Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

É possível determinar a maturidade fisiológica das sementes de milho *(Zea mays)* utilizando o sal de tetrazólio?

Luiz Felipe Nicoleti Torrezan

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2016

Luiz Felipe Nicoleti Torrezan
Engenheiro Agrônomo

É possível determinar a maturidade fisiológica das sementes de milho *(Zea mays)* pelo teste de tetrazólio?

Orientadora:
Profa. Dra. **ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVEMBRE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Torrezan, Luiz Felipe Nicoleti
É possível determinar a maturidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays*) utilizando o sal de tetrazólio? / Luiz Felipe Nicoleti Torrezan. - - Piracicaba, 2016.
56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Zea mays* 2. Produção da semente 3. Formação e viabilidade da semente I. Título

CDD 633.15
T694p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais essa jornada da minha vida concluída e este trabalho realizado com sucesso.

Agradeço a minha família pelo apoio e as palavras de incentivo nos momentos difíceis. E em especial a minha namorada Aline Ferreira da Silva que foi minha companheira nesse trabalho e mesmo a distância me motivou e ajudou, e entre um feriado e outro estava presente no campo e no laboratório me acompanhando.

Agradeço a minha orientadora a Professora Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre pela paciência e valiosos ensinamentos.

Esse trabalho só foi concluído devido uma equipe de laboratório excelente e a valiosa e necessária ajuda da Helena Pescarin Chamma, o João Elias Jabur e o Adilson.

Agradeço os colegas que sempre estavam presentes mesmo nos sábados, domingos e feriados, e as boas conversas entre um café e outro.

Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que forneceu todos os recursos necessários para que o projeto virasse realidade.

SUMÁRIO

RESUMO.....7
ABSTRACT. 9
LISTA DE FIGURAS 11
LISTA DE TABELAS 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....25
3.1 Local.....25
3.1 Tratamentos 25
3.2 Produção das Sementes em Campo.....25
3.3 Colheitas 26
3.3.1 Linha de Leite.....26
3.3.2 Camada Preta 27
3.3.3 Avaliação das Sementes com o Sal de Tetrazólio 28
3.3.4 Análise de Enzimas.....28
3.3.5 Teor de Água.....29
3.3.6 Massa Seca da Semente 29
3.4 Análises das Sementes Após a Colheita.....30
3.4.1 Teor de Água.....30
3.4.2 Teste de Germinação.....30
3.4.3 Teste de Frio 30
3.4.4 Teste de Condutividade Elétrica.....30
3.4.5 Comprimento da Plântula.....31
3.4.6 Teste de Envelhecimento Acelerado.....31
3.4.7 Emergência da Plântula 31
3.5 Análise Estatística.....31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....33
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 47
6 CONCLUSÃO.....49
REFERÊNCIAS.....50

RESUMO

É possível determinar a maturidade fisiológica das sementes de milho *(Zea mays)* utilizando o sal de tetrazólio?

Nessa pesquisa foi avaliada a utilização do sal de tetrazólio para determinar a maturidade fisiológica das sementes de milho. As sementes utilizadas foram dos híbridos Pioneer 4285 e Dow 2B587, semeadas em 03/10/2014 e 05/12/2014 respectivamente, e colhidas a partir dos 40 dias após o florescimento (DAF), com intervalos de 4 dias até os 68 DAF. As sementes colhidas foram avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor (testes de germinação, de emergência da plântula, de condutividade elétrica, de envelhecimento acelerado e determinações do comprimento da plântula). Os parâmetros utilizados para determinar o ponto de maturidade fisiológica das sementes foram a camada preta, a linha de leite, a massa de matéria seca, o teor de água e a avaliação dos tecidos da semente utilizando o sal de tetrazólio, utilizando o método descrito para avaliar a viabilidade, complementado pela avaliação da atividade das células da chalaza e da zona de transferência do endosperma para o embrião. Para as sementes de milho dos dois híbridos a germinação foi superior a 95% e não houve diferença entre as épocas de colheita, somente nas últimas colheitas das sementes do híbrido Dow 2B587 houve redução da germinação e do vigor. O ponto de maturidade fisiológica (PM) foi identificado aos 56 DAF para as sementes de milho do híbrido P4285 e aos 48 DAF para as do híbrido Dow 2B587 e correspondeu ao estádio 4 da linha de leite e ao máximo de acúmulo da matéria seca. O máximo de vigor foi detectado por meio do resultado do teste de envelhecimento acelerado oito dias antes do (PM) para os dois híbridos. A atividade das células do endosperma está relacionada com os demais indicadores do PM (linha de leite, camada preta, massa de matéria seca e teor de água). O transporte de fotoassimilados da planta mãe para a semente cessa no ponto de maturidade fisiológica da semente, desativando o transporte no qual atuam as células da chalaza e da região basal do endosperma. A utilização do sal de tetrazólio possibilita identificar a morte das células da região basal do endosperma, uma vez que a partir desse momento não há mais a reação dessas células com o sal de tetrazólio, indicando que não têm atividade celular. Dessa forma, é possível caracterizar o ponto de maturidade fisiológica da semente de milho, por meio da atividade do sal de tetrazólio; essa caracterização é confirmada pela expressão das enzimas CAT e MDH.

Palavras-chave: *Zea mays*; Produção da semente; Formação e viabilidade da semente

ABSTRACT

Is it possible to determine the physiological maturity of the corn seeds (*Zea mays*) using the tetrazolium salt?

In this study were evaluated the use of the tetrazolium salt to determine corn seed physiological maturity. The seeds used were the hybrids 4285 Pioneer and Dow 2B587, planted on 10.03.2014 and 05.12.2014 respectively, and harvested after 40 days after flowering (DAF), with 4-day intervals until 68 DAF. The harvested seeds were evaluated for viability and vigor (germination test, seedling emergence, electrical conductivity test, accelerated aging test and seedling length). The parameters used to determine the seeds physiological maturity were the black layer, the milk line, the seed dry matter, seed water content and the evaluation of seed tissues using the tetrazolium salt, method to assess seed viability associated to the evaluation of chalaza cells the endosperm cells. The seeds corn germination, both hybrids, was greater than 95% and there is no difference between harvest times. Corn seed physiological maturity (PM) was identified at 56 DAF for both hybrids, P4285 and 48 DAF for hybrid Dow 2B587 and corresponded to stage 4 of the milk line and the accumulation of maximum dry matter. The maximum vigor was detected by accelerated aging test eight days before PM, for the two seed hybrids. The activity of endosperm cells is related to the other PM indicators (milk line, black layer, dry matter and water content). The transport of the nutrients from plant to the seed ceases at the seed physiological maturity, disabling the transport through chalaza cells and basal area. The use of the tetrazolium salt allows identifying the cell death of basal region, since from that time no further reaction of these cells as the tetrazolium salt indicating that these do not already have cell activity. This parameter corresponds to the others evaluated, thus demonstrating that the tetrazolium salt is effective for corn seed physiological maturity characterization.

Keywords: *Zea mays*; Seed production; Formation and seed viability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sementes de milho híbrido P4285, colhidas aos 52 DAF de cinco espigas; cada linha, posição horizontal, corresponde às sementes de uma espiga, coletadas da região mediana da espiga. As 3 primeiras linhas encontram-se no estádio 3 da linha de leite e as duas últimas no estádio 4 26

Figura 2 – Imagens de sementes de milho Dow 2B587 obtidas em diferentes épocas colheita demonstrando os estádios da camada preta, (a) estádio 3, (b) estádio 4 e (c) estádio 5 27

Figura 3 – Secção longitudinal de uma semente de milho em desenvolvimento, com destaque para as regiões. Demonstrando o sistema de transporte a curta distância de solutos do pedicelo (tecido materno onde é o fim do floema) até a base do endosperma. Adaptado de Bewley e Black (1994) 28

Figura 4 – Análise de regressão do acúmulo de massa seca de sementes do híbrido P4285, colhidas aos 40,44,48,52,56,60,64 e 68 DAF, respectivamente no eixo x 33

Figura 5 – Sementes de milho P4285 resultados de: teor de água (TA), teste de germinação com semente seca (TGSS), teste de germinação com semente úmida (TGSU), sementes com o endosperma vivo (SEV), ponto de maturidade (PM), envelhecimento acelerado (EA) 37

Figura 6 – Sementes de milho, hibrido P4285, à esquerda antes do PM e à direita no PM 38

Figura 7 – Eletroforese da enzima malato desidrogenase (MDH) de sementes de milho do híbrido P4285, colhidas aos 44,48,52,56,64 e 68 DAF. 39

Figura 8 – Eletroforese de sementes de milho, do híbrido P4285, reveladas para a enzima catalase (CAT) 40

Figura 9 – Análise de regressão do acúmulo de massa seca de sementes do híbrido Dow 2B587, colhidas aos 40,44,48,52,56,60,64 e 68 DAF, respectivamente no eixo x 40

Figura 10 – Sementes de milho P4285 resultados: do teste de germinação com semente úmida (TGSU), teste de germinação com sementes secas

(TGSS), teor de água (TA), ponto de maturidade (PM), sementes com o endosperma vivo (SEV), teste de envelhecimento acelerado (EA) 43
Figura 11 – Eletroforese da enzima MDH de sementes de milho do híbrido 2B587 colhidas aos 40,44,48,52,56,60,64 e 68 DAF 44
Figura 12 – Eletroforese da CAT de sementes de milho do híbrido 2B587, colhidas aos 40,44,48,52,56,58,60,64 e 68 DAF 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sementes de milho, híbrido Pionner 4285: resultados do teor de água (TA), viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (TZ), teste de germinação das sementes úmidas (TGSU) e após a secagem (TGSS), emergência da plântula (EP), massa seca (MS), estádio da camada preta (CP), estádio da linha de leita (LL) e sementes com o endosperma vivo (SEV) 34

Tabela 2 – Sementes de milho Pioneer 4285: resultados dos testes de envelhecimento acelerado (EA) e de frio (F), comprimento da plântula (COP), índice de vigor (IV). 36

Tabela 3 – Sementes de milho Dow 2B587: resultados do teor de água (TA), viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (TZ), teste de germinação com sementes secas (TGSS) e com as sementes úmidas (TGSU), emergência de plantas (EP), sementes com endosperma vivo (SEV), massa seca (MS), estádio da camada preta (CP) e estádio da linha de leite (LL). 41

Tabela 4 – Sementes de milho Dow 2B587: resultados do envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (F), comprimento de plântulas (COP) e índice de vigor (IV). 43

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma Monocotyledoneae, da família Poacea, cuja origem remonta à Mesoamérica, existem registros de 7.300 anos do cultivo de milho em ilhas, próximas ao México. Seu nome é de origem indígena caribenha e significa “sustento da vida”; foi fundamental para a alimentação básica dos povos pré-colombianos como os Maias, os Astecas e os Incas (WELLHAUSEN, 1958).

Hoje é uma planta difundida e o principal produtor é os Estados Unidos, são produzidas anualmente 350 milhões de toneladas de milho no “corn belt” (cinturão do milho). É utilizado para a alimentação humana, para a produção de biocombustível, para a ração animal, além de muitos derivados com funções diversas. A composição principal é o amido, um polissacarídeo com valor energético alto (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2013).

O Brasil é o terceiro produtor mundial, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2015); a produção da safra 13/14 foi de 80 milhões de toneladas. Dessa produção 70,6 milhões de toneladas foram produzidas no Centro-Sul. A produtividade média foi de 5.057 t ha^{-1}, porém no Centro-Oeste, especialmente nos Estados de Mato Grosso e Goiás, já foram registradas produtividades de 12 t ha^{-1}, esse rendimento é devido à qualidade da semente e à tecnologia de produção.

Considerando a semente, na safra 2013/14 foram disponibilizados 467 cultivares de milho**,** dos quais 253 são transgênicos. Pela primeira vez, o número de cultivares transgênicos foi superior ao dos convencionais (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2013).

A demanda por sementes de milho, na safra 13/14, foi de 283.423 t e a taxa de utilização foi de 90%; sendo a espécie em que a taxa de utilização de sementes é a maior, devido à tecnologia vinculada à semente e à produtividade dos híbridos fornecidos pelas empresas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2015).

Em função da importância econômica e social da produção de milho, é essencial que as sementes originem plantas que atinjam o máximo rendimento e, para tanto, é fundamental que haja o estabelecimento do estande adequado, que a germinação e o vigor das sementes possibilitem o desenvolvimento rápido e uniforme das plântulas e que não haja prejuízo por pragas.

Existe o consenso quanto à redução da qualidade da semente de milho após a maturidade fisiológica. Dessa forma, métodos que identifiquem e determinem a maturidade fisiológica e, consequentemente, o momento da colheita são essenciais para minimizar a redução da qualidade da semente.

A semente inicia seu armazenamento no momento que atinge o ponto de maturidade fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012) e isso ocorre no campo de produção, especialmente em condições adversas de ambiente. Assim é essencial utilizar parâmetros que possibilitem a avaliação imediata da condição fisiológica da semente. Nesse contexto o sal de tetrazólio, que já é utilizado para determinar a viabilidade da semente, foi utilizado nessa pesquisa para avaliar a atividade das células da região basal do endosperma, essas células são as responsáveis em transferir os fotoassimilados da planta mãe para o embrião. Na medida em que a semente atinge a maturidade fisiológica e o embrião já não necessita mais de nutrientes essas células morrem; o sal de tetrazólio possibilita detectar esse momento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A formação da semente é o processo em que há alterações de natureza física, fisiológica, bioquímica e outras que iniciam-se no momento da fertilização; durante esse processo há a possibilidade de determinar o momento em que a semente está formada, que é denominado de maturidade fisiológica (DELOUCHE, 1971).

A maturação foi conceituada por Popinigis (1977) como a fase em que há as transformações morfológicas, fisiológicas e funcionais que ocorrem no óvulo fertilizado e que culminam com o ponto de máximo peso de matéria seca. Esses processos foram divididos em quatro fases: I e II compreendem a divisão e a expansão celular, a III é caracterizada pelo acúmulo de reservas e a fase IV pela intensa desidratação da semente (DURE, 1975).

Galau, Jakobsen e Hughes (1991) classificaram as fases finais da maturação, após a divisão e expansão celular, em cinco estágios: maturidade fisiológica, separação vascular, pré dessecação, dessecação e quiescência. Consideraram que somente após a formação do embrião é que ocorre a germinação e determinaram este como o ponto de maturidade, na sequência descreveram os demais estágios citados anteriormente.

A regulação dos processos bioquímicos é devida aos fitormônios como auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico, que atuam no processo de maturação e cada um possui sua função de acordo com os tecidos da semente.

A auxina é sintetizada na forma de ácido indol acético (AIA) e armazenada no endosperma, aguardando a germinação para ser liberada enzimaticamente e transportada para o coleóptilo; é também utilizada na fase inicial da diferenciação por assimilar compostos derivados da planta mãe (BEWLEY; BLACK, 1994).

As giberelinas são ativadas e desativadas durante o desenvolvimento da semente; são encontradas nos tecidos do embrião, quando estão em pleno desenvolvimento, e há redução da sua concentração na maturação (BEWLEY; BLACK, 1994; CASTRO; BRADFORT; HILHORST, 2004)

As citocininas têm ação similar a da giberelina com uma alta concentração durante a fase de divisão e expansão do embrião e rápida redução na fase final da maturação (BEWLEY; BLACK, 1994).

O ácido abscísico (ABA) possui uma função antagonista aos fitormônios anteriores, impede a germinação precoce da semente. Portanto depois da formação do embrião apresenta uma taxa elevada e somente durante a fase de desidratação há a rápida redução da sua concentração (BEWLEY; BLACK, 1994). O ABA ainda está relacionado com a síntese das proteínas tardias da embriogênese e a aquisição da tolerância à dessecação da semente (KERMODE, 1995)

Wu et al. (2015) comprovaram que mutantes de milho que tinham deficiência na biossíntese de ABA produziram uma quantidade menor de proteínas tardias da embriogênese, que promovem a germinação posteriormente, e têm como função primordial manter as estruturas celulares durante a fase de intensa desidratação da semente.

A composição química de sementes de milho, como os teores de proteínas, lipídeos e de carboidratos, foram determinados por Ingle, Beitz e Hageman (1965) que concluíram que aos 48 dias após a floração (DAF) o endosperma e o embrião apresentavam a maior taxa de lipídios, DNA, RNA e açúcares solúveis, determinando assim o ponto de maturidade fisiológica (PM).

Em sementes de outras espécies, como as de tabaco, de feijão, de amendoim, de trigo e de cevada foram também analisados os teores de proteínas, lipídeos e carboidratos e também houve a correlação desses compostos com o ponto de maturidade fisiológica (KLOZ; TURKOVA; KLOZOVA, 1966; KHAN; LAUDE, 1969; SKARSAUN; YOUNGS; GILLES, 1969).

Shaw e Loomis (1950); Popinigis (1977); Afuakwa e Crookston (1984); Dias (2001) consideraram que a maturidade da semente corresponde ao estádio de desenvolvimento em que as sementes atingem a máxima massa de matéria seca.

A variação do teor de água e o acúmulo de massa foram enfatizados por Carvalho e Nakagawa (2012), que consideraram que para a formação da semente há a translocação de fotoassimilados e há o acúmulo de matéria seca enquanto o teor de água mantém-se alto, porém quando essa translocação cessa o teor de água decresce rapidamente, para reduzir a respiração da semente e evitar a deterioração. Vários pesquisadores estudaram a formação das sementes de milho, considerando essas alterações associadas a outras características observáveis visualmente nas sementes.

O teor de água no PM foi descrito entre 28-42% por Shaw e Thom (1951); Daynard e Duncan (1969); Rench e Shaw (1971); outros autores estipularam

a faixa de 15,4-35% como o teor de água durante a maturidade Carter e Poneleit (1973); e Hunter et al. (1991) consideraram como adequado a variação entre 25-30%.

Outros pesquisadores estudaram a diversidade genética em 67 linhagens de milho relacionada ao teor de água no PM e acúmulo de massa seca. Verificaram que o teor de água no momento do máximo acúmulo de massa seca variou entre 28-60%. O acúmulo máximo de massa seca variou entre 96 a 327 mg semente^{-1} entre as linhagens e os anos (BORRAS et al., 2009).

Dessa forma, foram estudadas alternativas para identificar o PM das sementes de milho e Daynard e Duncan (1969), Rench e Shaw (1971), Carter e Poneleit (1973), Sutton e Stucker (1974) e Afuakwa, Crookston e Jones (1984) avaliaram a formação da camada preta.

Para a determinação do ponto ideal de colheita, com base na formação da camada preta, em sementes de milho, do híbrido simples BR201, Borba et al. (1994) verificaram que 95% das sementes aos 55 dias após a floração (DAF) já tinham essa característica e o máximo de germinação e vigor. Observaram que a germinação e o vigor decresceram a partir dos 67 DAF até o momento da colheita.

Estudos relacionando a formação da camada preta possibilitaram concluir que há a formação dessa camada na semente, independentemente do híbrido ou de condições edafoclimáticas (DAYNARD; DUNCAN, 1969; CARTER; PONELEIT, 1973; AFUAKWA; CROOKSTON; JONES, 1984).

No entanto, Daynard (1972) considerou que o aumento do número de graus-dias pode antecipar o aparecimento da camada preta, enquanto que a manutenção de elevados teores de água pode retardar esse aparecimento Carter e Poneleit (1973). De acordo com Afuakwa, Crookston e Jones (1984), essa coloração corresponde à redução ou à interrupção do transporte de sacarose.

Magalhães e Durães (2006) complementaram essa afirmação dizendo que a formação da camada preta é resultado da obstrução dos vasos e, então, rompe-se a ligação entre a planta de origem e o fruto, passando o mesmo a apresentar vida independente.

Em pesquisa realizada nos Estados Unidos, entre os anos de 1969 e 1971, com sementes de milho de vinte híbridos, foram determinadas diferenças quanto à formação da camada preta, que foi relacionada à variação genotípica entre os híbridos. Em alguns híbridos essa camada pode ser formada de forma rápida e

em outros híbridos de forma lenta. Como essa pesquisa foi realizada em diferentes anos agrícolas houve também variação entre o mesmo híbrido nos diferentes anos, demonstrando assim a interação entre o ambiente e o genótipo, que contribuiu para a variação do tempo de formação da camada preta (CARTER; PONELEIT, 1973).

A formação da camada preta pode ser variável, essa camada já foi detectada em sementes de milho com teores de água entre 15,4% e 75% (CARTER; PONELEIT, 1973; AFUAKWA; CROOKSTON; JONES, 1984).

Rench e Shaw (1971) estudaram o acúmulo de massa seca e a redução do teor de água juntamente com a formação da camada preta e propuseram uma escala 1 a 5, sendo o estádio 1 quando inicia-se o aparecimento da camada preta com uma coloração marrom no lado oposto ao embrião, o estádio 2 é caracterizado com uma tonalidade um pouco mais escura e os estádios 3, 4 e 5 é quando se caracteriza uma fina camada na região basal do endosperma que vai escurecendo de um estádio para o outro, até tornar-se totalmente preta no estádio 5. Afirmaram que durante a formação da camada preta há a intensa desidratação da semente e que o máximo de acúmulo de massa seca ocorre no estádio 3, quando surge em toda região basal do endosperma uma fina camada.

Para melhorar a visualização e a diferenciação entre os estádios da camada preta Hunter et al. (1991) aprimoraram a escala classificando como estádio 1 quando a região basal do endosperma tem uma coloração translúcida no endosperma, o estádio 2 quando há o surgimento de uma coloração marrom ou cinza esverdeada na região pedicelo-placental, o estádio 3 quando a coloração se torna mais fina e intensa, seguindo assim o estádio 4 com uma tonalidade marrom mais intensa e o estádio 5 quando há a completa formação da camada preta.

Outros pesquisadores, como Afuakwa e Crookston (1984), Hunter et al. (1991), Tekrony e Hunter (1995) estudaram a relação entre a formação da linha de leite e a maturidade fisiológica.

Com o objetivo de obter um parâmetro seguro e confiável Hunter et al. (1991) aplicaram na planta de milho o carbono-14 e verificaram as taxas de assimilação do carbono na semente, juntamente com as avaliações da linha de leite e da camada preta. Propuseram, então, para a formação da linha de leite a classificação em estádios de 1 a 5, incluindo o endosperma inteiramente líquido (estádio 1) e 25%, 50%, 75% e 100% do endosperma endurecido, respectivamente. Quando a taxa de carbono foi próxima a zero foi caracterizada a maturidade

fisiológica da semente, que correspondeu aos estádios 4 das formações da camada preta e da linha de leite.

Em cincos anos consecutivos, entre 1985 e 1989, e em duas localidades nos Estados Unidos Tekrony e Hunter (1995) demonstraram, por meio dos resultados dos testes de frio e de condutividade elétrica, que o máximo de acúmulo de matéria seca, o aparecimento da camada preta e o estádio quatro da linha de leite, estão relacionados com a máxima germinação e o vigor, tanto para os híbridos simples, como para os duplos e os triplos.

Egli e Tekrony (1997) conduziram mais pesquisas, com sementes de nove espécies e em diferentes condições ambientais, e descobriram que a qualidade máxima em função do parâmetro fisiológico pode ocorrer antes do ponto de maturidade. Para as sementes de milho esse ponto é diferente entre linhagens, híbridos simples e duplos. Sendo que para linhagens o máximo de vigor é durante o PM, no entanto para as sementes híbridas é antes, em média 5 dias para o híbrido simples e 10 dias para os híbridos duplos.

De acordo com Faria et al. (2002), sementes colhidas a partir do estádio três da linha de leite (LL-3) tinham qualidade fisiológica máxima. Os dados foram obtidos da avaliação da formação das sementes de quatro híbridos, no inverno de 2000, as colheitas foram realizadas nos quatro estádios da linha de leite. As sementes foram secas até atingirem 12% de água e após isso foram avaliadas pelos testes de germinação, de frio, de envelhecimento acelerado, de emergência da plântula e de condutividade elétrica.

Porém, em outra pesquisa, realizada no Estado de Minas Gerais, em que foram avaliados híbridos simples da empresa Syngenta, a melhor época para a colheita foi a determinada pela linha de leite no estádio quatro, conforme já haviam afirmado Hunter et al. (1991), Tekrony e Hunter (1995). As colheitas das espigas começaram aos 40 dias após a floração e foram avaliadas as seguintes características: formação da camada preta, desenvolvimento da linha de leite, conteúdo de água da semente e conteúdo de massa seca (JACOB et al., 2014).

Pelas informações anteriores, é evidente que os critérios propostos para avaliar a formação das sementes de milho são baseados em avaliações que têm variações e não são caracterizadas por processo bioquímico da semente. Dessa forma, o sal de tetrazólio poderá ser utilizado como um indicador bioquímico da maturidade fisiológica da semente.

É essencial destacar que em outras áreas da ciência, o sal de tetrazólio é utilizado para avaliar a viabilidade de células vegetais e animais e para acompanhar o desenvolvimento das células, em várias pesquisas das áreas de medicina e de microbiologia (ALUPEI et al., 2014; JUNILLON; FLANDROIS, 2014; WANG et al., 2014).

Na área de Tecnologia de Sementes esse sal já é utilizado em um teste para estimar a viabilidade das sementes. No entanto, não existem relatos de pesquisas na literatura, nacional e internacional, sobre a utilização desse sal para avaliar a formação das sementes.

O teste de tetrazólio é reconhecido mundialmente e utilizado como adequado para avaliar a viabilidade das sementes maduras (DELOUCHE et al., 1976; INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 2003; BRASIL, 2009)

O método para esse teste foi desenvolvido na Universidade de Hohenheim, na Alemanha, no começo dos anos 40, pelo professor Georg Lakon (COPELAND; McDONALD, 2001). Um dos primeiros trabalhos realizados por Lakon foi com as sementes de milho e de outros cereais Lakon (1940, 1942); no entanto, seu trabalho só foi conhecido na América após a II Guerra Mundial, quando foram entrevistados cientistas alemães (DELOUCHE et al., 1976).

Nos Estados Unidos o principal pesquisador sobre a utilização do teste de tetrazólio foi o Dr. Robert P. Moore, do Laboratório de Sementes da Universidade Estadual da Carolina do Norte. Entre 1943 e 1987 publicou 230 trabalhos sobre esse teste e editou o Manual do Teste de Tetrazólio (MOORE, 1985), publicado pela ISTA. Essa publicação contém informações sobre esse teste para sementes de mais de 650 espécies. Atualmente o manual para o teste de tetrazólio da ISTA tem informação para 687 espécies.

Para o teste de tetrazólio as sementes maduras são hidratadas e colocadas em uma solução incolor de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, cujo atividade do sal está relacionada à atividade de enzimas no interior das células vivas. Neste processo, os íons H^+, liberados durante a respiração dos tecidos vivos, são transferidos por um grupo de enzimas, particularmente, a desidrogenase do ácido málico, e interagem com o sal de tetrazólio, o qual é reduzido a um composto vermelho, estável e não difusível denominado de trifenil formazan. Como esta reação se processa no interior das células vivas e o composto não se difunde, há

nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não colorem (MOORE, 1985; BRASIL, 2009).

Nas sementes de milho o teste de tetrazólio é utilizado para determinar a viabilidade e o vigor da semente. As sementes maduras são previamente hidratadas e depois seccionadas longitudinalmente, a solução de tetrazólio é adicionada e depois as sementes são lavadas para avaliar a atividade celular das células do embrião Brasil (2009). Os demais tecidos da semente de milho, como o endosperma e o pericarpo, não têm atividade quando a semente está madura, por isso somente as células do embrião é que são avaliadas no teste de tetrazólio.

Nas sementes de milho existem células especializadas na região basal do endosperma que atuam no transporte dos açúcares solúveis das zonas terminais do floema, na região do pedicelo, para o endosperma e o embrião Bewley e Black (1994). Dessa maneira é possível utilizar o sal de tetrazólio para identificar essas células que se encontram na região basal do endosperma e, se estiverem ativas, significa que estão translocando fotoassimilados para a semente e reagirão com o sal de tetrazólio.

Outra maneira de determinar a maturidade da semente é a avaliação de proteínas relacionadas com a maturação. Estudos sobre a enzima malato desidrogenase em plantas de arroz determinaram que a atividade dessa enzima é intensa no feixe vascular dorsal, que liga a semente à planta, durante a maturação, até os 12 dias após a floração (DAF) e, em seguida, reduz gradativamente (YU et al., 2014). A atividade da desidrogenase no feixe vascular cessa imediatamente quando termina a formação da semente, o que demonstra que a formação está diretamente relacionada com a atividade do feixe vascular (GU et al., 2000; YU et al., 2014).

Outra enzima utilizada como parâmetro é a catalase (CAT), que tem como função impedir a oxidação das células e tem sua síntese acentuada nas fases finais da maturação. Dessa forma, Santos et al. (2014) correlacionaram a presença de CAT com um aprimoramento na qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arábica L..*

Nakada et al. (2011) observaram durante a maturação da semente de *Cucumis sativus* um incremento na atividade da CAT nas fases finais da maturação, o que correlacionaram com a rápida desidratação que as sementes passam nesse período e que gera um estresse e produz radicais livres.

A atividade da CAT foi evidenciada no trabalho com sementes de milho doce de Cao et al. (2010) uma vez que houve aumento da atividade enzimática até os 34 DAF. Este trabalho tinha como objetivo identificar a atuação da poliaminas na aquisição da tolerância aos estresses abióticos e na qualidade de sementes. E mostrou que a catalase tem função primordial nesse processo.

Nesse sentido Silva (2006) trabalhando com sementes de soja, colhidas com diferentes teores de água, evidenciou o acréscimo na atividade da CAT a qual atingiu o máximo quando a semente tinha tolerância à dessecação.

A partir do momento que o embrião tem tolerância à dessecação, ou seja, a semente já pode ser seca e que ao ser reidratada irá germinar. As enzimas responsáveis para proteger as células das espécies de oxigênio reativo (EOR) tem sua função aprimorada, como ficou esclarecido para a CAT anteriormente. Neste momento a enzima malato desidrogenase (MDH) apresenta uma redução na sua função, já que o metabolismo das células e, principalmente, das mitocôndrias é reduzido justamente para impedir a formação excessiva de EOR. Assim Wu et al. (2009) desenvolveram uma pesquisa para elucidar a fase de maturação em que as sementes têm tolerância à dessecação e descobriram que ocorre um ajuste no metabolismo para diminuir a respiração nas mitocôndrias e reduzir as EOR, e também mais atividade das enzimas antioxidantes.

Além dessas duas enzimas, existem inúmeras proteínas que atuam em diversos ciclos para permitir a funcionalidade e o pleno desenvolvimento dos tecidos meristemáticos e os tecidos de reserva. Por isso que é necessário conhecer o exato momento em que a semente chega a sua plena maturidade findando o ciclo de formação e entrando no estágio de quiescência e se preparando para germinar no momento oportuno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

A pesquisa foi desenvolvida em campo e em laboratório, no campus “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP, ESALQ), situado no município de Piracicaba, estado de São Paulo, entre as coordenadas geográficas 22°43’14’’ a 22º42’ 01’’ S e 47°38’46’’ a 47º36’49’’ W e altitude média de 546 m e clima Cwa (verão quente com estiagem no inverno).

3.1 Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos pelas épocas de colheita, totalizando 8 tratamentos, iniciando com a primeira colheita o aos 40 dias após o florescimento (DAF) e as demais, realizadas a cada 4 dias, referentes aos 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 DAF.

O florescimento das plantas foi determinado visualmente em campo e foi registrado quando mais de 50% das plantas apresentavam a emissão de polén no pendão.

3.2 Produção das Sementes em Campo

As sementes de milho utilizadas foram as de dois híbridos simples, um classificado como dentado e o outro como duro, produzidas na safra 2013/2014. Para a produção das sementes foram instaladas 6 parcelas em campo, correspondentes às repetições, com 4 linhas de 3,5 metros e espaçamento de 0,90m, com uma população final de 60.000 plantas ha^{-1}. Foram colhidas 20 espigas das duas linhas centrais, eliminando as bordaduras de 0,25m de cada lado da parcela. As semeaduras foram realizadas nos dias 03/10/2014 e 05/12/2014 e foram realizadas mecanicamente com a semeadora a disco Baldan PP Solo 4000 regulada para semear 5,67 $sementes.m^{-1}$ e distribuir 350 $kg.ha^{-1}$ de adubo 8-28-16. Foi realizada uma cobertura com uréia na dosagem de 150 $kg.ha^{-1}$, quando a cultura estava no estádio fenológico V3. Para o controle de plantas daninhas foi utilizado em pré-emergência o produto de marca comercial Primestra Gold® (atrazina+s-metolacloro) na dosagem de 3,85 $L.ha^{-1}$. Para o controle de *Spodoptera frugiperda* foram utilizados os seguintes inseticidas: Trinca caps® 30 $mL.ha^{-1}$, Lannate® 0,6 $mL.ha^{-1}$ e Ampligo® 150 $mL.ha^{-1.}$ E para o controle de pulgão foi utilizado o inseticida

Belt® 150 mL.ha^{-1}. A irrigação foi feita por aspersão de acordo com as necessidades da cultura.

3.3 Colheitas

A formação das sementes foi acompanhada por avaliações diárias dos estádios de desenvolvimento das plantas e das sementes nas espigas. O início da colheita foi a partir dos 40 dias do florescimento (DAF) e as sementes foram colhidas até os 68 DAF, em intervalos de quatro dias, de acordo com as indicações de Jacob et al. (2014). As colheitas foram manuais, bem como a despalha.

Imediatamente após a colheita foram avaliados:

3.3.1 Linha de Leite

A formação da linha de leite foi baseada em uma escala de 1 a 5 conforme propuseram Hunter et al. (1991), considerando como 1 o estádio em que o endosperma está inteiramente líquido e como os estádios 2, 3, 4 e 5 os correspondentes a 25%, 50%, 75% e 100% de endosperma endurecido, respectivamente. Foram coletadas cinco espigas por parcela, nas duas linhas centrais, dessas espigas foram avaliadas seis sementes da parte mediana, Figura 1. A avaliação foi feita visualmente atribuindo valores de acordo com a escala proposta. Posteriormente foi feita a média com os valores atribuídos para cada semente compondo a média da parcela.

Figura 1 – Sementes de milho híbrido P4285, colhidas aos 52 DAF de cinco espigas; cada linha, posição horizontal, corresponde às sementes de uma espiga, coletadas da região mediana da espiga. As 3 primeiras linhas encontram-se no estádio 3 da linha de leite e as duas últimas no estádio 4

3.3.2 Camada Preta

A avaliação da formação da camada preta foi visual, utilizando as mesmas espigas da avaliação da linha de leite, foram examinadas seis sementes da região mediana de cada espiga e para caracterizar a camada preta foi considerada a escala proposta por Hunter et al. (1991) sendo:

Estádio 1 – não há pigmentação do endosperma basal ou do tecido adjacente à região pedicelo/placental; o tecido de reserva apresenta aparência translúcida.

Estádio 2 – a região entre o embrião e a placental/chalazal tem aparência translúcida, tornando-se marrom ou cinza-esverdeada, com zonas mais escuras adjacentes ao embrião ou à região pedicelo/placental.

Estádio 3 – o tecido entre a base do embrião e a região pedicelo/placental é menos espesso e escuro que no estádio 2, como resultado do colapso parcial e dessecação desse tecido. Essa camada se estende através do funículo e aparece como marrom-escura ou verde-oliva.

Estádio 4 – uma banda marrom-escura, geralmente com menos de 1mm de espessura, preenche toda a base da cariopse, entre a junção do endosperma basal e do tecido embrionário com o tecido pedicelo/placental.

Estádio 5 – o desenvolvimento da camada preta se completa; uma fina camada escura se estende por toda a base da cariopse.

Foi atribuído o valor correspondente a essa escala para cada semente e, dessa maneira, calculando a quantidade média de sementes que tinha formada a camada preta em cada parcela.

(a) (b) (c)

Figura 2 – Imagens de sementes de milho Dow 2B587 obtidas em diferentes épocas colheita demonstrando os estádios da camada preta, (a) estádio 3, (b) estádio 4 e (c) estádio 5

3.3.3 Avaliação das Sementes com o Sal de Tetrazólio

Foram avaliadas quatro repetições de 50 sementes para cada repetição por época de colheita, as sementes foram avaliadas logo após a colheita com teores de água a partir dos 41% até 26,6% para o híbrido P4285 e 40,4 até 20,2% para o híbrido Dow 2B587. As sementes foram seccionadas longitudinalmente e imersas em solução aquosa 0,075% de sal de tetrazólio, durante 2 horas a 40ºC Chamma e Novembre (2007), Brasil (2009). Após esse período as sementes foram avaliadas quanto à viabilidade Brasil (2009) e quanto à coloração da região do pedicelo, da chalaza, e da região basal do endosperma, Figura 3, região em que há as células de transferência de fotoassimilados da planta mãe para a semente. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes que tinham atividade celular, identificada pelo sal de tetrazólio, na região basal da semente, que foram caracterizadas com sementes com o endosperma vivo (SEV).

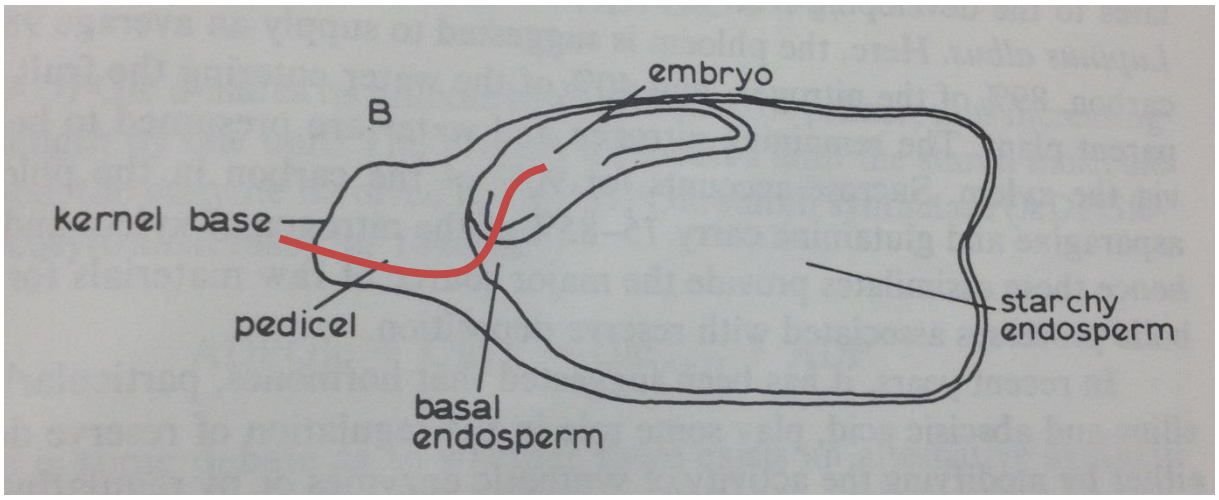

Figura 3 – Secção longitudinal de uma semente de milho em desenvolvimento, com destaque para as regiões. Demonstrando o sistema de transporte a curta distância de solutos do pedicelo (tecido materno onde é o fim do floema) até a base do endosperma. Adaptado de Bewley e Black (1994)

3.3.4 Análise de Enzimas

A técnica utilizada foi a eletroforese em gel não desnaturante (PAGE 12%). No momento de cada colheita foi coletada uma espiga por parcela e da parte mediana da espiga foram retiradas 10 sementes que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 ºC até até a análise ou até o preparo para a análise. As amostras foram maceradas em recipiente de porcelana contendo nitrogênio líquido e, posteriormente, foi adicionado o tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5), contendo 1mM de ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) e 3mM de DL-Ditiotreitol (DTT) na proporção 3:1 (volume do tampão/peso fresco) para a extração das proteínas. Após esta etapa, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi então retirado e armazenado em alíquotas, a -80ºC, até o momento das análises. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradfort (1976), utilizando o BSA (*bovine serum albumin*) como padrão, por espectofotometria a 595 nm.

Para a corrida eletroforética foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio Rad, o gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 65 mm e largura de 73 mm. Para a confecção de um mini gel foram utilizados 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida, 2,5 mL de tampão TRIS 3M (hidroximetil-aminonetano) (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio. Após a polimerização desse gel de resolução, foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida (40%), 1,25 mL de solução tampão TRIS 500 mM (pH 6,7) e 2,75 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio. Em cada faixa do gel foram aplicadas quantidades iguais de proteínas (40 µg de proteínas). A eletroforese foi realizada a 5ºC em corrente constante de 20 mA . placa^{-1}. O tampão de corrida foi o TRIS 25 mM (pH 8,3) acrescido de 192 mM de glicina – 5x concentrado, sendo diluído para 1x. A revelação para os sistemas isoenzimáticos MDH e CAT foi conduzida segundo metodologia de Alfenas (2006). As imagens com os resultados foram obtidas através do Image Scanner – Amersham Bioscience.

3.3.5 Teor de Água

Foi determinado por meio do método de estufa a 105 ºC ± 3 ºC durante 24 horas de acordo com as Regras para Análise de Sementes, Brasil (2009), e os resultados expressos em porcentagem de água em relação a massa seca da semente.

3.3.6 Massa Seca da Semente

Foi determinada com as mesmas sementes utilizadas para determinação do grau de umidade. O peso final foi dividido pelo número de

sementes e os resultados foram expressos em massa por semente (JACOB et al., 2014).

3.4 Análises das Sementes Após a Colheita

As espigas colhidas foram despalhadas, secadas em estufa com circulação de ar forçada a 35ºC até atingirem 25% de água e, depois, a 41ºC até atingirem 12% de água; a seguir as sementes foram retiradas manualmente das espigas para a obtenção das sementes para as demais análises, conforme segue:

3.4.1 Teor de Água

Determinado conforme indicado anteriormente.

3.4.2 Teste de Germinação

Avaliação de quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram distribuídas em papel, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco; a seguir, foram mantidas em germinador com temperatura de 25ºC, com avaliações aos 4 e aos 7 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

3.4.3 Teste de Frio

Avaliação de quatro repetições de 50 sementes, que foram distribuídas em papel, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Posteriormente as sementes foram colocadas em uma caixa plástica e mantidas por sete dias em câmara fria a 10ºC. Ao final desse período, foram colocadas em germinador com temperatura de 25ºC e após 4 dias a germinação foi avaliada. O resultado foi expresso em quantidade de plântulas normais, indicada em porcentagem, conforme sugerido por Barros et al. (1999).

3.4.4 Teste de Condutividade Elétrica

Foram avaliadas quatro repetições de 50 sementes, previamente pesadas. As sementes foram colocadas em copos plásticos, com capacidade para 200 mL, e, em seguida, foram colocados 75 mL de água destilada. Após isso foram mantidas a 25ºC durante 24 horas. Decorrido esse período, foi determinada a condutividade elétrica da solução de hidratação das sementes, por meio de

condutivímetro. Os resultados foram expressos em µS.cm-1.g-1 (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

3.4.5 Comprimento da Plântula

Avaliação de cinco repetições de 20 sementes, que foram distribuídas em papel, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em germinador com temperatura constante de 25ºC. O comprimento da plântula foi determinado após 72 horas por meio do software Seed Vigor Imaging System (SVIS®). Os resultados foram expressos em centímetros e pelos índices calculados pelo software.

3.4.6 Teste de Envelhecimento Acelerado

Avaliação de quatro repetições de 50 sementes, que foram distribuídas, em uma camada uniforme, sobre uma tela de alumínio fixada no interior de uma caixa plástica (11cm x 11 cm x 3 cm) e no fundo dessa caixa foram colocados 40 mL de água, em seguida, foram transferidas para uma câmara regulada a 41°C, onde permaneceram por 72 horas. Após esse período, foi instalado o teste de germinação, conforme descrito, e a avaliação foi aos quatro dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.4.7 Emergência da Plântula

Avaliação de quatro repetições de 50 sementes, que foram distribuídas em uma camada de areia umedecida. A quantidade de água que foi utilizada para o umedecimento da areia correspondeu a 60% da sua capacidade de retenção. Para cobrir as sementes foi distribuída uma camada uniforme de areia de, aproximadamente, 1 cm. As caixas com areia onde foram semeadas as sementes foram mantidas em condições de ambiente de laboratório e as avaliações foram feitas aos quatro e aos sete dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas emersas, pois não foi avaliado o sistema radicular.

3.5 Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento de blocos aleatorizado. Para a análise de variância foram considerados os tratamentos e a comparação de médias pelo teste de Tukey (0,05), utilizando o software SAS®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semente do híbrido P4285, que tem o endosperma do tipo duro, apresentou 40,9% de água inicial aos quarenta dias após o florescimento (DAF), Tabela 1, e 26,6% aos 68 DAF, com redução de 34,9% na medida em que a semente se formou. A massa seca variou entre 254 mg e 320 mg um acréscimo de 26% em sua massa seca final, Figura 4. A quantidade de massa seca pode ser variável, porque está relacionada aos fatores genéticos de cada linhagem ou híbrido (EGLI; TEKRONY, 1997).

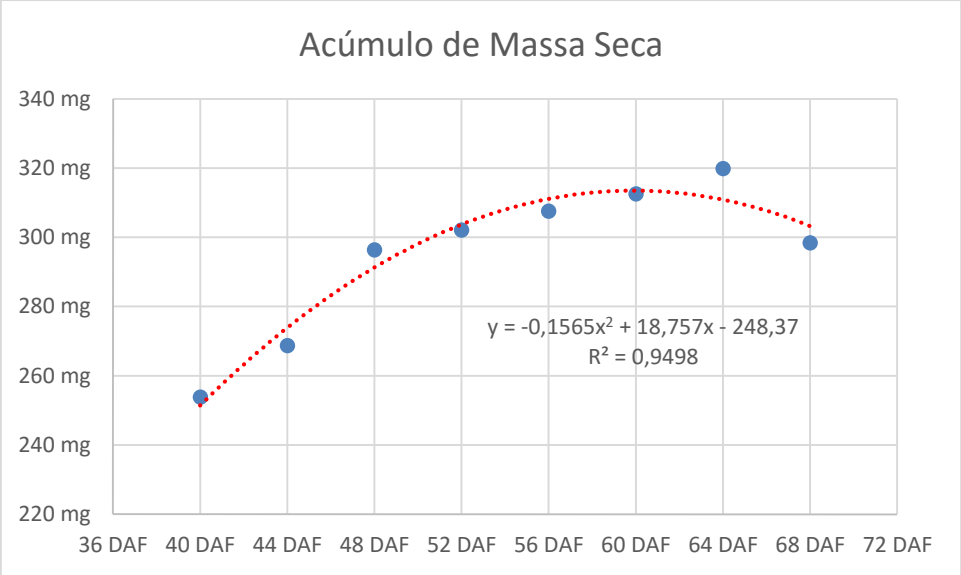

Figura 4 – Análise de regressão do acúmulo de massa seca de sementes do híbrido P4285, colhidas aos 40,44,48,52,56,60,64 e 68 DAF, respectivamente no eixo x

Durante as fases iniciais do desenvolvimento da semente ocorre a intensa divisão celular para formar os tecidos da semente e os tecidos de reserva acumulam nutrientes necessários para a germinação da semente (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). No caso da semente de milho um dos tecidos de reserva é o endosperma, no qual são armazenadas a amilopectina e a amilose que durante a germinação são degradadas pela enzima amilase, gerando energia em forma de ATP, desencadeando um longo processo para o estabelecimento da plântula (BEWLEY; BLACK, 1994; CASTRO; BRADFORT; HILHORST, 2004).

O teor de água se mantem elevado durante todo o desenvolvimento da semente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012) e, no caso das sementes ortodoxas, após terem sido formadas há a redução do teor de água e do metabolismo e há o

preparo para a fase do armazenamento. Para as sementes do híbrido P4285 a redução no teor de água foi de 34,9% durante o período dos 40 DAF aos 68 DAF.

Os resultados das avaliações do máximo acúmulo de massa seca, do teor de água e da linha de leite para as sementes do híbrido P4285 indicaram que o PM foi atingido aos 56 DAF. Neste momento o máximo de acúmulo de massa seca correspondeu a 308 mg.semente^{-1}, com um teor de água de 32,1% e a linha de leite se encontrava no estádio 4 com, aproximadamente, 75% do endosperma solidificado. Porém, esses indicadores não tiveram relação com a camada preta, em função da caracterização proposta por Hunter et al. (1991) que afirmaram que o PM corresponde ao estádio 4 da formação da camada preta, porém para as sementes do híbrido P4285 correspondeu ao estádio 5.

Tabela 1 – Sementes de milho, híbrido Pionner 4285: resultados do teor de água (TA), viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (TZ), teste de germinação das sementes úmidas (TGSU) e após a secagem (TGSS), emergência da plântula (EP), massa seca (MS), estádio da camada preta (CP), estádio da linha de leita (LL) e sementes com o endosperma vivo (SEV)

	TA	TZ		TGSU		TGSS		EP		SEV	MS		CP	LL
						%					mg			
40 DAF	41,0	96	a	0	a	99	a	98	a	100	254	f	1	1
44 DAF	39,3	97	a	1	b	99	a	99	a	100	269	e	2	2
48 DAF	36,7	99	a	14	c	98	a	100	a	98,17	296	d	3	3
52 DAF	34,8	99	a	17	c	100	a	99	a	79,33	302	c d	4	4
56 DAF	32,1	99	a	35	d	99	a	100	a	10,67	308	a b c	5	4
60 DAF	31,5	99	a	53	e	99	a	99	a	2,75	313	a b	5	5
64 DAF	29,1	99	a	73	f	99	a	98	a	0,08	320	a	5	5
68 DAF	26,6	99	a	88	g	98	a	99	a	0,00	298	d	5	5
CV %		0,85		4,21		0,72		1,04			3,27			

* Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não têm diferença estatística significativa (teste de Tukey $p \leq 0,05$)

Embora não tenha sido avaliada a comparação entre os resultados dos testes de germinação com as sementes úmidas e as secas, Tabela 1, é possível verificar que desde os 40 DAF a germinação das sementes avaliadas após a secagem foi praticamente 100%, independentemente do momento de colheita, demonstrando que as sementes já haviam adquirido a tolerância à dessecação. No entanto, as sementes avaliadas úmidas (TGSU) não germinaram até os 44 DAF e a partir desse período houve o aumento da germinação, que atingiu o máximo aos 68 DAF, mas a germinação foi inferior ao valor obtido com a germinação das sementes avaliadas secas.

A avaliação da viabilidade das células do endosperma, SEV, Tabela 1, utilizando o sal de tetrazólio, apresentou relação similar a dos resultados do teste de germinação das sementes úmidas, pois até os 44 DAF 100% das sementes tinha o endosperma vivo e aos 68 DAF nenhuma das sementes tinham o endosperma vivo.

Os resultados do teste de germinação das sementes úmidas relacionaram-se ao acúmulo de massa seca, uma vez que aos 40 DAF as sementes não germinaram e a quantidade de massa seca foi a menor, no entanto com o aumento progressivo da massa seca também houve o aumento da germinação das sementes úmidas.

Os resultados relacionados à viabilidade das sementes de milho, Tabela 1, determinada pelo sal de tetrazólio, foram compatíveis com os resultados do teste de germinação das sementes secas e da emergência da plântula.

Esses valores, provavelmente, estão relacionados à ação do ácido abiscísico (ABA) que suprime a germinação precoce durante a fase de pré-maturidade, quando a semente tem ainda mais de 35% de água, dependendo da espécie. Esse ácido atua diretamente na supressão da reversão do metabolismo e somente quando a semente está na fase de rápida desidratação é que o nível de ABA diminui (BEWLEY; BLACK, 1994; KERMODE, 1995).

Houve variação entre os resultados dos testes de vigor utilizados para caracterizar a qualidade das sementes do híbrido Pioneer 4285, nos diferentes momentos de colheita, Tabela 2. Os resultados das avaliações do comprimento da plântula e do índice calculado pelo software SVIS® foram estatisticamente superiores aos demais aos 56 DAF, que correspondeu ao PM. Porém, o resultado do teste de envelhecimento acelerado não coincidiu com estes resultados, pois o valor máximo da germinação das sementes foi atingido a partir dos 48 DAF, oito dias antes do PM. Por outro lado, os resultados do teste de frio não tiveram variação estatística significativa.

Tabela 2 – Sementes de milho Pioneer 4285: resultados dos testes de envelhecimento acelerado (EA) e de frio (F), comprimento da plântula (COP), índice de vigor (IV)

	EA	F	COP	IV
	(%)	(%)	(cm)	
40 DAF	94 b	99 a	5,96 c	670 c
44 DAF	94 b	99 a	7,45 b	784 b
48 DAF	98 a	99 a	6,06 c	680 c
52 DAF	96 a b	98 a	5,03 d	612 d
56 DAF	98 a	99 a	8,17 a	834 a
60 DAF	96 a b	98 a	5,70 c	665 c
64 DAF	98 a	99 a	6,08 c	678 c
68 DAF	99 a	98 a	2,89 e	465 e
CV %	1,80	2	17,51	8,35

* Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não têm diferença estatística significativa (teste de Tukey $p \leq 0,05$)

Jacob Junior et al. (2014) verificaram que houve variação no período do aparecimento da linha de leite no estádio 4 para as sementes de milho de três híbridos, dois deles apresentaram esse estádio aos 52 DAF e outro somente aos 60 DAF.

Em outro trabalho Faria et al. (2002) relataram um intervalo de 35,5 a 41,7% de água para o estádio 4 da linha de leite, quando 75% do endosperma está solidificado.

Para as sementes do híbrido P4285 o estádio 4 da linha de leite foi atingido aos 56 DAF com 32,1% de água e com o máximo de acúmulo de massa seca. A camada preta aos 56 DAF estava no estádio 5, diferente do relatado por Hunter et al. (1991) que considerou que no PM a camada preta corresponde ao estádio 4. Afirmaram ainda que em condições adversas como, por exemplo, a redução dos graus dias, há alteração do fluxo de metabólitos para a semente e assim modificar o período da formação da camada preta (AFUAKWA; CROOKSTON; JONES, 1984).

Utilizando o sal de tetrazólio, aos 56 DAF foi observado que 10,67% das sementes avaliadas possuíam atividade nas células da região da chalaza e das células de transferência do endosperma para o embrião. As sementes com atividade nas células da região da chalaza apresentaram uma tendência decrescente, iniciando com 100% aos 40 DAF, mantendo aos 44 DAF e reduziu abaixo de 50% somente aos 56 DAF e finalizou com números próximos a zero aos 60, 64 e 68 DAF, Figuras 5 e 6, e Tabela 1.

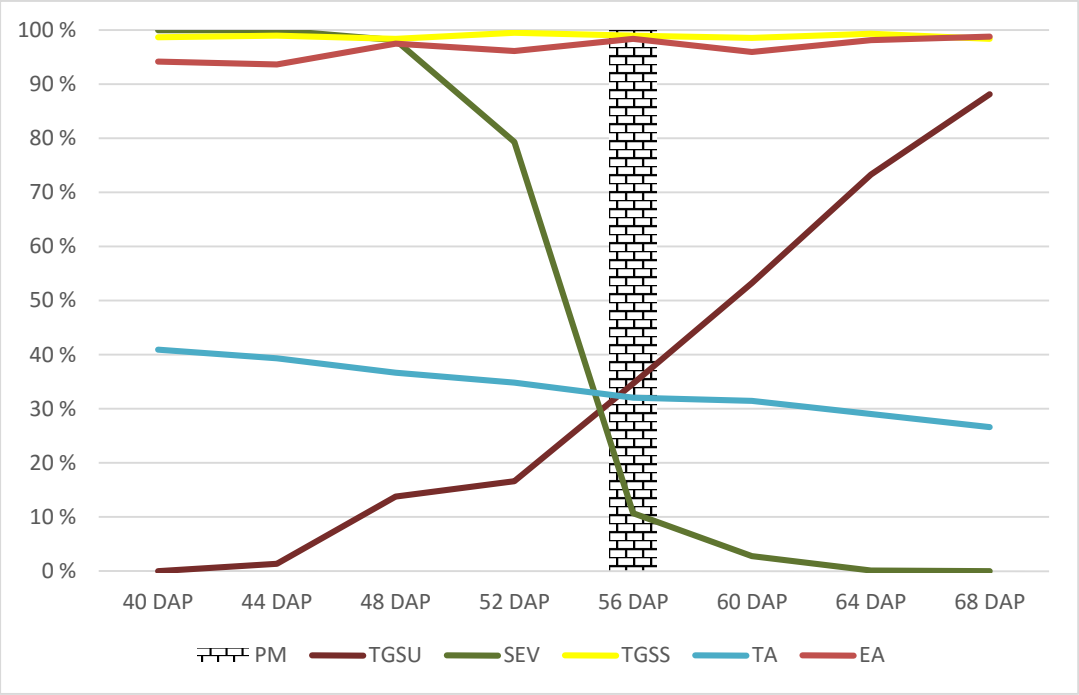

Figura 5 – Sementes de milho P4285 resultados de: teor de água (TA), teste de germinação com semente seca (TGSS), teste de germinação com semente úmida (TGSU), sementes com o endosperma vivo (SEV), ponto de maturidade (PM), envelhecimento acelerado (EA)

A morte celular programada, da região da chalaza e da região de transferência do endosperma para o embrião, representada pela avaliação da coloração do endosperma pelo sal de tetrazólio, Tabela 1 e Figura 6, relacionou-se com o acúmulo máximo da matéria seca e coincidiu com o estádio 4 da linha de leite e o estádio 5 da camada preta, houve também relação positiva desse resultado com os resultados do comprimento da plântula.

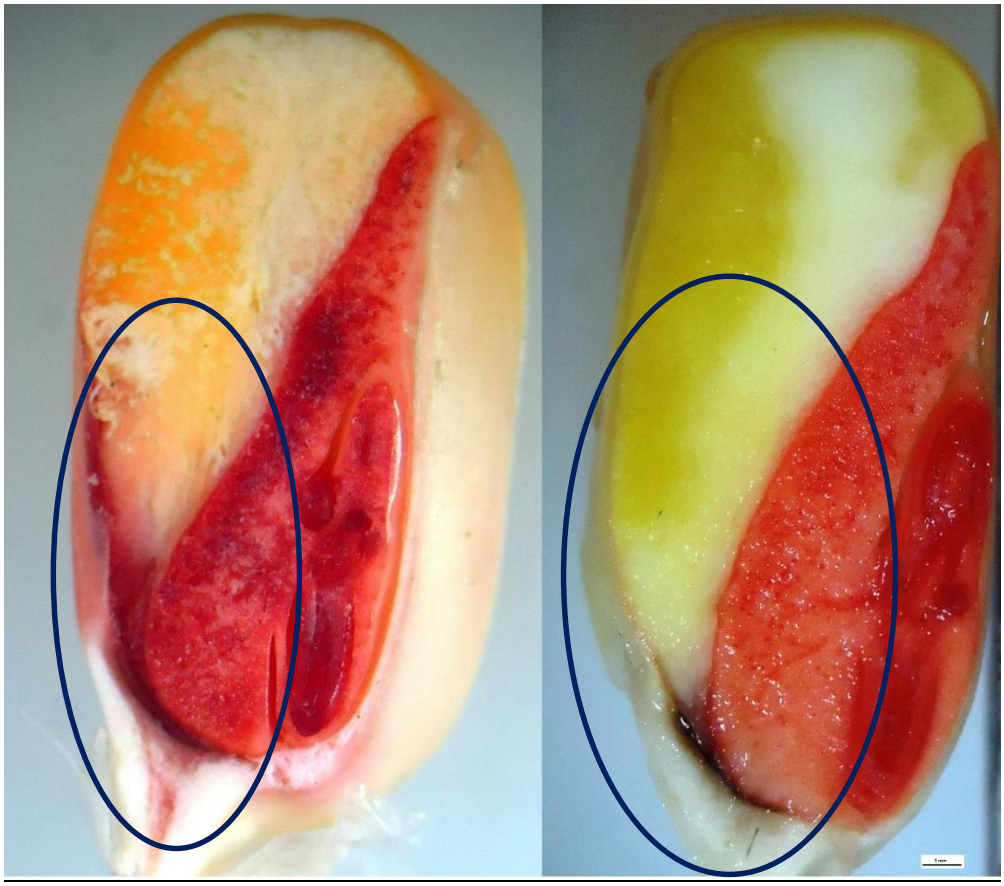

Figura 6 – Sementes de milho, hibrido P4285, à esquerda antes do PM e à direita no PM

A reação decorrente da ação do sal de tetrazólio com prótons de hidrogênio é a formação de um composto vermelho denominado trifenil formazan. Esses prótons de hidrogênio são produzidos quando a enzima malato desidrogenase (MDH) reduz o NAD^+ para NADH + H^+ e esses prótons de hidrogênio liberados reagem com o sal de tetrazólio, assim somente as células vivas que estão respirando apresentam a coloração específica dessa reação. Essa reação ocorre nas mitocôndrias, onde o ciclo de Krebs atua para produzir ATP através da respiração celular (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Dessa maneira, para verificar essa relação foi utilizada a técnica de eletroforese de enzimas para detectar a atividade da enzima MDH, Figura 7, e houve a possibilidade de determinar que aos 56 DAF, antes da semente de milho atingir a maturidade fisiológica havia mais atividade dessa enzima e após esse momento houve redução. Isso pode ser explicado devido ao avanço da formação da semente e na medida em que as sementes atingiam o PM as células da região da chalaza e as células de transferência do endosperma para o embrião param de atuar, pois não há mais a transferência de metabólitos da planta para a semente. Além de que após

a maturidade fisiológica o metabolismo celular do embrião é reduzido para que haja a conservação da semente.

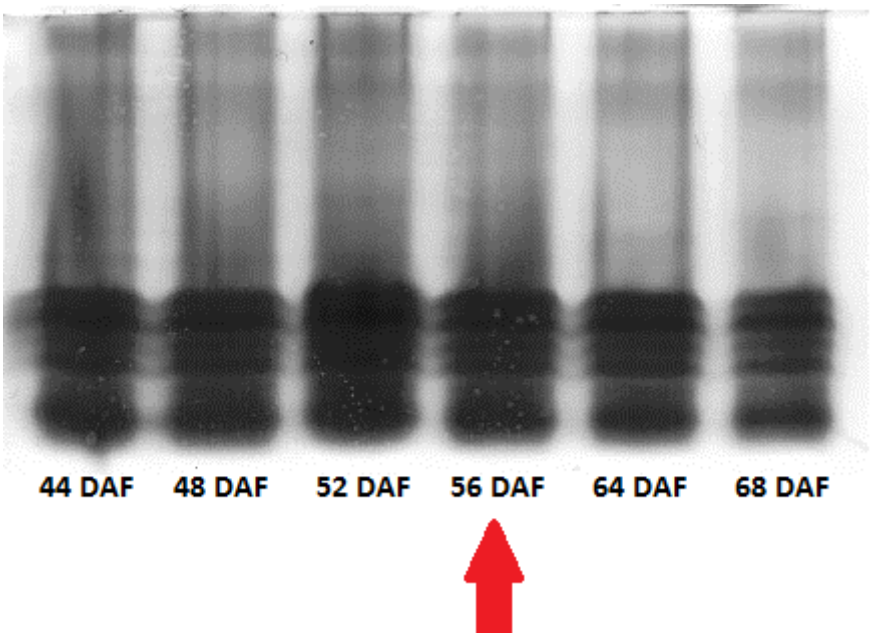

Figura 7 – Eletroforese da enzima malato desidrogenase (MDH) de sementes de milho do híbrido P4285, colhidas aos 44,48,52,56,64 e 68 DAF.

Ao atingir a maturidade fisiológica, a semente reduz o metabolismo para evitar a deterioração precoce dos tecidos devida à oxidação causada pelas espécies de oxigênio reativo (EOR) Castro, Bradfort e Hilhorst (2004), assim, havia a expectativa de que a atividade da MDH, que tem como sítio de ação o ciclo de Krebs, fosse reduzida, o que de fato ocorreu, como pode ser visualizado na Figura 7.

No caso da catalase (CAT) a análise de eletroforese, Figura 8, indicou atividade reduzida aos 44 DAF e o aumento gradativo aos 48,52,56,64 e 68 DAF em que as sementes de milho, híbrido P4285, foram colhidas. Essa alteração da quantidade da enzima catalase (CAT) já foi descrita por outros autores que pesquisaram sementes de outras espécies (LIU et al., 2011; NAKADA et al., 2011; PERALTA; SILVA; ACEVEDO, 2011).

A CAT atua como anti-oxidante complementando a ação da superoxidase dismutase (SOD), que capta o O_2^+ e transforma em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e na sequência a CAT transforma o H_2O_2 em H_2O+O_2, já que este composto é prejudicial às células vegetais. Portanto, há medida em que a semente se forma, esse complexo anti-oxidante atua de forma a impedir qualquer dano às organelas celulares.

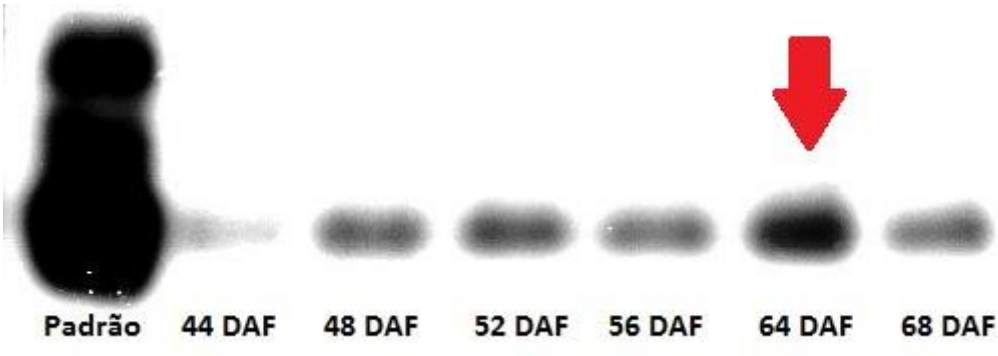

Figura 8 – Eletroforese de sementes de milho, do híbrido P4285, reveladas para a enzima catalase (CAT)

Os resultados obtidos para as sementes do híbrido Dow 2B587 foram similares aos das sementes do híbrido P4285, mas em alguns parâmetros houve diferença. A primeira colheita das sementes desse híbrido foi aos 40 DAF quando tinham 40,4% de água e aos 68 DAF tinham 20,2%, tabela 3, houve redução de 50% no grau de umidade, o que é esperado durante a formação da semente, uma intensa desidratação da semente para reduzir o teor de água para 10 a 20% no caso das sementes de milho Carvalho e Nakagawa (2012), reduzindo a atividade metabólica dos tecidos.

A massa seca, Figura 9, apresentou um acréscimo 16,57% devido ao intenso acúmulo de reservas, principalmente no endosperma, que ocorre na fase final do processo de maturação. Essas reservas serão utilizadas posteriormente para a plântula se desenvolver.

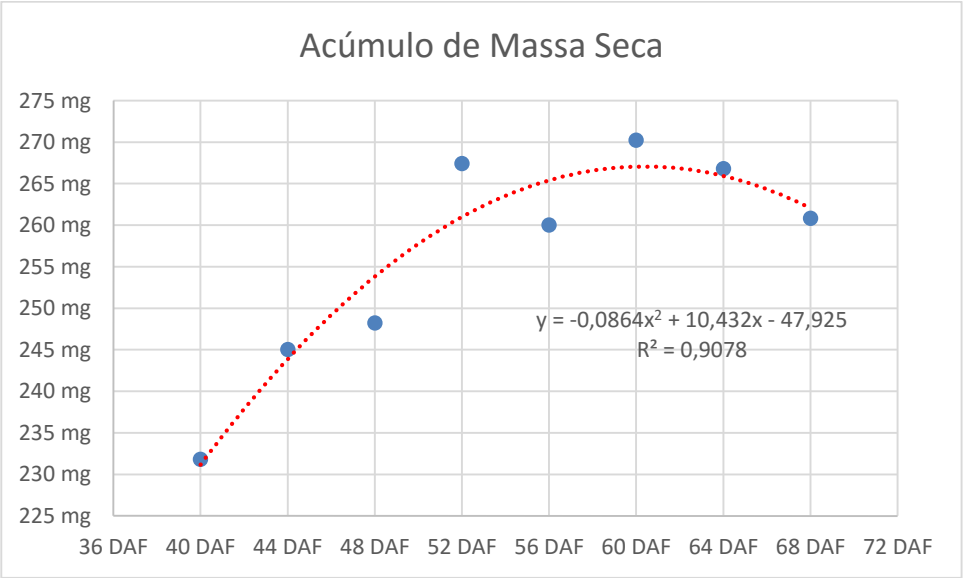

Figura 9 – Análise de regressão do acúmulo de massa seca de sementes do híbrido Dow 2B587, colhidas aos 40,44,48,52,56,60,64 e 68 DAF, respectivamente no eixo x

O resultado do teste de germinação com as sementes secas (TGSS), Tabela 3, evidenciou que houve redução significativa aos 68 DAF. Esse dado comprova que as sementes a partir do PM estão formadas e se forem mantidas em campo, especialmente em condições adversas, haverá redução da qualidade do parâmetro fisiológico.

O resultado de emergência da plântula foi similar aos resultados do teste de germinação de sementes secas, com a redução na germinação nas últimas avaliações. Porém o teste realizado com o sal de tetrazólio demonstrou que havia uma quantidade maior de sementes viáveis, mas essas sementes posteriormente não germinaram. Este fato pode estar relacionado com a incidência de patógenos na semente. Para o híbrido Dow 2B587 no final do seu ciclo no campo foi registrado, por meio visual, incidência do fungo *Giberela zeae* que causa *a* podridão da espiga*,* o que foi confirmado nos testes de germinação, em função da presença de micélios do fungo, que causou aumento da quantidade de sementes mortas.

A germinação das sementes úmidas (TGSU) aos 40 DAF foi de 68% enquanto que a das sementes avaliadas secas (TGSS) foi de 98%. A semente já estava formada neste momento, porém o metabolismo ainda não tinha sido revertido Bewley e Black (1994). Somente aos 48 DAF os resultados da germinação das sementes avaliadas úmidas (TGSU) e das sementes avaliadas secas TGSS os resultados foram similares, demonstrando assim que o metabolismo foi revertido e a semente já tinha tolerância à dessecação.

Tabela 3 – Sementes de milho Dow 2B587: resultados do teor de água (TA), viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (TZ), teste de germinação com sementes secas (TGSS) e com as sementes úmidas (TGSU), emergência de plantas (EP), sementes com endosperma vivo (SEV), massa seca (MS), estádio da camada preta (CP) e estádio da linha de leite (LL)

	TA	TZ	TGSU	TGSS	EP	SEV	MS	CP	LL
			%				g		
40 DAF	40,4	99 a	68 b	98 a	98 a	100	11,59 d	3	3
44 DAF	38,3	99 a	72 b	99 a	98 a	96,7	12,25 c	4	3
48 DAF	35,2	99 a	90 a	98 a	95 a b	89,33	12,41 c	4	4
52 DAF	31,2	100 a	98 a	98 a	97 a	75,08	13,37 a b	4	5
56 DAF	29,6	99 a	98 a	98 a	97 a	19,58	13,00 b	5	5
60 DAF	28,6	100 a	97 a	91 a b	91 a b	4,25	13,51 a	5	5
64 DAF	23,8	99 a	95 a	92 a b	93 a b	0,08	13,34 a b	5	5
68 DAF	20,2	99 a	88 a	90 b	87 b	0,00	13,04 b	5	5
CV %		0,71	7,29	4,86	5,66		3,70		

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não têm diferença estatística significativa (teste de Tukey p ≤ 0,05)

Segundo os critérios determinados por Hunter et al*.,* (1991) que afirmaram que o PM é atingido com estádio 4 da linha de leite e da camada preta, as sementes do híbrido Dow 2B587 atingiram esses pontos aos 48 DAF. Nesse momento o teor de água era de 35,2% e o acúmulo de massa seca era de 91,6% em relação ao máximo encontrado, com um valor de 248 mg.semente^{-1}. Esses mesmos autores afirmaram que existe relação entre as formações da camada preta e da linha de leite e o máximo de acúmulo de massa seca, portanto provavelmente para as sementes desse híbrido o PM foi atingido entre os 48 e os 52 DAF quando a linha de leite e a camada preta estavam no estádio 4 e coincidiu com o máximo de acúmulo de massa seca.

Utilizando o sal de tetrazólio, de acordo com a semente e os métodos mencionados anteriormente, para identificar a atividade celular no transporte de metabólitos para o embrião, o PM foi identificado aos 56 DAF quando a quantidade de sementes com endosperma vivo (SEV) correspondeu a 19,58%. Indicando assim, que 80,42% das sementes avaliadas já não apresentavam mais células vivas na região basal da semente e no pedicelo, não reagindo com o sal de tetrazólio, o que possibilita concluir que já estavam formadas.

O resultado da avaliação da utilização do sal de tetrazólio não correspondeu com os dos parâmetros anteriores mencionados, tais como, a camada preta, a linha de leite e o máximo de acúmulo de massa seca, identificando o PM aproximadamente 6 dias após os outros parâmetros avaliados citados anteriormente.

Os resultados dos testes de envelhecimento acelerado e de frio, do comprimento da plântula e do índice de vigor atingiram os maiores valores antes do PM, especialmente os obtidos aos 40 DAF, Tabela 4, os resultados dos testes de envelhecimento acelerado e de frio foram similares demonstrando um decréscimo significativo da germinação das sementes na medida em que decorreu o tempo de colheita, os resultados do teste de envelhecimento acelerado foram estatisticamente inferiores aos 64 DAF e aos 68 DAF e os do teste de frio aos 68 DAF.

Tabela 4 – Sementes de milho Dow 2B587: resultados do envelhecimento acelerado (EA), teste de frio (F), comprimento de plântulas (COP) e índice de vigor (IV)

	EA (%)	F (%)	COP (cm)	IV
40 DAF	99 a	98 a	7,16 a	780 a
44 DAF	98 a	99 a	6,81 a	741 b
48 DAF	95 a b	98 a b	5,78 b	663 c
52 DAF	92 a b	89 a b	3,96 d	542 e
56 DAF	95 a b	91 a b	4,06 d	548 e
60 DAF	90 a b	90 a b	4,42 c d	577 d e
64 DAF	87 b	89 a b	4,79 c	605 d
68 DAF	85 b	86 b	5,69 b	675 c
CV %	6,09	5,41	12,86	7,39

* Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não têm diferença estatística significativa (teste de Tukey, p ≤ 0,05)

Para as sementes do híbrido Dow 2B587 o máximo da qualidade foi determinada 8 dias antes do PM aos 40 DAF para todos os testes utilizados. O efeito negativo da perda de qualidade ao longo do período avaliado entre os 40 DAF e os 68 DAF, é demonstrado na Figura 10, onde se observa que após o PM há a redução de todos os resultados da avaliação da qualidade das sementes.

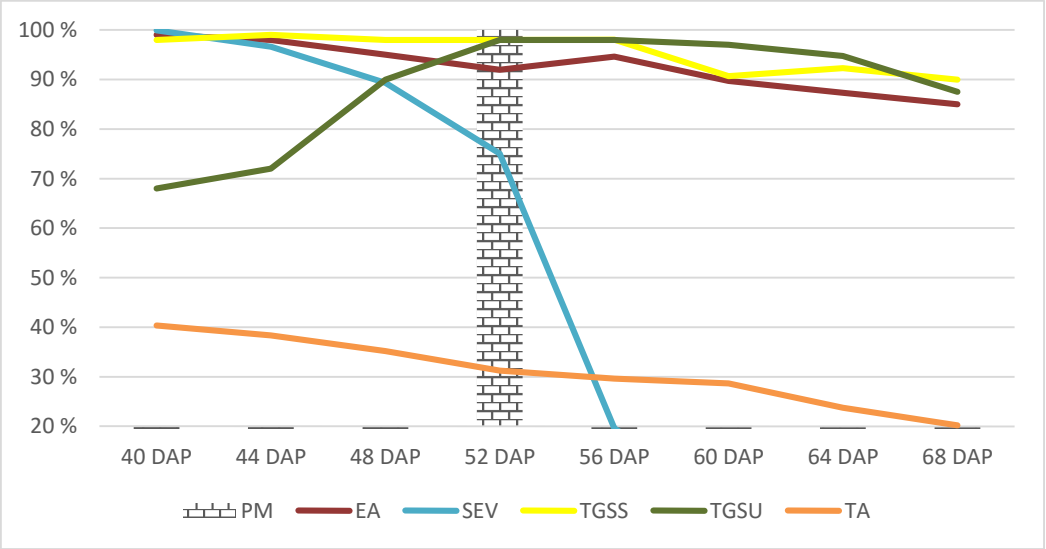

Figura 10 – Sementes de milho P4285 resultados: do teste de germinação com semente úmida (TGSU), teste de germinação com sementes secas (TGSS), teor de água (TA), ponto de maturidade (PM), sementes com o endosperma vivo (SEV), teste de envelhecimento acelerado (EA)

Os resultados das análises eletroforéticas das enzimas CAT e MDH para as sementes do híbrido Dow 2B587, tiveram os mesmos padrões apresentados para as sementes do híbrido P4285, com uma redução da atividade da MDH a partir do PM,

Figura 11, e o aumento da atividade da enzima CAT, inclusive com o aparecimento de uma isoenzima, demonstrando uma atividade acentuada do complexo anti-oxidante aos 64 DAF, Figura 12.

Para a enzima MDH é possível identificar a diminuição da intensidade da coloração das bandas enzimáticas a partir dos 52 DAF.

No entanto para a CAT o aumento esperado na atividade dessa enzima foi, justamente, aos 56 DAF, quando o sal de tetrazólio identificou a maturidade fisiológica das sementes.

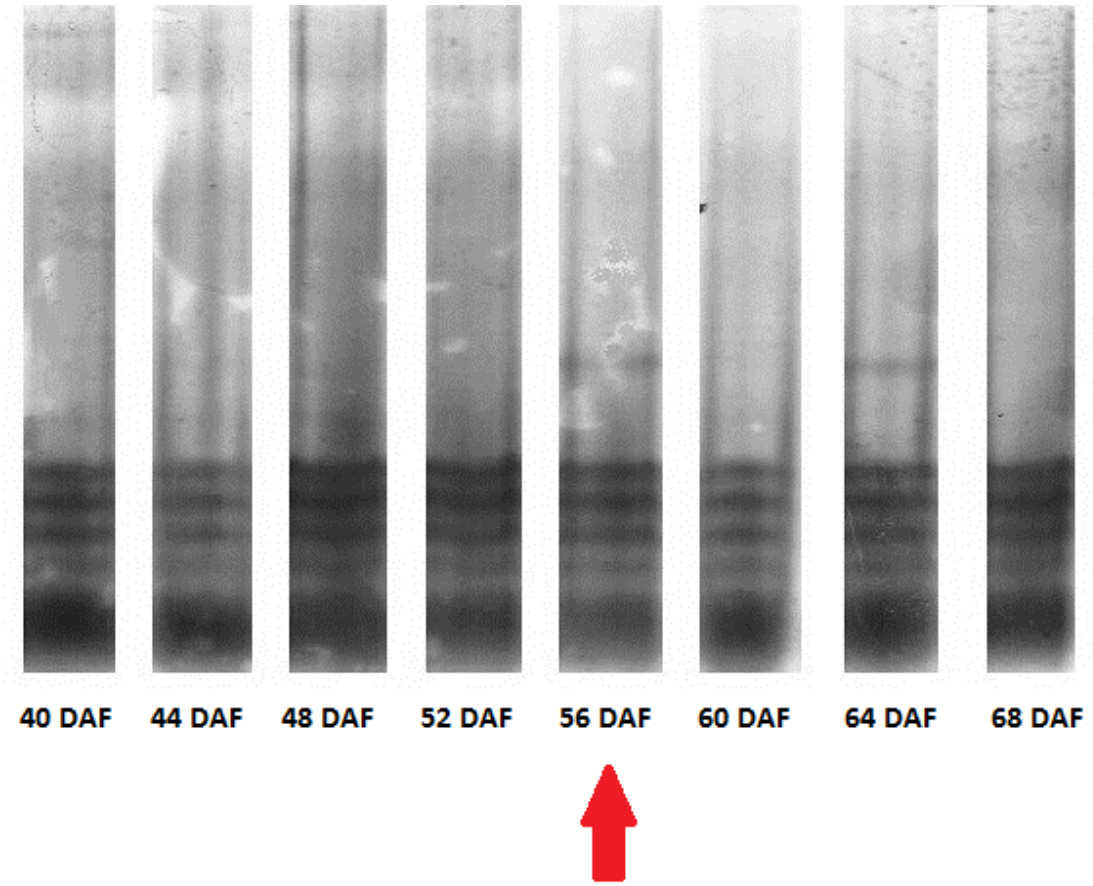

Figura 11 – Eletroforese da enzima MDH de sementes de milho do híbrido 2B587 colhidas aos 40,44,48,52,56,60,64 e 68 DAF

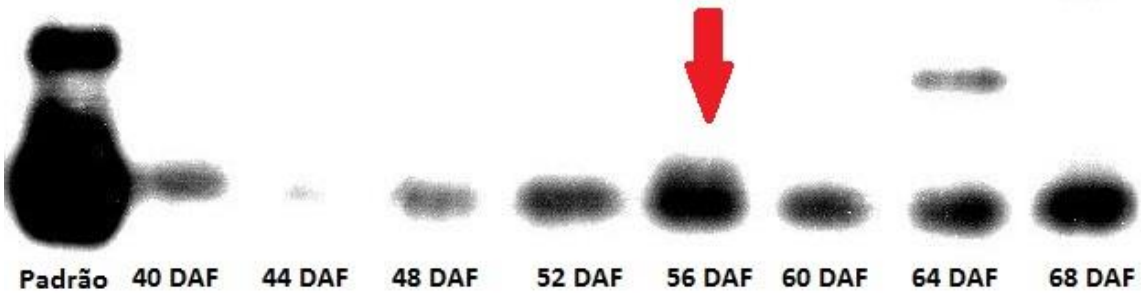

Figura 12 – Eletroforese da CAT de sementes de milho do híbrido 2B587, colhidas aos 40,44,48,52,56,58,60,64 e 68 DAF

Os parâmetros de linha de leite, camada preta e acúmulo de massa seca divergiram dos resultados da atividade do sal de tetrazólio e das análises da atividade das enzimas CAT e MDH. A linha de leite e a camada preta definiram o PM aos 48 DAF, o máximo de acúmulo de massa seca aconteceu aos 52 DAF, e o sal de tetrazólio e as enzimas CAT e MDH identificaram o PM aos 56 DAF. Essa variação entre os parâmetros para determinar o PM pode ser devida aos fatores genotípicos das plantas avaliadas e condições ambientais não controladas, o PM foi identificado no período entre 48 DAF e 56 DAF.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A semente do híbrido P4285 atingiu o PM aos 56 DAF quando 89,03% das sementes avaliadas pelo sal de tetrazólio não apresentavam atividade celular na região basal do endosperma e estavam no estádio 4 da linha de leite, estádio 5 da camada preta e com o máximo acúmulo de matéria seca.

Porém a formação da semente do híbrido Dow 2B587 teve resultados diferentes, atingindo o estádio 4 da linha de leite e da camada preta quatro dias antes ao máximo de acúmulo da massa seca da semente, sugerindo que o PM foi atingido entre os 48 e 52 DAF quando, provavelmente, todos os fatores convergiram no mesmo sentido. Mas o sal de tetrazólio identificou como PM as sementes colhidas aos 56 DAF quando 80,42% das sementes avaliadas não tinham atividade na região basal do endosperma. Dessa forma, a formação das sementes de milho pelos parâmetros utilizados corresponderam aos 48 DAF para a camada preta e a linha de leite, aos 52 DAF para o máximo de acúmulo de massa seca e aos 56 DAF para o sal de tetrazólio.

Essa diferença entre os dois híbridos pode ter um fundamento genético já que são híbridos derivados de germoplasmas diferentes e também de grupos de classificação do endosperma distintos. O híbrido P4285 tem o endosperma classificado como duro, enquanto que o híbrido Dow 2B587 semi-duro. As sementes do híbrido Dow 2B587 desenvolveram-se em menos tempo em relação às sementes do outro híbrido e a linha de leite se desenvolveu de forma mais rápida.

Mas para as sementes dos dois hibridos o máximo de vigor foi determinado antes do PM; para as sementes do híbrido P4285 o resultado do teste de envelhecimento acelerado (EA) atingiu o máximo 8 dias antes do PM, o do teste de frio 16 dias antes do PM e as avaliações do comprimento da plântula e do índice de vigor no momento do ponto de maturidade fisiológica. Esses dados confirmam que a qualidade máxima da semente é atingida próximo ao PM e que na medida em que a semente permanece no campo há possibilidade de redução da qualidade.

Os resultados dos testes de vigor relacionados às sementes do híbrido Dow 2B587 tiveram os maiores valores 8 dias antes do PM; após atingirem a maturidade fisiológica as sementes tiveram redução de qualidade.

A utilização do sal de tetrazólio por ser um teste bioquímico possibilita identificar o ponto de maturidade fisiológica independentemente das influências do

ambiente e do genótipo. As avaliações da camada preta e da linha de leite tiveram alterações em função da interação genótipo x ambiente, apresentando dados divergentes.

Tecnicamente é indicada a utilização do sal de tetrazólio para identificar o ponto de maturidade fisiológica de sementes de milho híbrido. As enzimas CAT e MDH comprovam esse resultado indicando para sementes de milho, dos dois cultivares, a mesma caracterização do PM obtida com a utilização do sal de tetrazólio. Portanto os testes bioquímicos são mais eficazes em determinar o PM que os testes práticos visuais, como a camada preta e a linha de leite.

6 CONCLUSÃO

É possível caracterizar o ponto de maturidade fisiológica da semente de milho, por meio da atividade do sal de tetrazólio; essa caracterização é confirmada pela expressão das enzimas CAT e MDH.

REFERÊNCIAS

AFUAKWA, J.J.; CROOKSTON, R.K. Using the kernel milk line to visually monitor grain maturity in maize. **Crop Science,** Madison, v. 24, n. 4, p. 687-691, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984SY30900015>. Acesso em: 21 jan. 2016

AFUAKWA, J.J.; CROOKSTON, R.K.; JONES, R.J. Effect of temperature and sucrose availability on kernel black layer development in maize. **Crop Science,** Madison, v. 24, n. 2, p. 285-288, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984SJ72400017>. Acesso em: 21 jan. 2016.

ALUPEI, M.C.; LICARETE, E.; CRISTIAN, F.B.; BANCIU, M. Cytotoxicity of lipophilic statins depends on their combined actions on HIF-1 alpha expression and redox status in B16.F10 melanoma cells. **Anti-Cancer Drugs,** London, v. 25, n. 4, p. 393-405, Apr. 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000332602500005>. Acesso em: 21 jan. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Milho Brasil 2014:** estatísticas. 2015. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/site/estatisticas/#>. Acesso em: 31 jul. 2015.

BARROS, A.S.D.R.; DIAS, M.C.L.L.; CICERO, S.M.; KRZYZANOWSKI, F.C. Testes de frio. In: KRZYZANOWSKI, F.C.;VIERIA, R.D. (Ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 5.1- 5.13.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds:** physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BORBA, C.S.; ANDRADE, R.V.; AZEVEDO, J.T.; OLIVEIRA, A.C. Maturidade Fisiológica de sementes do híbrido simples BR 201 de milho (*Zea mays L.*). **Revista Brasileira de Sementes,** Londrina, v. 16, n. 1, p. 63-67, 1994.

BORRAS, L.; ZINSELMEIER, C.; LYNN, M.; WESTGATE, M.E.; MUSZYNSKI, M.G. Characterization of grain-filling patterns in diverse maize germplasm. **Crop Science,** Madison, v. 49, n. 3, p. 999-1009, May/June 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000266214500031>. Acesso em: 21 jan. 2016.

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

CAO, D.D.; HU, J.; ZHU, S.J.; HU, W.M.; KNAPP, A. Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of sh(2) sweet corn (*Zea mays* L.) seed. **Scientia Horticulturae,** London, v. 123, n. 3, p. 301-307, Jan. 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000273927500003>. Acesso em: 21 jan. 2016.

CARTER, M.W.; PONELEIT, C.G. Black layer maturity and filling period variation among inbred lines of corn (*Zea mays* L.). **Crop Science,** Madison, v. 13, n. 4, p. 436-439, 1973. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1973Q533000014>. Acesso em: 21 jan. 2016.

CARVALHO, N.M.D.; NAKAGAWA, J. **Sementes:** ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CASTRO, D.R.; BRADFORT, K.J.; HILHORST, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A;G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação:** do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 3, p. 51-67.

CHAMMA, H.M.C.P.; NOVEMBRE, A.D.D.L.C. Teste de tetrazólio para as sementes de milho: períodos de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes,** Londrina, v. 29, p. 125-129, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222007000200017&nrm=iso>. Acesso em: 21 jan. 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Milho 1 e 2 safra:** séries históricas. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 31 jul. 2015.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M. **Principles of seed science and technology**. 4th ed. Boston: Springer US, 2001. 467 p.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; QUEIROZ, L.R. Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14. In: _____. **Milho:** cultivares para 2013/2014. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2013. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>. Acesso em: 24 ABR. 2014.

DAYNARD, T.B. Relationships among black layer formation, grain moisture percentage, and heat unit accumulation in corn. **Agronomy Journal,** Madison, v. 64, n. 6, p. 716-719, 1972. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1972O153900003>. Acesso em: 21 jan. 2016.

DAYNARD, T.B.; DUNCAN, W.G. Black layer and grain maturity in corn. **Crop Science,** Madison, v. 9, n. 4, p. 473-476, 1969. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1969E051300026>. Acesso em: 21 jan. 2016.

DELOUCHE, J.C. Seed maturation. In: _____. **Handbook of seed technology**. (Ed.) Mississippi: Mississippi State University, 1971. p.17-21.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARO, M. **O teste de tetrazólio para a viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.

DIAS, D.C.F. Maturação de sementes. **Seed News,** Pelotas, v. 5, n. 6, p. 5-7, 2001.

DURE, L.S. Seed formation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Athens, v. 26, p. 259-278, 1975. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1975AE28300013>. Acesso em: 21 jan. 2016.

EGLI, D.B.; TEKRONY, D.M. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. **Seed Science Research,** Cambridge, v. 7, n. 1, p. 3-11, Mar. 1997. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XC22000001>. Acesso em: 21 jan. 2016.

FARIA, M.A.V.D.R.; VON PINHO, R.G.; VON PINHO, E.V.R.; GUIMARÃES, R.M.; FREITAS, F.E.O. Qualidade fisiológica de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de “linha de leite”. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo,** Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2002. Disponível em: <http://rbms.cnpms.embrapa.br/index.php/ojs/article/view/14>. Acesso em: 21 jan. 2016.

GALAU, G.A.; JAKOBSEN, K.S.; HUGHES, D.W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum,** Malden, v. 81, n. 2, p. 280-288, Feb. 1991. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991EZ69900021>. Acesso em: 21 jan. 2016.

GU, Y.; XIONG, F.; WANG, Z.; CHEN, G.; LI, W. A contrast of the endosperm development between rice and wheat. **Nanjing Shida Xuebao,** Xangai, v. 24, n. 3, p. 65-74, 2000.

HUNTER, J.L.; TEKRONY, D.M.; MILES, D.F.; EGLI, D.B. Corn seed maturity indicators and their relationship to uptake of c-14 assimilate. **Crop Science,** Madison, v. 31, n. 5, p. 1309-1313, Sept./Oct. 1991. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991GH12300045>. Acesso em: 21 jan. 2016.

INGLE, J.; BEITZ, D.; HAGEMAN, R.H. Changes in composition during development and maturation of maize seeds. **Plant Physiology,** Rockville, v. 40, n. 5, p. 835-839, 1965. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19656843400011>. Acesso em: 21 jan. 2016.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **ISTA working sheets on tetrazolim testing**. Bassersdorf, 2003. 176 p.

JACOB, E.A.; MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; LABBE, L.M.B. Ideal seeds harvest moment of different maize hybrids. **Ciencia Rural,** Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 253-260, Feb. 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000332200400010>. Acesso em: 21 jan. 2016.

JUNILLON, T.; FLANDROIS, J.P. Diminution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride toxicity on Listeria monocytogenes growth by iron so urce addition to the culture medium. **Food Microbiology,** London, v. 38, p. 1-5, Apr. 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000328660400001>. Acesso em: 21 jan. 2016.

KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. chap. 11, p. 273-331.

KHAN, R.A.; LAUDE, H.M. Influence of heat stress during seed maturation on germinability of barley seed at harvest. **Crop Science,** Madison, v. 9, n. 1, p. 55-59, 1969. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1969C711400018>. Acesso em: 21 jan. 2016.

KLOZ, J.; TURKOVA, V.; KLOZOVA, E. Proteins found during maturation and germination of seeds of phaseolus vulgaris l. **Biologia Plantarum,** Praga, v. 8, n. 2, p. 164-173, 1966. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19667428500009>. Acesso em: 21 jan. 2016.

LAKON, G. **The topographical selenium method, a new method for the establishment of viability of cereal seed without a growth test**. Copenhagen: ISTA, 1940. 10 p.

_____. **Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte durch Tetrazoliumsalze**. Deutschen: Deutschen Botanischen Gesellschaft, 1942. 8 p.

LIU, J.B.; FU, Z.Y.; XIE, H.L.; HU, Y.M.; LIU, Z.H.; DUAN, L.J.; XU, S.Z.; TANG, J.H. Identification of QTLs for maize seed vigor at three stages of seed maturity using a RIL population. **Euphytica,** Amsterdam, v. 178, n. 1, p. 127-135, Mar. 2011. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000287456800010>. Acesso em: 21 jan. 2016.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. **Fisiologia da produção de milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 10 p.

MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium test**. Zurich: International Seed Testing Association, 1985. 99 p.

NAKADA, P.G.; OLIVEIRA, J.A.; MELO, L.C.; GOMES, L.A.A.; VON PINHO, E.V.R. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes,** Londrina, n. 1, p. 113-122, 2011. Disponível em: <Go to ISI>://SCIELO:S0101-31222011000100013>. Acesso em: 21 jan. 2016.

PERALTA, R.; SILVA, P.; ACEVEDO, E. Characterization of the weed seed bank in zero and conventional tillage in central chile. **Chilean Journal of Agricultural Research,** Chillán , v. 71, n. 1, p. 140-147, Jan./Mar. 2011. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000289003500017>. Acesso em: 21 jan. 2016.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: Agiplan, 1977. 289 p.

RENCH, W.E.; SHAW, R.H. Black layer development in corn. **Agronomy Journal,** Madison,v. 63, n. 2, p. 303-305, 1971. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1971I833600031>. Acesso em: 21 jan. 2016.

SANTOS, F.C.; CAIXETA, F.; CLEMENTE, A.C.S.; PINHO, E.V.; ROSA, S.D.V.F. Gene expression of antioxidant enzymes and coffee seed quality during pre- and post-physiological maturity. **Genetics and Molecular Research,** Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 10983-10993, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000350229200135>. Acesso em: 21 jan. 2016.

SHAW, R.H.; LOOMIS, W.E. Bases for the prediction of corn yields. **Plant Physiology,** Rockville, v. 25, n. 2, p. 225-244, 1950. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1950UJ36100003>. Acesso em: 21 jan. 2016.

SHAW, R.H.; THOM, H.C.S. On the phenology of field corn, silking to maturity. **Agronomy Journal,** Madison, v. 43, n. 11, p. 541-546, 1951. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1951UC64400004>. Acesso em: 21 jan. 2016.

SILVA, P.A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural, durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja**. 2006. 55 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SKARSAUN.S; YOUNGS, V.L.; GILLES, K.A. Changes in wheat lipids during seed maturation. **Cereal Chemistry,** St. Paul, v. 47, n. 5, p. 522-532, 1969. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1969D209700018>. Acesso em: 21 jan. 2016.

SUTTON, L.M.; STUCKER, R.E. Growing degree days to black layer compared to minnesota relative maturity rating of corn hybrids. **Crop Science,** Madison, v. 14, n. 3, p. 408-412, 1974. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1974T567100021>. Acesso em: 21 jan. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TEKRONY, D.M.; HUNTER, J.L. Effect of seed maturation and genotype on seed vigor in maize. **Crop Science,** Madison, v. 35, n. 3, p. 857-862, May/June 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QW74800035>. Acesso em: 21 jan. 2016

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p. 4.1-4.20.

WANG, Y.-H.; WU, J.Y.; CHOU, P.J.; CHEN, C.H.; WANG, C.Z.; HO, M.L.; CHANG, J.K.; YEH, M.L.; CHEN, C.H. Characterization and evaluation of the differentiation ability of human adipose-derived stem cells growing in scaffold-free suspension culture. **Cytotherapy,** New York, v. 16, n. 4, p. 485-495, Apr. 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000333438000007>. Acesso em: 21 jan. 2016.

WELLHAUSEN, E.J. **Razas de maíz en la América Central**. México: Secretaría de Agricultura y Ganadería, Oficina de Estudios Especiales, 1958. 138 p.

WU, J.H.; WANG, W.Q.; SONG, S.Q.; CHENG, H.Y. Reactive oxygen species scavenging enzymes and down-adjustment of metabolism level in mitochondria associated with desiccation-tolerance acquisition of maize embryo. **Journal of Integrative Plant Biology,** Amsterdam, v. 51, n. 7, p. 638-645, July 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000267426600002>. Acesso em: 21 jan. 2016.

WU, X.; GONG, F.; YANG, L.; HU, X.; TAI, F.; WANG, W. Proteomic analysis reveals differential accumulation of small heat shock proteins and late embryogenesis abundant proteins between ABA-deficient mutant vp5 seeds and wild-type Vp5 seeds in maize. **Frontiers in Plant Science,** Zhengzhou, v. 5, Jan. 2015. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000348032600001>. Acesso em: 21 jan. 2016????????.

YU, X.-R.; ZHOU, L.; XIONG, F.; WANG, Z. Structural and histochemical characterization of developing rice caryopsis. **Rice Science,** Yangzhou, v. 21, n. 3, p. 142-149, 2014.