

Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho por meio da atividade respiratória

Iolanda Vilela Von Pinho¹, Heloisa Oliveira dos Santos², Edila Vilela de Resende Von Pinho³, Kalinka Carla Padovani de Carvalho Salgado⁴

¹Universidade Federal de Lavras – UFLA, Graduanda em Agronomia, bolsista FAPEMIG (iolandavvp@hotmail.com), ²Universidade Federal de Lavras – UFLA, doutoranda em Agronomia/fitotecnia, bolsista CNPq, ³Universidade Federal de Lavras – UFLA, professora associada IV, ⁴ Pesquisadora Dow AgroSciences.

RESUMO - Atualmente observa-se um novo cenário do mercado de sementes de milho, com a oferta de cultivares com características de interesse do agricultor e com mais valores agregados. Para a transferência destas características aos agricultores é preciso garantir a qualidade fisiológica das sementes comercializadas, o que demanda a avaliação desta qualidade por meio de testes seguros e que demandam menor tempo. Assim, objetivou-se nesta pesquisa avaliar a qualidade fisiológica de cinco lotes de sementes de milho com diferentes níveis de qualidade por meio dos testes de Pettenkofer e de Titulação, ambos baseados na respiração de sementes. Também foi avaliada a correlação entre os resultados obtidos nos testes de Pettenkofer e de Titulação e os obtidos nos testes de germinação e vigor. Para os testes os quais foram utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi utilizado o DIC com quatro repetições. Os métodos de Pettenkofer e de Titulação são ferramentas importantes para a separação de lotes de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração, principalmente por demandar menor tempo de avaliação e pelo fato de os resultados observados nestes se correlacionarem com os observados em outros testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica destas sementes.

Palavras-chave: *Zea mays* L., respiração, qualidade de sementes.

Introdução

Nos últimos anos, tem sido observado aumento da demanda de sementes híbridas de milho com alta qualidade principalmente com a comercialização de transgênicos no Brasil, o que exige das empresas produtoras, altos padrões de qualidade, devendo ser associados a sistemas produtivos rentáveis. A alta taxa de utilização de sementes de milho, cerca de 90%, deve-se ao valor agregado em sementes híbridas que resultam em maiores produtividades.

Sabe-se que o aumento na produção, em plantas da geração F1, está diretamente relacionado com o efeito da heterose, fenômeno no qual o cruzamento entre variedades produz um indivíduo superior quanto ao rendimento e o vigor (Ramalho et al., 2000).

Neste contexto a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho por meio de testes seguros é ferramenta fundamental para a comercialização de sementes. Na indústria sementeira de milho a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho tem sido feita por meio de testes de germinação e de vigor. O teste de germinação embora seja considerado um teste oficial para a comercialização de sementes de milho apresenta algumas deficiências principalmente pelo fato de não detectar os estágios de deterioração de sementes uma vez que a

perda da germinação é um dos últimos eventos no processo de deterioração, antes da morte das mesmas. Assim além do teste de germinação nas empresas produtoras de sementes de milho têm sido utilizados testes de vigor em sementes para um melhor controle da qualidade durante as etapas de produção.

Os testes de frio, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas têm sido considerados nos programas de controle de qualidade interno das empresas. No entanto, são testes que demandam mais tempo o que pode inviabilizar a utilização dos mesmos quando da necessidade de tomada de decisões em menor período de tempo. Assim a avaliação de testes rápidos e seguros para a determinação da qualidade fisiológica de sementes é demandada com frequência nas empresas produtoras de sementes durante os processos de produção.

Um dos primeiros sinais de deterioração de sementes é a alteração na taxa respiratória das mesmas (Guimarães, 1999). Dessa forma é a liberação de CO_2 que tem sido a principal forma de quantificar a respiração de sementes. A respiração é a oxidação completa de compostos de carbono a CO_2 e água, por meio de uma série de reações, usando oxigênio comoceptor final de elétrons. Na respiração ocorre a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia e compostos secundários. A energia é liberada e conservada na forma de ATP, o qual pode ser prontamente utilizado para o desenvolvimento de plântulas (Taiz e Zeiger, 2009). Importantes macromoléculas, como DNA e RNA, proteínas, lipídios, clorofilas, carotenóides e fitormônios, são formadas por esqueletos carbonados desviados da via respiratória. Para a síntese desses novos materiais indispensáveis ao crescimento, são necessárias também substâncias de alto poder redutor (NADH , FADH_2) e elevado conteúdo energético (ATP). Portanto, nem todo carbono contido no substrato respiratório é liberado na forma de CO_2 , e nem todos os elétrons contidos nos nucleotídeos reduzidos (NADH , FADH_2) se combinam com O_2 para produzir H_2O (Marenco e Lopes, 2007).

Sendo assim a determinação da atividade respiratória de sementes pode ser um parâmetro importante para a determinação da qualidade fisiológica de sementes, podendo constituir uma alternativa promissora para a tomada de decisões no controle de qualidade interno das empresas produtoras de sementes de milho.

Os métodos mais utilizados, baseados em trocas gasosas, são o respirômetro de Warburg e o eletrodo de Clark, que consistem na medição manométrica do O_2 consumido, e o analisador de gás infravermelho (IRGA) e os métodos físico-químicos que se baseiam na retenção de CO_2 em uma base e em sua determinação por titulometria, colorimetria ou condutivimetria (Maestri, Alvim e Silva, 1998).

Nos métodos físico-químicos de Pettenkofer e da Titulação se avalia a quantidade de CO₂ liberado pela respiração das sementes por grama de semente por hora e tem se mostrado promissor para a diferenciação de lotes quanto ao vigor (Castro, 2011). Os resultados obtidos nestes testes podem ser correlacionados com os observados em outros testes de vigor.

Assim objetivou-se nesta pesquisa avaliar a qualidade fisiológica de cinco lotes de sementes de milho com diferentes níveis de qualidade por meio dos testes de Pettenkofer e de Titulação, ambos baseados na respiração de sementes. Também foi avaliada a correlação entre os resultados obtidos nos testes de Pettenkofer e de Titulação e os obtidos nos testes de primeira contagem de germinação, germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas e índice de velocidade de germinação.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, UFLA, em Lavras, MG. Foram utilizados cinco lotes de sementes de milho com diferentes níveis de qualidade os quais foram cedidos pela empresa Dow AgroSciences. As sementes foram submetidas aos seguintes testes e determinações:

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105±3°C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras para cada tratamento, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida).

Para germinação e emergência foram adotados os critérios recomendados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Foram realizadas avaliações diárias a partir do início da emergência de plântulas, computando-se o número de plântulas emersas até a estabilização do estande. Foi computada a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias. Para o cálculo do índice de velocidade de emergência, segundo Edmond e Drapala (1958), foram realizadas leituras diárias do número de plântulas com as folhas acima do solo. O teste de primeira contagem de germinação foi realizado em conjunto com o teste de germinação, cuja avaliação foi realizada no quarto dia após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado de acordo o método de mini câmaras do tipo "gerbox" onde as sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas, em uma temperatura de 41°C, e em seguida foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente (Vieira e Carvalho, 1994). As plântulas normais foram avaliadas aos cinco dias.

A atividade respiratória foi determinada por meio do aparelho de Pettenkofer. Este é constituído por quatro frascos, sendo que os dois primeiros contêm hidróxido de sódio (NaOH), no terceiro são acondicionadas as sementes em análise e o quarto contém hidróxido de bário (Ba(OH)_2). Após duas horas de exposição das sementes, retiraram-se duas alíquotas do sobrenadante para titulação. Em cada alíquota foram adicionadas duas gotas de reagente de cor fenolftaleína e em seguida submetida à titulação com ácido clorídrico (HCl). O volume de HCl utilizado até o ponto de viragem é proporcional à quantidade de BaCO_3 presente na solução, que também é proporcional à quantidade de CO_2 proveniente da atividade respiratória das sementes. A partir dos cálculos estequiométricos foi possível obter a quantidade de CO_2 liberada no processo de respiração das sementes. O resultado foi expresso em quantidade de dióxido de carbono liberado por grama de semente por hora ($\bullet \text{ g CO}_2 \text{ g semente}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Na avaliação da respiração pelo método da titulação foram utilizadas caixas de plástico transparente tipo gerbox, contendo bandeja de tela fina, utilizada como suporte para as sementes. No fundo da cada gerbox foram colocados 40 ml de solução de KOH a 0,1N. Para evitar trocas gasosas com o meio, cada gerbox foi vedado com plástico tipo rolopac. Cada uma das quatro repetições de 50 sementes foi colocada sobre a tela contendo uma folha de papel mata borrão umedecido 2x o seu peso seco. Os gerboxs foram mantidos em câmara de germinação, tipo BOD, por um período de 24hs a temperatura constante de 25°C.

Após esse período, gotas do corante de cor fenolftaleína foram adicionadas a uma amostra de 25ml da solução de KOH, por repetição, a qual foi submetida a titulação com HCl 0,1N. No ponto de viragem, foi registrado o volume de HCl gasto em cada uma das repetições testadas. Esse volume de HCl que é diretamente relacionado com a quantidade de CO_2 fixado pela solução de KOH, é proveniente da respiração. O resultado foi expresso em mg de CO_2 por grama de semente seca (Crispim et al., 1994).

Os testes realizados para avaliação da qualidade fisiológica das sementes seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico Sisvar[®] (Ferreira, 2000). Foram determinados os coeficientes de correlação linear simples (r) de Pearson, entre os valores obtidos nos teste utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes.

Resultados e Discussão

Foram observadas diferenças significativas entre os lotes avaliados para as características de germinação e de vigor por meio dos testes utilizados com exceção dos

resultados observados no teste de germinação, Tabelas 1 e 2. Pelos testes de envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência e emergência maiores valores de vigor foram observados em sementes do lote 1 e menores valores de vigor no lote 2. Por meio do teste de primeira contagem de germinação, menor vigor foi observado em sementes do lote 2. Pelo teste de germinação não foi observada diferença da qualidade de sementes entre os lotes avaliados, o que reforça a deficiência deste teste para a separação de lotes de sementes com diferentes níveis de deterioração.

Pelo método de Pettenkofer foram observados maiores valores de respiração em sementes do lote 1 caracterizado, por meio dos outros testes já descritos, como de alto vigor. Já para nas sementes do lote 2, caracterizado como de baixo vigor, foram observados os menores valores de respiração. Assim, em sementes com alto vigor foram observados os maiores valores de respiração avaliados pela liberação de CO₂ caracterizando a integridade das mitocôndrias. Segundo Bewley e Black (1994), a integridade dos mitocôndrios de embriões viáveis aumentam a partir do início da embebição, o que torna mais eficiente a produção de ATP, com consequentes elevações do consumo de oxigênio e produção de gás carbônico. Assim sementes mais vigorosas tendem a respirar mais quando comparadas às sementes de menor vigor, em um mesmo período de tempo.

Em outras pesquisas também foi observada a diferenciação de lotes de sementes em relação ao vigor por meio do método de Pettenkofer. Castro (2011) observou esta diferenciação em sementes de milho, Mendes (2008) em sementes de soja e arroz e Matos (2012) em sementes de pimenta e pimentão.

Pelo método da titulação (Tabela 2), em que se avalia a quantidade de O₂ liberado pela respiração das sementes, foi possível separar estatisticamente os cinco lotes de sementes de milho em três níveis de vigor. Maior valor foi observado para o lote 2 e menor para o lote 1.

Com relação a análise de correlação linear simples, Tabela 3, entre os resultados observados nos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho houve correlação significativa entre os resultados da atividade respiratória medida por meio do método de Pettenkofer e os observados nos teste de germinação com (r) de 0.9136, primeira contagem de germinação com (r) de 0.8626, índice de velocidade de emergência de plântula com (r) de -0.9092 e envelhecimento com (r) de 0.9831. Houve correlação significativa entre os resultados da atividade respiratória medida por meio do método de titulação e os observados nos teste de índice de velocidade de emergência de plântula com (r) de 0.9370, envelhecimento com (r) de - 0.8743 e o método de Pettenkofer com (r) de - 0.9347. Crispim et al. (1994) observaram correlações significativas entre os resultados observados no método de titulação e

outros testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja . Matos, 2012, também observou a importância de se avaliar a atividade respiratória de sementes em complemento aos outros testes de germinações e vigor, para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimenta e pimentão.

Na presente pesquisa foi verificado que os métodos de Pettenkofer e de Titulação, relacionados à respiração de sementes, são ferramentas importantes para a separação de lotes de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração, principalmente por demandar menor tempo de avaliação e pelo fato de os resultados observados nestes se correlacionarem com os observados em outros testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica destas sementes.

Conclusões

Pelos métodos de Pettenkofer e de Titulação, relacionados à respiração de sementes, é possível separar lotes de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração.

Há correlação entre os resultados observados nos métodos de Pettenkofer e de Titulação e os observados em outros testes utilizados para a determinação da qualidade fisiológica de sementes de milho.

Literatura Citada

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília, 2009.

CASTRO, M.B. de. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho por meio da atividade respiratória. 2011. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras UFLA, Lavras, 2011.

CRISPIN, J.E., MARTINS, J.C., PIRES, J.C., ROSOLEN, C.A., CAVARIANI, C. Determinação da Taxa de Respiração em Sementes de Soja pelo Método da Titulação. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.29, n.10, p.1517-1521, out.1994.

EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. 1958. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 71: 428-443.

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, SP. Programas e Resumos... São Carlos: UFSCar. p. 235.2000.

GUIMARÃES, R. M. Fisiologia de sementes. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 81 p.

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

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

PEREIRA, E. M. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimenta e pimentão por meio da atividade respiratória. 2012. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras UFLA, Lavras, 2012.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Genética na Agropecuária. Lavras: Editora UFLA, 2000. 404 p.

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

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

Tabela 1. Valores médios de primeira contagem de germinação (PC), germinação (G), emergência em bandeja (E) índice de velocidade de germinação (IVE) e envelhecimento acelerado (ENV), para lotes de sementes de milho. UFLA, 2012.

Lotes	PC	%G	%E	IVE	ENV
01	91 a	99 a	98 a	3 a	99 a
02	77 c	96 a	82 b	5 c	82 c
03	88 b	99 a	98 a	4 b	93 b
04	87 b	98 a	98 a	4 b	91 b
05	92 a	98 a	99 a	4 b	94 b
CV(%)	2,58	1,44	2,17	1,04	3,36

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

Tabela 2. Atividade respiratória pelo método de Pettenkofer e pelo método da Titulação, para lotes de sementes de milho. UFLA, 2012.

Lotes	Respiração método Pettenkofer	Respiração método titulação
01	460,50 a	3,16 a
02	209,75 d	6,62 c
03	365,25 b	5,39 b
04	313,50 c	5,76 b
05	351,25 b	5,58 b
CV(%)	6,35	5,90

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

Tabela 3. Coeficientes de correlação linear simples (r) entre os testes analisados. UFLA, 2012.

	Germ.	%E	IVE	Envel,	Pett	Respiração
PC	0.8565 ^{ns}	0.9510 [*]	-0.0631 ^{ns}	0.9375 [*]	0.8626 ^{**}	-0.6611 ^{ns}
Germ.		0.8972 [*]	-0.2217 ^{ns}	0.9187 [*]	0.9136 [*]	-0.7442 ^{ns}
%E			0.1205 ^{ns}	0.8777 [*]	0.7930 ^{ns}	-0.5555 ^{ns}
IVE				-0.3619 ^{ns}	-0.9092 [*]	0.9370 [*]
Envel.					0.9831 ^{**}	-0.8743 ^{**}
Pettenkofer						-0.9347 [*]