

açúcares e tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho¹

SOLANGE CARVALHO BARRIOS ROVERI JOSÉ², ÉDILA VILELA RESENDE VON PINHO³, MARIA APARECIDA GOMES SOUZA DIAS⁴

RESUMO – Dentre outros mecanismos, a presença de determinados açúcares solúveis na semente parece estar envolvida na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação. Nesse trabalho foi pesquisado a composição de açúcares solúveis em sementes de milho híbrido com diferentes níveis de tolerância à alta temperatura de secagem, assim como a relação entre o conteúdo desses açúcares e a tolerância à dessecação. Foram utilizadas sementes de dez cultivares de milho híbrido que apresentavam efeito recíproco para a tolerância à alta temperatura de secagem. As sementes foram colhidas com teor de água de aproximadamente 35% e secadas a 45°C. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio do teste de germinação, teste frio sem solo e de envelhecimento acelerado. Os açúcares glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose foram extraídos dos embriões na presença de metanol e separados por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Foi observada variação na composição dos açúcares entre as sementes dos híbridos e as de seus recíprocos. Uma maior concentração de sacarose foi verificada nas sementes dos híbridos tolerantes à alta temperatura de secagem. Não foi possível estabelecer uma relação entre a sacarose e rafinose que pudesse servir de parâmetro para a tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. Maior tolerância das sementes foi associada com uma maior relação da sacarose, rafinose e estaquiose/glicose e frutose.

Termos para indexação: *Zea mays*, tolerância à dessecação, açúcares solúveis, qualidade fisiológica

SUGARS AND TOLERANCE TO HIGH DRYING TEMPERATURE IN CORN SEEDS

ABSTRACT – Among other mechanisms, the presence of certain soluble sugars in seed seems to be involved in the acquisition and maintenance of desiccation tolerance. In this study, the composition of soluble sugars in hybrid corn seeds with different levels of tolerance to high drying temperature as well as the relationship between the content of those sugars and desiccation tolerance was researched. Seeds of ten hybrid corn cultivars presenting reciprocal effect to the tolerance to high drying temperature were employed. The seeds were harvested with a water content of about 35% and dried at 45°C. The physiological quality of the seeds was evaluated by means of the germination test, cold test without soil and accelerated aging test. The sugars glucose, fructose, sucrose, raffinose and stachiose were extracted from the embryos in the presence of methanol and separated by means of the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. Variation in the presence of sugars among the hybrid seeds and those of their reciprocals was detected. A higher concentration of sucrose was verified in hybrid seeds tolerant to high drying temperature. It was not possible to establish a ratio between sucrose and raffinose which could serve as a parameter of the tolerance to high drying temperature in corn seeds. Increased tolerance of the seeds was associated with a greater ratio of sucrose, raffinose and stachiose/glucose and fructose.

Index terms: *Zea mays*, desiccation tolerance, soluble sugars, physiological quality

¹ Submetido em 23/04/2005. Aceito para publicação em 04/04/2006.

² Eng. Agrônoma, Dra., Depto. Agricultura - Setor Sementes - Universidade Federal de Lavras - UFLA, Caixa Postal 37, CEP: 37200-000, Lavras-MG. marsol@ufla.br;

³ Eng. Agrônoma, Dra., Professora do Departamento de Agricultura da UFLA. edila@ufla.br;

⁴ Laboratorista do Laboratório de Microbiologia do Depto. de Biologia – UFLA. magsdias@ufla.br.

INTRODUÇÃO

Apesar das vantagens que apresenta, a secagem artificial tem sido causa de danos nas sementes, com significativas reduções na sua qualidade fisiológica, principalmente quando as sementes são colhidas em espiga, com altos teores de água. A seleção de genótipos tolerantes a alta temperatura de secagem pode propiciar a redução no tempo de secagem com a adoção de temperaturas mais altas, o que proporciona maior eficiência nas diferentes etapas do processo.

Organismos tolerantes à dessecação, tais como sementes e pólen, são capazes de sobreviverem à remoção da maior parte de sua água celular, sendo também capazes de sobreviverem por longos períodos no estado seco (Buitink, 2000).

Vários mecanismos como a presença de açúcares solúveis, de enzimas que atuam contra o sistema de oxidação lipídica, anti-oxidantes e de proteínas específicas (Late embryogenesis abundant proteins – LEA proteínas) têm sido envolvidos na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação, conferindo proteção contra as conseqüências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação. Apesar de serem determinados geneticamente, a presença desses mecanismos pode ser intensificada ou reduzida de acordo com a taxa de secagem da semente ou com o meio ambiente no qual a semente se desenvolveu (Guimarães, 1999). Devido o fato da água afetar as condições da célula de muitas maneiras, os tecidos que sobrevivem à sua remoção têm uma combinação de estratégias para limitar os danos resultantes da desidratação. Em organismos que sobrevivem à remoção de água, seus constituintes celulares estão protegidos ou podem ser reparados (Walters et al., 2001).

Dentre os carboidratos solúveis presentes principalmente em tecidos vivos tais como embriões e cotilédones, incluem-se alguns monossacarídeos e dissacarídeos, principalmente a sacarose, e os oligossacarídeos, dentre eles, a rafinose, estaquiase ou verbascose (Kigel e Galili, 1995).

Na maioria das sementes ortodoxas, a sacarose, os oligossacarídeos da família rafinose e os monossacarídeos contribuem com 1 a 12% da matéria seca. Nas sementes ortodoxas maduras, o conteúdo de sacarose varia entre 15 a 90% dos carboidratos solúveis, sendo encontrado vestígio de monossacarídeos. O acúmulo de açúcares não reduzidos, tem sido envolvido na tolerância à dessecação. Tecidos tolerantes têm sido caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiase ou rafinose), e ausência ou reduzida quantidade de

monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, frutose e glicose (Chen e Burris, 1990; Leprince et al., 1992 e Kuo et al., 1998).

Quando as células estão hidratadas, suas membranas apresentam a bicamada lipídica num estado líquido cristalino em temperaturas biológicas. Com a secagem, a disposição dos fosfolípidos na membrana muda da configuração lamelar para uma configuração hexagonal, causando disfunção desta membrana (Guimarães, 1999). Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares, na medida que formam ligações de hidrogênio, repondo a água normalmente associada com as superfícies das membranas, mantendo assim o espaçamento dos grupos de lipídios, evitando a transição da fase líquida cristalina para a fase gel (Pammenter e Berjak, 1999). A sacarose pode ter a função de manter a estrutura da bicamada líquida cristalina da membrana, em níveis baixos de hidratação.

Outro mecanismo por meio do qual os açúcares podem agir para proteger as células durante a dessecação é a formação de um vidro intracelular. Uma nova abordagem tem sido introduzida para o entendimento dos efeitos do conteúdo de água e da temperatura sobre a longevidade do germoplasma, baseado na vitrificação ou na formação de “vidros” dentro do citoplasma (Burke, 1986). Vidro pode ser entendido como uma solução líquida, com propriedades de viscosidade de um sólido, que não forma cristais mesmo em temperaturas muito baixas e com estabilidade numa ampla faixa de temperatura (Koster, 1991). Em geral, sistemas biológicos tolerantes à dessecação têm a habilidade de formar vidros. Os oligossacarídeos contribuem para a estabilização de vidros intracelulares por aumentarem a temperatura de transição de vidro para líquido, bem como a sua viscosidade (Sun, 1997). A formação de vidro previne a desnaturação de moléculas e formação de agregados moleculares. Podem também ocupar espaços em tecidos, e durante a desidratação servem para evitar aumento excessivo do colapso nos tecidos, a concentração de solutos e alteração de pH. Por ser extremamente viscoso, o vidro deve paralisar todas as reações químicas que requerem difusão molecular, assegurando a estabilidade por muito tempo (Burke, 1986).

A composição de açúcares solúveis é importante no processo de formação de vidro. A sacarose é um açúcar importante para a formação de vidro, mas quando está concentrada em níveis correlacionados com a tolerância à dessecação, não é estável e tende a cristalizar, não formando vidro. (Kigel e Galili, 1995). A presença da rafinose, previne

esta cristalização, fornecendo uma melhor proteção comparada com a sacarose isoladamente. Caffrey et al. (1988), demonstraram que a relação de massa de 1:0,3, entre a sacarose e a rafinose, inibiu a cristalização, e que a lixiviação em vesículas artificiais, que continham sacarose e rafinose, foi menor quando comparada com a presença isolada da sacarose. Para Brenac et al. (1997), a tolerância à dessecação não foi observada na ausência de rafinose, mas nem sempre pequenas quantidades desse açúcar estava associada com o início da tolerância durante o desenvolvimento precoce de embrião de sementes de milho. A tolerância à dessecação foi associada com a proporção entre sacarose e rafinose menor que 20:1.

Eixos embrionários de milho tolerantes à dessecação que apresentaram 85% (peso/peso) de sacarose e 15% (peso/peso) de rafinose foram capazes de formar vidro à temperaturas acima de 0°C. Entretanto em mistura de 75% de glicose e 25% de sacarose, encontrada em eixos sensíveis à dessecação, somente houve formação de vidro à temperatura abaixo de 0°C (Koster, 1991). É importante salientar que o conteúdo de água no qual ocorre a formação de vidro durante a secagem de sementes a temperatura ambiente é muito mais baixo que o conteúdo crítico de água das espécies mais sensíveis à dessecação. Aparentemente os danos induzidos pela desidratação nessas sementes ocorrem num conteúdo de água bem acima daquele no qual a proteção do estado vítreo pode ser efetivo (Buitink, 2000).

Entretanto, a combinação de sacarose e rafinose ou algum outro açúcar parece não ser obrigatória. A sacarose parece contribuir com 97% dos carboidratos solúveis em algumas sementes tolerantes à dessecação. No entanto, nem todas as sementes ortodoxas acumulam altas concentrações de açúcares solúveis, podendo chegar somente a 1% do seu peso seco, abaixo de 10%, que é a proporção requerida, e a rafinose pode ser observada em quantidades muito baixas em vários grãos de cereais. Sendo assim, tem sido proposto que os oligossacarídeos são importantes para a tolerância à dessecação, não por proteger estruturas celulares, “per se”, mas por reduzir o “pool” de monossacarídeos (Kigel e Galili, 1995).

Embora a maioria dos caracteres dos organismos superiores seja controlado por genes nucleares, que segregam de acordo com o comportamento dos cromossomos na meiose, existe outro grupo de caracteres que é herdado graças aos genes ou produtos gênicos presentes no citoplasma, no qual o gameta feminino contribui com quase a totalidade do citoplasma para o descendente. Assim, para estudar este tipo de herança, deve-se verificar se existe diferença entre os

resultados de um cruzamento e de seu recíproco. Cruzamento recíproco é aquele em que o genitor é usado ora como fêmea, ora como macho; e se os resultados de um cruzamento e de seu recíproco forem idênticos, a herança do caráter em questão é controlada por genes nucleares. Caso contrário, o caráter é devido a efeitos citoplasmáticos, ou seja, os descendentes de cada cruzamento terão o mesmo fenótipo do genitor feminino (Ramalho et al., 1990). Em sementes de milho, diferenças na expressão fenotípica entre híbridos e recíprocos têm sido observados para várias características como peso seco do embrião e endosperma, taxa de crescimento do grão, proteína e óleo no embrião, síntese de zeína, germinação de sementes a baixa temperatura e tolerância a injúrias por secagem (Kollipara et al., 2002). Efeito recíproco também foi verificado para a tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho, por José (2003), que constatou diferenças na atividade da enzima α -amilase e na estrutura do pericarpo entre as semente híbridas e de seus respectivos recíprocos.

O objetivo desse trabalho foi pesquisar a relação entre o conteúdo de açúcares solúveis e a tolerância à alta temperatura de secagem e verificar se a composição desses açúcares é alterada entre as sementes de milho híbrido e seus respectivos recíprocos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram utilizadas sementes de híbridos simples e dos respectivos recíprocos provenientes de linhagens de milho cedidas pela empresa GeneSeeds – Recursos Genéticos em Milho Ltda. A colheita das espigas foi realizada quando as sementes atingiram aproximadamente 35% de teor de água. As espigas foram colhidas manualmente e em seguida submetidas à secagem artificial a 45°C até atingirem o conteúdo de água de aproximadamente 8%. Nessa secagem foram utilizados secadores experimentais de pequena escala, construídos de acordo com Navratil e Burris (1982) e o fluxo de ar utilizado foi de 23,0m³.min⁻¹.t⁻¹.

As sementes, retidas na peneira 16 de crivo circular, foram tratadas com os fungicidas Tecto 600® (60g do produto comercial/100Kg de sementes) e Captan® (150g do produto comercial/100Kg de sementes), e permaneceram em câmara fria e seca regulada a \pm 15°C e umidade relativa de 50% até o momento da avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

Foram selecionadas sementes provenientes dos cruzamentos 7/5, 9/6, 8/6, 3/8, 11/1, 4/8, 4/10, 1/7, 2/7, 1/9

e dos respectivos híbridos recíprocos. Em experimento anterior foi observado efeito recíproco significativo dessas combinações para a qualidade fisiológica das sementes submetidas à alta temperatura de secagem (José, 2003). A designação 7/5, por exemplo, significa que o parental masculino é a linhagem 7 e o feminino é a linhagem 5, e o seu recíproco, 5/7, apresenta pais invertidos.

O grau de umidade dos embriões foi realizado com duas repetições de cinco embriões para cada híbrido, que foram colocados em recipientes de alumínio com diâmetro de 4cm. Os embriões foram pesados e secos a 105°C, por 23 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem média de umidade. O peso seco dos embriões utilizados na análise de açúcares foi obtido a partir da determinação do grau de umidade.

O teste de germinação foi conduzido com cinquenta sementes para cada repetição, que foram semeadas entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5mL:1g de papel. As sementes permaneceram no germinador regulado para 25°C e as avaliações foram efetuadas aos 7 dias após a instalação do teste, segundo recomendações das Regras para análise de sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem média das quatro repetições.

O teste frio sem solo foi realizado com cinquenta sementes por repetição, distribuídas em papel toalha umedecido com água destilada numa proporção de três vezes o seu peso seco, perfazendo um total de duzentas sementes por tratamento. Os rolos foram confeccionados seguindo os mesmos padrões do teste de germinação e após semeadura foram colocados no interior de sacos plásticos e mantidos em câmara regulada a 10°C durante 7 dias. Decorrido este prazo, os rolos foram transferidos para o germinador regulado para 25°C. Nas avaliações, realizadas aos quatro e sete dias, foram consideradas plântulas normais as que apresentavam parte aérea com 2,5cm, duas raízes seminais e a raiz principal (Dias e Barros, 1995).

Para o teste de envelhecimento acelerado utilizou-se do método de mini câmaras do tipo “gerbox”, em que as sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior de cada caixa contendo 40mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas, numa temperatura de 41°C, e em seguida foi efetuado o teste de germinação (Marcos Filho, 1994). Foram consideradas plântulas normais aquelas que apresentavam 2,5cm de parte aérea, pelo menos duas raízes seminais e a raiz principal.

Para a extração dos açúcares solúveis, sementes de cada

híbrido foram embebidas em água destilada, por um período de cinco horas, para facilitar a retirada dos embriões. Cinco embriões, previamente pesados, foram macerados em mortar resfriado com nitrogênio líquido, na presença de areia fina lavada e de solução de metanol a 80%. A proporção utilizada foi de 175mg de embrião: 1,5mL de metanol. O conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio com capacidade de 12mL e incubado em banho-maria por 15 minutos à 70°C, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em deep freezer à - 86°C, até a realização das análises.

Antes das análises de açúcares, o excesso de água contido nas amostras foi evaporado com o auxílio de um compressor de ar, e posteriormente as amostras foram ressuspendidas em água destilada, na proporção de 175mg de embrião (peso original): 1,25mL. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C e o pellet descartado. As amostras foram diluídas seis vezes, coletando-se 250µL do sobrenadante acrescidos de 1250µL de água destilada e filtradas em membranas de 0,45mm. Os açúcares foram separados por meio da técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, marca Shimadzu). Três repetições de vinte microlitros de amostra foram injetadas manualmente e as condições cromatográficas para a separação dos açúcares foram:

Coluna: Zorbax (nº 840300-908) para análise de carboidratos, com diâmetro interno de 5mm e dimensões de 4,6mm x 250mm;

Fase móvel: acetronitrila/ água ultrapura 75/25 v/v. A fase móvel foi colocada num balão volumétrico adaptado a uma bomba de vácuo. Para a retirada do excesso de bolhas, esse balão permaneceu em banho ultrassônico, com a bomba de vácuo acionada por um período de trinta minutos.

Fluxo: 1,5mL.min⁻¹ (bomba LC- 10)

Detector: índice de refração

O sistema foi operado numa temperatura de 30°C, ajustada por meio do programa Class LC-10 da Shimadzu, onde foi definido o modo de operação do forno que continha a coluna. Os padrões externos de açúcares foram a glicose D (+), 99%; sacarose D (+) p.a.; frutose D (-) 98%; estaquiose tetrahidratada 98,5% e a rafinose D(+) pentahidratada 99%, todos da Marca Acros Organics. A curva padrão para os açúcares frutose, sacarose e estaquiose, confeccionada com 6 concentrações diferentes, apresentaram valores limites de 0 e 15mg.mL⁻¹. Para os demais açúcares esses limites foram 0 e 20mg.mL⁻¹. De posse da curva padrão, foi possível quantificar os açúcares contidos nas amostras. Os resultados foram expressos em mg de açúcar por g de embrião seco das três repetições.

Os testes realizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes seguiram o delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Sisvar (Sistema de Análise de Variâncias) para Windows (Ferreira, 2000) e a comparação das médias dos dados obtidos da análise de açúcares como da qualidade fisiológica das sementes foi feita pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a falta de sementes de alguns híbridos durante a produção de sementes, algumas análises para a avaliação da qualidade fisiológica não foram realizadas.

Os resultados da avaliação da qualidade fisiológica das sementes dos híbridos e seus respectivos recíprocos estão apresentados na Tabela 1. No teste frio, os valores foram mais baixos que os observados no teste de germinação, indicando uma maior sensibilidade do teste frio em detectar danos por secagem. Esses resultados concordam com os observados por Madden e Burris (1995), os quais verificaram

TABELA 1. Valores médios do teste de germinação (TG), teste frio (TF) e de envelhecimento acelerado (EA) de sementes híbridas de milho e seus recíprocos, secas artificialmente.

Híbridos e Recíprocos	TG (%)	TF (%)	EA (%)
11/1 ¹	60 b	41 d	50 c
1/11	0 e	0 f	0 f
8/3 ¹	90 a	82 a	76 b
3/8	1 e	1 f	1 f
1/9 ¹	97 a	66 b	90 a
9/1	- -	- -	7 f
6/9 ¹	95 a	57 c	56 c
9/6	40 c	22 e	14 e
4/8 ¹	96 a	93 a	87 a
8/4	59 b	26 e	20 e
7/5 ¹	90 a	86 a	87 a
5/7	68 b	13 f	31 d
4/10 ¹	92 a	51 c	78 b
10/4	45 c	3 f	0 f
6/8 ¹	82 a	72 b	73 b
8/6	13 d	8 f	4 f
7/1 ¹	92 a	78 a	50 c
1/7	40 c	23 e	5 f
7/2 ¹	86 a	67 b	51 c
2/7	33 c	11 f	5 f

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

- Tratamento não avaliado

¹ Híbridos tolerantes à alta temperatura de secagem

maior redução na viabilidade das sementes de milho híbrido secadas a 45°C, quando submetidas ao teste frio. Os danos provocados pelo envelhecimento acelerado também refletiu de forma mais acentuada sobre a taxa de crescimento da radícula e coleótilo quando comparados à porcentagem de germinação. Observa-se diferenças acentuadas nos valores de germinação e de vigor, avaliados pelo teste frio e envelhecimento acelerado, entre as sementes híbridas e seus recíprocos. Por meio dessas diferenças infere-se que o efeito materno está influenciando na qualidade fisiológica das sementes, uma vez que os genes presentes no núcleo são idênticos entre híbridos e nos respectivos recíprocos. Ibrahim e Quick (2001) verificaram que o efeito materno concorreu com 67% da variação recíproca para o controle genético para tolerância térmica em trigo. Em sementes de milho, diferenças na expressão fenotípica entre híbridos e recíprocos foram observadas para a tolerância a alta temperatura de secagem, evidenciando a importância da escolha do genitor feminino quando da obtenção de híbridos (José, 2004).

Com relação aos conteúdos de açúcares, a sacarose foi o mais abundante nas sementes (Tabela 2), como também observado por Caffrey et al. (1998), podendo contribuir até 97% dos carboidratos solúveis em algumas sementes tolerantes à dessecação (Kigel e Galili, 1995). Tem sido proposto que a sacarose tem a função de manter a estrutura da bicamada líquida cristalina da membrana, em níveis baixos de hidratação. Observa-se pela Tabela 2 que a sacarose estava presente em todos os híbridos estudados, mesmo naqueles considerados intolerantes, não sendo portanto, o único açúcar responsável pela tolerância à alta temperatura de secagem, como observado por Bochicchio et al. (1996). Entretanto, observa-se que a quantidade de sacarose foi mais elevada nas sementes tolerantes, exceção feita para o híbrido 9/6 e seu recíproco. Esses resultados reforçam a importância da sacarose na prevenção dos efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares. Brandão Jr. (2000), destacou que acréscimos no conteúdo de glicose e sacarose estão associados com a proteção de sementes de café contra danos por secagem e aquisição de tolerância à dessecação. Açúcares da família rafinose, incluindo a rafinose e estaquiase, bem como do monossacarídeo glicose estavam presentes em todas as sementes híbridas estudadas, com uma tendência da quantidade de monossacarídeos ser menor nas sementes tolerantes à alta temperatura de secagem. Rosa (2000) verificou a ausência de rafinose em sementes de milho colhidas com 37,2% de teor de água e sensíveis à temperatura de secagem de 50°C. Segundo Amuti e Pollard (1977), os monossacarídeos frutose e glicose desapareceram durante a

TABELA 2. Composição de açúcares solúveis de embriões de sementes híbridas de milho secadas artificialmente.

Híbridos	Glicose (mg/g) ²	Frutose (mg/g) ²	Sacarose (mg/g) ²	Rafinose (mg/g) ²	Estaquiose (mg/g) ²
11/1 ¹	1,84 d	0 f	90,91 c	22,86 b	10,51 a
1/11	9,45 c	0 f	85,25 c	5,25 d	6,30 a
8/3 ¹	4,54 d	0 f	108,59 b	18,18 c	5,65 a
3/8	7,83 d	0 f	52,74 d	4,75 d	5,90 a
1/9 ¹	2,00 d	0 f	120,00 b	21,87 b	7,00 a
9/1	7,81 d	1,24 f	94,25 c	28,64 b	9,18 a
6/9 ¹	2,86 d	3,61 f	125,34 b	6,67 d	8,57 a
9/6	43,58 a	27,71 a	152,94 a	51,65 a	10,09 a
4/8 ¹	2,73 d	2,61 f	90,60 c	9,31 d	7,82 a
8/4	6,39 d	3,54 f	74,58 d	21,70 b	7,88 a
7/5 ¹	6,19 d	4,90 e	78,60 c	33,04 b	8,52 a
5/7	10,57 c	6,21 e	66,45 d	24,16 b	2,94 b
4/10 ¹	16,60 b	22,75 b	127,83 b	52,60 a	8,97 a
10/4	13,68 b	16,74 c	72,23 d	33,66 b	3,26 b
6/8 ¹	7,58 d	5,41 e	95,35 c	26,40 b	8,39 a
8/6	4,48 d	3,52 f	63,15 d	16,11 c	6,93 a
7/1 ¹	5,63 d	0 f	115,38 b	27,20 b	7,35 a
1/7	16,85 b	11,36 d	66,94 d	26,78 b	2,07 b
7/2 ¹	5,41 d	1,30 f	79,48 c	4,65 d	4,97 b
2/7	9,57 c	8,71 d	57,42 d	26,78 b	1,85 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

¹ Híbridos tolerantes à alta temperatura de secagem

² Miligramas de açúcar por grama de peso seco de embrião

maturação de sementes de várias espécies e não foram detectados nas sementes secas. No entanto, observa-se na Tabela 2, que somente a frutose estava ausente nos híbridos 11/1, 1/11, 8/3, 3/8, 1/9 e 7/1.

A temperatura é um dos fatores que influencia na velocidade de secagem e segundo Corbineau et al. (2000), o processo de secagem induz mudanças no conteúdo de açúcares solúveis. Essas mudanças foram observadas por Rosa (2000) que constatou um decréscimo no conteúdo de glicose e acréscimo no de rafinose após pré-secagem a 35°C e posterior secagem a 50°C. O autor constatou que a tolerância à temperatura de 50C foi adquirida gradativamente, à medida que as sementes perderam água na pré-secagem a 35°C. Buitink (2000) investigando a composição de açúcares após “priming” em sementes de ervilha e nas propriedades intracelulares do “vidro” no citoplasma, não constatou a hipótese de que os oligossacarídeos estabilizam o vidro intracelular, pela diminuição da mobilidade molecular. Aparentemente outras moléculas além dos açúcares solúveis tem uma função importante na formação de vidro intracelular.

Sabe-se que a combinação de açúcares pode propiciar uma melhor proteção às células do que o açúcar isoladamente

(Koster e Leopold, 1988; Borowski et al, 1995; Greggains et al., 2000). A sacarose, quando concentrada, não é estável e tende a cristalizar, não formando “vidro”. A presença da rafinose previne essa cristalização e fornece melhor proteção às células que a sacarose sozinha (Kigel e Galili, 1995). Brenac et al. (1997) em estudos sobre o acúmulo da rafinose e sua relação com a tolerância à dessecação em sementes de milho, concluíram que a completa tolerância foi associada com uma razão sacarose: rafinose menor que 10:1. Para Chen e Burris (1990), a razão percentual da rafinose: sacarose maior do que 9%, parece ser importante na indução da tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho.

Na Tabela 3, observa-se que entre os híbridos tolerantes, apenas o 7/2 e 6/9 não apresentaram a relação rafinose/sacarose maior que 0,09 e sacarose/rafinose menor que 10. No entanto, sementes híbridas consideradas intolerantes também apresentaram essa relação, como verificado para as combinações 9/1, 9/6, 8/4, 5/7, 10/4, 8/6, 1/7 e 2/7. Uma combinação específica de sacarose e rafinose ou algum outro açúcar parece não ser obrigatória, como comentado por Kigel e Galili (1995). Esses resultados suportam a idéia de Koster e Leopold (1988), que comentam que a sacarose pode servir

TABELA 3. Relação dos açúcares rafinose (Ra)/Sacarose (Sa), Sacarose (Sa)/Rafinose (Ra), Sacarose (Sa) + Rafinose (Ra) + estaquiase (Est)/Glicose (Gl) + Frutose (Ft) e dos açúcares Sa + Ra + Est + Gl + Ft/Peso seco (Ps) mensurada em eixos de embriões de híbridos de milho secados artificialmente.

Híbridos	Ra/Sa ²	Sa/Ra ²	Sa + Ra + Est/ Gl + Ft ²	Sa + Ra + Est + Gl + Ft/ Ps ³ (%)
11/1 ¹	0,25	3,98	67,54	12,61
1/11	0,06	16,23	10,24	10,62
8/3 ¹	0,17	5,97	29,17	13,70
3/8	0,09	11,10	8,09	7,12
1/9 ¹	0,18	5,49	74,43	15,09
9/1	0,30	3,29	14,59	14,11
6/9 ¹	0,05	18,79	21,73	14,70
9/6	0,34	2,96	3,01	28,60
4/8 ¹	0,10	9,73	20,17	11,31
8/4	0,29	3,44	10,49	11,41
7/5 ¹	0,42	2,38	10,83	13,12
5/7	0,36	2,75	5,57	11,03
4/10 ¹	0,41	2,43	4,81	22,87
10/4	0,47	2,14	3,59	13,96
6/8 ¹	0,28	3,61	10,02	14,31
8/6	0,25	3,92	10,77	9,42
7/1 ¹	0,23	4,24	26,63	15,56
1/7	0,40	2,50	3,4	12,40
7/2 ¹	0,06	17,09	13,28	9,58
2/7	0,38	2,65	4,43	9,92

¹ Híbridos tolerantes à alta temperatura de secagem; ² mg/mg; ³ (ã dos açúcares em mg/g peso seco)/ 1000 x 100%

como o agente principal da tolerância à dessecação em sementes, com os oligossacarídeos servindo para prevenir a cristalização da sacarose. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação entre sacarose e rafinose que pudesse servir de parâmetro para a tolerância à secagem à alta temperatura.

Nem todas as sementes ortodoxas acumulam altas concentrações de carboidratos solúveis, podendo chegar a 1% do peso seco, abaixo de 10%, que é a proporção requerida. A rafinose é observada em quantidades muito baixas em vários grãos de cereais (Kigel e Galili, 1995). Nessa pesquisa foi observada a relação entre os açúcares solúveis analisados e o peso seco dos embriões tolerantes superior a 9% e nos materiais intolerantes essa relação foi menor, quando comparada com a de seus recíprocos tolerantes. Exceção feita para os híbridos 2/7, 8/4 e 9/6 comparados com os seus recíprocos. De uma forma geral essa relação variou muito entre os materiais. Em híbridos intolerantes por exemplo, foi observada proporção de açúcares solúveis/ peso seco maior que outros classificados como tolerantes, não existindo uma relação específica que possa servir de referência.

Outro aspecto a ser considerado é o conteúdo de água no qual ocorre a formação de vidro durante a secagem, que

poderia ter sido mais baixo que o conteúdo de água crítico nos híbridos intolerantes. Koster (1991) abordou que os danos induzidos pela desidratação de sementes de espécies mais sensíveis à dessecação ocorrem num conteúdo de água bem acima daquele no qual a proteção do estado vítreo pode ser feito. Sendo assim, a formação do “vidro” intracelular nas sementes intolerantes pode ter ocorrido após as mesmas já terem sofrido os danos de secagem à alta temperatura.

Observando os valores da composição de açúcares individualmente, não foi possível determinar um conteúdo ótimo que pudesse estar associada com a tolerância à alta temperatura de secagem. Comparando materiais tolerantes, os valores também variam muito. A sacarose parece ser importante na tolerância a alta temperatura de secagem, um vez que contribui sobremaneira na relação sacarose, rafinose, estaquiase/ glicose, frutose, nas sementes híbridas tolerantes, que foi sempre maior que seus híbridos recíprocos intolerantes. Exceção feita para a combinação 6/8 e seu recíproco, na qual foi constatada proporção de 10,02 e 10,77, respectivamente.

Considerando que a constituição do embrião não depende da linhagem utilizada como genitor, pode-se inferir que essas diferenças na proporção de açúcares, refletindo na tolerância à secagem depende também do endosperma, cuja contribuição

dos genitores é diferente. Lopes e Larkins (1993) observaram um aumento na quantidade de DNA do endosperma entre 10 a 20 dias após a polinização, passando de 3C até casos com 690C. Esta quantidade foi variável em função da linhagem avaliada. A razão do aumento na quantidade de DNA das células do endosperma não é bem conhecida. Uma das hipóteses seria que esse processo possibilitaria o armazenamento de nucleotídeos, visando atender a demanda das plântulas em desenvolvimento. Também essa amplificação poderia ser uma estratégia em aumentar os produtos resultantes da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de enzimas, promovendo, assim, aumento na produção de proteínas de reserva e carboidratos, com um reflexo direto, não só no vigor das sementes, como também, na produtividade de grãos por planta ou por área .

Na verdade, uma maior concentração de sacarose, rafinose e estaquiase parece conferir uma maior proteção aos embriões contra os danos de secagem à alta temperatura. Isso foi evidente entre as sementes híbridas tolerantes à alta temperatura de secagem. Altos níveis de monossacarídeos podem contribuir para as reações de “Maillard”, que são importantes em potenciais hídricos entre -15 e -150Mpa, onde existe pouco controle metabólico (Wettlaufer e Leopold, 1991). Um conteúdo mais baixo dos monossacarídeos resulta numa redução do substrato para a respiração, podendo impor uma quiescência metabólica, limitando a fonte de radicais livres, previamente à secagem.

Os açúcares não redutores são menos reativos e considerados componentes contra radicais livres (Kranmer e Grill, 1996). Sendo assim, tem sido proposto que os oligossacarídeos são importantes para a tolerância à dessecação, não por proteger estruturas celulares “per se”, mas por reduzir o pool de monossacarídeos. Durante os estágios avançados da maturidade de sementes ortodoxas, o nível de monossacarídeos é reduzido possibilitando a formação dos oligossacarídeos (Kigel e Galili, 1995). Isso parece ter sido importante para as diferenças de comportamento entre as sementes híbridas quanto à secagem à alta temperatura.

CONCLUSÕES

O conteúdo de açúcares solúveis varia entre as sementes de milho híbrido e seus respectivos recíprocos.

A maioria dos híbridos tolerantes à alta temperatura de secagem apresentam menores conteúdos dos monossacarídeos glicose e frutose. A sacarose é o açúcar mais abundante e sua quantidade é maior nas sementes tolerantes.

Uma maior tolerância à alta temperatura de secagem está associada com uma maior relação entre a sacarose, rafinose e estaquiase/glicose e frutose.

REFERÊNCIAS

- AMUTI, K.S.; POLLARD, C.J. Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. **Phytochemistry**, v.16, n.5, p.529-532, 1977.
- BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; MURELLI, C.; VAZZANA, C. Desiccation tolerance in immature embryos of maize: sucrose, raffinose and the ABA-sucrose relation. In: Fifth INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: BASIC AND APPLIED ASPECTS OF SEED BIOLOGY, 5., 1995, U.K. **Proceedings...** United Kingdom: University of Reading, 1996. p.13-22.
- BOROWSKI, A.M.; FRITZ, V.A.; WALTERS-JÚNIOR, L. Seed maturity and desiccation affect carbohydrate composition and leachate conductivity in *shrunk-2* sweet corn. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.7, p.1396-1399, 1995.
- BRANDÃO JR., D.S. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de caféiro**. 2000. 144f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M. DICKERMAN, A.M.; SMITH, M.E.; OBENDORF, R.L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed developing and maturation. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.150, n.4, p.481-488, 1997.
- BUITINK, J. **Biological Glasses: Nature's Way to Preserve Life**. 2000. 202f. Thesis. (Department of Plant Science, Laboratory of Plant Physiology). Wageningen Universiteit. 2000
- BURKE, M.J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: LEOPOLD, A.C., ed. **Membranes, Metabolism and Dry Organisms**. Ithaca, NY, Cornell University Press, 1986. p.358-363.
- CAFFREY, M.; FONSECA, V.; LEOPOLD, A.C. Lipid-sugar interactions: relevance to anhydrous biology. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, n.3, p.754-758, 1988.
- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, v.30, n.5, p.971-975, 1990.
- CORBINEAU, F.; PICARD, M. A.; FOUGEREUX, J. A.; CÔME, D. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v.10, n.3, p.329-339, 2000.
- DIAS, M.C.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 41p. (Circular, 88).
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para

- Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.255-258.
- GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Purative desiccation tolerance mechanisms in orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.10, n.3, p.317-327, 2000.
- GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1999. 132p. (Curso de Especialização Pós-Graduação "Lato Senso" por tutoria à distância).
- IBRAHIM, A.M.H.; QUICK, J.S. Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. **Crop Science**, Madison, v.41, n.5, p.1405-1407, 2001.
- JOSÉ, S.C.B.R. **Tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho**. 2003. 149f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853p.
- KOLLIPARA, K.P.; SAAB, I.N.; WYCH, R.D.; LAUER, M.J.; SINGLETARY, G.W. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation to tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, n.3, p.974-992, 2002.
- KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.1, p.302-304, 1991.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n.3, p.829-832, 1988.
- KRANNER, I.; GRILL, D. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. **Botanica Acta**, Stuttgart, v.109, n.1, p.8-14, 1996.
- KUO, T.M.; VANMIDDLESWORTH, J.F.; WOLF, W.F. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.36, n.1, p.32-36, 1998.
- LEPRINCE, O.; VAN DER WERF, A.; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiration pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, n.4, p.581-588, 1992.
- LOPES, M.A.; LARKINS, B.A. Endosperm origin, development, and function. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, n.10, p.1383-1399, 1993.
- MADDEN, R.F.; BURRIS, J.S. Respiration and mitochondrial characteristics of imbibing maize embryos damaged by high temperatures during desiccation. **Crop Science**, Madison, v.35, n.6, p.1661-1667, 1995.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.
- NAVRATIL, R.J.; BURRIS, J.S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v.74, n.1, p.159-161, 1982.
- PAMMENTER, N.M.; BERJAK, P. Uma revisão da fisiologia de sementes recalcitrantes em relação aos mecanismos de tolerância à dessecação. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.1, p.13-37, 1999.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo; Lavras: FAEPE, 1990. 359p.
- ROSA, S.D.V.F. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura**. 2000. 121f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- SUN, W.Q. Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at T-T_g and the plasticization effect of water on storage stability. **Annals Botany**, Oxford, v.79, p.291-297, 1997.
- WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.11, n.2, p.135-148, 2001.
- WETTLAUFER, S.H.; LEOPOLD, A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, n.1, p.165-169, 1991.

