

## PADRÕES ELETROFORÉTICOS DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE EM SEMENTES DE MILHO SUBMETIDAS A ALTA TEMPERATURA DE SECAGEM<sup>1</sup>

SOLANGE CARVALHO BARRIOS ROVERI JOSÉ<sup>2</sup>; ÉDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO<sup>2</sup>;  
RENZO GARCIA VON PINHO<sup>3</sup>; CÉSAR MARTORELI DA SILVEIRA<sup>2</sup>

**RESUMO** – Importantes mudanças fisiológicas e bioquímicas têm sido estudadas em sementes de milho submetidas a alta temperatura de secagem. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito da secagem a alta temperatura nos padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de linhagens, de híbridos simples e respectivos recíprocos. As sementes foram colhidas com teor de água de aproximadamente 35% e secadas a 45°C. A qualidade fisiológica das sementes de cada material foi avaliada pelo teste de germinação e a enzima  $\alpha$ -amilase foi extraída de sementes germinadas, em tampão Tris-HCl 0,2 M. Sementes das linhagens secadas à sombra foram utilizadas como testemunha. Os perfis isoenzimáticos para a  $\alpha$ -amilase revelaram uma maior intensidade de banda para as sementes das linhagens e de híbridos tolerantes a alta temperatura de secagem. Para as linhagens tolerantes a alta temperatura de secagem nenhuma diferença foi observada na atividade da enzima nas sementes secadas à sombra e artificialmente, o que já não ocorreu para as linhagens intolerantes, para as quais maior atividade foi verificada para as sementes secadas naturalmente. Foram observadas ainda diferenças na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes híbridas e nas dos seus respectivos recíprocos.

Termos para indexação: dessecação, germinação, isoenzima, *Zea mays* L.

## ELECTROPHORECTIC PATTERNS OF THE $\alpha$ -AMILASE ENZYME IN CORN SEEDS SUBMITTED TO HIGH DRYING TEMPERATURE.

**ABSTRACT** – Important physiological and biochemical changes in corn seeds submitted to high drying temperatures have been studied. The objective of this research was to evaluate the effect of high drying temperature on electrophoretic patterns of the  $\alpha$ -amylase enzyme in corn seed lines of simple hybrids and respective reciprocals. The seeds were harvest with approximately 35% water content and dried at 45°C. The physiological quality of seeds from each material was evaluated by the germination test and the  $\alpha$ -amylase enzyme was extracted from germinated seeds in Tris – HCl 0, 2 M buffer. Seeds of lines dried in the shade were utilized as control. The enzyme profiles of  $\alpha$ -amylase showed great band intensity for tolerance to high drying temperature lines and hybrids. For lines tolerant to high drying temperature there were hardly any differences in enzyme activity for shade-dried seeds or artificially dried seeds, unlike the intolerant lines, in which more activity was verified in naturally dried seeds. Hybrids seeds and respective reciprocal hybrids presented differences in the activity  $\alpha$ -amylase enzyme.

Index terms: drying, germination,  $\alpha$ -amylase, *Zea mays* L.

## INTRODUÇÃO

A susceptibilidade das sementes aos danos por secagem é função das condições de secagem, da qualidade e teor de água iniciais da semente, além dos aspectos genéticos (Navratil & Burris, 1984; Herter & Burris, 1989a; Chen & Burris, 1990 e 1991).

<sup>1</sup> Submetido em 13/09/2003. Aceito para publicação em: 19/03/2004; parte da Tese de Doutorado apresentada pela primeira autora à UFLA, em 2003; trabalho financiado pela CAPES.

<sup>2</sup> Setor Sementes/ Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras – UFLA. Caixa Postal 37, Lavras, MG. CEP: 372000-000. E-mails: <sup>2</sup> marsol@ufla.br; edila@ufla.br; <sup>5</sup> cmspirangi@hotmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Agricultura – UFLA. E-mail: renzo@ufla.br

A remoção de água das sementes pode causar alterações químicas, físicas e fisiológicas nas sementes, o que torna a secagem uma etapa crítica do processo de produção de sementes.

A causa primária do dano produzido por alta temperatura de secagem em tecidos vegetativos é a desintegração do sistema de membranas celulares, possivelmente por alterações nos lipídeos que as constituem. Altas temperaturas de secagem podem também diminuir a solubilidade e a capacidade de ligação das proteínas (Peplinski et al., 1994), causar injúria tanto na estrutura da mitocôndria, refletindo na taxa respiratória (Burris et al., 1997), como em outros sistemas subcelulares.

Sementes que toleram a dessecação dispõem de alguns mecanismos de proteção capazes de manter os sistemas de membranas das células, as estruturas das macromoléculas e as substâncias de reserva em condições de readquirir suas funções fisiológicas quando as sementes são reembebidas. O desenvolvimento desses mecanismos depende de características genéticas da espécie. A ausência ou inefetiva expressão de um ou mais desses mecanismos determinam o grau relativo de sensibilidade à dessecação (Pammenter & Berjak, 1999).

Em sementes de milho, importantes mudanças metabólicas e bioquímicas envolvidas na prevenção de injúrias causadas por alta temperatura de secagem têm sido estudadas, como a eficiência da taxa respiratória, a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase e a degradação de grãos de amido (Seyedin et al., 1984; Perdomo & Burris, 1998 e Rosa et al., 2000). Ehrenshaft & Brambl (1990), constataram que logo após a embebição das sementes, a absorção inicial de oxigênio pelos tecidos hidratados é geralmente atribuída à presença de um sistema enzimático mitocondrial nas sementes secas, que se tornam ativas quando hidratadas. Após completa a hidratação das sementes, a taxa respiratória parece depender de um contínuo desenvolvimento da mitocôndria, devido inicialmente à importação e organização de proteínas pré-existentes no citoplasma (Nakayama et al., 1980).

A  $\alpha$ -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em semente de milho. Usualmente não está presente nas sementes secas, sendo sintetizada e secretada pela camada de aleurona (Kigel & Galili, 1995). Durante o desenvolvimento da semente, a camada de aleurona serve para o estoque de reservas, enquanto que na germinação, constitui-se em uma fonte de enzimas para a mobilização das reservas (Fincher, 1989). As giberelinas estão envolvidas na regulação da mobilização das reservas, no entanto, para que a camada de aleurona se torne sensível ao hormônio  $GA_3$  e ative a síntese da  $\alpha$ -enzima, é preciso que a semente entre na fase de secagem pós-maturação ou seja submetida à secagem artificial, em estágios mais precoces do seu desenvolvimento (Armstrong et al., 1982). Não se

conhece, no entanto se a atividade da  $\alpha$ -amilase está associada a tolerância a alta temperatura de secagem.

O objetivo desta pesquisa foi estudar o efeito da alta temperatura de secagem na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de linhagens e híbridos de milho e verificar as possíveis conseqüências na qualidade fisiológica das mesmas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi instalado, em novembro de 1999, um campo de multiplicação das linhagens, provenientes da empresa Geneseeds – Recursos Genéticos em Milho Ltda. Na época de florescimento as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas, para evitar cruzamentos indesejáveis, e posteriormente foram realizadas as autofecundações. Durante o desenvolvimento das sementes, foi feito um acompanhamento da solidificação do endosperma por meio da linha de leite e as espigas foram amostradas para determinação do teor de água, utilizando-se o método da estufa a 130°C, por 4 horas, conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), até que o teor de água das mesmas atingisse aproximadamente 35%, momento este em que foi realizada a colheita.

Dez a quinze espigas, correspondentes a cada linhagem, foram colhidas e despalhadas manualmente e em seguida submetidas à secagem artificial a 45°C até as sementes atingirem o conteúdo de água de aproximadamente 11%. Para a secagem das espigas, foram utilizados secadores experimentais de pequena escala, construídos de acordo com Navratil & Burris (1982). As espigas foram debulhadas manualmente e as sementes, retidas na peneira 16 de crivo circular foram tratadas com os fungicidas Tecto 600<sup>®</sup> e Captan<sup>®</sup>, nas doses de 40g e 120g do produto comercial por 100Kg de sementes, respectivamente. Sementes secadas à sombra foram utilizadas como testemunha. Sementes secadas artificialmente e à sombra permaneceram em câmara fria e seca regulada a  $\pm 15^\circ\text{C}$  e umidade relativa em torno de 50% até a realização dos testes fisiológicos. O tempo de permanência na câmara fria foi o suficiente para que todos os materiais pudessem estar disponíveis.

A partir das linhagens foram obtidas as sementes dos híbridos e respectivos recíprocos. Cruzamento recíproco é aquele em que o genitor é usado ora como fêmea, ora como macho. A semeadura, realizada em novembro de 2000, foi conduzida em três épocas distintas para garantir a coincidência no florescimento entre os parentais. Sementes das linhagens também foram autofecundadas. A metodologia de colheita e beneficiamento das sementes foi a mesma citada anteriormente. As sementes foram secadas até atingirem um teor de água em torno de 8%. As sementes também

permaneceram em câmara fria e seca até a realização dos testes fisiológicos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise e de Técnicas Moleculares do Setor de Sementes da UFLA. Foram utilizadas sementes das linhagens produzidas nas duas safras e sementes de híbridos simples e respectivos recíprocos.

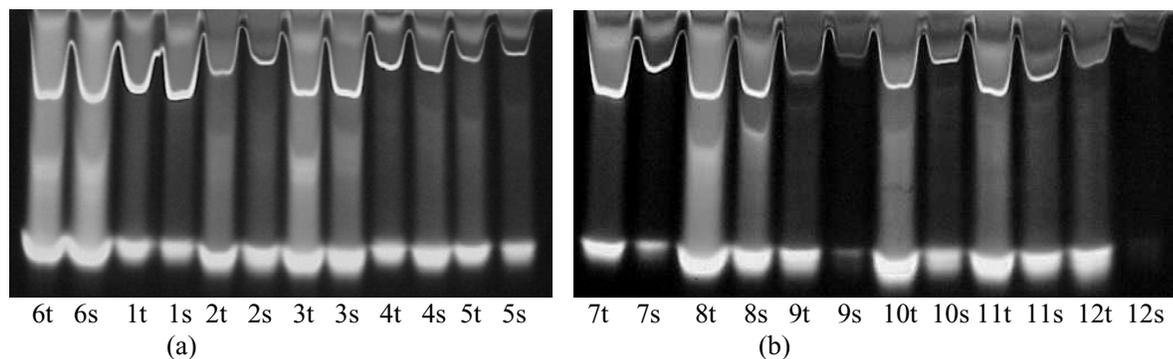
A avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi realizada pelo teste de germinação, conduzido com 4 repetições. Cinquenta sementes por repetição foram semeadas entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 mL: g de papel<sup>-1</sup>. As sementes permaneceram no germinador regulado para 25°C e as avaliações foram realizadas segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Para a extração da enzima  $\alpha$ -amilase, nove sementes de cada tratamento foram germinadas por um período de 70 horas. Decorrido esse período, a plúmula e raízes das sementes foram descartadas e o restante foi triturado em mortar sobre gelo, na presença de N-líquido (Roveri José, 2003). Para a extração da enzima, 200 mg do pó das sementes germinadas foram ressuspensos em 600  $\mu$ L do tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 + 0,4% de PVP (polivinil pirrolidone)) e estas amostras permaneceram em geladeira ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ), incubadas no gelo por um período de aproximadamente 12 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 60 minutos a 4°C. Quarenta microlitros do sobrenadante de cada tratamento foram aplicados em géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador contendo 5% de amido solúvel) e a corrida eletroforética foi realizada a 75 V, durante uma hora, no gel concentrador, e a 150 V, por 3:30 horas, no separador, utilizando-se, para o sistema tampão gel eletrodo, uma solução de Tris-glicina pH 8,9. A revelação para detecção da atividade da enzima foi conduzida segundo metodologia descrita por Alfenas et al. (1991).

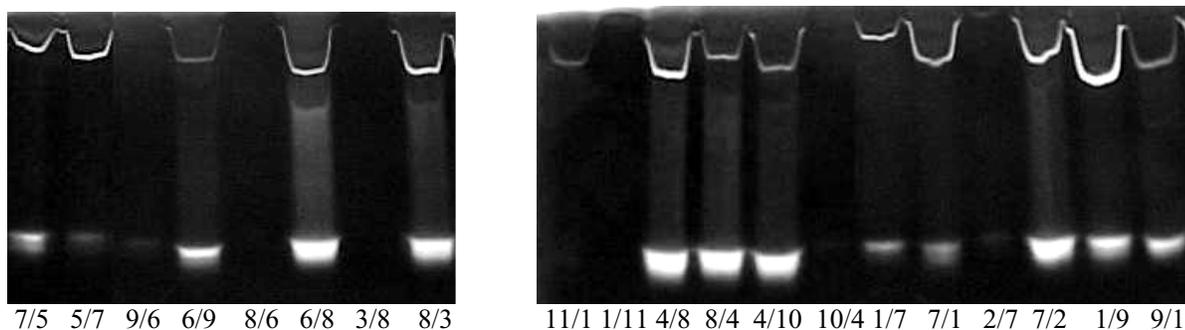
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1, 2 e 3 estão representados os géis revelados para a enzima  $\alpha$ -amilase das sementes das linhagens e híbridos. A atividade dessa enzima pode ser evidenciada pelas bandas acromáticas em fundo azulado devido à reação do iodo com a amilase, tratando-se de uma revelação negativa. Desta forma, o amido foi hidrolisado nos locais em que a enzima estava presente. A coloração dos géis nas figuras citadas não ficou azulada porque as fotos são preto e branco. A atividade dessa enzima pode ser melhor visualizada na parte de cima do gel, no início da corrida eletroforética.

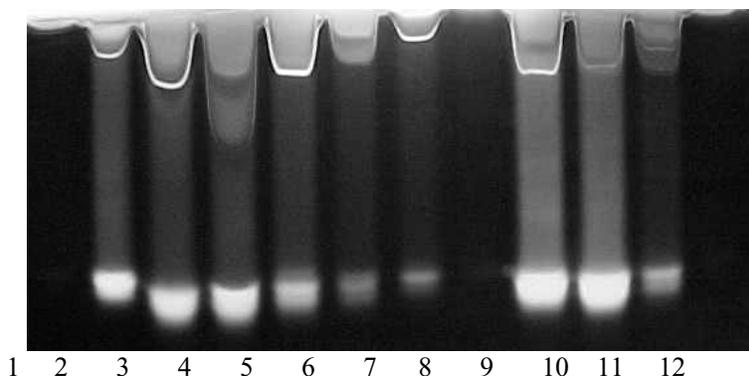
Os padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase das sementes das linhagens produzidas na safra 1999/00 e submetidas à secagem artificial e natural estão representados na Figura 1. Comparando a atividade enzimática das sementes após a secagem artificial verificou-se, de modo geral, maior intensidade de bandas nas sementes das linhagens de 1 a 6 classificadas como tolerantes a alta temperatura de secagem por meio do teste de germinação (Figura 1 (a), Tabela 1), quando comparada com a intensidade das bandas das sementes intolerantes das linhagens de 7 a 12 (Figura 1 (b), Tabela 1). Em sementes das linhagens classificadas como intolerantes, menor atividade enzimática pode ter influenciado nos valores de germinação das sementes após secagem a alta temperatura, os quais foram inferiores quando comparados aos observados para as sementes de genótipos tolerantes, safra 1999/00 (Tabela 1). Desse modo, a secagem das sementes à temperatura de 45°C parece ter provocado alterações mais drásticas no metabolismo relacionado à síntese da enzima  $\alpha$ -amilase das sementes das linhagens intolerantes.



**FIGURA 1.** Padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase de sementes de linhagens de milho produzidas na safra 1999/00 na área experimental da UFLA: (a) tolerantes à alta temperatura de secagem; (b) intolerantes a alta temperatura de secagem. s: após secagem artificial; t: testemunha, sementes secadas à sombra.



**FIGURA 2. Padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase de sementes híbridas de milho e seus respectivos recíprocos, produzidas na safra 2000/01 na área experimental da UFLA e submetidas a alta temperatura de secagem.**



**FIGURA 3. Padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase de sementes de linhagens de milho produzidas na safra 2000/01 e submetidas a alta temperatura de secagem.**

Segundo Herter & Burris (1989b), danos térmicos às sementes são caracterizados pela ruptura de ligações peptídicas de proteínas e outros componentes celulares, sendo que o início do efeito deletério, durante secagem à alta temperatura, coincidiu com o início da secagem do embrião. Rosa (2000) constatou que sementes de milho secadas em espigas a 50°C, embora tenham sofrido redução do teor de água até próximo de 12%, não apresentaram a mesma atividade enzimática daquelas que já haviam adquirido tolerância à alta temperatura de secagem. Para a mesma autora, sementes de milho colhidas com alto teor de água devem ser secadas pelo menos até um teor de água de 24-25% para que ocorra a síntese da  $\alpha$ -amilase, permitindo, assim, o início do processo germinativo após a reidratação. Nessa pesquisa, as sementes foram secadas até um teor de água de 11%, suficiente para sensibilizar a camada de aleurona ao hormônio GA<sub>3</sub> e ativar a síntese da  $\alpha$ -amilase.

Para as linhagens consideradas tolerantes à alta temperatura de secagem (Figura 1 (a)), não foi observada diferença na atividade da enzima nas sementes secadas à sombra e artificialmente, o que já não ocorreu para as linhagens não tolerantes (Figura 1 (b)), para as quais maior

intensidade de banda, ou seja, maior atividade foi verificada para as sementes da testemunha. Os danos ocasionados pela alta temperatura de secagem nas sementes das linhagens intolerantes podem ter afetado a solubilidade das enzimas, reduzindo sua atividade, como mencionado por Peplinski et al. (1994). Provavelmente isso não ocorreu nas sementes tolerantes porque estas apresentam algum mecanismo de proteção contra os danos causados por uma rápida perda de água. Importantes mudanças morfológicas na prevenção de injúrias causadas por alta temperatura de secagem foram constatadas por Perdomo & Burris (1998), que submeteram as espigas de milho a uma pré-secagem (pré-condicionamento), para posterior secagem a 45°C. Os autores observaram a migração dos corpos lipídicos para a parede celular das células meristemáticas da raiz e a formação dos corpos protéicos dentro dos vacúolos, durante o pré-condicionamento de sementes de milho. Essas mudanças foram mais evidentes nos tratamentos que permitiram uma maior taxa de secagem. Mudanças metabólicas e bioquímicas também foram verificadas. Elevada atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi observada nas sementes pré-condicionadas a 35°C e a 90% de umidade relativa, sendo que nesse tratamento foi observado degradação de grãos de amido na base do escutelo,

adjacente ao meristema radicular. As taxas respiratórias foram significativamente maiores em sementes cujos tratamentos de pré-condicionamento envolveram a temperatura de 35°C do que a de 20°C.

**TABELA 1. Valores médios de germinação (%) de sementes de milho produzidas nas safras 1999/00 e 2000/01, no campo experimental da UFLA, e submetidas à secagem artificial e secagem à sombra (natural).**

Linhasgens	Safrá 1999/00		Safrá 2000/01	
	Artificial <sup>1</sup>	Natural	Artificial <sup>2</sup>	Natural <sup>3</sup>
1	95	76 <sup>4</sup>	8	92
2	100	96	12	83
3	99	98	63	83
4	99	99	49	91
5	99	99	82	88
6	99	100	30	96
7	66	92	16	91
8	59	98	4	-
9	55	97	-	99
10	57	99	78	86
11	56	100	60	90
12	11	97	3	96

<sup>1</sup> Teor de água após secagem artificial: 11%.

<sup>2</sup> Teor de água após secagem artificial: 8%.

<sup>3</sup> Germinação realizada após 16 meses de armazenamento.

<sup>4</sup> Sementes bastante atacadas por fungos por ocasião da colheita.

Sabe-se que a camada de aleurona é um tecido digestivo, especializado na secreção de enzimas mobilizadoras de reserva do endosperma, incluindo a  $\alpha$ -amilase, e sua atividade inicia na presença de ácido giberélico, secretado pelo embrião durante a germinação (McCarty & Carsa, 1991). Segundo Golovina et al. (2000), as células da camada de aleurona são tolerantes à dessecação sob condições de secagem lenta ou durante diferenciação das células do endosperma em células da camada de aleurona. Na presente pesquisa, as sementes que foram secadas à sombra, caracterizando portanto uma secagem lenta, apresentaram valores elevados de germinação. Isso demonstra que as diferenças observadas quanto à susceptibilidade aos danos por secagem a alta temperatura foi dependente da linhagem em questão.

Na Figura 2 estão apresentados os padrões observados para a enzima  $\alpha$ -amilase nas sementes de híbridos simples e respectivos híbridos recíprocos. A designação 1/11, por exemplo, refere-se à linhagem 1 como genitor masculino e à linhagem 11, como feminino. Na Figura 3 estão representados os perfis isoenzimáticos das linhagens. Tem sido relatada a expressão da heterose na qualidade das sementes (Gomes et al., 2000), bem como ligação entre as giberelinas e a heterose no controle da

síntese da  $\alpha$ -amilase e subsequente hidrólise das reservas em sementes de milho (Paleg, 1965). No entanto, na presente pesquisa, foram verificadas diferenças na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase (Figura 2), bem como nos valores de germinação entre as sementes híbridas e as do respectivo recíproco (Tabela 2). Isso sugere que existem outros fatores além de genes nucleares que afetaram o comportamento dessas sementes híbridas com relação à atividade dessa enzima, uma vez que o genoma nuclear é o mesmo para os híbridos e seus respectivos recíprocos. Para as combinações originadas de pais bem contrastantes, para a intensidade da banda da enzima  $\alpha$ -amilase, geralmente foi observado padrão semelhante ao do parental feminino, como observado nas combinações envolvendo as linhagens 6 com 9; 3 com 8; 4 com 10; 2 com 7 e 1 com 9 (Figuras 2 e 3).

**TABELA 2. Valores médios de germinação de sementes híbridas de milho produzidas na safra 2000/2001, na área experimental da UFLA e submetidas a secagem artificial.**

Híbridos	Germinação (%)
7/5	90
5/7	68
9/6	40
6/9	95
8/6	13
6/8	82
3/8	1
8/3	90
11/1	60
1/11	0
4/8	96
8/4	59
4/10	92
10/4	45
1/7	40
7/1	92
2/7	33
7/2	86
1/9	97
9/1	*

\* Não consta dados, devido a escassez de sementes durante a etapa de produção.

É importante mencionar que o zigoto que dará origem ao "híbrido" possui 50% da informação dos cromossomos de origem paterna e 50% de origem materna. Já no endosperma, 66,66% dos cromossomos são de origem materna e 33,33%, paterna (Veit et al., 1993). O endosperma portanto é um tecido triploide. Juntamente com a formação do embrião e do endosperma, durante o desenvolvimento da semente, ocorre o crescimento das paredes do ovário que revestirão a semente, constituindo no

pericarpo. O pericarpo é, portanto, um tecido materno independente da fertilização.

Considerando que a constituição do embrião não depende da linhagem utilizada como genitor, pode-se inferir que a maior tolerância a alta temperatura de secagem depende do pericarpo da semente, ou do endosperma, cuja constituição dos genitores é diferente. O embrião também poderia sofrer a influência materna devido a constituição do citoplasma, que independe do pólen.

Roveri-José (2003), observou que um estrutura menos densa do pericarpo refletiu positivamente sobre a qualidade fisiológica de sementes híbridas submetidas a secagem artificial. Lopes & Larkins (1993) verificaram que após a polinização ocorre um aumento na quantidade de DNA do endosperma como estratégia para aumentar os [produtos resultantes da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de enzimas. Essa quantidade, segundo os autores, é variável em função da linhagem avaliada.

Os danos causados pela alta temperatura de secagem às sementes parecem ter afetado a síntese da  $\alpha$ -amilase, uma vez que sementes híbridas com baixa atividade enzimática, a exemplo do 5/7, 9/6, 8/6, 3/8, 1/11, 8/4, 10/4, 1/7, 2/7 e 9/1 (Figura 2), também apresentaram valores mais baixos de germinação, quando comparados aos seus recíprocos (Tabela 2). Isso sugere que o pericarpo pode estar influenciando nessa tolerância a alta temperatura de secagem, uma vez que o pericarpo da semente híbrida é originado da linhagem utilizada como genitor feminino. Burris & Navratil (1980) constataram que sementes de genótipos de milho tolerantes a alta temperatura de secagem apresentaram maior taxa de secagem. Os autores sugeriram que genótipos tolerantes podem ser capazes de dissipar água a uma maior taxa que os tipos intolerantes. Maior permeabilidade do pericarpo foi associada com secagem mais rápida, segundo Purdy & Crane (1967), sugerindo que diferenças na estrutura podem ser uma característica importante no processo de secagem.

Baixa atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi observada em sementes da linhagem 9 na safra 1999/00 (Figura 1) após secagem; na safra 2000/01 (Figura 3), a atividade foi mais elevada, demonstrando que a tolerância das sementes a alta temperatura de secagem pode estar relacionada à síntese de  $\alpha$ -amilase, sendo influenciada pelo ambiente no qual as sementes foram produzidas.

Na Figura 3, observa-se uma elevada atividade da enzima para as linhagens 9, 10, 3 e 5, produzidas na safra 2000/01, estando entre as linhagens que apresentaram maiores valores de germinação de suas sementes (Tabela 1). As demais linhagens foram mais sensíveis à secagem a alta temperatura, refletindo na capacidade germinativa das mesmas. Peplinsk et al. (1994) observaram perda das proteínas classificadas como albuminas, nas quais se encontra a  $\alpha$ -amilase, com o aumento da temperatura de secagem de sementes de milho. No entanto, nenhuma mudança no gel de prolaminas, que são proteínas de

reservas, como a zeína em milho, foi constatada, sugerindo que essas proteínas podem não ser tão facilmente desnaturadas como as albuminas.

## CONCLUSÕES

A atividade da enzima  $\alpha$ -amilase é afetada pela alta temperatura de secagem de sementes de milho.

Os perfis isoenzimáticos para a  $\alpha$ -amilase revelam uma maior intensidade de banda para as sementes das linhagens e de híbridos tolerantes a alta temperatura de secagem.

Sementes híbridas e seus respectivos recíprocos apresentam diferenças na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- ARMSTRONG, C. et al. The induction of sensitivity to gibberellin in aleurone tissue of developing wheat grains. I. The effect of dehydration. **Planta**, Berlim, v.154, n.6, p.573-577, 1982.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- BURRIS, J. S.; NAVRATIL, R. J. Drying high-moisture seed corn. **Proceeding Annual Corn Sorghum Research Congress**, Dordrecht, n. 35, p. 116-132, 1980.
- BURRIS, J. S.; PETERSON, J. M.; PERDOMO. Morphological and physiological changes associated with desiccation in maize embryos. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: BASIC AND APPLIED ASPECTS OF SEED BIOLOGY, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading: University of Reading, 1997. p. 103-111.
- CHEN, Y.; BURRIS, J. S. Desiccation tolerance in maturing maize seed: membrane phospholipid composition and thermal properties. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 766-770, 1991.
- 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.
- EHRENSHAFT, M.; BRAMBL, R. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.93, p.295-304, 1990.

- FINCHER, G. B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, Palo Alto, v.40, p.305-346, 1989.
- GOLOVINA, E. A.; HOEKSTRA, F. A.; van AELST, A. C. Programmed cell death or desiccation tolerance: two possible routes for wheat endosperm cells. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 365-379, 2000.
- GOMES, M. S.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, M. G. G. C. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho, **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.
- HERTER, U.; BURRIS, J. S. Changes in moisture, temperature, and quality of corn seed during high-temperature drying. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 69, n. 3, p. 749-761, 1989a.
- HERTER, U.; BURRIS, J. S. Effect of drying rate and temperature on drying injury of corn seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 69, n. 3, p. 763-774, 1989b.
- KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.
- LOPES, M. A.; LARKINS, B. A. Endosperm origin, development, and function. **The plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1383-1399, 1993.
- MCCARTY, D. R.; CARSON, C. B. The molecular genetics of seed maturation in maize. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 81, n. 2, p. 267-272, 1991.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. The effect of drying temperature on corn seed quality. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 64, n. 3, p. 487-496, 1984.
- NAKAYAMA, N.; SUGIMOTO, I.; ASAHI, T. Presence in dry pea cotyledons of soluble succinate dehydrogenase that is assembled into the mitochondrial inner membrane during seed imbibition. **Plant Physiology**, Rociville, v.65, p.229-233, 1980.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n.1, p. 159-161, 1982.
- PALEG, L. G. Physiological effects of giberellins. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 16, p. 291-322, 1965.
- 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.
- PEPLINSKI, A. J. et al. Drying of high moisture corn: changes in properties and physical quality. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 71, n. 2, p. 129-133, 1994.
- PERDOMO, A.; BURRIS, J. Histochemical, physiological, and ultrastructural changes in the maize embryo during artificial drying. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 5, p. 1236-1244, 1998.
- PURDY, J. L.; CRANE, P. L. Influence of pericarp on differential drying rate in "mature" corn. (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 379-381, 1967.
- ROSA, S. D. V. F. da. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura**. Lavras. 2000. 121f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2000.
- ROVERI JOSÉ, S. C. B. **Tolerância a alta temperatura de secagem de sementes de milho**. Lavras. 2003. 149f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2003.
- SEYEDIN, N.; BURRIS, J. S.; FLYNN, T. E. Physiological studies on the effects of drying temperatures on corn seed quality. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 64, n. 3, p. 497-504, 1984.
- VEIT, B. et al. Maize floral development: new genes and old mutants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1205-1215, 1993.

