclimáticas, adotando-se uma população de 60000 plantas/ha. Foram realizados todos os tratamentos culturais recomendados para a cultura.

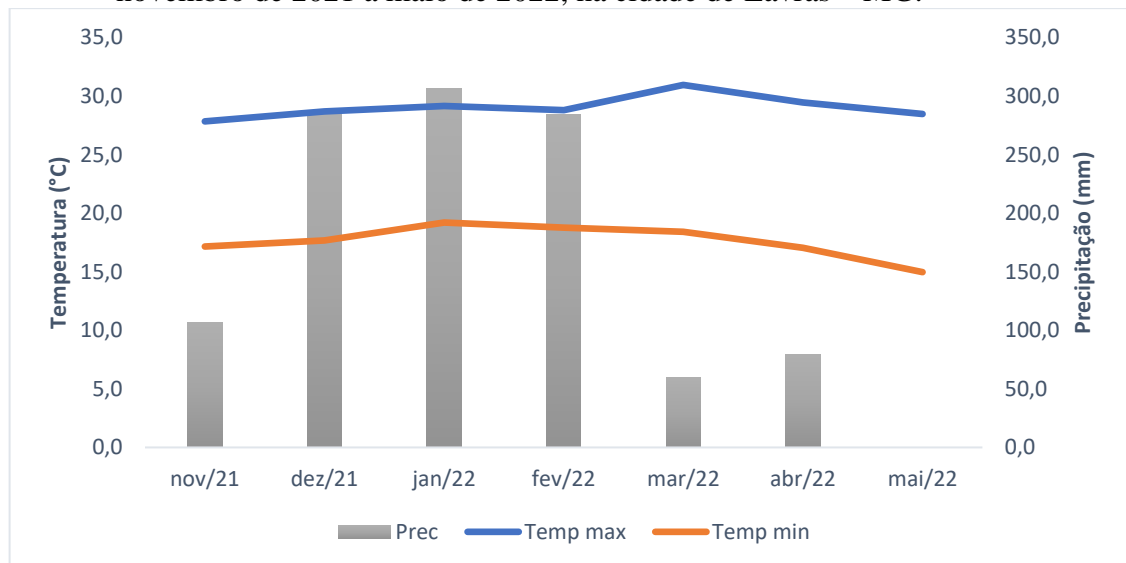
No campo de produção de sementes híbridas, as sementeiras foram realizadas em novembro de 2021, em três épocas, split (0, 7 e 14 dias), para garantir o sincronismo entre os florescimentos das plantas dos materiais utilizados. Foram utilizadas como parental feminino as linhagens 1 NT, 2 T, 3 NT e 5 T e como parental masculino a linhagem 4 NT.

Para a produção de sementes híbridas, foi realizada a emasculação manual das plantas das linhagens femininas antes da emissão dos estileto-estigmas para garantir o cruzamento entre as linhagens femininas com a linhagem masculina. Já para a multiplicação das sementes das linhagens, realizou-se a proteção das bonecas antes da emissão dos estileto-estigmas seguida de autofecundações manuais das plantas, quando da disponibilidade de pólen.

A colheita foi realizada em espiga quando as sementes híbridas e das linhagens atingiram 13% de teor de água. A trilha foi realizada mecanicamente na trilhadeira estacionária e, na sequência, as sementes foram armazenadas em câmara fria, até a realização dos testes.

Os dados de precipitação, temperatura máxima, média e mínima foram registrados durante todo o ciclo dos materiais utilizados (Figura 1).

Figura 1 - Valores de precipitação (mm) e temperaturas mínima e máxima (°C) no período de novembro de 2021 a maio de 2022, na cidade de Lavras – MG.



Fonte: Inmet (2023).

As sementes foram classificadas em peneiras de crivo oblongo retidas nas peneiras de tamanho (14; 15 e 16 x ¾) e de furo circular de tamanho 20 e 21 de polegadas.

## **2.4 Análises laboratoriais**

### **2.4.1 Teor de água**

O teor de água das sementes foi avaliado por meio do método em estufa a 105 °C durante 24 horas, utilizando-se duas amostras de cada material genético, conforme as Regras para Análise de Sementes-RAS (Brasil, 2009) e os resultados foram expressos em porcentagem.

### **2.4.2 Determinação do teor de água para a realização do teste de deterioração controlada**

O teor de água inicial das sementes foi elevado para os níveis de 25% e 35%. Para atingir o teor de água previamente determinado, foi adicionada a quantidade de água necessária de acordo com a seguinte fórmula:  $W2 = 100 - A / 100 - B \times W1$  (1), em que:

A - teor de água inicial das sementes (base no peso úmido);

B - teor de água requerido;

W1 - peso inicial das sementes (g);

W2 - peso final das sementes (g);

W2 - W1 - água a ser adicionada (Wang; Hampton, 1991 citado por Hampton; Johnstone; Eua-Umpon, 1992).

Após esse procedimento, as sementes foram acondicionadas em embalagens de alumínio herméticas e foi adicionada a água seguida de homogeneização. Em seguida, para a uniformização do teor de água de 25%, das sementes, as embalagens foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD por 24 horas a 10 °C e para o teor de água de 35%, das sementes, as embalagens foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD por 54 horas a 10 °C.

Após o tempo de uniformização do teor de água, as sementes foram expostas a 42 °C por 48 horas. Após este período as sementes foram submetidas ao teste de germinação, no qual foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes/cada, para cada tratamento a ser avaliado. Neste teste, as sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest, cobertas com uma terceira, e organizadas em forma de rolo. Os papéis foram previamente umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram

acondicionados em sacos plásticos transparentes, fechados com atilhos de borracha, para evitar a perda de água por evaporação. Na sequência, foram acondicionados em germinadores tipo BOD, regulados a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações das plântulas foram realizadas do terceiro ao sétimo dia de avaliação, sendo que em cada dia de avaliação foram determinados os padrões baseados nas características das plântulas, por meio das quais era possível distinguir os tratamentos visando a fenotipagem para a característica de tolerância à deterioração das sementes. No terceiro dia foram consideradas as plântulas com no mínimo um centímetro de comprimento de raiz primária e presença de parte aérea. No quarto dia, foram consideradas as plântulas com no mínimo um centímetro de raiz primária, duas raízes seminais e presença de parte aérea. E do 5º dia ao 7º dia de avaliação foram consideradas as plântulas com no mínimo um centímetro de raiz primária, duas raízes seminais e o rompimento da plúmula pelo coleóptilo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 5 + 5$ , sendo dois teores de água, cinco genótipos e cinco adicionais, sendo o adicional o teste de germinação, avaliado no sétimo dia.

### **2.4.3 Avaliação da secagem das sementes após o processo de deterioração controlada**

Para a avaliação da necessidade de secagem das sementes após a deterioração controlada por 48 horas, foram selecionados os tratamentos nos quais as sementes foram submetidas à deterioração com o teor de água ajustados para 25%, com base nos resultados obtidos, os quais serão discutidos posteriormente.

Neste experimento, parte das sementes submetidas à deterioração foi submetida à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 35 °C por 24 horas, até atingirem 13% de teor de água. A outra parte das sementes não foi submetida à secagem. Sementes de ambos os tratamentos com e sem secagem, foram submetidas ao teste de germinação utilizando-se quatro repetições com 50 sementes/cada, para cada tratamento.

Neste teste, as sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest, cobertas com uma terceira e organizadas em forma de rolo. Os papéis foram previamente umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, fechados com atilhos de borracha, para evitar a perda de água por evaporação. Na sequência foram acondicionados em germinadores tipo BOD, regulados à temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações das plântulas foram realizadas do terceiro ao sétimo dia de avaliação, contabilizando o número de plântulas que atendessem os padrões preestabelecidos no momento da avaliação, como descrito na metodologia anterior.

No terceiro dia foram consideradas as plântulas com no mínimo um centímetro de raiz primária e presença de parte aérea. No quarto dia foram consideradas as plântulas que apresentaram no mínimo um centímetro de raiz primária, duas raízes seminais e presença da parte aérea. E, do 5º ao 7º dia de avaliação foram consideradas as plântulas com, no mínimo, um centímetro de raiz primária, duas raízes seminais e o rompimento da plúmula pelo coleóptilo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 5 + 5$ , sendo dois métodos de secagem, cinco genótipos e cinco adicionais, sendo o adicional o teste de germinação, avaliado no sétimo dia.

#### **2.4.4 Determinação do período ao qual as sementes foram expostas ao processo de deterioração controlada**

Sementes com teor de água ajustado para 25%, conforme metodologia descrita anteriormente, foram expostas a 42 °C por 48, 72 e 96 horas. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme metodologia já descrita. As avaliações das plântulas foram realizadas do terceiro ao sétimo dia de avaliação, contabilizando o número de plântulas de acordo com os padrões descritos anteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 9 + 9$ , sendo dois tempos, nove genótipos e nove adicionais, sendo o adicional o teste de germinação, avaliado no sétimo dia.

#### **2.4.5 Avaliação do uso do hipoclorito a 1% para desinfestação das sementes durante a condução do teste de deterioração controlada**

Para avaliar a possível influência de fungos presentes nas sementes, nos resultados do teste de deterioração controlada, foram testados três tratamentos: desinfestação das sementes com hipoclorito 1% durante 1 minuto, antes da submissão das sementes ao teste de deterioração controlada; desinfestação das sementes com hipoclorito 1% durante 1 minuto após a deterioração das sementes, com 25% de teor de água, à 42°C, por 48 horas e testemunha, sem desinfestação.

Após esse período as sementes foram submetidas ao teste de germinação. As avaliações das plântulas foram realizadas do terceiro ao sétimo dia de avaliação, contabilizando o número de plântulas de acordo com os padrões descritos anteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $3 \times 3 + 3$ , sendo três uso do hipoclorito, três genótipos e três adicionais, sendo o adicional o teste de germinação, avaliado no sétimo dia.

#### **2.4.6 Teste de deterioração controlada, para a fenotipagem de genótipos da Bayer, para a característica de tolerância à deterioração de sementes pós colheita**

Uma vez selecionada, com base nos resultados obtidos anteriormente, a metodologia do teste de deterioração controlada visando a fenotipagem de genótipos para a característica de tolerância à deterioração das sementes após a colheita em espigas, foram avaliados os materiais genéticos da Bayer para esta característica. Sementes das cultivares UJRM-8419, UKGRAO-1583, UKGRAO-1383, U1R1M-5047 e IR2M-0080, produzidas em campos de produção de sementes da empresa, tiveram seus teores de água ajustados para 25%, conforme metodologia descrita anteriormente. Em seguida, foram submetidas à deterioração a 42 °C por 48 horas e ao teste de germinação, conforme metodologias descritas anteriormente.

As avaliações das plântulas foram realizadas do terceiro ao sétimo dia após a instalação do teste. Os padrões adotados ao terceiro dia: mínimo de três centímetros de comprimento raiz primária; presença de parte aérea, mínimo de três raízes secundárias. No quarto dia: mínimo de três centímetros de comprimento de raiz primária; presença de parte aérea; mínimo de quatro raízes secundárias. Do quinto até o sétimo dia de avaliação foram adotados no mínimo três centímetros de comprimento de raiz primária; parte aérea com o coleóptilo rompido e no mínimo quatro raízes secundárias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $5 + 5$ , sendo cinco genótipos e cinco adicionais, sendo o adicional o teste de germinação, avaliado no sétimo dia.

#### **2.4.7 Germinação**

No teste de germinação foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes/cada, para cada genótipo avaliado. Neste teste, as sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest, cobertas com uma terceira e organizadas em forma de rolo. Os papéis foram previamente umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel seco.

Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, fechados com atilhos de borracha, para evitar a perda de água por evaporação. Na sequência foram acondicionados em germinadores tipo BOD, regulados a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações das plântulas foram realizadas no sétimo dia após a instalação do teste. Os padrões adotados nesta avaliação foram adotados para os tratamentos nas quais as sementes foram submetidas à deterioração controlada, e já descritas.

#### **2.4.8 Análise de imagem de plântulas**

Para a análise de imagens foram utilizadas plântulas de milho aos três dias após a semeadura, provenientes de sementes submetidas ao processo de deterioração controlada, conforme metodologia descrita anteriormente. Também foram utilizadas plântulas provenientes de sementes que não foram submetidas ao processo de deterioração. As plântulas foram retiradas do papel germitest e colocadas na bandeja do módulo de captura do sistema GroundEye®, versão S800, para a captura das imagens de alta resolução.

Na configuração da análise para a calibração da cor de fundo foi utilizado o modelo de cor CIE  $L^*a^*b^*$ , com índice de luminosidade de 0,00 a 100, dimensão “a” - 27,80 a 32,20 e dimensão “b” de -58,90 a -18,90. Depois da calibração da cor do fundo foi realizada a análise das imagens com correção manual das partes das plântulas nas quais foram extraídos valores médios das características das plântulas como o comprimento das raízes secundárias, comprimento da raiz primária, comprimento total e comprimento total + comprimento das raízes secundárias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo com e sem deterioração e cinco genótipos.

#### **2.4.9 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias dos tratamentos para todos os testes foi realizada pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no software Sisvar® (Ferreira, 2019). Já o adicional foi realizado pelo Teste T a 5% de probabilidade pelo software R.

#### 2.4.10 Análises de proteínas pela técnica de eletroforese

Para a análise proteica, foram selecionados os materiais mais discrepantes para a característica de tolerância à deterioração de sementes, avaliados pelo vigor, por meio do teste de deterioração controlada.

Assim, as análises proteicas foram realizadas em sementes dos seguintes materiais genéticos: UKGRAO- 1583; UKGRAO-1383 e IR2M-0080 da Empresa Bayer e das linhagens 4 e 5 e das sementes híbridas das combinações 4 x 5, 4 x 2. Parte das sementes destes materiais genéticos foi submetida ao processo de deterioração controlada, com 25% de teor de água a 42 °C, por 48 horas, conforme metodologia descrita anteriormente. Após este processo estas sementes e aquelas não expostas ao processo de deterioração foram armazenadas em *deep freezer* a -86 °C, até a realização das análises proteicas.

As análises das enzimas Álcool Desidrogenase, Malato Desidrogenase, Catalase, Esterase, Superóxido Dismutase, Peroxidase e Piruvato Descarboxilase, foram realizadas por meio da técnica de eletroforese (Alfenas, 2006). As sementes foram maceradas em moinho analítico, na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido. Após a maceração os materiais foram armazenados em *deep freezer* à temperatura de -86 °C.

Para a extração das enzimas Álcool Desidrogenase, Malato Desidrogenase, Catalase, Esterase e Piruvato Descarboxilase, foi utilizado o tampão de extração Tris HCL 0,2 M pH8,0 + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, na proporção de 250  $\mu$ L para cada 100 mg do material macerado. Já para a enzima peroxidase, foi realizado o tampão de extração (fosfato de potássio + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol) na proporção de 250  $\mu$ L para cada 100 mg do material macerado. O material foi homogeneizado em vórtex e mantido na geladeira em *overnight*, seguido de centrifugação a 14000 rpm, em temperatura de 4 °C por 30 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em géis de poliácridamida do tipo NATIVA PAGE, a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão utilizado foi o Tris-glicina pH8,9. Foram aplicados na canaleta 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada tratamento, e a corrida eletroforética foi realizada a 120V por 5 horas sob refrigeração. No término da corrida eletroforética, os géis foram revelados de acordo com as metodologias propostas por Alfenas (2006). Em seguida, os géis foram fotografados sobre transluminador.

Para a análise da expressão da Alfa Amilase, as sementes (sem deterioração) foram germinadas, em rolos de papel, na temperatura de 25 °C, por período de 72 horas. Já as sementes submetidas ao processo de deterioração por 48 horas a 42 °C, foram germinadas em rolos de

papel, na temperatura de 25 °C, por um período de 24 horas, totalizando as 72 horas, preconizadas para a análise da expressão desta enzima.

Após esse período, foram retirados os eixos embrionários e escutelos e, somente o endosperma foi macerado em moinho analítico, na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido. Após a maceração os materiais foram armazenados em *deep freezer* na temperatura de -86 °C.

Para a extração da enzima Alfa Amilase, foi utilizado o tampão de extração Tris HCL 0,2 M pH8,0 + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, na proporção de 250  $\mu$ L para cada 100 mg do material macerado. O material foi homogeneizado em vórtex e mantido em geladeira em *overnight*, seguido de centrifugação a 14000 rpm, em temperatura de 4 °C por 30 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em géis de poliacrilamida do tipo NATIVA PAGE, a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador) e foi acrescentado amido solúvel no gel separador. O tampão utilizado para a corrida foi o Tris-glicina pH8,9. Foram aplicados na canaleta 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada tratamento, e a corrida eletroforética foi realizada a 120V por 5 horas sob refrigeração. Ao término da corrida eletroforética, os géis foram revelados de acordo com as metodologias propostas por Alfenas (2006). Em seguida, os géis foram fotografados sobre transluminador.

Para a análise de proteínas resistentes ao calor, as sementes submetidas a cada tratamento foram maceradas em moedor elétrico, na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido. Após a maceração os materiais foram armazenados no *deep freezer* na temperatura de -86 °C.

Para a extração de proteínas resistentes ao calor, foi utilizado o tampão de extração Tris HCL 50 mM pH7,5 + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, na proporção de 1000  $\mu$ L para cada 100 mg do material macerado. O material foi homogeneizado em vórtex, seguido de centrifugação a 14000 rpm, em temperatura de 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi extraído e colocado em um novo microtubo e incubado em banho maria a 85 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, por 30 minutos, a 4°C. Após centrifugação, 70  $\mu$ L do extrato foram transferidos para outro microtubo e adicionou 40  $\mu$ L da solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul de bromofenol completado o volume para 20 ml de tampão de extração TRIS pH7,5), seguido de banho maria em água fervente por 5 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em géis de poliacrilamida do tipo SDS-PAGE, a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Foram aplicados na canaleta 50  $\mu$ L do sobrenadante, para cada tratamento, sendo que na primeira canaleta foram aplicados 10  $\mu$ L da

amostra padrão de proteína, com peso molecular variando de 10 KDa a 220 KDa. A corrida eletroforética foi conduzida a 120V por 8 horas sob temperatura ambiente. Ao término da corrida eletroforética, os géis foram revelados de acordo com as metodologias propostas por Alfenas (2006). A coloração do gel foi realizada com solução cortante Comassie brilhante por 16 horas e a descoloração com a solução contendo álcool etílico por 4 horas. Em seguida, os géis foram fotografados sobre transluminador.

Os dados referentes à expressão de proteínas foram analisados com base na análise dos géis de eletroforese, considerando a presença/ausência e intensidade de cada uma das subunidades proteicas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação do teor de água das sementes de milho no teste de deterioração controlada

Foi observada interação significativa entre os fatores material genético e teor de água das sementes, quando submetidas ao teste de deterioração controlada, em todos os períodos avaliados, terceiro ao sétimo dia, após a semeadura (Tabela 1 A).

Como descrito na metodologia, considerou-se as linhagens 1, 3 e 4 como intolerantes e 2 e 5 como tolerantes, com base nos resultados obtidos por Dutra *et al.* (2015), quando eles utilizaram o teste de deterioração controlada para fenotipar genótipos de milho para a característica de tolerância a altas temperaturas durante o processo de germinação das sementes.

Maiores valores de vigor foram observados em sementes com 25% de teor de água, das linhagens 2 e 5, classificadas como tolerantes, quando as avaliações ocorreram aos 3,5,6 e 7 dias após a semeadura. No quarto dia de avaliação, maior vigor foi observado em sementes da linhagem 5 e não houve diferença estatística entre os valores observados para as linhagens 2 e 4, sendo esta última considerada intolerante.

Ao comparar os resultados de vigor em sementes com 35% de teor de água dos diferentes materiais genéticos, não foi possível observar consistência dos resultados em relação à classificação quanto a tolerância à deterioração após colheita em espigas.

Assim, foi possível discriminar com mais segurança, os materiais genéticos utilizando sementes com teor de água de 25%. Esse resultado é de grande relevância, pois para obter o teor de água de 25% foram necessárias cerca de 24 horas a 10 °C, enquanto que o teor de água de 35%, foi alcançado após cerca de 54 horas, tempo considerado demasiadamente longo. Sabe-se que o menor tempo para fenotipar os genótipos para as características de interesse, é fundamental nos processos de seleção em programas de melhoramento, em função do número significativo de materiais a serem avaliados.

Além disso, quando foram utilizadas sementes com 35% de teor de água, os resultados foram inconsistentes, provavelmente pela falta de uniformização do teor de água. Mesmo adotando as metodologias recomendadas, após o período de 54 horas foi observada água livre na embalagem na qual as sementes foram acondicionadas.

Comparando-se os resultados de vigor observados em sementes com 25% e 35% de teor de água para cada linhagem, houve interação com os materiais genéticos utilizados. Para a linhagem 5, classificada como tolerante, não houve diferença significativa entre o vigor das sementes com 25 e 35% de teor de água, independentemente do período de avaliação. O mesmo

foi observado para a linhagem 2, quando as avaliações foram realizadas aos 3 e 4 dias, após a semeadura. Para a linhagem 4, classificada como intolerante, menor vigor foi observado quando foi adotado o teor de água de 35% nas sementes no teste de deterioração controlada. No entanto, para outros materiais, a exemplo da linhagem 1, também classificada como intolerante, para a maioria dos períodos de avaliação menores valores de vigor foram observados quando foram utilizadas sementes com 25% de teor de água.

Neste contexto, ao avaliar os resultados para todos os materiais genéticos e a interação destes com teores de água das sementes adotadas no teste de deterioração controlada, recomenda-se a utilização de sementes com 25% de teor de água para a fenotipagem, visando a seleção de materiais para a característica de tolerância à deterioração após a colheita em espigas.

Ao comparar os resultados do teste de germinação e os de vigor, quando das avaliações realizadas no sétimo dia após a semeadura, foram observados para a maioria dos tratamentos, maiores valores de germinação em detrimento dos de vigor (Tabela 1). No entanto, para a linhagem 5, classificada como tolerante, maiores valores de vigor foram observados em relação aos de germinação, independentemente do teor de água das sementes adotado no teste de deterioração controlada. Justificar o maior potencial de germinação em relação ao vigor em sementes parece óbvio, em função das consequências da deterioração de sementes, uma vez que é esperada perda do vigor antes da de germinação. A linhagem 5 tem apresentado características de tolerância aos estresses abióticos a exemplo de tolerância a seca (Von Pinho, 2021) ao frio durante o processo de germinação (Silva Neta *et al.*, 2020) e tolerâncias a altas temperaturas durante o processo de germinação de sementes (Dutra *et al.*, 2015). Os resultados observados na presente pesquisa e nas demais citadas anteriormente, podem explicar os maiores valores de vigor das sementes da linhagem 5, comparados aos observados no teste de germinação.

Tabela 1 - Resultados de vigor (%) de sementes de milho, pelo teste deterioração controlada, obtidos do terceiro ao sétimo dia após a semeadura, em sementes com 25% e 35% de teor de água, de diferentes materiais genéticos, e resultados do teste de germinação ao sétimo dia.

Materiais Genéticos	3º dia		4º dia		5º dia		6º dia		7º dia		Germinação ao 7º dia
	Teor de Água		Teor de Água		Teor de Água		Teor de Água		Teor de Água		
	25%	35%	25%	35%	25%	35%	25%	35%	25%	35%	
Linhagem 1	18Db	24Ca	23Cb	42Ba	4Ca	7Ca	33Ca	26Cb	44Ca*	33Cb*	72
Linhagem 2	48Ba	53Ba	54Ba	54Ba	73Aa	56Bb	75Ba	63Bb	88Aa	66Bb*	85
Linhagem 3	20Da	78Ab	22Cb	74Aa	13Bb	58Ba	23Db	76ABa	37Cb*	79Aa	76
Linhagem 4	32Ca	1Db	53Ba	1 Db	4Ca	1Db	38Ca	1Db	59Ba*	1Db*	86
Linhagem 5	77Aa	77Aa	91Aa	85 Aa	86Aa	81Aa	95Aa	89Aa	96Aa	92Aa	85*
CV	5,39		11,88		7,92		6,55		4,86		3,64

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \* Significativo ao teste T.

Fonte: Da autora (2024).

### 3.2 Avaliação da secagem das sementes após o processo de deterioração controlada

Houve interação significativa entre os fatores material genético e secagem, em todos os períodos de avaliação, do terceiro ao sétimo dia. Como descrito anteriormente houve a necessidade de avaliar a necessidade ou não de secagem de sementes de milho após a deterioração das sementes e antes da realização do teste de germinação (Tabela 2). Com base nos resultados do primeiro ensaio, as sementes foram submetidas ao processo de deterioração com 25% de teor de água.

Quando as sementes foram submetidas à secagem e a avaliação realizada aos três dias após a semeadura, maiores valores de vigor foram observados em sementes da linhagem 2, seguida da linhagem 1, classificada como tolerante e intolerante. Não houve diferença estatística entre os valores de vigor das sementes das linhagens 3 e 5 classificadas, como intolerante e tolerante, respectivamente. No entanto, quando as sementes não foram submetidas à secagem após a deterioração e o teste de germinação realizado na sequência, nas sementes das linhagens classificadas como tolerantes à deterioração foram observados os maiores valores de vigor. Também no quinto, sexto e sétimo dia de avaliação, após a semeadura, foi possível discriminar os materiais genéticos de acordo com a classificação realizada anteriormente quanto à deterioração das sementes (Tabela 2), sem a necessidade de submeter as sementes à secagem. Também foi possível, em alguns períodos de avaliação, discriminar os materiais genéticos para a característica em referência, quando as sementes foram submetidas à secagem. No entanto, a realização do teste sem a necessidade de secagem o torna mais rápido e prático, características desejáveis para a fenotipagem de materiais genéticos em processos de seleção, em programas de melhoramento.

Importante ressaltar também, que em sementes das linhagens intolerantes e não submetidas à secagem, após o processo de deterioração, foram observados os menores valores de vigor ao sétimo dia de avaliação quando comparados aos valores de germinação, também ao sétimo dia de avaliação.

Já para as sementes das linhagens tolerantes 2 e 5, os valores de vigor não diferenciaram ou foram superiores quando foram deterioradas, sem secagem, em relação aos valores de germinação, obtidas por meio do teste padrão de germinação. Como já discutido anteriormente, o fato de as linhagens serem tolerantes à deterioração e apresentarem mecanismos que amenizam os danos sob estresse, explicam tais resultados. Resultados semelhantes foram observados por Dutra *et al.* (2015), para a linhagem 5, sob condições de altas temperaturas durante o processo de germinação.

Assim, para a fenotipagem de materiais genéticos de milho, para a característica de tolerância à deterioração, pós-colheita em espigas, por meio do teste e deterioração controlada, não há necessidade de submeter as sementes à secagem após o processo de deterioração, anteriormente à realização do teste de germinação. Desta forma, o processo se torna mais rápido e prático.

Tabela 2 - Resultados de vigor (%) de sementes de milho, pelo teste de deterioração controlada, obtidos do terceiro ao sétimo dia após a semeadura, submetidas (CS) ou não (SS) à secagem após o processo de deterioração e os de germinação no sétimo dia de avaliação.

Materiais Genéticos	3° dia		4° dia		5° dia		6° dia		7° dia		Germinação ao 7º dia
	Método		Método		Método		Método		Método		
	CS	SS	CS	SS	CS	SS	CS	SS	CS	SS	
Linhagem 1	35Ba	18Db	55Ba	23Cb	3 CDa	4Ca	27ca	33Cda	74Ba	44Cb*	72
Linhagem 2	51Aa	48 Ba	93Aa	54Bb	40Ab	73Aa	97Aa	75Bb	99Aa*	88Ab	85
Linhagem 3	20Ca	20Da	49Ba	22Cb	8Ca	4Cb	25ca	23Da	72Ba	37Cb*	76
Linhagem 4	1Db	32Ca	2Cb	53Ba	1Db	12Ba	7Db	38Ca	2Cb*	58Ba*	86
Linhagem 5	14Cb	77Aa	5 Bb	91Aa	28Bb	86Aa	77Bb	95Aa	91Aa	97Aa	85*
CV	10,24		7,79		10,7		10,8		4,27		3,64

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \* Significativo ao teste T.

Fonte: Da autora (2023).

### 3.3 Avaliação do período de exposição à deterioração, no teste de deterioração controlada

Após a definição de teor de água das sementes no processo de deterioração, houve a necessidade de avaliar o período de exposição das sementes ao processo de deterioração. As sementes foram expostas à deterioração por período de 48, 72 e 96 horas.

Quando as sementes dos materiais genéticos foram submetidas à deterioração por 96 horas, não se observou quaisquer germinação e crescimento de plântulas, ou seja, houve a morte de 100% das sementes. Diante disso, foram comparados os períodos de 48 e 72 horas de deterioração.

Foi observada interação significativa entre os fatores material genético e período de deterioração, em todos os períodos avaliados, do terceiro ao sétimo dia de avaliação, após a semeadura (Tabela 3 A).

Ao analisar os dados constantes na Tabela 3, verifica-se que foi possível discriminar os genótipos quanto a tolerância à deterioração, quando as sementes foram deterioradas por 48 e 72 horas, em todos os períodos de avaliação.

Importante ressaltar, que os maiores valores de vigor das sementes submetidas aos períodos de 48 e 72 horas de deterioração e avaliados do terceiro ao sétimo dia após a semeadura, foram observados, para a maioria dos resultados, para as linhagens 2 e 5, classificadas como tolerantes à deterioração, e também em sementes híbridas provenientes do cruzamento 4 x 5, no qual o parental feminino é a linhagem 5. Essa linhagem 5 tem se destacado em outras pesquisas nas quais foram estudadas a tolerância aos estresses abióticos (Von Pinho, 2021; Silva Neta *et al.*, 2020; Dutra *et al.*, 2015; Abreu *et al.*, 2016; Abreu *et al.*, 2017; Abreu *et al.*, 2019; Souza, 2022; Salgado, 2005).

Abreu *et al.* (2019) e Roveri *et al.* (2005), ao estudarem o controle genético para as características de tolerância à seca e tolerância de sementes às temperaturas de secagem, respectivamente, observaram que para estas características o efeito é materno, com a participação dos genes aditivos e não aditivos. Na presente pesquisa, com os resultados obtidos não é possível concluir sobre o controle genético para a característica de tolerância à deterioração, em função dos tratamentos testados, uma vez que os objetivos propostos foram outros. No entanto, é possível inferir sobre o potencial da linhagem 5 em relação a tolerância à deterioração pós colheita em espigas. Também podem ser observados menores valores de vigor em sementes da linhagem 1, classificada como intolerante, deterioradas por 48 horas, em todos os períodos de avaliação, do terceiro ao sétimo dia, após a semeadura.

Deve ser ressaltado ainda, que nos processos de fenotipagem, a seleção precoce, de forma rápida e segura é fundamental para a aplicação em programas de melhoramento. Assim, a deterioração das sementes por 48 horas, e a avaliação no terceiro dia, parecem viabilizar a fenotipagem em grande escala. De acordo com Marinho *et al.* (2021) a germinação após a deterioração controlada, utilizando um menor tempo de deterioração é eficiente para reduzir o tempo da realização do teste.

Pela Tabela 3 é possível comparar os resultados obtidos no teste padrão de germinação e de vigor de sementes submetidas a 48 horas de deterioração, ambos avaliados no sétimo dia após a semeadura. Não foram observadas diferenças significativas nos resultados de vigor e germinação para os materiais genéticos, linhagem 2, linhagem 5, híbridos 4 x 1 e 4 x 5. Ressalta-se que, para as linhagens 2 e 5, classificadas como tolerante,s e para o híbrido 4 x 5, estes resultados podem ser explicados pela característica de tolerância à deterioração. Para os demais materiais genéticos, cujas sementes também foram deterioradas por 48 horas, foram observados maiores valores de germinação, os quais foram obtidos sob condições favoráveis a germinação.

Tabela 3 - Resultados de vigor (%) de sementes de milho, de diferentes materiais genéticos, expostas por 48 e 72 horas de deterioração, obtidos do terceiro ao sétimo dia após a semeadura, e resultados de germinação.

Materiais Genéticos	3° dia		4° dia		5° dia		6° dia		7° dia		Germinação ao 7° dia
	Tempo		Tempo		Tempo		Tempo		Tempo		
	48	72	48	72	48	72	48	72	48	72	
Linhagem 1	9Db	24Ca	10Eb	31Ca	1Fb	7CDa	6Gb	12CDa	15Db*	27Ea*	72
Linhagem 2	82Aa	57Bb	85Aba	73Ab	85Aa	61ABb	90Aa	78Ab	96Aa	79Bb*	85*
Linhagem 3	46Ba	16Db	37Da	18Db	21Da	5Db	34EFa	17Cb	53Ca*	22Eb**	76
Linhagem 4	48Ba	9Eb	53Ca	12Eb	23Da	1Eb	28Fa	6Eb	54Ca*	9Gb**	86
Linhagem 5	85Aa	68ABb	95Aa	80Ab	86Aa	57Bb	96Aa	77Ab	97Aa	92Aa	85*
4 x 1	80Aa	68ABb	91Aa	56Bb	32Ca	7Db	50CDa	32Bb	83Ba	63Cb*	85
4 x 2	31Ca	3Fb	37Da	11Eb	22Da	5Db	54Ca	11Db	61Ca*	15Fb**	87
4 x 3	35Ca	30Cb	56Ca	49Bb	13Ea	12Ca	41DEa	27Bb	57Ca*	49Db*	80
4 x 5	76Aa	70Aa	78Ba	72Aa	57Bb	71Aa	71Ba	75Aa	83Ba	78Ba*	80
CV	4,83		4,32		7,17		5,53		3,7		4,01

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\* Significativo ao teste T.

Fonte: Da autora (2024).

### **3.4 Avaliação da desinfestação das sementes, com hipoclorito de sódio 1%, no teste de deterioração controlada**

Pelos resultados dos ensaios apresentados até o momento, foi possível definir o teor de água das sementes, período de deterioração e influência da secagem, para a definição da metodologia para a fenotipagem de materiais genéticos para a característica de tolerância à deterioração das sementes pós-colheita em espigas.

No entanto, durante as avaliações dos ensaios foi observada a presença de patógenos, principalmente de fungos de armazenamento. Assim, com o objetivo de avaliar todos os fatores que pudessem interferir nos resultados, foi avaliada a influência da desinfestação com hipoclorito sobre a qualidade fisiológica das sementes.

No processo de desinfestação das sementes, foi utilizada a solução de hipoclorito de sódio 1%, antes do processo de deterioração das sementes (AD), após o processo de deterioração das sementes (DD) e foi utilizada como testemunha sementes sem a desinfestação (SD).

Foi observada interação significativa entre os fatores material genético e solução de hipoclorito de sódio para a característica de vigor, avaliado em todos os períodos de avaliação, do terceiro ao sétimo dia (Tabela 4 A).

Pela Tabela 4, pode ser observado que independentemente da utilização ou não da solução de hipoclorito de sódio, antes ou após o período de deterioração das sementes por 48 horas e do período de avaliação do vigor das plântulas, terceiro ao sétimo dia, os maiores valores de vigor em sementes da linhagem 5, classificada como tolerante. Os menores valores de vigor foram observados em sementes da linhagem 1, em todos os tratamentos, a exceção do observado aos três dias de avaliação em que não houve diferença significativa entre os valores de vigor observados para as sementes da linhagem 1 e das híbridas 4 x 2.

Ao avaliar os resultados de vigor entre os tratamentos ou não com solução de hipoclorito de sódio, para cada material genético pôde-se observar que: em sementes da linhagem 5, tolerante, não houve diferenças significativas nos valores de vigor das sementes desinfestadas antes e após a deterioração e daquela não submetida à desinfestação com solução de hipoclorito, nos diferentes períodos avaliados. Já para a linhagem 1, intolerante, e o híbrido 4 x 2, a desinfestação com a solução de hipoclorito de sódio após o processo de deterioração, antes de as mesmas serem submetidas ao teste de germinação, teve efeito negativo sobre o vigor das sementes.

Diante destes resultados, conclui-se que não há a necessidade de desinfestar as sementes com a solução de hipoclorito de sódio a 1%, quando da realização do teste de deterioração controlada, para fins de fenotipagem para a característica em referência.

Cappelini *et al.* (2005), após realizarem desinfestação de sementes de milho, com hipoclorito de sódio 1%, por três minutos, verificaram maior porcentagem de vigor pelo teste de envelhecimento acelerado, quando as mesmas não foram desinfestadas.

Quando foram comparados os resultados de vigor das sementes submetidas ou não à desinfestação com as observadas no teste padrão de germinação (Tabela 4), em sementes desinfestadas com a solução de hipoclorito de sódio 1% após o processo de deterioração, houve menores valores de vigor das sementes, em relação aos resultados de germinação, ambas avaliadas ao sétimo dia após a semeadura.

Importante ressaltar que, para a linhagem tolerante à deterioração, linhagem 5, os valores de vigor das sementes desinfestadas antes da deterioração ou sem desinfestação, foram estatisticamente iguais aos observados no teste padrão de germinação. Isto não foi observado em sementes da linhagem 1 e das híbridas 4 x 2 para as quais foram observados maiores valores de germinação em relação aos de vigor.

Assim, diante destes resultados é possível reiterar que não há necessidade de desinfestar as sementes, com solução de hipoclorito de sódio, durante o teste de deterioração controlada, para fins de fenotipagem para a característica de tolerância das sementes à deterioração pós-colheita em espigas. Também pode-se concluir que os fungos de armazenamento, presentes, no nível apresentado nos lotes de sementes de milho nesta pesquisa, não interferiram na distinção dos genótipos, para a característica em referência.

O fato de não haver necessidade de desinfestar as sementes submetidas à deterioração controlada é uma vantagem, considerando o tempo, rapidez e a economicidade para o processo de fenotipagem.

Neste contexto, ao avaliar as diferentes metodologias de fenotipagem dos materiais genéticos, para a característica de tolerância das sementes à deterioração pós-colheita em espigas, por meio do teste de deterioração controlada, recomenda-se a utilização de sementes com teor de água ajustado para 25%, exposição ao processo de deterioração por 48 horas, sem a necessidade de secagem após a deterioração e na ausência de desinfestação.

Em relação ao tema, durante a revisão, foi observado que na maioria das pesquisas, o teste de deterioração controlada, para a avaliação de vigor, não é realizado em sementes tratadas.

Tabela 4 - Resultados de vigor (%) de sementes de milho de diferentes materiais genéticos, submetidos à desinfestação com hipoclorito de sódio antes do processo de deterioração controlada (AD), após a deterioração controlada (DD) e não submetido à desinfestação (SD) e a germinação realizada ao sétimo dia de avaliação.

Materiais Genéticos	3° dia			4° dia			5° dia			6° dia			7° dia			Germinação ao 7° dia
	Hipoclorito			Hipoclorito			Hipoclorito			Hipoclorito			Hipoclorito			
	AD	DD	SD	AD	DD	SD	AD	DD	SD	AD	DD	SD	AD	DD	SD	
L 1	41Ba	17Cb	41Ca	43Ca	22Cb	47Ca	7Ca	2Cb	4Cab	32Ca	18Cb	26Ca	47Ca*	31Cb**	50Ca*	74
L 5	92Aa	85Aa	95Aa	95Aa	91Aa	97Aa	89Aa	84Aa	90Aa	96Aa	88Aa	96Aa	97Aa	93Aa*	99Aa	97
4 x 2	45Bb	27Bc	56Ba	56Bb	40Bc	65Ba	34Bb	14Bc	44Ba	60Ba	36Bb	55Ba	65Ba*	41Bb**	67Ba*	80
CV	5,22			4,4			7,67			6,22			4,55			3,89

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \* Significativo ao teste T.

Fonte: Da autora (2024).

### **3.5 Teste de deterioração controlada para a fenotipagem dos genótipos da Empresa Bayer**

A partir da definição da metodologia do teste de deterioração controlada para a fenotipagem de genótipos de milho do programa de melhoramento da UFLA, para a característica de tolerância à deterioração das sementes pós-colheita em espigas, foram avaliados materiais genéticos da Empresa Bayer. Estas sementes foram produzidas em campos de produção de sementes desta empresa.

Houve efeito significativo do genótipo sobre o vigor das sementes avaliado por meio do teste de deterioração controlada, em todos os períodos de avaliação, do terceiro ao sétimo dia (Tabela 5A).

De forma geral, foram observados maiores valores de vigor das sementes do genótipo IR2M-0080, submetidas ao teste de deterioração controlada (Tabela 5). Já em sementes do genótipo UKGRAO-1583, houve os menores valores de vigor.

Ao três, seis e sete dias de avaliação, foram observados os maiores valores de vigor em sementes dos materiais genéticos IR2M-0080 e U1R1M-5047, os quais não diferenciaram entre si. Os demais materiais genéticos se comportaram como intermediários.

Ao comparar os resultados de vigor das sementes dos materiais genéticos submetidos aos testes de deterioração controlada e de germinação, respectivamente, ambos avaliados no sétimo dia após a semeadura, houve diferenças significativas entre os resultados para os materiais genéticos UJR1M-8419, UKGRAO-1383 e UKGRAO-1583. Merecem destaque, no sétimo dia de avaliação, os valores de vigor observados para os materiais genéticos IR2M-0080 e UKGRAO-1583, os quais foram superiores e inferiores, respectivamente, em relação aos demais, na maioria dos períodos avaliados.

Tabela 5 - Resultados de vigor (%) de sementes de milho de diferentes materiais genéticos, submetidos ao teste de deterioração controlada, obtidos do terceiro ao sétimo dia após a semeadura e a germinação realizada ao sétimo dia de avaliação.

Materiais	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia	Germinação ao 7° dia
UJR1M - 8419	11 B	36 C	1 D	8 B	37 C*	64
UKGRAO - 1583	2 C	1 D	1 D	3 C	26 D	65
UK GRAO - 1383	18 B	47 B	23 BC	57 A	70 B*	84
U1R1M – 5047	31 A	38 BC	21 B	53 A	72 AB	76
IR2M – 0080	33 A	72 A	33 A	58 A	84 A	85
CV	12,21	13,01	13,64	8,44	4,49	6,59

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \* Significativo ao teste T.

Fonte: D autora (2024).

Em relação a avaliação de características de plântulas, avaliadas por meio da análise de imagem, foi observada interação significativa entre os fatores material genético e exposição ou não das sementes à deterioração controlada para as variáveis: comprimento da raiz secundária (CRS), comprimento da raiz primária (CRP), comprimento total (CT) e comprimento total + secundárias (CTS) (Tabela 6).

Os maiores e menores valores de comprimento da raiz secundária e comprimento total + secundárias, foram observados em plântulas provenientes das cultivares IR2M-0080 e UKGRAO-1583, respectivamente, expostas ou não à deterioração controlada. Para os demais materiais genéticos os valores para estas variáveis foram intermediários em relação aos observados para os dois materiais citados acima. Em relação ao comprimento total, maiores valores foram observados em plântulas provenientes de sementes da cultivar IR2M-0080, expostas ou não expostas à deterioração, sendo que para expostas, não houve diferença significativa em relação aos valores observados para a cultivar UJR1M-8419 (Tabela 6).

Para a variável comprimento da raiz primária, maiores valores foram observados em plântulas provenientes de sementes das cultivares IR2M-0080 e UKGRAO-1383, não submetidas à deterioração e para as sementes das cultivares IR2M-0080 e UJR1M-8419, expostas à deterioração. Após a análise de dados, de uma maneira geral, observa-se maior crescimento de plântulas provenientes de sementes da cultivar IR2M-0080 e menor, para a maioria das variáveis, em plântulas provenientes de sementes da cultivar UKGRAI-

1583. Ressalta-se que, o maior e menor vigor, avaliados pelo teste de deterioração controlada, também foram observadas em sementes destas cultivares (Tabela 6).

Ao comparar os resultados do crescimento de plântulas provenientes de sementes expostas ou não à deterioração controlada, para cada material genético, foi possível observar que para as variáveis: comprimento da raiz secundária, comprimento total e comprimento total + secundárias, os maiores valores foram observados em sementes submetidas à deterioração controlada, com destaque para as variáveis nas quais eram computadas as raízes secundárias. Em relação a estes resultados é importante considerar alguns aspectos: sementes submetidas à deterioração controlada se encontravam com 25% de teor de água, ou seja, mais avançadas no processo de germinação em relação às sementes não submetidas à deterioração as quais se encontravam com cerca de 13% de teor de água. Outro aspecto muito importante é o fato de as plântulas, principalmente, as das cultivares tolerantes aos fatores abióticos, terem o crescimento de suas raízes secundárias estimulado, sob condições de estresse. Isto pode ser observado pelos valores absolutos e relativos de comprimento da raiz secundária, comprimento total e comprimento total + secundárias provenientes de sementes da cultivar IR2M-0080, submetidas à deterioração controlada (Tabela 6).

Von Pinho (2021), observou maior crescimento de raízes secundárias em plântulas de milho de materiais genéticos tolerantes ao déficit hídrico. Além disso, a autora concluiu que por meio da análise de imagem foi possível a fenotipagem dos materiais genéticos tolerantes ao déficit hídrico. Ela ressaltou também, a vantagem de esta técnica ser mais rápida e depender menos de mão de obra, em relação a avaliação manual.

O uso de análise de imagens possibilita maior confiabilidade dos resultados, agilidade e também menor interferência humana (Santos *et al.*, 2020). Também existe a vantagem da captura das imagens e análise posterior, diferentemente do que acontece quando é realizada manualmente. Lima *et al.* (2023) verificaram que a avaliação do vigor de plântulas de algodão por meio da análise de imagem é eficiente para realizar a fenotipagem para a característica do línter residual em sementes. Já Silva *et al.* (2021) também verificaram que a fenotipagem realizada pela análise de imagem foi eficiente para discriminar genótipos de goiabeira.

Tabela 6 - Resultados de comprimento da raiz secundária (CRS); comprimento da raiz primária (CRP); comprimento total (CT) e comprimento total + comprimento das raízes secundárias (CTS), provenientes de sementes submetidas à deterioração controlada, avaliados ao terceiro dia após a semeadura.

Materiais Genéticos	Análise de Imagem ao terceiro dia							
	CRS		CRP		CT		CTS	
	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD
UJR1M - 8419	5,9 Ba	1,5 Cb	5,6 Aa	3,6 Bb	7,0 Aa	4,1 Bb	12,9 Ba	6,1 BCb
UKGRAO - 1583	1,6 Da	0,4 Db	3,9 Ba	3,5 Ba	4,9 Ba	4,5 Ba	6,5 Da	4,5 Cb
UK GRAO - 1383	5,7 Bca	3,2 Bb	3,8 Ba	4,4 Aba	4,9 Ba	5,2 Ba	10,6 Bca	8,4 Bb
U1R1M – 5047	3,9 Ca	2,6 BCb	3,4 Bb	4,2 Ba	4,5 Ba	5,1 Ba	8,5 Cda	7,7 Ba
IR2M – 0080	9,6 Aa	6,6 Ab	6,2 Aa	5,5 Aa	8,1 Aa	6,9 Ab	17,7 Aa	13,6 Ab
CV	9,4		12,4		5,1		6,5	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Da autora (2024).

Os coeficientes de correlação foram calculados a partir dos dados de características de plântulas, provenientes de sementes submetidas à deterioração controlada, avaliadas nos períodos de três a sete dias após a semeadura, por meio da análise de imagem (Tabela 7).

Ao considerar os dados obtidos na avaliação realizada no terceiro dia após a semeadura em comparação com os demais períodos de avaliação, foi observado maior valor de correlação 0,89, com os dados obtidos no sétimo dia, após a semeadura. Uma vez que foi possível discriminar os materiais genéticos quanto à tolerância à deterioração das sementes pós colheita, por meio de metodologia proposta do teste de deterioração controlada, no terceiro dia após a semeadura, não há razão para estender o período de avaliação. Além disso, o processo de fenotipagem pode ser feito em grande escala e conseqüentemente a rapidez é uma característica desejável.

Verificou-se alta correlação 0,97, entre os dados de comprimento da raiz secundária e comprimento total + comprimento de raízes secundárias (Tabela 7).

O coeficiente de correlação de 0,99 foi observado entre as variáveis comprimento da raiz primária e comprimento total. Este resultado era esperado uma vez que o comprimento da raiz primária é computado no comprimento total da plântula. Também foi observado alto coeficiente de correlação, 0,84, entre o comprimento de raiz primária e o comprimento total + comprimento das raízes secundárias.

Resultados semelhantes foram observados por Santos *et al.* (2023) quando verificaram correlação positiva entre os dados de características de plântulas avaliadas por meio da análise de imagem, os dados de plântulas normais obtidas por meio do teste de germinação padrão.

Padilha *et al.* (2001) observaram correlação positiva 0,78, entre os dados de vigor, obtidas por meio do teste de deterioração controlada, no qual as sementes com 25% de teor de água foram deterioradas e o de emergência de plântulas, em condições de estresse hídrico. Já Leão-Araújo *et al.* (2017) também verificaram correlação positiva entre o teste emergência de plântulas com os dados de análise de imagem em plântulas de crambe.

Tabela 7 - Coeficiente de Correlação, dos dados de características de plântulas para as variáveis, comprimento da raiz secundária (CRS); comprimento da raiz primária (CRP); comprimento total (CT) e comprimento total + comprimento das raízes secundárias (CTS), provenientes de sementes submetidas à deterioração controlada, avaliadas do terceiro ao sétimo dia após a semeadura, por meio da análise de imagem.

Coeficiente de Correlação ao terceiro dia										
	Materiais	Terceiro	Quarto	Quinto	Sexto	Sétimo	TRS	TRP	TT	TTS
Materiais	1									
Terceiro	0,83*	1								
Quarto	0,66	0,74*	1							
Quinto	0,9*	0,79*	0,8*	1						
Sexto	0,84*	0,8*	0,77*	0,95*	1					
Sétimo	0,88*	0,89*	0,85*	0,92*	0,93*	1				
TRS	0,5	0,64	0,84	0,58	0,49	0,66	1			
TRP	0,08	0,22	0,48	0,11	-0,06	0,16	0,69*	1		
TT	0,16	0,3	0,54	0,18	0,01	0,23	0,77*	0,99*	1	
TTS	0,4	0,55	0,78	0,47	0,34	0,54	0,97*	0,84*	0,9*	1

\*(P<0,001); \*\*(P=0,005).

Fonte: Da autora (2024).

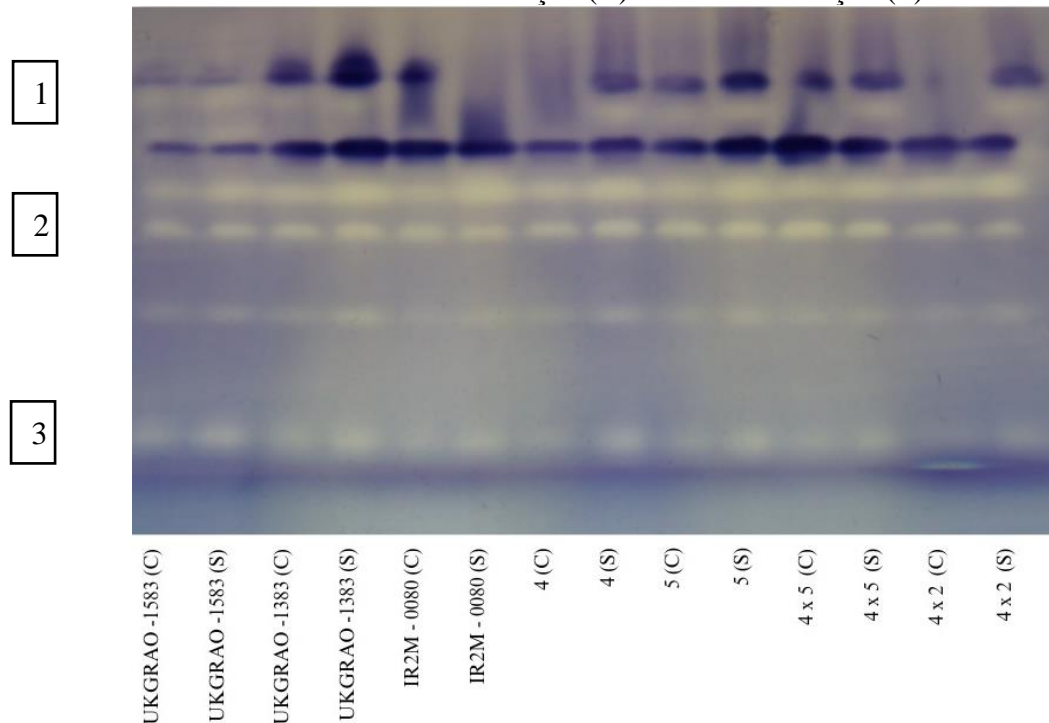
### 3.6 Expressão de Proteínas

Em relação a expressão da enzima piruvato descarboxilase, maior expressão foi observada em sementes dos diferentes materiais genéticos, não submetidos ao processo de deterioração controlada. Isto pôde ser observado em subunidades com pesos moleculares maiores e menores. Esta diferença pode ser observada tanto na intensidade das subunidades como na presença e ausência destas, a exemplo da subunidade identificada como 1.

Quando a expressão desta enzima é comparada entre os materiais genéticos utilizados há diferenças principalmente em relação à intensidade das subunidades. Em sementes híbridas, 4 x 2, há menor intensidade da subunidade identificada como 2.

Ao associar a expressão desta enzima com o vigor das sementes submetidas ou não ao teste de deterioração controlada, houve maior expressão da enzima piruvato descarboxilase em sementes com maior vigor, não submetidas à deterioração controlada. Isso pôde ser observado para os diferentes materiais genéticos avaliados, subunidade 1 e 3.

Figura 1 - Expressão da enzima piruvato descarboxilase, em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



Fonte: Da autora (2024).

A piruvato descarboxilase tem como função converter o piruvato em acetaldeído (Zhang *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2017) e está envolvida no metabolismo anaeróbico da respiração (Almeida *et al.*, 2019).

Sabe-se que o acetaldeído produzido a partir da ação da piruvato descarboxilase pode afetar negativamente a qualidade fisiológica das sementes, por acelerar o processo de deterioração das sementes. No entanto, deve ser ressaltado que o acúmulo de acetaldeído em sementes depende da atividade da álcool desidrogenase (ADH).

Segundo Chaengsakul *et al.* (2019) e Oliveira *et al.* (2020), a álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima que atua no processo respiratório, rota anaeróbica e evita o acúmulo de acetaldeído que é considerado um composto tóxico à célula, convertendo ao etanol.

Nery *et al.* (2018) também observaram em sementes de gergelim, submetidas ao teste de envelhecimento acelerado, menores expressões da enzima álcool desidrogenase, e menor qualidade fisiológica destas sementes.

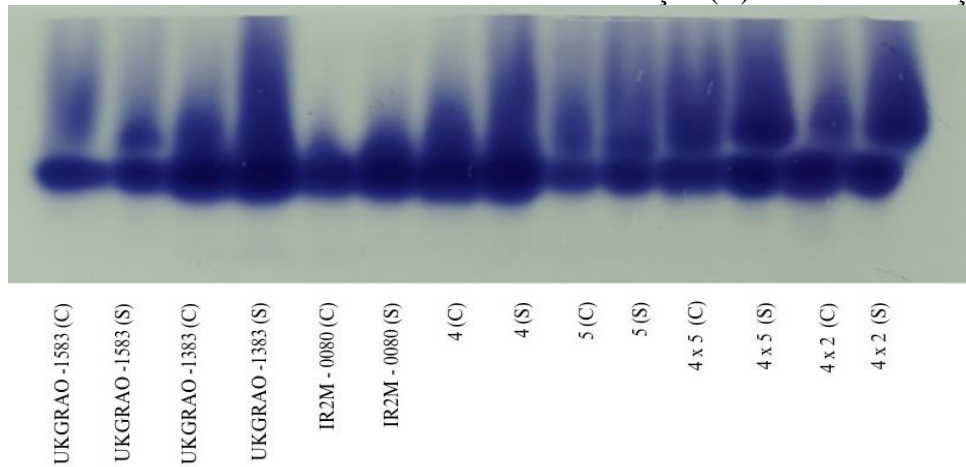
Quando da avaliação do zimograma da Figura 2, maiores expressões da enzima álcool desidrogenase foram observadas em sementes não expostas ao processo de deterioração.

Assim, considerando que as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase são expressas na rota anaeróbica da respiração, e que de alguma forma possuem atividades dependentes, há coerência dos resultados em relação à expressão de ambas nesta pesquisa. Em sementes não submetidas ao processo de deterioração controlada houve maior expressão da enzima piruvato descarboxilase, com a consequente produção de acetaldeído. Nestas sementes também houve maior atividade da ADH, para o controle ou redução do acetaldeído e também foram observados os menores valores de vigor, pelo teste de deterioração controlada (Tabela 3 e 5).

Comparando a expressão da ADH em sementes dos diferentes materiais genéticos, maiores expressões foram observadas em sementes dos híbridos UKGRAO-1383, 4 X 5 e da linhagem 4, não expostas ao processo de deterioração. Menor expressão desta enzima foi observada em sementes expostas ao processo de deterioração, dos materiais genéticos IR2M-0080 e da linhagem 5, ambas classificadas como tolerantes à deterioração.

Infere-se que as sementes submetidas à deterioração controlada possuem menor atividade das enzimas da rota anaeróbica. Ressalta-se que estas sementes se encontravam com 25% de teor de água, quando submetidas ao teste de germinação e as não expostas à deterioração se encontravam com 13% de teor de água.

Figura 2 - Expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH), em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).

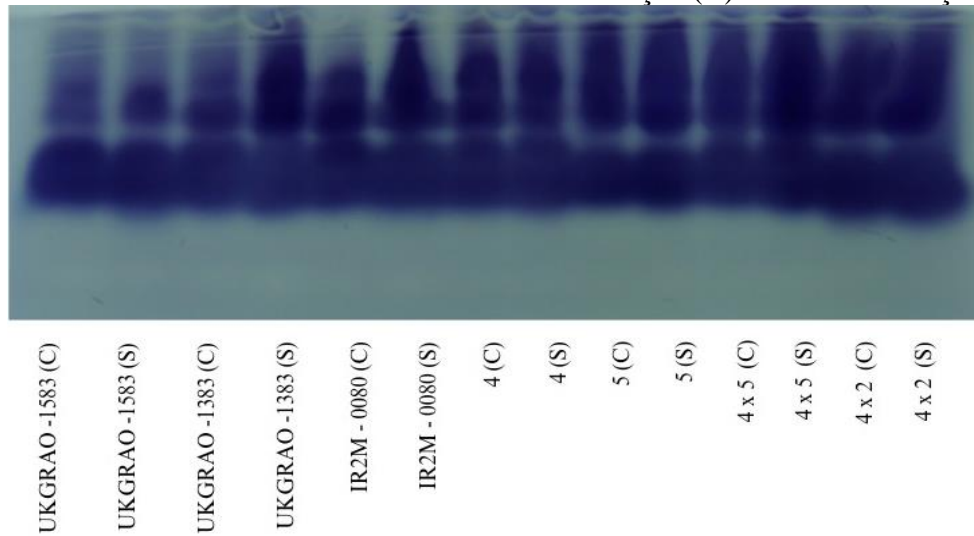


Fonte: Da autora (2024).

Outra enzima envolvida no processo de respiração é a Malato desidrogenase, MDH. Esta enzima catalisa a conversão de malato ao oxaloacetato no Ciclo de Krebs. Segundo Spinola *et al.* (2000) esta enzima está envolvida no movimento de malato através da membrana da mitocôndria e outros compartimentos celulares. Segundo estes autores esta enzima é de natureza constitutiva.

Na presente pesquisa maior atividade desta enzima foi observada em sementes não submetidas à deterioração, para a maioria dos materiais genéticos estudados. Ao comparar a expressão da MDH entre os materiais genéticos, maiores expressões foram observadas em sementes não submetidas à deterioração, dos híbridos IR2M-0080, 4 x 2 e UKGRAO-1383 e da linhagem 5, para as quais também foram observados os maiores valores de vigor. Considerando ainda as sementes não submetidas à deterioração, menor expressão da enzima MDH foi observada para os materiais genéticos UKGRAO-1583 e linhagem 4, ambas classificadas como não tolerantes à deterioração.

Figura 3 - Expressão da enzima malato desidrogenase (MDH), em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



Fonte: Da autora (2024).

Abreu *et al.* (2014) não observaram diferença na intensidade da atividade da enzima malato desidrogenase em sementes de milho, submetidas a diferentes potenciais osmóticos, definidos por meio de PEG -0,3, -0,6 e -0,9 para simular deficiência hídrica durante o processo de germinação das sementes e crescimento de plântulas.

Os resultados observados na presente pesquisa corroboram os de Santos *et al.* (2016), que observaram maior expressão da enzima malato desidrogenase em sementes de milho mais vigorosas, obtidas por meio de cinco lotes de sementes híbridos com diferentes níveis de vigor.

Ao avaliar em conjunto, as expressões das enzimas piruvato descarboxilase, ADH e MDH, todas envolvidas no processo de respiração e fundamentais para o processo de germinação e crescimento de plântulas pode-se inferir que a maior expressão destas enzimas ocorre em sementes mais vigorosas, que dão origem às plântulas mais desenvolvidas. Assim, em sementes de maior vigor, não submetidas à deterioração foram observadas as maiores expressões destas enzimas.

Por fim, deve ser ressaltado que enzimas da respiração são fundamentais para a produção de energia para que ocorra a germinação. Além disso, algumas enzimas como a MDH são importantes para a formação dos precursores de aminoácidos e, conseqüentemente, influenciam no crescimento de plântulas.

Sabe-se que um dos principais fatores que influenciam a deterioração de sementes é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $OH^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), entre outras. Estas espécies podem causar danos

oxidativos às biomoléculas, a exemplos de lipídios, proteínas e DNA, o que compromete a germinação das sementes e o crescimento das plântulas. No entanto, os danos de ROS podem ser neutralizados por meio da atividade de enzimas antioxidantes a exemplo da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX), dentre outras.

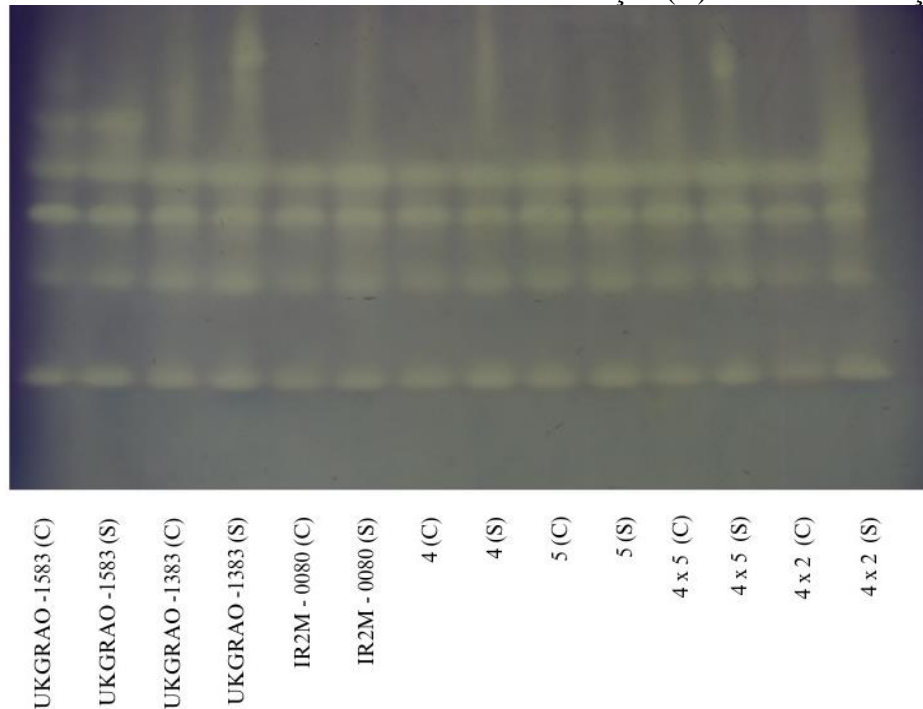
Na presente pesquisa foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e POX. Para estas três enzimas foram observadas diferenças das expressões entre os materiais genéticos avaliados, assim como nas das sementes submetidas ou não ao processo de deterioração controlada.

Para a enzima superóxido dismutase, houve maior expressão em sementes não submetidas à deterioração controlada, para a maioria dos materiais avaliados com destaque para o observado em sementes dos híbridos UKGRAO-1383, 4 x 2 e da linhagem 4. Importante ressaltar, que em sementes da linhagem 5, classificadas como tolerante à deterioração, os padrões observados em sementes deterioradas ou não foram os mesmos.

Ao comparar a expressão da SOD em sementes dos diferentes materiais genéticos pôde-se observar que: a maior expressão foi observada em sementes dos híbridos UKGRAO-1383, UKGRAO-1583 e 4 x 5, em sementes submetidas ou não à deterioração.

A superóxido dismutase é uma enzima que atua no sistema de defesa antioxidante, com a função de remover o superóxido, dificultando a formação do radical hidroxila (Del Ríó *et al.*, 2018). Esta enzima atua na primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) e transforma o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Gill; Tuteja, 2010; Dutra *et al.* 2015; Liu *et al.*, 2019; Paul; Roychoudhury, 2017).

Figura 4 - Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



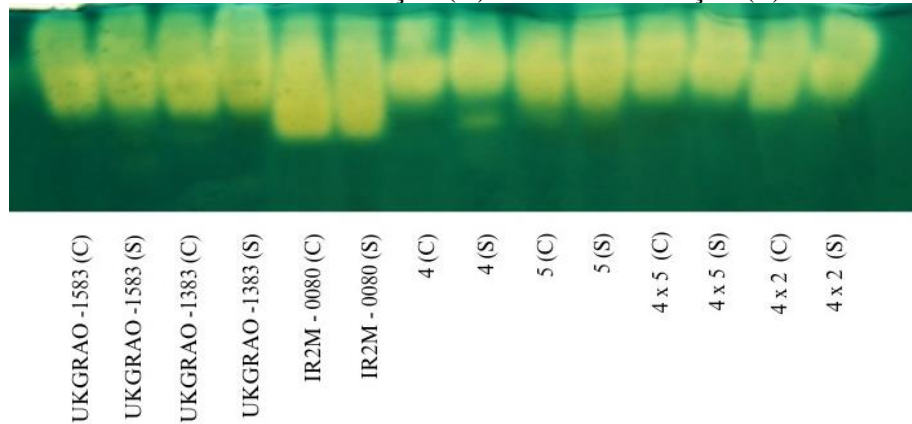
Fonte: Da autora (2024).

Para a enzima catalase, houve variação da expressão em sementes dos diferentes materiais genéticos, sendo que a maior expressão foi observada em sementes do híbrido IR2M-0080, classificada como tolerante à deterioração, independentemente de as sementes terem sido submetidas ou não ao processo de deterioração controlada.

Ao comparar a expressão destas enzimas em sementes submetidas ou não à deterioração, maiores expressões foram observadas em sementes não submetidas ao processo de deterioração, o que também foi observado, de uma maneira geral, para a enzima SOD.

De forma semelhante, isto também foi observado quando da avaliação da expressão da peroxidase, ou seja, houve menor atividade desta enzima em sementes submetidas ao processo de deterioração. Exceção foi observada apenas em sementes do material genético UKGRAO-1583.

Figura 5 - Expressão da enzima catalase, em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).

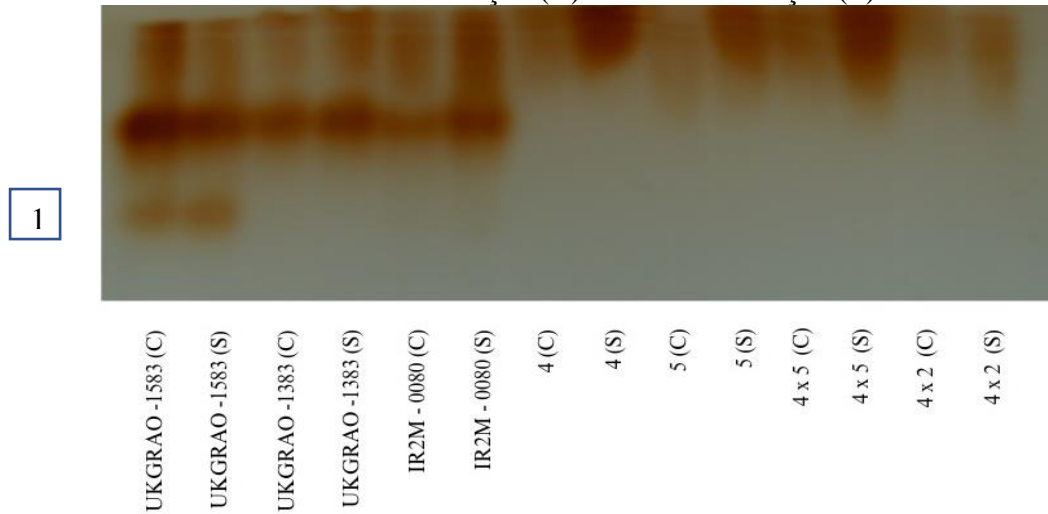


Sabe-se que a SOD, CAT e POX desempenham papéis importantes na proteção contra danos oxidativos. A catalase e a peroxidase estão envolvidas na decomposição do peróxido de hidrogênio,  $H_2O_2$ , formado a partir da ação da SOD (Bian *et al.*, 2024).

A catalase está envolvida no processo de desintoxicação da célula, decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Kibinza *et al.*, 2011; Anjum *et al.*, 2016). Essa enzima atua principalmente nos peroxissomos (Choudhary; Kumar; Kaur, 2020). Além de realizar a desintoxicação celular, transformação as espécies reativas ao oxigênio em substância não reativas, por meio da reação de dismutação (Paul; Roychoudhury, 2017; Marques *et al.*, 2019).

A peroxidase, como já descrito, também está envolvida na desintoxicação de compostos tóxicos como peróxidos e fenóis. Na presente pesquisa, houve diferença da expressão da peroxidase em sementes dos diferentes materiais genéticos avaliados. Ao comparar a expressão em sementes das duas linhagens 4 e 5, não tolerante e tolerante à deterioração, respectivamente, maior expressão foi observada em sementes da linhagem 4. Dentre todos os materiais estudados, maior expressão desta enzima foi observada em sementes da cultivar UKGRAO-1583, para a qual foi observada uma subunidade (1), não observada nos demais materiais (Figura 6).

Figura 6 - Expressão da enzima peroxidase, em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



Fonte: Da autora (2024).

Importante ressaltar que as enzimas do sistema antioxidante desempenham funções cruciais na proteção do metabolismo celular durante o processo de germinação e crescimento de plântulas. No entanto, as atividades destas enzimas podem ser comprometidas durante a deterioração das sementes, o que resulta em aumento de ROS e, conseqüentemente, os danos oxidativos.

Por meio de pesquisas tem sido observado que em sementes expostas às condições de estresse, a exemplo de alta umidade relativa e temperatura e deficiência hídrica durante o processo de germinação, a atividade de enzimas do sistema antioxidante pode ser insuficiente para proteger as células dos danos oxidativos o que contribui para a maior deterioração das sementes (Jhanji *et al.*, 2024).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) também estão ligadas à peroxidação dos lipídeos, com a conseqüente fluidez do sistema de membranas celulares e da capacidade seletiva deste (Paul; Roychoudhury 2017; Marques *et al.*, 2019).

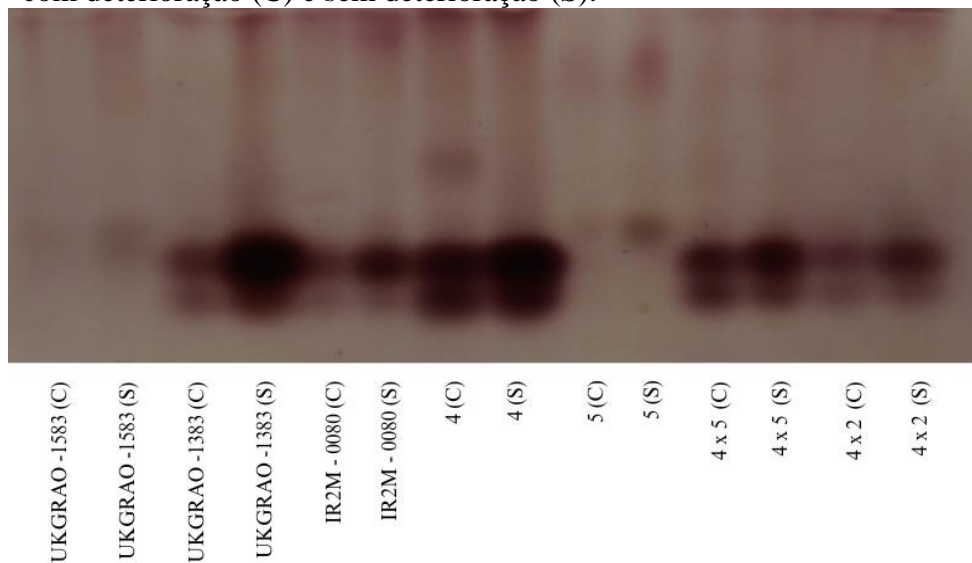
A peroxidação lipídica envolve a oxidação de lipídeos, como fosfolipídios e ácidos graxos insaturados, o que resulta na formação de produtos tóxicos, como aldeídos e peróxidos.

Outra enzima que também pode estar envolvida no metabolismo de lipídeos e conseqüentemente no processo de deterioração de sementes é a esterase (Dubal *et al.*, 2016).

Na presente pesquisa, para a maioria dos materiais genéticos avaliados, menor expressão da enzima esterase foi observada em sementes submetidas ao processo de deterioração controlada. Padrões semelhantes de expressão foram observados em sementes deterioradas ou não do híbrido 4 x 5 (Figura 7).

Ao comparar a expressão desta enzima em sementes das linhagens 4 e 5, classificadas como intolerante e tolerante, respectivamente, quanto a característica de deterioração, maior expressão foi observada para a intolerante. Ressalta-se que a produção destas sementes foi realizada nas mesmas condições edafoclimáticas, assim como o processamento destas pós-colheita. Já em sementes do híbrido UKGRAO-1583, que se mostrou com baixo vigor, pelo teste de deterioração controlada também foi observada baixa expressão da enzima (Figura 7).

Figura 7 - Expressão da enzima esterase, em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



Fonte: Da autora (2024).

Ferreira *et al.* (2015) observaram em sementes de milho em elevado nível de deterioração, maior expressão da enzima esterase. Já Oliveira *et al.* (2020) não observaram diferenças da expressão da esterase entre os híbridos avaliados, quando as sementes foram tratadas com inseticidas e armazenadas por nove meses. É uma enzima que está envolvida na reação de hidrólise de ésteres (Silva *et al.*, 2018).

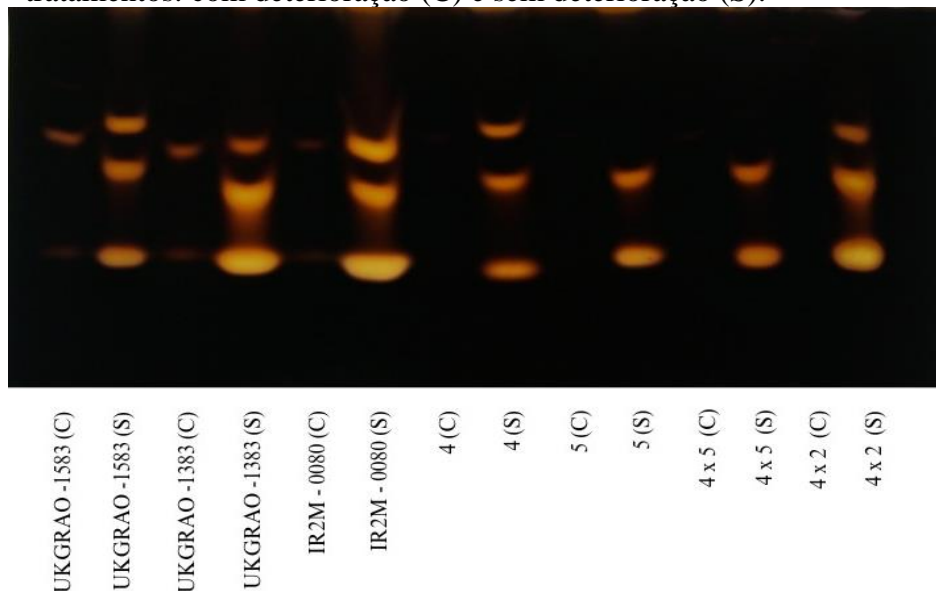
Insta ressaltar, que essa enzima envolvida na quebra de ésteres de ácidos graxos, pode contribuir para a mobilização de reservas de energia durante a germinação de sementes e crescimento inicial das plântulas. Ao avaliar os resultados de expressão desta enzima observados na presente pesquisa, infere-se que o processo de deterioração ao qual as sementes de milho foram submetidas, pode ter prejudicado a atividade da enzima e, conseqüentemente, a mobilização de reservas de energia durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas. Isto explicaria a menor atividade da esterase em sementes submetidas ao processo de deterioração e o menor vigor das sementes, avaliados pelo teste de deterioração controlada.

No entanto, os aspectos bioquímicos da deterioração de sementes de milho envolvem uma série de processos que afetam a composição e integridade das biomoléculas. Durante o processo de deterioração ocorrem mudanças nas concentrações de várias substâncias como: carboidratos, lipídios, proteínas, compostos antioxidantes, dentre outras. Isto explica a importância de se avaliar diferentes sistemas enzimáticos em pesquisas relacionadas à deterioração de sementes.

Sabe-se que durante o processo de deterioração de sementes de milho também ocorrem alterações das concentrações de carboidratos solúveis. Isso pode influenciar o fornecimento de energia demandado para os processos metabólicos durante a germinação de sementes e o crescimento inicial de plântulas. Neste contexto, a enzima alfa amilase é uma das principais enzimas envolvidas na hidrólise do amido que está presente no endosperma, sendo essencial como fonte de energia para o crescimento do eixo embrionário (Diniz *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

Na presente pesquisa, houve maior expressão da alfa amilase em sementes não submetidas à deterioração, independentemente do material genético avaliado (Figura 8).

Figura 8 - Expressão da enzima alfa amilase, em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



Fonte: Da autora (2024).

Segundo Oliveira *et al.* (2023) e Lopes *et al.* (2017) a enzima alfa amilase está diretamente relacionada às melhores taxas de germinação e vigor das sementes. Roveri *et al.* (2004) observaram associação entre a expressão da enzima alfa amilase em sementes de milho e os genótipos tolerantes às altas temperaturas de secagem.

Também, na presente pesquisa, maiores expressões desta enzima foram observadas em sementes submetidas ao processo de deterioração controlada e com melhor qualidade fisiológica.

Oliveira *et al.* (2020) observaram uma redução na atividade da enzima alfa amilase, com o avanço da deterioração fisiológica em sementes de milho, tratadas com inseticidas e submetidas ao armazenamento.

Na presente pesquisa também foi observada influência do material genético sobre a expressão da enzima alfa amilase, principalmente quando as sementes não foram expostas ao processo de deterioração controlada. Maiores expressões foram observadas em sementes dos híbridos UKGRAO-1383 e IR2M-0080, sendo este último classificado como material tolerante à deterioração. Por outro lado, baixa expressão desta enzima foi observada em sementes da linhagem 5, também classificada como tolerante.

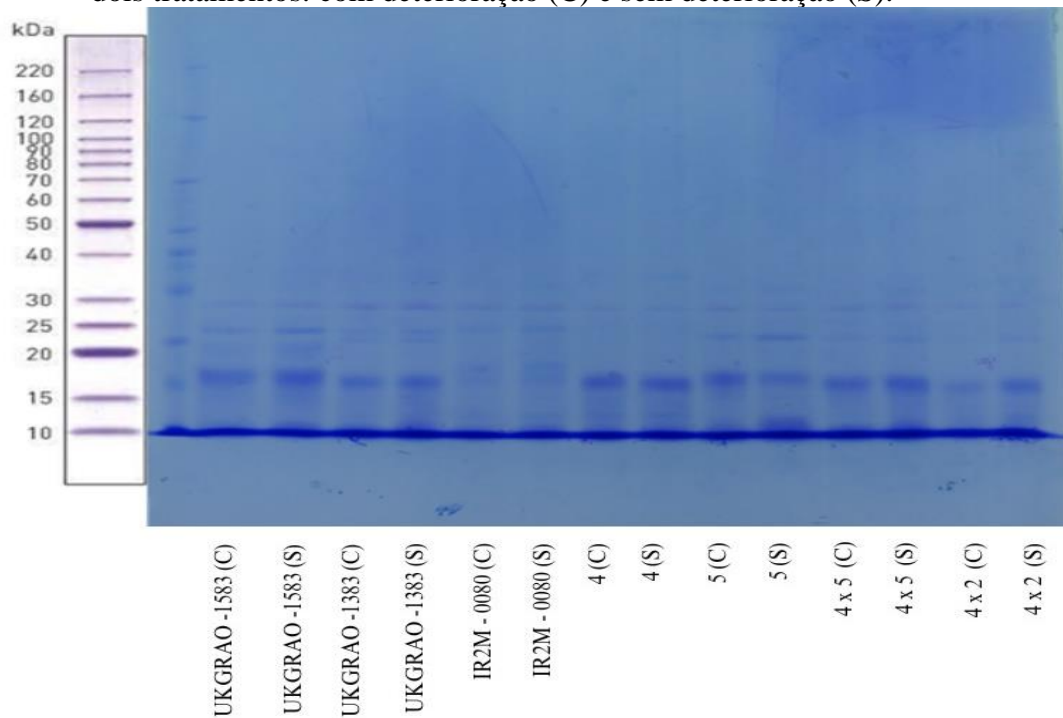
Apesar da influência desta enzima sobre a qualidade fisiológica das sementes de milho, já relatada na literatura, é importante ressaltar que são vários os genes que estão associados a esta característica. Andrade *et al.* (2015) observou após a inibição da enzima alfa amilase, por meio do paclobutrazol, que nem sempre há correlação positiva entre a maior expressão da enzima alfa amilase e a melhor qualidade fisiológica de sementes de milho. Ela também inferiu que proteínas resistentes ao calor podem estar relacionadas à qualidade fisiológica das sementes.

Na presente pesquisa, para a maioria dos materiais genéticos avaliados, a menor expressão de proteínas resistente ao calor foi observada em sementes submetidas ao processo de deterioração. Nestas sementes também foram verificados os menores valores de vigor, avaliados pelo teste de deterioração controlada (Tabelas 3 e 5).

Em algumas pesquisas foi observada uma correlação positiva entre a qualidade fisiológica das sementes de milho e a expressão de proteína resistente ao calor (Silva Neta *et al.*, 2015; Silva Neta *et al.*, 2020). José *et al.* (2005) associaram maior expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de genótipos tolerantes às altas temperaturas de secagem.

Também foram observados padrões diferentes destas proteínas entre alguns materiais genéticos. Menor expressão foi observada em sementes híbridas de IR2M-0080, classificada como tolerante, independentemente da exposição ou não à deterioração controlada. Por outro lado, maiores expressões foram observadas em sementes dos materiais UKGRAO-1583 e UKGRAO-1383 (Figura 9).

Figura 9 - Expressão da proteína resistente ao calor, em genótipos de milho, submetidas a dois tratamentos: com deterioração (C) e sem deterioração (S).



Fonte: Da autoria (2024).

O polimorfismo observado entre diferentes cultivares de milho, por meio de proteínas resistentes ao calor, tem sido explorado em algumas pesquisas para fins de identificação de cultivares. José *et al.* (2005) e Menezes *et al.* (2008). Em ambos os artigos, a estabilidade destas proteínas foi ressaltada pelos autores. No entanto, associar a expressão destas à qualidade fisiológica de sementes merece mais estudos.

#### **4 CONCLUSÕES**

A deterioração controlada em sementes com teor de água de 25%, acondicionadas por 48 horas à 42 °C, seguida do teste de germinação, por três dias, é recomendada para fenotipagem de genótipos de milho, quanto a tolerância das sementes à deterioração, após a colheita em espigas.

Há menor expressão das enzimas piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, esterase, alfa amilase e de proteínas resistentes ao calor, em sementes de milho submetidas ao processo de deterioração controlada.

Há influência do genótipo sobre a expressão de algumas proteínas avaliadas nesta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. **Análise dialélica e estratégias para a seleção de genótipos de milho submetidos ao estresse hídrico nas fases de germinação e emergência de plântulas.** 2016. 138 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.
- ABREU, V. M. de *et al.* Indirect selection for drought tolerance in maize through agronomic and seeds traits. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 16, n. 2, p. 287-296, 2017.
- ABREU, V. M. de *et al.* Desempenho fisiológico e expressão de isoenzimas em sementes de milho submetidas ao estresse hídrico. **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 40-47, 2014.
- ABREU, V. M. de *et al.* Capacidade de combinação e heterose de genótipos de milho sob estresse hídrico durante a germinação de sementes e emergência de plântulas. **Crop Science**, v. 1, p. 33-43, 2019.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos.** 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- ALMEIDA, F. A. de *et al.* Germination temperatures affect the physiological quality of seeds of lettuce cultivars. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 35, n. 4, p. 1143-1152, July/Aug. 2019.
- ALVARENGA, R. O.; MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação do vigor de sementes de milho super doce por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas e tecidos remanescentes de material de reserva. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 488-494, set. 2012.
- ANDRADE, D.; BERNARDES de *et al.* Ferramentas de inteligência artificial e escala diagramática para avaliação da qualidade de revestimento em sementes de soja tratadas. **Computação Neural e Aplicações**, p. 1-6, 2023.
- ANDRADE, J. C. de *et al.* **Qualidade do milho safrinha em função do tempo de transporte após a colheita.** 2015. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2015.
- ANJUM, N. A. *et al.* Catalase e ascorbato peroxidase – enzimas heme desintoxicantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representativas em planta<sup>5</sup> s. **Ciência Ambiental e Pesquisa sobre Poluição**, v. 23, p. 19002-19029, 2016.
- BIAN, J. Y.; GUO, X. Y.; LEE, D. *et al.* O plasma não térmica melhora a germinação das sementes de arroz, o desenvolvimento das mudas e o crescimento das raízes sob estresse de baixa temperatura. **Appl Biol Chem.**, v. 67, n. 2, 2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília. SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 395 p.
- CAPPELINI, L. T. D. *et al.* Efeito de Fusarium moniliforme na qualidade de sementes de milho. **Científica**, v. 33, n. 2, p. 185-191, 2005.

- CHAENGSAKUL, C. *et al.* Produção de etanol e expressão gênica mitocondrial de sementes de milho (*Zea mays*) durante o armazenamento. **Revista de Agricultura Integrativa**, v. 18, n. 11, p. 2435-2445, 2019.
- CHOUDHARY, A.; KUMAR, A.; KAUR, N. ROS e explosão oxidativa: Raízes no desenvolvimento das plantas. **Diversidade Vegetal**, v. 42, n. 1, p. 33-43, 2020.
- CHOUDHURY, F. K. *et al.* Espécies reativas de oxigênio, estresse abiótico e combinação de estresse. **O Diário da Planta**, v. 5, p. 856-867, 2017.
- COSTA, C. J. Deterioração e armazenamento de sementes de hortaliças. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012.
- DEL RÍO, L. A. *et al.* Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants**, p. 1-26, 2018.
- DINIZ, R. P.; VON PINHO, I. V.; PANIAGO, B. D. C.; VON PINHO, E. V. D. R.; DOS SANTOS, H.; VON PINHO, R. G.; CALDEIRA, C. M. Qualidade fisiológica e expressão de alfa-amilase em sementes de milho produzidas em condições de estresse salino e hídrico. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 17, n. 1, p. 37-48, 2018.
- DMITRIEVA, V. A.; TYUTEREVA, E. V.; VOITSEKHOVSKAJA, O.V. Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3237, 2020.
- DUBAL, ITP *et al.* Efeito da temperatura na germinação de sementes de feijão: vigor e expressão de isoenzimas. **Agric Sci Res J**, v. 1, n. 5, pág. 0001-0009, 2016.
- DUTRA, S. M. F. *et al.* Genes related to high temperature tolerance during maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18047-18058, 2015.
- FIABANE, R.; LAZARETTI, N. S. Efeitos da antecipação da colheita sobre a qualidade fisiológica de semente de milho. **Revista Cultivando o Saber**, p. 120-133, 2023.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019.
- FERREIRA, L. A. *et al.* Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 80-89, 2007.
- FERREIRA, T. F. *et al.* Isoenzyme activity in maize hybrid seeds harvested with different moisture contents and treated. **Journal of Seed Science**, v. 37, p. 139-146, 2015.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. Controlled deterioration test. *In*: HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. Zurich: International Seed Testing Association, 1995. p.70-78.

HAMPTON, J.G.; JOHMSTONE, K.A E EUA-UMPON, V. Ageing vigour tests for mungbean and reach beand seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich. v. 20. n. 3. p. 643-653,1992.

HUANG, L. *et al.* O papel da melatonina na regulação da produção de culturas hortícolas sob vários estresses abióticos. **Scientia Horticulturae**, v. 112508, 2024.

JHANJI, S. *et al.* Explorando o ajuste fino entre fitohormônios e cascata de sinalização de ROS na regulação da dormência de sementes, germinação e desenvolvimento de plântulas. **Fisiologia e Bioquímica Vegetal**, p. 108352, 2024.

KIBINZA, S. *et al.* A catalase é uma enzima chave na recuperação das sementes do envelhecimento durante o priming. **Ciência das plantas**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.

KLUGE, E. R. *et al.* Expression of catalase, alcohol dehydrogenase, and malate dehydrogenase in rot grains upon fungicide use on maize hybrids grown at different spacings. **Genet. Mol. Res.**, v. 16, n. 2, 2017.

LEÃO-ARAÚJO, E. F. *et al.* Controlled deterioration test and use of the Seed Vigor Imaging System (SVIS®) to evaluate the physiological potential of crambe seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 393-400, 2017.

LIMA, J. M. E. *et al.* Efeito dos resíduos de deslincamento e neutralizantes na qualidade fisiológica de sementes de algodão armazenadas determinada por análise de imagens de fenotipagem. **Journal of Seed Science**, v. e202345014, 2023.

LIU, B.; SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A. Mechanisms of silicon-mediated amelioration of salt stress in plants. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 307, 2019.

LIU, L. *et al.* A salinidade inibe a germinação das sementes de arroz, reduzindo a atividade da  $\alpha$ -amilase através da diminuição do conteúdo bioativo de giberelina. **Fronteiras na Ciência Vegetal**, v. 275, 2018.

LOBOS, G. A. *et al.* Fenotipagem e fenômica de plantas para melhoramento de plantas. **Fronteiras na Ciência das Plantas**, v. 8, p. 2181, 2017.

LOPES, C. A. *et al.* Importance of amylases for physiological quality in maize seeds. **Biotemas**, v. 30, n. 3, p. 1-7, 2017.

MANTOVANI, E. C.; PIMENTEL, M. A. G. Colheita. *In*: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Eds.). **Milho do plantio a colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 323-351.

MARCOS FILHO, J. Teste de vigor de sementes: uma visão geral da perspectiva do passado, presente e futuro. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 363-374, ago. 2015.

MARINHO, J. de L. *et al.* Teste de deterioração controlada para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho doce. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 949-962, 2021.

MARQUES, T. L. *et al.* Physiological analysis and gene expression analysis of ZmDBP3, ZmALDH9, ZmAN13, and ZmDREB2A in maize lines. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 42, p. e43479, 2019.

MATTHEWS, S. Evaluation of techniques for germination and vigor studies. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, p. 543-51, 1981.

MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D.; SILVA, J. A. Processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife, v. 13, n. 3, e5540, 2018.

MEEKS, M. *et al.* Measuring maize seedling drought response in search of tolerant germplasm. *Agronomy*, Basel, v. 3, p. 135-147, 2013.

MENEZES, M. de *et al.* Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 111-122, 2008.

MEEKS, M. *et al.* Measuring maize seedling drought response in search of tolerant germplasm. *Agronomy*, Basel, v. 3, p. 135-147, 2013.

NASCIMENTO, Q. *et al.* Perdas quantitativas no transporte curto de grãos de milho (*Zea Mays* L.) em função de aspectos gerais de pós-colheita no norte do estado de Mato Grosso. **Navus-Revista de Gestão e Tecnologia**, v. 6, n. 1, p. 60-71, 2016.

NATH, M. *et al.* Aumento do conteúdo de nitrogênio e fósforo mediado por micróbios para melhoramento de culturas. *In: Melhoramento de culturas através da biotecnologia microbiana*. [S.l.], Elsevier, 2018. p. 293-304.

NERY, M. C.; ROCHA, A. de S.; Pinho, E. V. de R. V.; SANTOS, H. O. dos; FIALHO, C. M. T.; NERY, F. C. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, n. 1, p. e39449, 2018.

OLIVEIRA, T. L. de *et al.* Alterações bioquímicas e qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos químicos e tempos de armazenamento. **Journal of Seed Science**, v. 42, 2020.

PACE, J. *et al.* Analysis of Maize (*Zea mays* L.) Seedling Roots with the High-Throughput Image Analysis Tool ARIA (Automatic Root Image Analysis) **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 9, e108255, 2014.

PADILHA, L. *et al.* Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 198-204, 2001.

PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties. **Plant Gene**, v. 11, n. 2, p. 124-132, 2017.

- PINHEIRO, R. de M.; GADOTTI GI, B. R. *et al.* Processamento de imagens como ferramenta importante para inteligência artificial no setor de sementes. **Rev Agrar Acad.**, v. 5, p. 89-101, 2022.
- PINTO, C. A. G. *et al.* Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. **Revista de Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2015.
- ROVERI, J. S. C. B. *et al.* Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 115-121, 2005.
- SALGADO, K. C. P. de C. **Mapeamento de QTLs associados à tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho**. 2018. 109 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- SANTOS, G. C. R. *et al.* Análise de imagens na determinação da viabilidade de sementes de milho pelo teste de tetrazólio. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, v. 16, n. 9, p. 14940-14957, 2023.
- SANTOS, R.F.; GOMES-JUNIOR, F.G.; MARCOS-FILHO, J. Mudanças morfológicas e fisiológicas durante a maturação das sementes de quiabo avaliadas através da análise de imagem. **Scientia Agricola**, v.77, n.3, p.1-9, 2020.
- SILVA NETA, I. C. *et al.* Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2674-2690, 2015.
- SILVA NETA, I. C. *et al.* Expressão gênica e controle genético para tolerância ao frio durante a germinação de sementes de milho. **Biologia vegetal BMC**, v. 1-14, 2020.
- SILVA, A. B. C. *et al.* Controlled deterioration test for evaluation of sunn hemp seed vigor. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p. 249-253, 2015.
- SILVA, C. C. A. da *et al.* Fenotipagem digital em linhagens de goiaba: caracterização de sementes. **Revista Funcional de Melhoramento de Plantas**, v. 2, 2021.
- SINGH, A. *et al.* Sinalização mediada por espécies reativas de oxigênio durante estresse abiótico. **Gene Vegetal**, v. 18, p. 100-173, 2019.
- SOUZA, E. M. de. **Avaliação de genótipos de milho quanto a tolerância à alta temperatura durante a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas**. 2022. 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2022.
- SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. de. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo ao envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 263-270, 2000.
- TIAN, L. *et al.* Enhanced ethanol formation by *Clostridium thermocellum* via pyruvate decarboxylase. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017.

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

VON PINHO, I. V. Fenotipagem e expressão gênica para tolerância ao déficit hídrico em milho. 2021. 114 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

ZHANG, Ji-Yu *et al.* Overexpression of *Actinidia deliciosa* pyruvate decarboxylase 1 gene enhances waterlogging stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 244-252, 2016.

## ANEXOS

Tabela 1 - Resumo da Análise de variância, dos dados de vigor de sementes submetidas em dois teores de água, durante o teste de deterioração controlada, em diferentes períodos de avaliação.

Fonte de Variação	GL	QM				
		3 Dia	4 Dia	5 Dia	6 Dia	7 Dia
Material	4	36,7*	4653,9*	79,6*	44,2*	35,7*
Teor de Água	1	0,22	81,2	1,83*	3,1*	15,5*
Material*Teor de água	4	20,5*	2838,7*	18,8*	20,9*	22,9*
Erro	30	0,1	34,9	0,18	0,2	0,1

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2024).

Tabela 2 - Resumo da Análise de variância, dos dados de vigor de sementes submetidas ou não a secagem, durante o teste de deterioração controlada, em diferentes períodos de avaliação.

Fonte de Variação	GL	QM				
		3 Dia	4 Dia	5 Dia	6 Dia	7 Dia
Material	4	16,7*	25,8*	62,6*	48,6*	5962,5*
Método	1	24,8*	0,3	27,3*	6,9*	96,1*
Material*Método	4	18,8*	28,5*	7,1*	7,9*	2721,5*
Erro	30	0,3	0,3	0,2	0,5	8

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2024).

Tabela 3 - Resumo da Análise de variância, dos dados de vigor de sementes submetidas em dois tempos de envelhecimento, durante o teste de deterioração controlada, em diferentes períodos de avaliação.

Fonte de Variação	GL	QM				
		3 Dia	4 Dia	5 Dia	6 Dia	7 Dia
Material	8	35,5*	32,2*	54,6*	42,1*	30,5*
Tempo	1	36,6*	23,1*	33,8*	31,2*	36,1*
Material*Tempo	8	6,9*	6,2*	6,3*	4,5*	6,7*
Erro	54	5,2	0,1	0,1	0,1	0,1

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2024).

Tabela 4 - Resumo da Análise de variância, dos dados de vigor de sementes submetidas ou não a desinfestação com solução de hipoclorito 1%, durante o teste de deterioração controlada, em diferentes períodos de avaliação.

Fonte de Variação	GL	QM				
		3 Dia	4 Dia	5 Dia	6 Dia	7 Dia
Material Genético	2	50,3*	41,6*	161,4*	66,6*	34,4*
Hipoclorito	1	9,9*	6,4*	6,6*	5,0*	5,2*
Material Genético*Hipoclorito	2	1,4*	1,1*	2,2*	0,6*	0,8*
Erro	18	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2024).

Tabela 5 - Resumo da Análise de variância, dos dados de vigor de sementes de diferentes materiais genéticos, obtidos pelo teste de deterioração controlada, em diferentes períodos de avaliação.

Fonte de Variação	GL	QM				
		3 Dia	4 Dia	5 Dia	6 Dia	7 Dia
Material Genético	4	12,1*	2649,7*	22,1*	33,5*	12,1*
Erro	15	3,7	25,2	0,2	0,2	0,1

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2024).

Tabela 6 - Resumo da Análise de variância, dos dados de vigor de sementes de diferentes matérias genéticos, para as variáveis comprimento da raiz secundária(CRS); comprimento da raiz primária; comprimento total (CT) e comprimento total + comprimento das raízes secundárias (CTS), provenientes de sementes submetidas à deterioração controlada, avaliados ao terceiro dia após a semeadura.

Fonte de Variação	GL	QM			
		CRS	CRP	CT	CTS
Material	4	2,9*	6,11*	0,45*	2,5*
Teste	1	3,6*	1,2*	0,19*	2,5*
Material*Teste	4	0,2*	2,5*	0,12*	0,3*
Erro	30	0,03	0,2	0,01	0,04

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2024).