

INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À ALTA TEMPERATURA DE SECAGEM EM SEMENTES DE MILHO POR MEIO DE PRÉ-CONDICIONAMENTO À BAIXA TEMPERATURA

STTELA DELLYZETE VEIGA FRANCO DA ROSA¹, ÉDILA VILELA RESENDE VON PINHO², MARIA DAS GRAÇAS GUIMARÃES C. VIEIRA², RUBEN DELLY VEIGA³

¹Pesquisadora, Dra, Embrapa Café, CEPECAFÉ/DAG/Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, CEP. 37200-000 Lavras, MG. E-mail: sttelaveiga@ufla.br (autora para correspondência).

²Professores Drs., Dep. de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, CEP. 37200-000 Lavras, MG.

³Professor Dr., Dep. Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, CEP. 37200-000 Lavras, MG.

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3, n.2, p.290-310, 2004

RESUMO - Sementes de milho maduras, sob condição de secagem natural, perdem água lentamente e tornam-se mais tolerantes a temperaturas de secagem mais elevadas, em consequência da ocorrência de mudanças físicas, fisiológicas e bioquímicas. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do pré-condicionamento de sementes de milho, por meio de pré-secagem sob temperatura de 35°C, sobre a tolerância à secagem a 50°C. Para tanto, sementes de milho de três cultivares, colhidas com teores de água de 42,3%, de 37,2% e de 34,2%, foram submetidas à pré-secagem a 35°C (pré-condicionamento), por períodos de 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 e 56 horas, antes da secagem conduzida a 50°C até 12% de teor de água. Após os períodos de pré-condicionamento, embriões foram analisados quanto aos conteúdos de glicose, sacarose e estaquiose. Após a secagem a 50°C, as sementes foram avaliadas por testes de germinação, de primeira contagem de germinação, de frio, de condutividade elétrica, de peso de matéria seca de plântula e de comprimento de plântula. Em uma das cultivares foi determinada a atividade da enzima α -amilase. As sementes recém colhidas são tolerantes a 35°C e intolerantes a 50°C, mas tornam-se tolerantes a essa temperatura após a pré-secagem a 35°C (pré-condicionamento) até que atinjam teores de água entre 25,3 e 28,5%. As sementes intolerantes a 50°C apresentam menores germinação, vigor e atividade enzimática. Coincidentemente com a aquisição de tolerância a 50°C, ocorrem a diminuição de glicose e o aumento de rafinose; o conteúdo de sacarose parece não sofrer alteração durante a transição do estado de intolerância para o de tolerância.

Palavras-chave: secagem artificial, tolerância à dessecação, qualidade fisiológica, açúcares, *Zea mays* L.

INDUCTION OF TOLERANCE TO HIGH DRYING TEMPERATURE IN CORN SEEDS THROUGH PRE-CONDITIONING AT LOW TEMPERATURE

ABSTRACT - Mature corn seeds, under natural drying conditions, lose water slowly and become more tolerant to higher drying temperatures in consequence of the occurrence of physical, physiological and biochemical changes. The aim of the present work was to investigate the effect of the pre-conditioning of corn seeds by means of pre-drying, under

temperature of 35°C on the drying tolerance at 50°C. So, corn seeds of three cultivars harvested with water contents of 42.3%, 37.2% and 34.2%, were submitted to pre-drying at 35°C (pre-conditioning) for periods of 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 and 56 hours before the drying, conducted at 50°C up to 12% of water content. After the pre-conditioning periods, embryos were analyzed as to the contents of glucose, sucrose and stachiose. After drying at 50°C, the seeds were evaluated through tests of germination, first count, cold test, test of electric conductivity, dry weight and seedling length. In one of the cultivars, the activity of the α -amylase enzyme was determined. The freshly collected seeds are tolerant at 35°C and intolerant at 50°C but they become tolerant to that temperature after pre-drying at 35°C (pre-conditioning) till they reach water contents between 25.3 and 28.5%. The seeds intolerant at 50°C present poorer germination, vigor and enzyme activity. Concomitantly with the acquisition of tolerance at 50°C, the decrease of glucose and the increase of raffinose take place. Sucrose content seems not to suffer any changes during the transition of the state of intolerance to that of tolerance.

Key words: artificial drying, tolerance desiccation, physiological quality, sugars, *Zea mays* L.

Sementes maduras de milho, à medida que sofrem desidratação natural, tornam-se tolerantes a temperaturas de secagem elevadas (Herter & Burris, 1989b; Chen & Burris, 1990 e 1991), em consequência de mudanças físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem juntamente com a redução do teor de água. O entendimento dessas mudanças é de fundamental importância para o desenvolvimento de metodologias de secagem de sementes de milho colhidas em espigas com altos teores de água.

A literatura destaca a importância da secagem para a aquisição de germinabilidade (Dasgupta & Bewley, 1982; Kermode & Bewley, 1989; Misra *et al.*, 1985; Bewley *et al.*, 1989; Oishi & Bewley, 1990; Burris *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 2000b). A produção de enzimas essenciais à degradação de reservas, durante a fase de germinação ocorre em resposta à secagem prematura. Durante o desenvolvimento da semente, a camada de aleurona serve para o estoque de reservas enquanto que, na germinação, constitui-se em fonte de enzimas para a mobilização das reservas (Fincher, 1989). A α -amilase é importante na hidrólise do amido e sua produção, pela camada

de aleurona em sementes de cereais, que normalmente não ocorre em resposta ao ácido giberélico (GA_3), a não ser que a semente entre na fase de secagem pós-maturação ou seja submetida à secagem artificial, em estádios precoces do seu desenvolvimento (Armstrong *et al.*, 1982; Rosa *et al.*, 2000b).

Os mecanismos responsáveis pela aquisição de tolerância à dessecação, em sementes ortodoxas, podem incluir: a) o acúmulo de açúcares não redutores, os quais podem estabilizar membranas e proteínas em sementes secas (Chen & Burris, 1991; Bochicchio *et al.*, 1994; Bochicchio *et al.*, 1996; Brenac *et al.*, 1997; Wolkers *et al.*, 1998) ou promover a formação de uma fase vítrea no citoplasma (Williams & Leopold, 1989; Bruni & Leopold, 1992; Sun *et al.*, 1994); b) a síntese de proteínas hidrofílicas defensivas, estáveis ao calor e que são induzidas por ácido abscísico (Blackman, Obendorf & Leopold, 1995; Thomann *et al.*, 1992); c) a presença de sistemas de proteção contra o ataque de radicais livres durante a dessecação (Bewley, 1979; Leprince *et al.*, 1990, 1994, e 1995; Hoekstra *et al.*, 1997; Nkang *et al.*, 2000).

Tecidos tolerantes à dessecação e organismos anidrobióticos, que sobrevivem na ausência de água, apresentam altas concentrações de sacarose e oligossacarídeos, como estaquiose e rafinose e ausência ou baixas concentrações de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, glucose e frutose (Blackman *et al.*, 1992). Estudos (Koster & Leopold, 1988; Chen & Burris, 1990; Leprince *et al.*, 1992 e Crowe *et al.*, 1997) sugerem que altas concentrações de açúcares não redutores podem atuar no mecanismo de proteção contra os efeitos da dessecação, estabilizando membranas e mantendo sua dupla camada, mesmo na ausência de água. A plasmalema e as membranas intracelulares parecem ser o local primário das lesões comuns de danos induzidos por dessecação de tecidos intolerantes (Hoekstra & van Roekel, 1988; Koster & Leopold, 1988; Herter & Burris, 1989a; Hoekstra *et al.*, 1997 e Rosa *et al.*, 2000a).

Brenac *et al.* (1997) concluíram que a gradual aquisição de tolerância à dessecação em sementes inteiras e embriões isolados de milho, ocorreu após o acúmulo de rafinose e, mais especificamente, na presença de razões sacarose: rafinose inferiores a 20:1; a sacarose foi acumulada independentemente de aquisição de tolerância. Bochicchio *et al.* (1994 e 1996) concluíram que a sacarose, mesmo em altas concentrações, não é o único fator responsável e não parece ser requisito para a aquisição de tolerância à dessecação.

O acúmulo de sacarose tem sido proposto como um fator para a estabilização de membranas (Caffrey *et al.*, 1988; Sun, Irwing & Leopold, 1994). Por outro lado, a sacarose parece representar um papel importante na proteção durante os estádios iniciais da secagem (Sun, Irwing & Leopold, 1994), enquanto que a rafinose, um inibidor de cristalização da sacarose

(Caffrey *et al.*, 1988), parece ser importante para a sobrevivência durante os estádios pós-secagem.

A participação das membranas celulares na qualidade de sementes submetidas à secagem foi evidenciada por resultados de testes de condutividade elétrica e de composição dos eletrólitos lixiviados (Hoekstra *et al.*, 1997 e Rosa *et al.*, 2000a); organismos não tolerantes à dessecação apresentam menores germinação e vigor e, adicionalmente lixiviam solutos endógenos após embebição, indicando disfunção de membranas, não observada nos organismos tolerantes.

Por outro lado, o declínio do vigor de sementes de milho no armazenamento também pode estar associado à baixa proporção de rafinose, uma vez que a tolerância à dessecação e a manutenção da qualidade das sementes durante o armazenamento podem depender da presença de rafinose em concentração capaz de conferir estabilidade às membranas (Horbowicz & Obendorf, 1994 e Bernal-Lugo & Leopold, 1995). Hoekstra *et al.* (1997) enfatizaram a importância dos açúcares na proteção de membranas no estado seco, seja prevenindo a fusão de fosfolipídeos, transição de fase ou separação lateral de fase, sendo fundamental a habilidade do açúcar em formar cristais e para interagir diretamente com os fosfatos da cabeça polar dos fosfolipídios da membrana.

Este trabalho teve o objetivo de investigar os efeitos do pré-condicionamento de sementes de milho, por meio de uma pré-secagem a baixa temperatura, sobre a tolerância à secagem sob temperatura mais elevada. Alguns eventos fisiológicos e bioquímicos, relacionados à redução do teor de água nas sementes e ao seu envolvimento com a aquisição de tolerância à dessecação, foram paralelamente estudados.

Material e Métodos

Os trabalhos foram realizados na Embrapa Negócios para a Transferência de Tecnologia, em Sete Lagoas (MG), nos Laboratórios de Análises de Sementes e de Química da Universidade Federal de Lavras (MG) e no Departamento de Química da Universidade Federal de MG, em Belo Horizonte (MG). Foram utilizadas sementes de milho do híbrido simples HS-7213, da linhagem L161-8A, e do híbrido triplo BRS-3060 colhidas com teores de água de 34,2, de 37,2 e de 42,3%, respectivamente.

Após a colheita, as espigas foram despalhadas a mão e distribuídas em secadores experimentais, construídos em madeira, de acordo com Navratil & Burris (1982), constituídos de uma base, quatro bandejas sobrepostas e um tampo, com calor fornecido por um conjunto de resistências elétricas (3400 kW). A temperatura, monitorada a cada hora, foi controlada por um termostato microprocessado. Na base de cada secador, do lado externo, foi montado um ventilador centrífugo com vazão de 196 litros/segundo, sob pressão estática de 7,6 cmca. O fluxo de ar, de $23,0\text{m}^3\text{min}^{-1}\text{ton}^{-1}$, foi ajustado por meio de uma porta deslizável, fixada na entrada do ar no ventilador. Cada secador foi utilizado de tal forma que cada grupo de duas bandejas formasse um bloco experimental. Dois secadores foram regulados para atuar a 35°C e um a 50°C.

As espigas despalhadas, após permanecerem em pré-condicionamento por 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 e 56 horas a 35°C, foram transferidas para secador (50°C) até que as sementes atingissem 12% de teor de água. Foi utilizada uma testemunha composta por espigas não pré-condicionadas e secadas à sombra, até que as sementes apresentassem 12,0% de teor de água.

Após cada período de pré-condicionamento e antes do início da secagem a 50°C, foram

amostradas sementes para a determinação dos conteúdos de açúcares nos embriões das sementes da cultivar L161-8A. Ao final da secagem a 50°C, as espigas de todas as cultivares foram desprovidas de suas pontas e bases e foram debulhadas manualmente para a obtenção de duas porções. Uma porção foi armazenada em câmara sob temperatura de 10°C e umidade relativa de 50% até a estabilização do teor de água e, posteriormente, submetida aos testes de germinação e de vigor. A outra porção foi armazenada em ambiente não controlado com temperatura e umidade relativa do ar registradas em termohigrógrafo. Todas as sementes foram expurgadas com gastoxim e tratadas com Thiabendazole e Captan, nas dosagens de 50 e 300g/100 Kg de sementes, respectivamente. Ao final de oito meses de armazenamento, as sementes foram submetidas aos testes de germinação e de vigor. Para as sementes do híbrido triplo, foi adicionalmente determinada a atividade enzimática, por meio de eletroforese da enzima α -amilase. Foi ainda determinado o teor de água das sementes no início da secagem, após os períodos de pré-condicionamento a 35°C e após o período de oito meses de armazenamento.

Foram realizadas as seguintes análises:

a) Teste de germinação (%) - realizado com quatro subamostras de 50 sementes, distribuídas em papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a duas vezes e meia o peso do substrato seco, colocadas para germinar a 25°C; as avaliações foram realizadas no sétimo dia após a semeadura, segundo as Regras para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 1992);

b) Primeira contagem de germinação (%) - realizado aos quatro dias do início do teste de germinação, sendo computadas as plântulas normais que apresentavam duas ou mais raízes seminais

e parte aérea com comprimento mínimo de dois centímetros;

c) Teste de frio (%) – realizado, conforme metodologia proposta por Dias & Barros (1995), com quatro subamostras de 50 sementes distribuídas em caixas plásticas, contendo mistura de areia e terra, recentemente cultivada com milho, na proporção de 2:1 e umidade ajustada para 70% da capacidade de retenção; as caixas foram mantidas a 10°C, em câmara fria, por sete dias e, então, transferidas para câmaras de crescimento a 25°C para a contagem de plântulas emersas no sétimo dia;

d) Teste de comprimento de plântula (mm) - realizado de acordo com Dias & Barros (1995), com quatro subamostras de 10 sementes previamente classificadas (peneira 20), semeadas sobre duas folhas de papel toalha, umedecido com quantidade de água equivalente a duas vezes e meia o peso do substrato seco, e colocadas para germinar a 25°C, durante quatro dias; as sementes foram distribuídas em uma linha traçada a oito centímetros da margem superior do papel, com as radículas voltadas para baixo; após o período no germinador, foram computados os comprimentos das plântulas normais e calculados os comprimentos médios em função do total de sementes;

e) Peso de matéria seca de plântula (mg) - ao final do teste de comprimento, as plântulas normais foram colocadas em sacos de papel, secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até atingirem peso constante; o peso médio foi obtido, dividindo-se o peso total pelo número de sementes instaladas;

f) Teste de condutividade elétrica (μ hos/g.cm) - realizado com quatro subamostras de 25 sementes de massa conhecida em copos plásticos, contendo 75mL de água deionizada, cuja condutividade não excedeu 3 μ hos/cm; as leituras de

condutividade, realizadas após 24 horas de embebição a 25°C, foram realizadas em condutímetro;

g) Análise eletroforética da enzima α -amilase

- as sementes foram amostradas como no teste de germinação; após 70 horas, as plântulas foram retiradas (Rood & Larsen, 1988), liofilizadas, trituradas a frio em moinho refrigerado e armazenadas em freezer a -81°C, em recipiente contendo sílica gel, até o momento das análises. A extração da enzima ocorreu pela adição de 200 μ L de tampão de extração Tris-HCl, 0,2Mol.L⁻¹, pH 8,0, com 0,1g do pó obtido. O homogeneizado foi mantido por 12 horas em geladeira a 5°C, sendo que, após este período, as amostras foram centrifugadas a 16.000xg a 4°C, por 60 minutos. Volumes de 40 μ L do extrato protéico foram aplicados aos géis de poliacrilamida e não géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador-contendo amido) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-Glicina pH 8,9 e as corridas eletroforéticas foram efetuadas a 12mA no gel concentrador e 24mA no gel separador; os géis foram revelados para o sistema α -amilase, em solução tampão de acetato de sódio 50mMol.L⁻¹, pH 5,6 e solução de iodo 10mMol.L⁻¹, contendo iodeto de potássio, 14mMol.L⁻¹, segundo Alfnas (1998);

h) Determinação do conteúdo de açúcares – realizou-se a extração dos açúcares solúveis com duas repetições de 150 a 200mg de embriões. Os embriões foram triturados em mortar, com areia fina lavada, na presença de 1mL de solução de metanol ultrapuro 80%. O conteúdo foi transferido para um microtubo de 2mL, incubados em banho-maria por 15 minutos a 70°C, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C, até a detecção dos conteúdos de açúcares em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Para a detecção em HPLC, as

amostras foram descongeladas, diluídas em água ultrapura para 5mL ou 10mL (em função da concentração inicial) e filtradas em membranas de 0,45mm; utilizando água ultrapura como fase móvel, um volume de injeção de 10µL e fluxo de 1,0mL/minuto. Os açúcares foram separados em coluna Dextrapak, cartucho Waters 8mm x 10cm (Radial-Pak) e analisados em detector de índice de refração (Waters 410), sensibilidade 32 x 20, polaridade positiva; o sistema operou em temperatura ambiente e o padrão interno foi constituído por glicose, sacarose e rafinose; teor de água (%) - determinado pelo método da estufa a 105±3°C, durante 24 horas, utilizando duas subamostras de 50g para cada tratamento, segundo Brasil (1992).

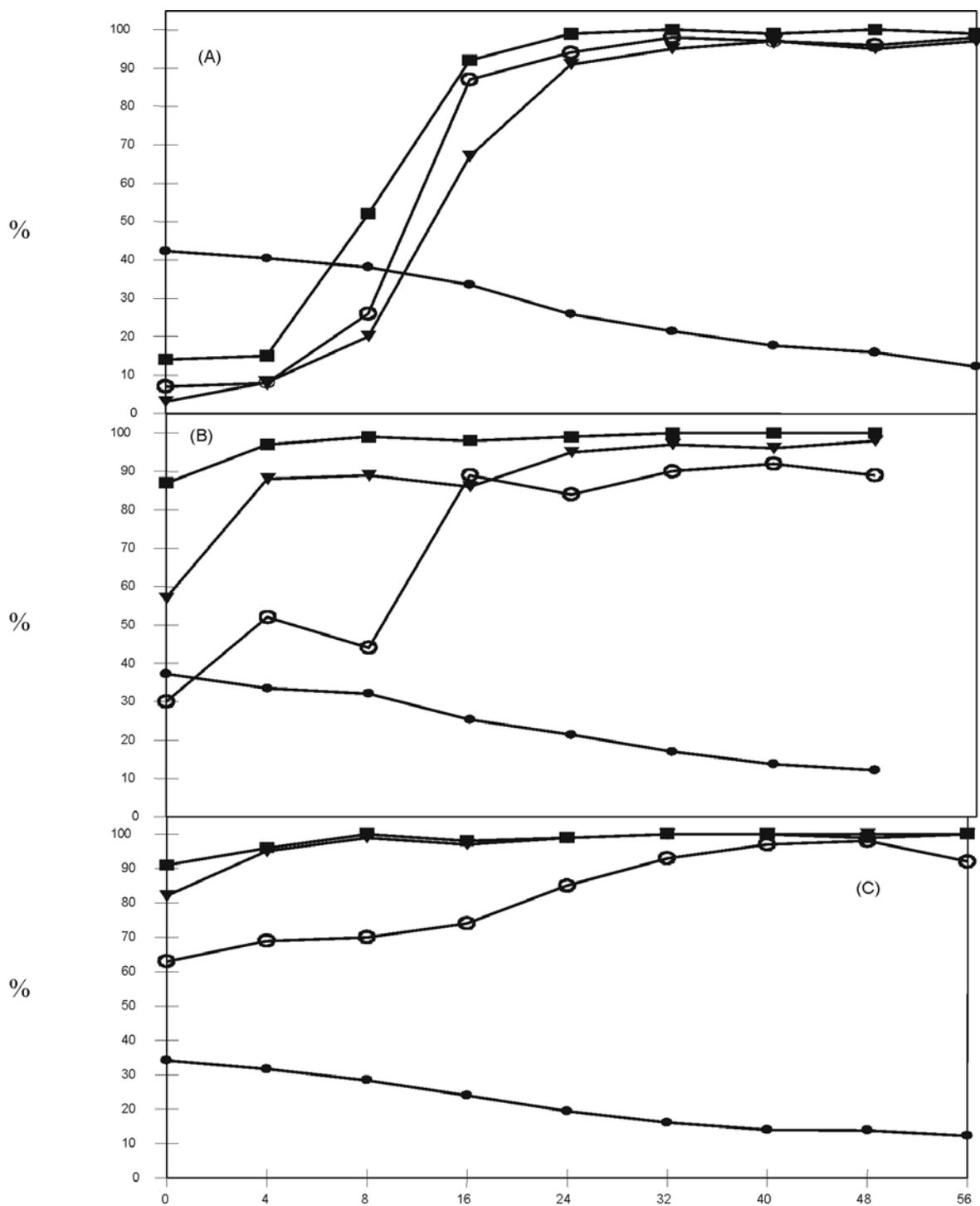
O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 4 repetições e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; os dados em percentagem foram transformados em $[(\text{arc sen } X \cdot 100^{-1/2}) + 0,5]$. A análise dos dados foi realizada por meio do SAS-System for Windows. A testemunha, parte não integrante da estrutura de blocos do experimento, foi individualmente comparada com cada tratamento pelo teste t, com valor de significância protegido pelo processo de Bomferroni (Neter, Wasserman & Kwtner, 1990), para preservar o nível global de confiança das comparações realizadas. Análises de regressão entre os teores de água das sementes e os diversos parâmetros avaliados foram realizadas e, a partir das equações ajustadas, com maiores coeficientes de regressão, foram determinados, algébricamente (pontos de intercepção entre as duas retas ajustadas), os teores de água máximos das sementes (*threshold*) que garantiram subsequente secagem a 50°C, sem causar danos significativos às sementes. Segundo Webster's... (1989), *threshold* é o ponto ou momento, em qualquer processo, no qual um estímulo tem suficiente intensidade

para iniciar ou produzir um efeito. Os valores de germinação, teste de frio e de primeira contagem foram estimados por meio de equações lineares ajustadas, em função do teor de água das sementes (variável independente).

Resultados e Discussão

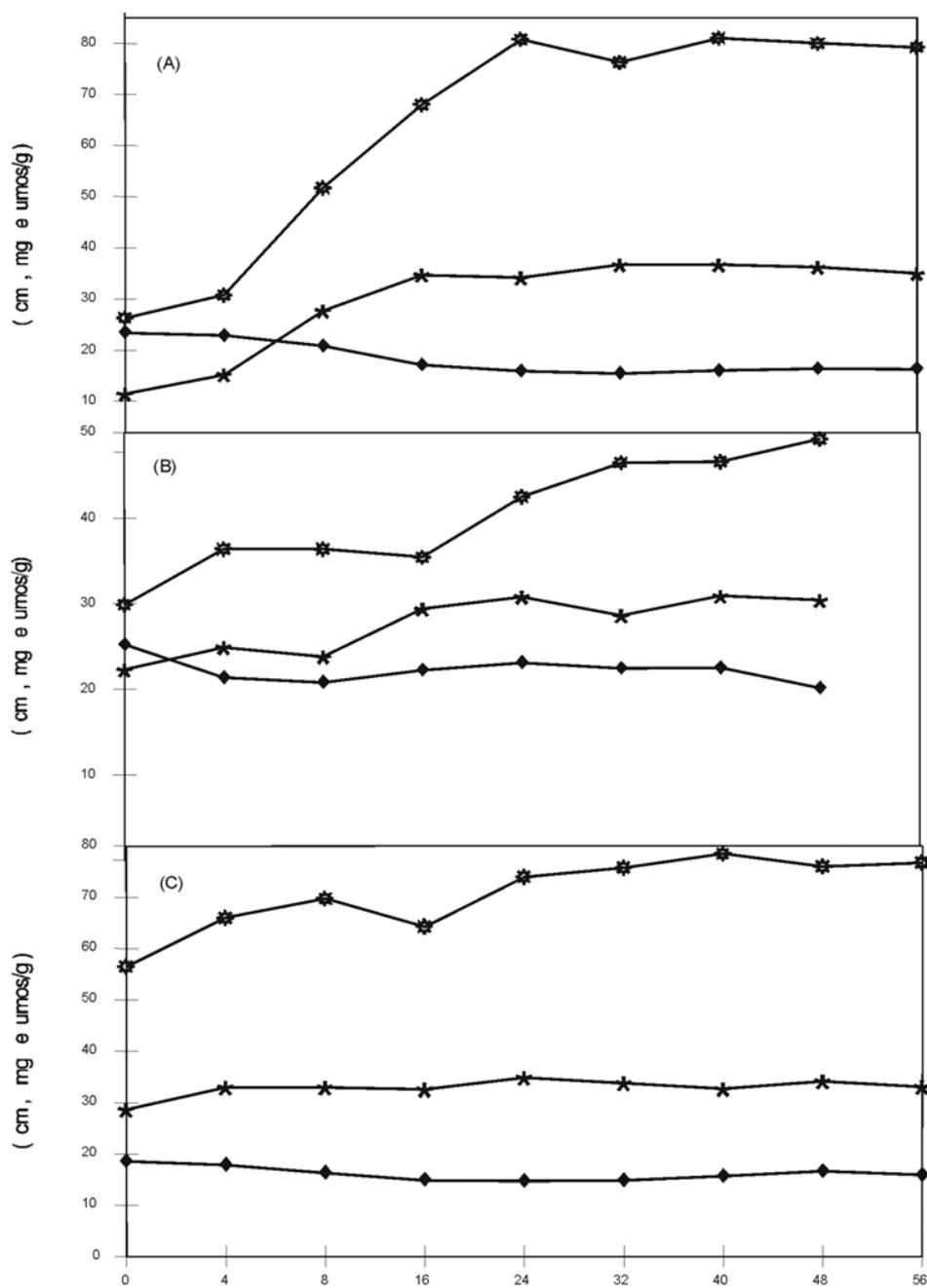
A secagem a 50°C sem o pré-condicionamento a 35°C das sementes recém-colhidas, resultou em danos à germinação e vigor das sementes (Figura 1-coordenadas de abscissa zero). À medida que as sementes foram submetidas ao pré-condicionamento a 35°C, os danos causados à germinação e vigor, pela temperatura de 50°C diminuíram gradativamente, indicando que houve efeito favorável e progressivo na qualidade das sementes, até atingir o maior efeito, avaliado pelos testes de vigor, após 24, 16 e 8 horas quando as sementes com teores de água iniciais de 42,3, de 37,2 e de 34,2% alcançaram respectivamente, teores de água de 25,9, de 25,3, e de 28,5%. Observa-se, ainda, que quanto maior o teor de água das sementes maior é a sua sensibilidade à temperatura de 50°C.

Comparando os resultados do teste de germinação com os dos testes de vigor (Figura 1), observa-se que a aquisição da tolerância a 50°C requereu menores períodos de pré-condicionamento das sementes para alcançarem máximo desempenho germinativo do que para alcançarem máximo vigor. Esse fato foi similarmente observado por Herter & Burris (1989a) e por Navratil & Burris (1984). Esses autores, medindo a tolerância a altas temperaturas por meio dos testes de germinação e de frio, reportaram que altas temperaturas de secagem têm maior efeito sobre a performance das sementes no teste de frio do que no de germinação. A embebição de sementes a baixas temperaturas pode reduzir a germinação (dano de embebição a frio) em decorrência



Número de horas de exposição a 35°C (pré-condicionamento) antes da secagem a 50°C.

Continuação da Figura 1.



Número de horas de exposição a 35°C (pré-condicionamento) antes da secagem a 50°C).

FIGURA 1. Valores médios de germinação (■), de primeira contagem (θ), teste de frio (≡), peso de matéria seca (↔), comprimento de plântula (⚙), condutividade elétrica (▣) e de teores de água (★), das sementes submetidas a crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C, seguidas de secagem a 50°C. A (BRS-3060), B (L161-8A) e C (HS-7213). Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.

de prejuízos causados às membranas (Cal & Obendorf, 1972). Esses fatos indicam, segundo Herter & Burris (1989a), que danos provenientes da secagem ou do frio estão relacionados e, como a secagem a altas temperaturas pode danificar membranas, a tolerância ao frio poderá ser reduzida.

A relação entre danos causados por altas temperaturas e os efeitos do estresse por baixa temperatura pode ser expressada por danos em raízes, comuns em sementes danificadas por secagem (Navratil & Burris, 1984) ou por embebição à baixa temperatura (Cal & Obendorf, 1972). Nos testes de germinação e de comprimento de plântulas, correspondentes às sementes secadas continuamente a 50°C, sem pré-condicionamento, foi observada maior incidência de anormalidades nas raízes principais do que na parte aérea das plântulas (dados não apresentados).

A condutividade elétrica das sementes de todos os tratamentos foi superior à da testemunha (Figura 1). No entanto, as sementes pré-condicionadas por períodos suficientes para indução de tolerância a 50°C, não apresentaram danos nas membranas, como verificado nos demais testes de vigor. Por outro lado, as sementes secadas continuamente a 50°C apresentaram os maiores valores de condutividade elétrica e os menores de germinação e de vigor. Esses resultados concordam com os de diversos autores, que consideraram membranas celulares como sendo o local primário de danos induzidos por secagem em estádios intolerantes à dessecação (Koster & Leopold, 1988; Herter & Burris, 1989a; Chen & Burris, 1990; Crowe *et al.*, 1997; Hoekstra *et al.*, 1997 e Rosa *et al.*, 2000a).

Na Figura 2, encontram-se os valores obtidos nos testes de germinação e de frio das sementes secadas a 50°C após crescentes períodos

de pré-condicionamento, bem como as equações lineares ajustadas destes valores em função do teor de água das sementes no início da secagem a 50°C. Observam-se dois estágios distintos: o primeiro, em que a qualidade das sementes submetidas a 50°C aumentou linearmente com as reduções de teor de água e o segundo, após o alcance da máxima qualidade fisiológica, representado pela reta paralela ao eixo X, em que os valores médios já não apresentavam diferenças entre si ou com os da testemunha. Na Tabela 1, estão representados os parâmetros das regressões lineares e de ajuste das equações das retas representativas dos dois estágios identificados. As equações foram ajustadas em função dos teores de água e estimou-se, algebricamente, os teores de água máximos (*thresholds*) requeridos para que as sementes atingissem a máxima qualidade, avaliada pelos testes de germinação, de frio e de primeira contagem.

Observa-se pela Tabela 1 que as correlações (valores de R^2) entre os teores de água e os parâmetros de qualidade das sementes foram maiores para as sementes colhidas com 42,3% de teor de água (BRS-3060), seguidos das colhidas com 37,2 e 34,2% de teor de água, demonstrando a influência do teor de água das sementes no pré-condicionamento das mesmas. Sementes colhidas com 42,3% de teor de água adquiriram máxima tolerância a 50°C quando atingiram teores de água estimados de 31,8, 26,7 e 25,3%, conforme observado pelos resultados dos testes de germinação, de frio e de primeira contagem, respectivamente. Sementes colhidas com o menor teor de água (34,2%), aparentemente já haviam avançado em seu processo natural de aquisição de tolerância à dessecação ainda na planta mãe.

Quanto maior o valor absoluto do coeficiente angular da reta representativa do primeiro estágio (Tabela 1 e Figura 2), mais efetivo é o pré-condicionamento para promover a aquisição

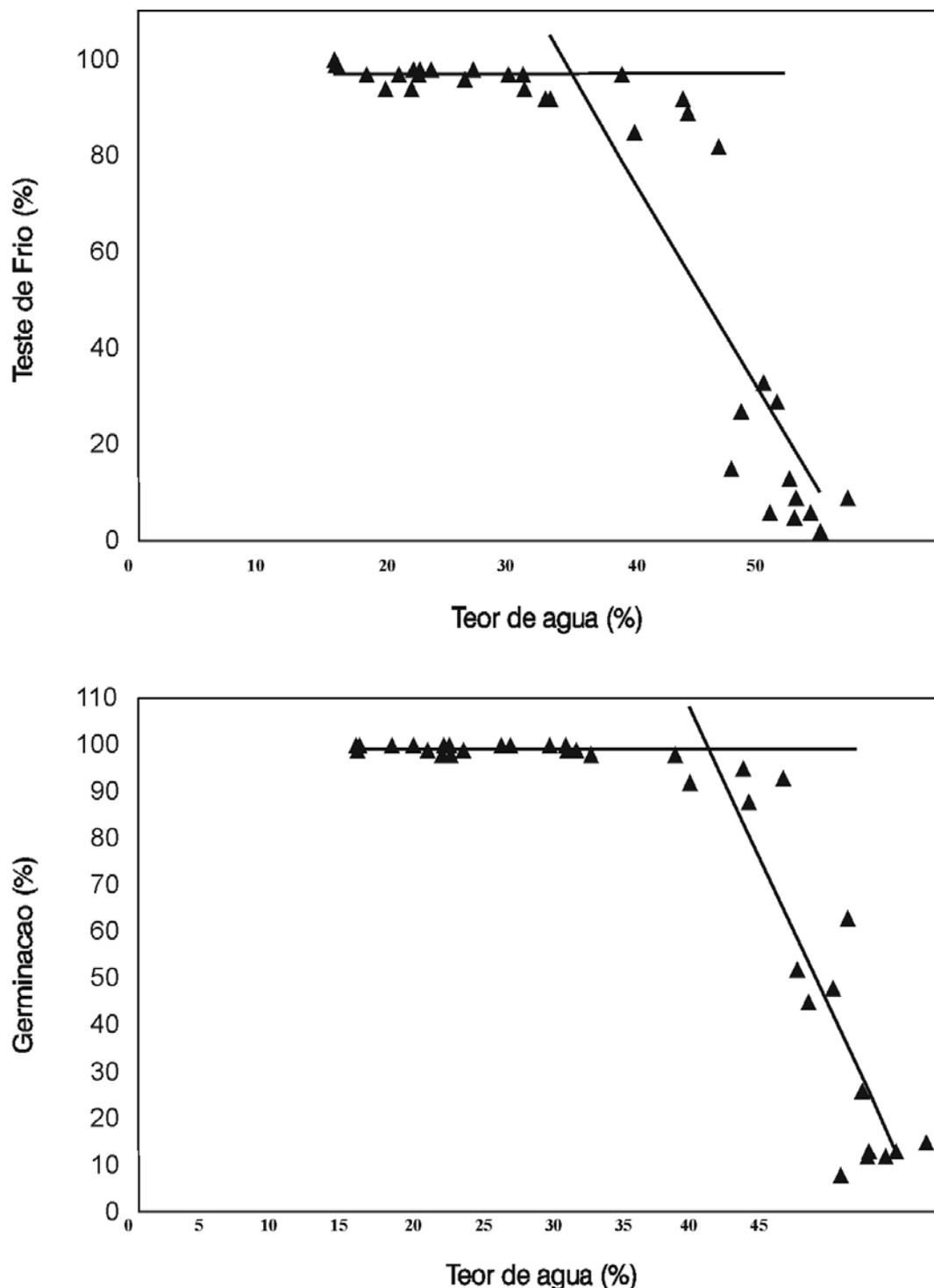


FIGURA 2. Dados originais (▲) e dados ajustados por regressões lineares, obtidos pelo teste de frio e de germinação de sementes de milho (BRS-3060) com diferentes teores de água, submetidas a crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C, seguidas de secagem a 50°C. Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.

TABELA 1. Parâmetros das regressões lineares e estimativas dos máximos teores de água (thresholds), após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C, requeridos para a aquisição de tolerância à secagem das sementes a 50°C. Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.

Eixo X	Eixo Y	Cultivar	Parâmetros da regressão linear						Threshold (estimativas)	
			Primeiro estágio ⁽¹⁾			Segundo estágio ⁽²⁾			Variável (eixo Y) (%)	Teor de água (%)
			Intercepção	Inclinação	R ²	Intercepção	Inclinação	R ²		
	Germinação	BRS-3060 L161-8A HS7213	361,052 177,939 131,217	-8,249 -2,451 -1,143	0,88 0,41 0,26	99,317 101,617 101,176	-0,018 -0,151 -0,127	0,01 0,39 0,37	98,733 96,614 97,420	31,8 33,2 29,6
Teor de água (%)	Teste de frio	BRS-3060 L161-8A HS7213	246,050 206,318 200,635	-5,604 -4,766 -4,289	0,91 0,77 0,54	97,630 98,597 103,188	-0,038 -0,631 -0,975	0,01 0,31 0,28	96,630 82,149 74,507	26,7 26,1 29,4
	Primeira contagem	BRS-3060 L161-8A HS7213	229,079 131,068 158,620	-5,319 -1,618 -2,130	0,86 0,48 0,26	97,526 98,435 102,866	-0,117 -0,139 -0,245	0,04 0,03 0,05	94,569 95,371 95,626	25,3 22,1 29,6

1. Estágio de crescimento linear da qualidade das sementes

2. Estágio de estabilização da qualidade das sementes

de tolerância a 50°C. Observa-se, para as sementes colhidas com 42,3% (BR-3060) de teor de água, que a tolerância foi detectada mais precocemente pelo teste de germinação (coeficientes angulares de 8,249) do que pelo de frio (coeficientes angulares de 5,604).

Outro dano, aparentemente causado às sementes secadas a 50°C ou sem pré-condicionamento suficiente para obtenção da tolerância, foi observado na análise eletroforética da enzima α -amilase (Figura 3). Nessa análise, a atividade da enzima é evidenciada nos géis por bandas claras em fundo azulado, pela reação do iodo com a amilose (revelação negativa). A atividade da α -amilase aumentou com a elevação dos períodos de pré-condicionamento, à medida que as sementes

adquiriram tolerância a 50°C. Para que a germinação e o crescimento de plântulas de milho possam ocorrer após a embebição das sementes, a secagem é necessária para sensibilizar a camada de aleurona ao ácido giberélico e ativar a síntese de α -amilase (Oishi & Bewley, 1990; Rosa *et al*, 2000b). Embora as sementes secadas continuamente a 50°C tenham sofrido redução do teor de água até próximo de 12%, estas não apresentaram a mesma atividade enzimática das sementes que haviam adquirido tolerância à alta temperatura, indicando que os danos causados às sementes, em estádios intolerantes, parecem estar relacionados à síntese das enzimas necessárias à degradação do amido para a retomada do crescimento do embrião.

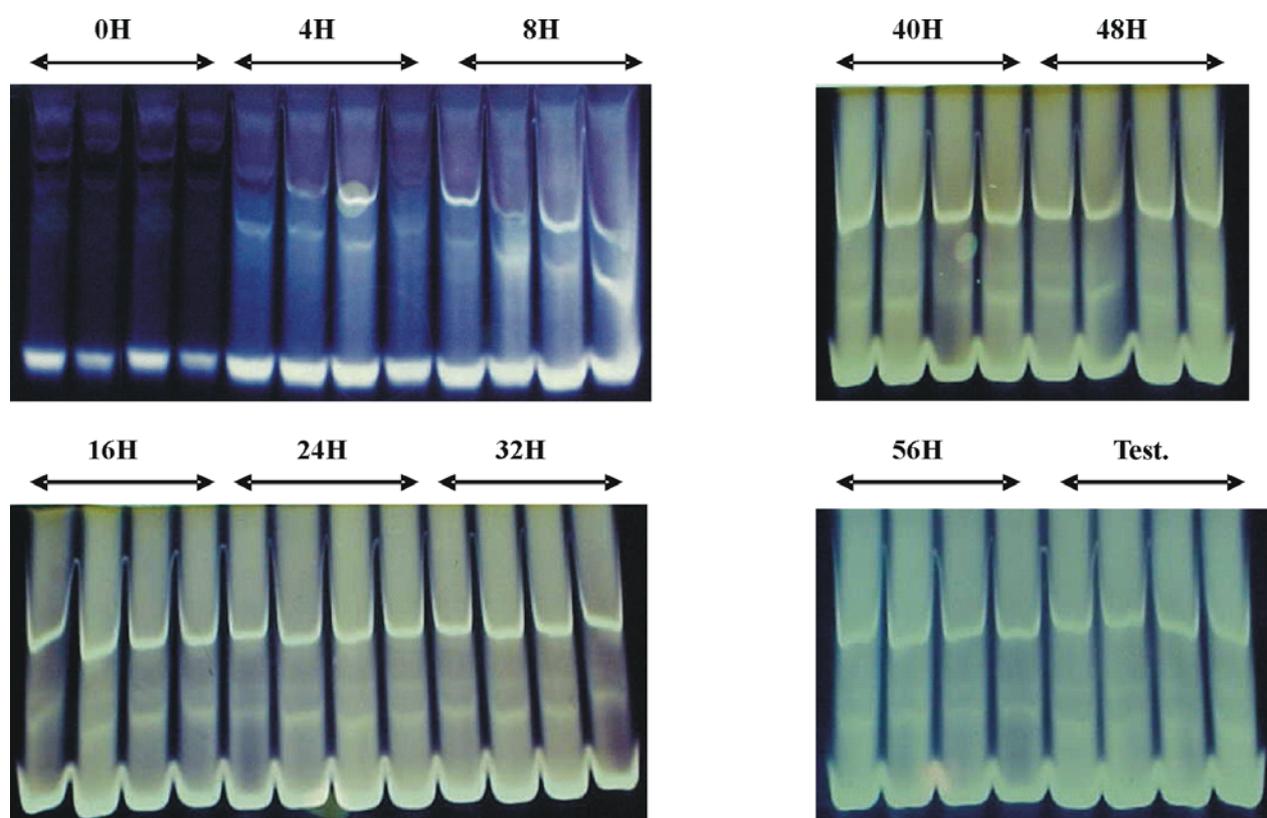


FIGURA 3. Padrão eletroforético da enzima α -amilase em plântulas oriundas de sementes de milho (cultivar BRS-3060) submetidas a crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C, seguidas de secagem a 50°C. Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.

A Tabela 2, representativa dos conteúdos médios dos açúcares detectados nos embriões das sementes colhidas com 37,2% de teor de água (L161-8A), conforme os períodos de pré-condicionamento, indica que, nos embriões das sementes secadas a 50°C, sem pré-condicionamento, ou pré-condicionadas por quatro horas (período insuficiente para a aquisição da tolerância a 50°C), foram detectados glicose e sacarose, sem a presença de rafinose. O teor de rafinose aumentou à medida que o período de pré-condicionamento foi ampliado para 16 e 24 horas, demonstrando que, aparentemente, ocorreu o acúmulo de rafinose necessário à aquisição de tolerância a 50°C. A sacarose, presente nos embriões intolerantes a 50°C (Figura 4), aparentemente, apresentou redução no conteúdo com a diminuição do teor de água. Bochicchio *et al.* (1996) concluíram que o conteúdo de sacarose não interfere na aquisição de tolerância à dessecação em embriões

de milho. Brenac *et al.* (1997) também verificaram uma correlação entre o acúmulo de rafinose e a aquisição de tolerância à secagem a 50°C, sendo que a aquisição da tolerância foi dependente da existência de razão sacarose:rafinose inferior a 10:1.

Os resultados dessa pesquisa confirmam, também, os obtidos por Chen & Burris (1990), pois verificaram decréscimo nos teores de monossacarídeos e aumento nos teores de oligossacarídeos concomitantes ao aumento à elevação da tolerância das sementes de milho a 50°C, concluindo que uma proporção de 9% de rafinose em relação à sacarose, parece ser importante na indução de tolerância a altas temperaturas.

A secagem lenta realizada durante o pré-condicionamento proporcionou mudanças nos conteúdos de açúcares nos embriões. Essa vantagem da secagem lenta foi observada por Wolkers *et al.* (1998) ao submeterem embriões

TABELA 2. Conteúdos médios de glicose, sacarose e rafinose presentes nos embriões das sementes de milho (cultivar L161-8A) submetidas a crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C. Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.

Período de Secagem ⁽¹⁾ (h)	Glicose (mg/g) ⁽²⁾	Sacarose (mg/g) ⁽²⁾	Rafinose (mg/g) ⁽²⁾	Raf/Sacm (%)
0H	2,227	51,039	0,000	0,000
4H	1,757	44,994	0,000	0,000
8H	1,853	61,320	0,739	1,206
16H	0,864	46,015	2,228	4,840
24H	0,413	42,765	12,942	30,264
32H	0,000	30,473	13,370	43,874
40H	0,000	31,169	12,595	40,409
48H	0,000	35,228	15,433	43,810
Testemunha	0,000	53,451	9,941	18,600

1. Período de pré-condicionamento à 35°C.

2. Miligramas por grama de peso seco de embrião.

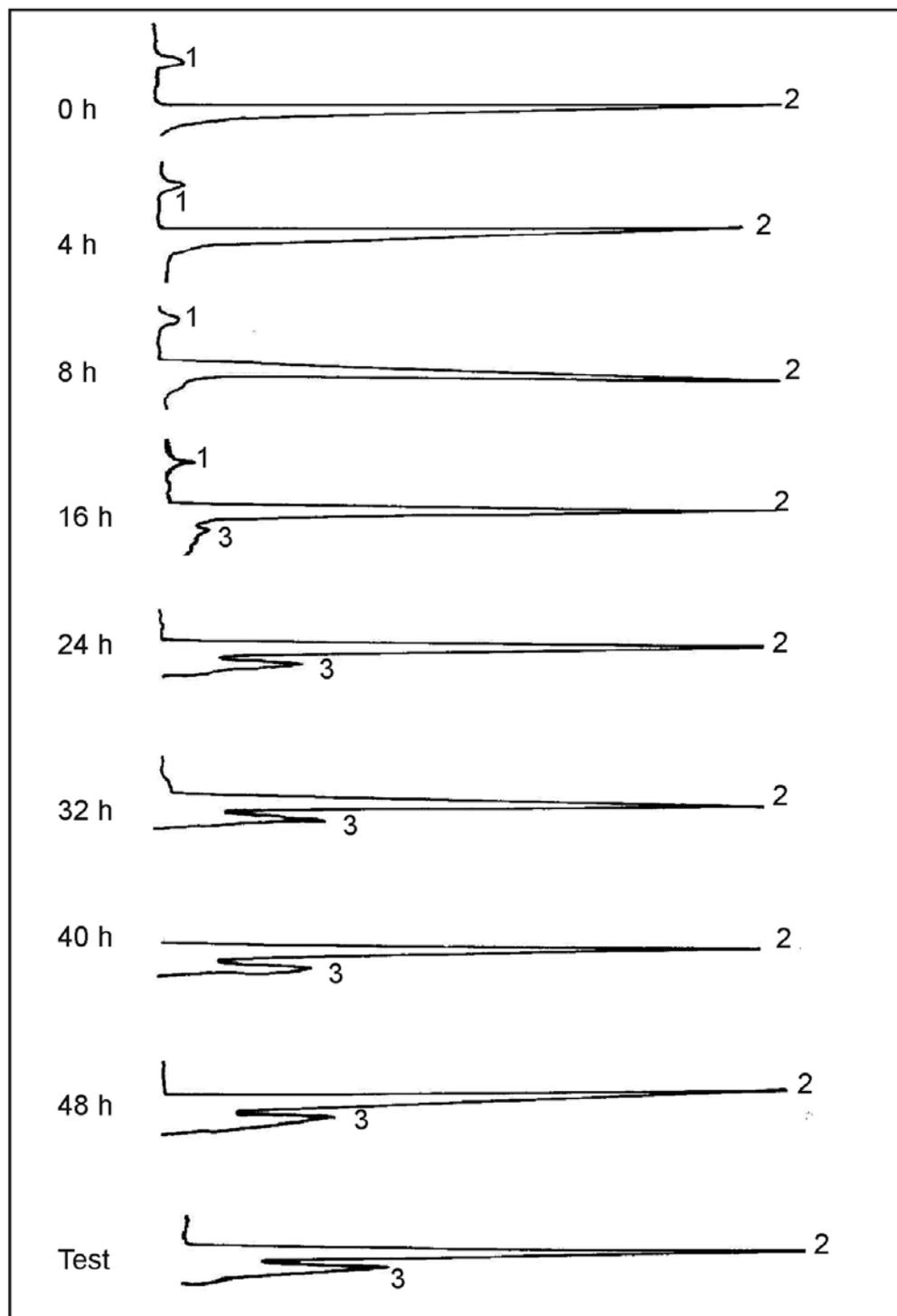
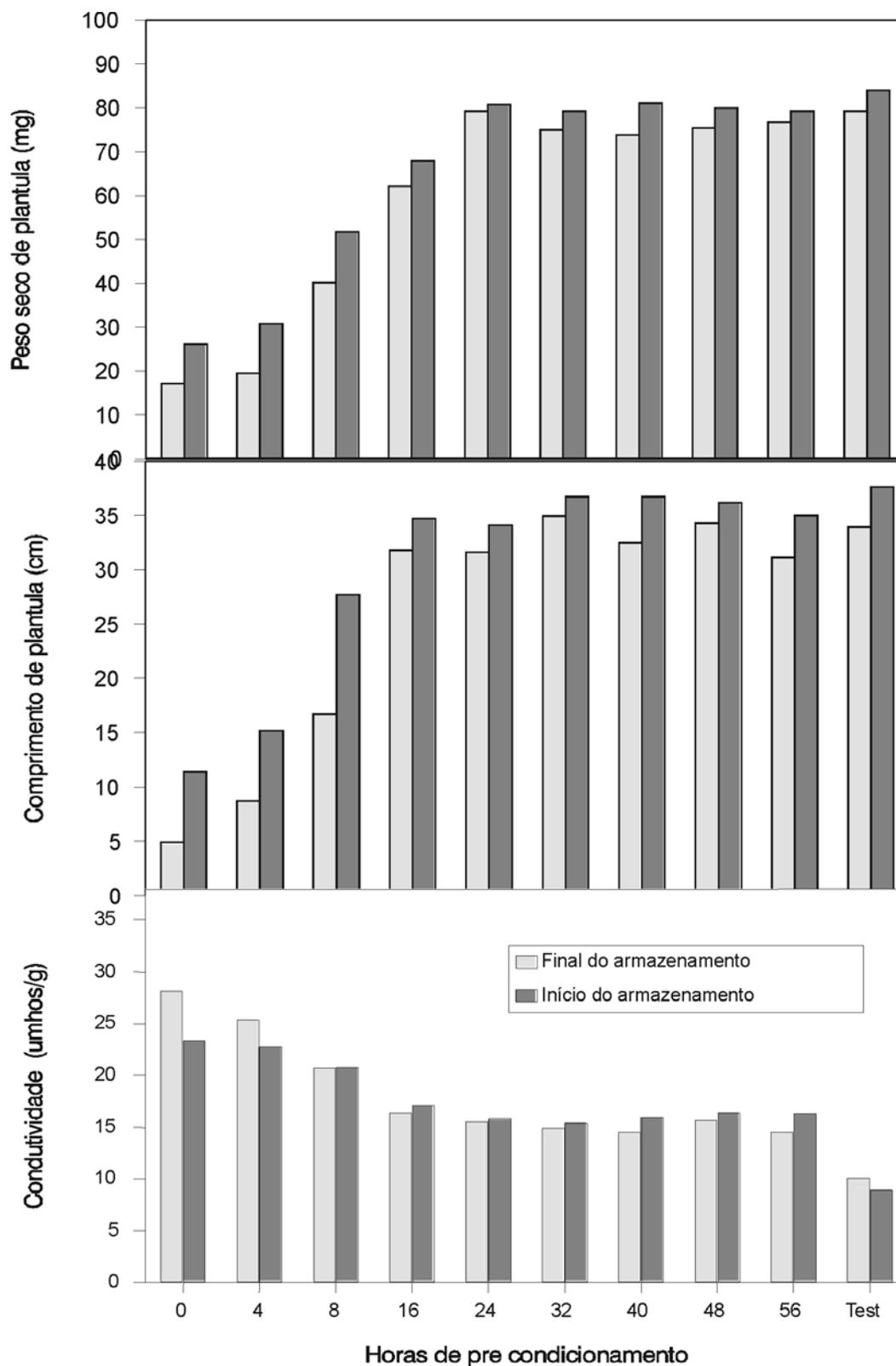


FIGURA 4. Cromatogramas das análises de açúcares (1.glicose; 2.sacarose; 3.rafinose) presentes em embriões de sementes de milho (cultivar L161-8A), submetidas a crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C, seguidas de secagem a 50°C. Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.



Continuação da Tabela 5.

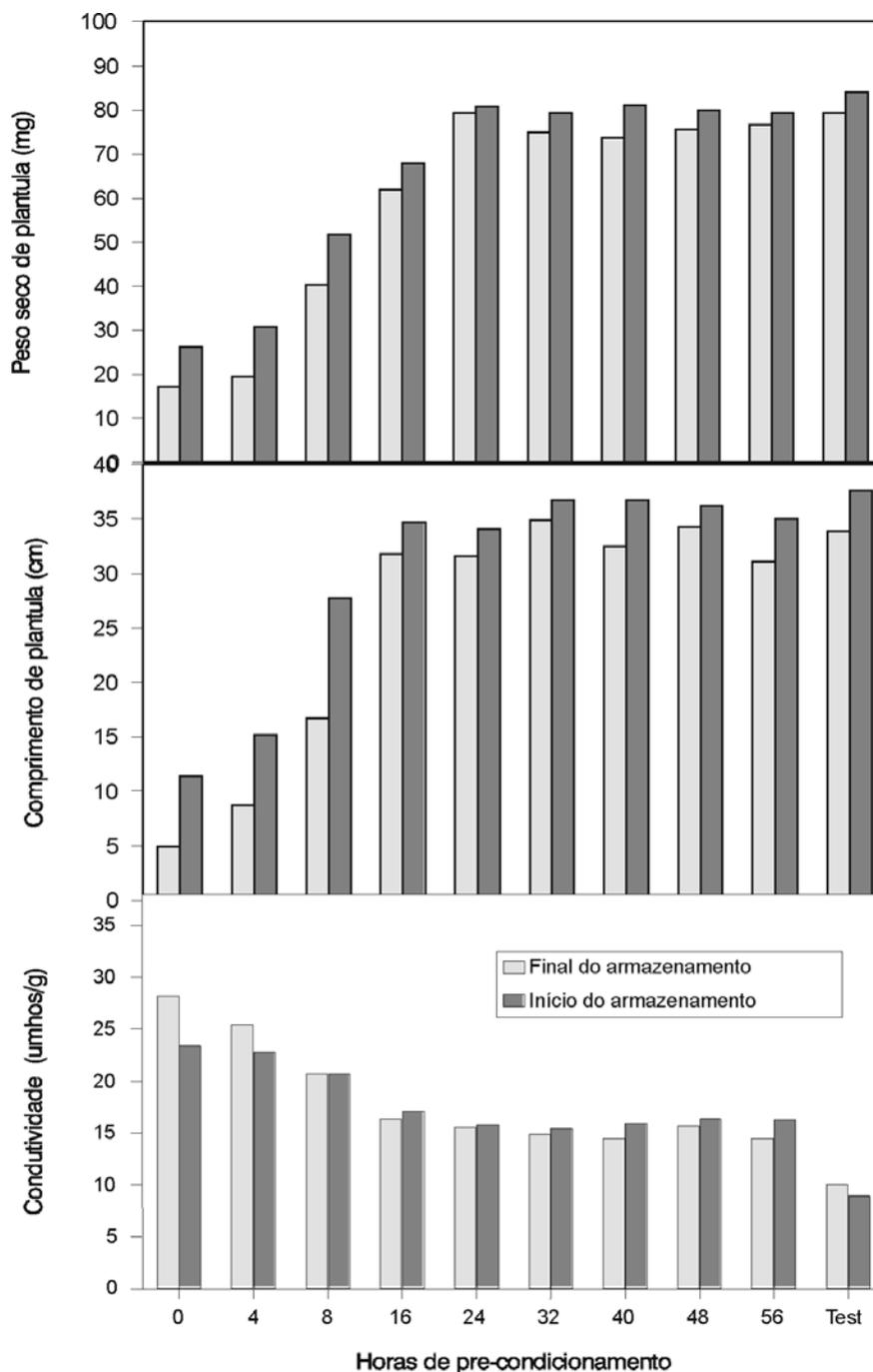


FIGURA 5. Valores médios, no início e após oito meses de armazenamento, obtidos nos testes de germinação, de primeira contagem, de frio, de conteúdo de matéria seca da plântula, de comprimento de plântula e de condutividade elétrica, de sementes de milho (cultivar BRS-3060), submetidas a crescentes períodos de pré-condicionamento, seguidos de secagem a 50°C. Embrapa/UFLA, Lavras – MG, 2003.

de milho, imaturos e intolerantes à dessecação, à retirada lenta de água. Essa ocorrência, segundo os autores, envolveram a síntese de sacarose e rafinose e o aumento relativo na presença de proteínas com estruturas secundárias α -hélice, de modo semelhante ao perfil observado em sementes maduras e tolerantes à dessecação. Borowski, Fritz & Waters (1995) concluíram que a secagem lenta proporcionou acúmulo de dissacarídeos e oligossacarídeos e redução de monossacarídeos em sementes de milho doce.

Após oito meses de armazenamento, todas as sementes apresentaram decréscimo na qualidade, como pode ser observado na Figura 5, para as sementes da cultivar BRS-3060. As sementes da testemunha, secadas à sombra e armazenadas nas mesmas condições que as dos demais tratamentos, também apresentaram deterioração. No entanto, as sementes intolerantes a 50°C, apresentaram maiores reduções nos valores de germinação, de primeira contagem, de peso de matéria seca, de comprimento de plântula e de condutividade elétrica, do que as tolerantes. Já pelo teste de frio, os valores observados após o armazenamento foram maiores do que no início em alguns tratamentos. Essa ocorrência pode ser devido a uma redução da patogenicidade de fungos, conforme também observado por Von Pinho (1999). O fato de sementes tolerantes a 50°C terem apresentado menor redução na qualidade, em relação às intolerantes indica que as mudanças proporcionadas às sementes, durante o pré-condicionamento, parecem ter dotado as sementes de mecanismos de proteção no estado seco (Bernal-Lugo & Leopold, 1995; Kigel & Galili, 1995; Borowski *et al.*, 1995; Hoekstra *et al.*, 1996).

O pré-condicionamento a 35°C parece ter simulado os processos que normalmente ocorrem na planta, permitindo que os mecanismos

de tolerância à dessecação tornem-se ativos ou sejam impostos às sementes. Chen & Burris (1990) demonstraram que sementes de milho, colhidas em estágio próximo ao da maturidade fisiológica, podem tolerar a secagem a temperaturas moderadas, embora apresentem-se intolerantes a altas temperaturas ou à secagem excessivamente lenta. Herter & Burris (1989b) reportaram que sementes de milho, colhidas com teor de água de 48%, requereram secagem inicial a 35°C (23 a 40 horas), para atingirem teores de água de 30 a 39% e adquirirem tolerância a 50°C. Segundo os autores, os processos que ocorrem nas fases finais da maturação tornam as sementes cada vez mais tolerantes a temperaturas mais elevadas.

Portanto, se a secagem lenta artificial de milho em espigas pode propiciar a ocorrência de mudanças que tornem as sementes mais tolerantes a temperaturas mais elevadas, o pré-condicionamento pode representar vantagens para o produtor de sementes, uma vez que possibilita a retirada das sementes do campo logo após a maturidade fisiológica.

Conclusões

Sementes de milho, submetidas à secagem sob 50°C, apresentam, em estádios intolerantes à dessecação, menor germinação, vigor e atividade da enzima α -amilase e, em estádios tolerantes, valores similares aos das sementes secadas à sombra.

Pré-secagem inicial a 35°C (pré-condicionamento) induz tolerância a 50°C, adquirida progressivamente à medida que as sementes de milho perdem água até teores de água em torno de 27%.

Decréscimo no conteúdo de glicose e acréscimo no de rafinose, após pré-secagem a 35°C, estão associados à proteção das sementes com altos teores de água dos danos causados por

secagem a 50°C, ao passo que mudanças em conteúdos de sacarose parecem não estar relacionadas à aquisição dessa tolerância.

Literatura Citada

ALFENAS, A. C. **Eletoforese de izoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ARMSTRONG, C.; BLACK, M.; CHAPMAN, J. M.; NORMAN, H. E.; ANGOLD, R. The induction of sensitivity to gibberellin in aleurone tissue of developing wheat grains. I. The effect of dehydration. **Planta**, Berlin, v. 154, n. 6, p. 573-577, 1982.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A. C. Seed stability during storage: raffinose content and seed glassy state. **Seed Science Research**, Oxon, v. 5, p. 75-80, 1995.

BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 30, p. 195-238, 1979.

BEWLEY, J. D.; KERMODE, A. R.; MISRA, S. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA syntheses. **Annals of Botany**, London, v. 63, n. 1, p. 3-17, 1989.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p. 630-638, 1995.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean

seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 225-230, 1992.

BOCHICCHIO A.; RIZZI E.; BALCONI C.; VERNIERI P.; VAZZANA C. Sucrose and raffinose contents and acquisition of desiccation tolerance in immature maize embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 123-126, 1994.

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: ELLIS, R. H.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. (Ed.). **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 1-12 (Current Plant Sciences and Biotechnology in Agriculture, 30).

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**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 63-67, 1994.

BOROWSKI, A. M.; FRITZ, V. A.; WATERS JR., L. Seed maturity and desiccation affect carbohydrate composition and leachate conductivity in shrunken-2 sweet corn. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 7, p. 1396-1399, 1995.

BRASIL. Ministerio da Agricultura e Reforma Agraria. Secretaria Nacional de Defesa Vegetal. Coordenacao de Laboratorio Vegetal. **Regras para analise de sementes**. Brasilia, 1992. 365 p.

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**, Stuttgart, v. 150, n. 4, p. 481-488, 1997.
- BRUNI, F.; LEOPOLD, A. C. Cytoplasmatic glass formation in maize embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, p. 251-253, 1992.
- BURRIS, J. S.; PETERSON, J. M.; PERDOMO, A. J.; FENG, D. S. Morphological and physiological changes associated with desiccation in maize embryos. In: ELLIS, R. H.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 103-111.
- CAFFREY, M.; FONSECA, V.; LEOPOLD, A. C. Lipid-sugar interactions: relevance to anhydrous biology. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 86, p. 754-758, 1988.
- CAL, J. P.; OBENDORF, R. L. Imbibitional chilling injury in *Zea Mays* L. altered by initial kernel moisture and maternal parent. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 369-373, 1972.
- CHEN, Y.; BURRIS, J. S. Desiccation tolerance in maturing maize seed: membrane phospholipid composition and thermal properties. **Crop Science**, Madison, v. 30, 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, p. 971-975, 1990.
- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A.; WISTROM, C. A. Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: the problem of imbibition damage in dry organisms. In: STANWOOD, P. C.; McDONALD, M. B. (Ed.). **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.1-22. (CSSA Special Publication, 14).
- CROWE, J. H.; OLIVER, A. E.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: The role of vitrification. **Cryobiology**, New York, v. 35, p. 20-30, 1997.
- DASGUPTA, J.; BEWLEY, J. D. Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development causes a switch from a developmental pattern of protein synthesis to a germination pattern. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, n. 4, p. 1224-1227, 1982.
- DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 43 p. (IAPAR.Circular, 88).
- 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.
- HERTER, U.; BURRIS, J. S. Evaluating drying injury on corn seed with a conductivity test. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 17, p. 625-638, 1989a.
- HERTER, U.; BURRIS, J. S. Preconditioning reduces the susceptibility to drying injury in corn seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 69, p. 775-789, 1989b.
- HOEKSTRA, F. A. Sugars, the glassy state and membrane stabilization. In: WORKSHOP ON IMPROVED METHODS FOR HANDLING AND STORAGE OF INTERMEDIATE/RECALCITRANT TROPICAL FOREST TREE SEEDS, 1995, Humleba. **Proceedings...** Rome: International Plant Genetic resources Institute, 1996. p.74-82. Editado por A.S. Ouédraogo, K. Poulsen, F. Stubsgaard.

- HOEKSTRA, F. A.; van ROEKEL, T. Desiccation tolerances of *Papaver dubium* during its development in the anther. Possible role of phospholipid composition and sucrose content. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, p. 626-632, 1988.
- HOEKSTRA, F. A.; WOLKERS, W. F.; BUITINK, J.; GOLOVINA, E. A.; CROWE, J. H. & CROW, L. M. Membrane stabilization in the dry state. **Comparative Biochemistry And Physiology**. Part A, Physiology, New York, v. 117A, n. 3, p. 335-341, 1997.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R. L. Seeds desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols - review and survey. **Seed Science Research**, Oxon, v. 4, p. 385-405, 1994.
- KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. Development seeds of *Ricinus communis* L when detached and maintained in atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 3, p. 702-707, July 1989.
- KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.
- KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 4, p. 829-832, Dec. 1988.
- LEPRINCE, O.; ATHERTON, N. M.; DELTOUR, R.; HENDRY, G. A. F. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. An electron paramagnetic resonance study. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 4, p. 1333-1339, 1994.
- LEPRINCE, O.; WERF, A. van der; DELTOUR, R.; LAMBERS, H. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.85, n.4, p.581-588, Apr. 1992.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; HENDRY, G. A. F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.) **New Phytologist**, London, v. 116, n. 4, p. 573-580, Dec. 1990.
- LEPRINCE, O.; VERTUCCI, C. W.; HENDRY, G. A. F.; ATHERTON, N. M. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 233-240, 1995.
- MISRA, S.; KERMODE, A.; BEWLEY, J. D. Maturation drying as the "switch" that terminates seed development and promotes germination. In: VLOTEN-DOTING, L. van; GROOT, G. S. P.; HALL, T. C. (Ed.). **Molecular form and function of the plant genome**. New York: Plenum Press, 1985. p. 113-128. (Nato ASI Series).
- Falta autoria Maturation drying as the "switch" that terminates seed development and promotes germination. In: autoria do livro. Título do livro **falta local; editora e data** p.113-128.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 159-161, 1982.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. The effect of drying temperature on corn seed quality.

- Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 64, p. 487-496, 1984.
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KWTNER, M. H. **Applied linear statistical models regression: analysis of variance and experimental designs**. Burr Ridge: Irwin, 1990. 1181 p.
- NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2000.
- OISHI, M.Y.; BEWLEY, J. D. Distinction between the responses of developing maize kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability, α -amylase activity, and abscisic acid content. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, n. 2, p. 592-598, 1990.
- ROOD, S. B.; LARSEN, K. M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal Experimental Botany**, London, v. 39, n. 199, p. 223-233, 1988.
- ROSA, S. D. V. F.; PINHO, E. V. R. VON; VIEIRA, M. G. G. C.; VEIGA, R. D. Eficácia do teste de condutividade elétrica para uso em estudos de danos de secagem em sementes de milho (*Zea mays*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 54-63, 2000a.
- ROSA, S. D. V. F.; PINHO, E. V. R. VON.; VIEIRA, M. G. G. C.; SANTOS, C. D.; VEIGA, R. D. Qualidade fisiológica e enzimática em sementes de milho submetidas a secagem artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 177-184, 2000b.
- SANHEWE, A. J.; ELLIS, R. H. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. I. Ability to Germinate and to tolerate desiccation. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, p. 949-958, 1996.
- SUN, W. Q.; IRVING, T. C.; LEOPOLD, A. C. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, p. 621-628, 1994.
- THOMANN, E. B.; SOLLINGER, J.; WHITE, C.; RIVIN, C. J. Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. Roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 607-614, 1992.
- WEBSTER'S Encyclopedic Unabridged Dictionary of the English Language. New York: GRAMERCY BOOKS, 1989. 1693 p. Thresholds, p.1479.
- WILLIAMS, R. J.; LEOPOLD, A. C. Changes in glass transition temperatures in germinating pea seeds. **Seed Science Research**, Oxon, v. 5, p. 117-120, 1995.
- WOLKERS, W. F.; BOCHICCHIO, A.; SELVAGGI, G.; HOEKSTRA, F. A. Fourier transform infrared microscopy detects changes in protein secondary structure associated with desiccation tolerance in developing maize embryos. **Plant. Physiology**, Rockville, v. 116, p. 1169-1177, 1998.