



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL

AGRONOMIA

ISIS BRUNA PORTOLAN

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ANATÔMICAS, BIOQUÍMICAS E
FISIOLÓGICAS EM PLÂNTULAS DE MILHO HÍBRIDO E CRIOULO
SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

LARANJEIRAS DO SUL

2017

ISIS BRUNA PORTOLAN

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ANATÔMICAS, BIOQUÍMICAS E
FISIOLÓGICAS EM PLÂNTULAS DE MILHO HÍBRIDO E CRIOULO
SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do
grau de bacharel em Agronomia da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luisa Helena Cazarolli

LARANJEIRAS DO SUL

2017

ISIS BRUNA PORTOLAN

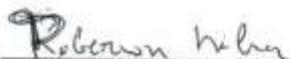
**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ANATÔMICAS, BIOQUÍMICAS E
FISIOLÓGICAS EM PLÂNTULAS DE MILHO HÍBRIDO E
CRIOULO SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Laranjeiras do Sul (PR).

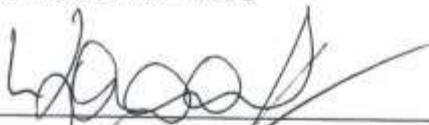
Orientadora: Pro^{fa} Dra. Luisa Helena Cazarolli.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:
03/02/2017

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberson Dibax - UFFS



Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome - UFFS



Eng. Agrônomo Tiago Scolari - UFFS

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

PORTOLAN, ISIS BRUNA
ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ANATÔMICAS, BIOQUÍMICAS E
FISIOLÓGICAS EM PLÂNTULAS DE MILHO HÍBRIDO E CRIOULO
SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS / ISIS BRUNA
PORTOLAN. -- 2017.
63 f.:il.

Orientador: LUISA HELENA CAZAROLLI.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
aGRONOMIA , Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. Zea mays. 2. variedades tradicionais. 3.
agricultura familiar. 4. estresse por temperatura. 5.
espécies reativas de oxigênio. I. CAZAROLLI, LUISA
HELENA, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

*A minha filha Marina, motivo de todo
meu esforço, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o dom da sabedoria e iluminar meus passos até aqui e daqui para frente.

A minha família, especialmente minha mãe Santina, seu marido Osvaldir e a minha avó Elza por me apoiarem em tudo que precisei, sempre. Minha filha Marina e minhas irmãs lindas Izabela e Izadora.

Aos meus professores orientadores, Prof^a Luisa Cazarolli e Prof. Lisandro Bonome, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados. Aprendi muita coisa com vocês e espero continuar aprendendo. Tenho além de professores, amigos que tenho certeza que posso contar sempre.

Ao Prof. Roberson Dibax pelos puxões de orelha que sempre foram de grande valia.

Ao colega Tiago Scolari, pela participação na minha banca, sendo muito gentil por deixar seus trabalhos para que eu pudesse contar com ele na data solicitada.

A todos os meus professores da graduação, que direta ou indiretamente, me prepararam para este momento.

Aos meus colegas, que ajudaram no projeto de pesquisa que foi a inspiração deste trabalho de conclusão de curso. Alguns permaneceram por pouco tempo, mas todos foram importantes para o resultado final. Esperando não esquecer de ninguém, agradeço aos colegas Diogo Siqueira, Yasmin Tomazi, Lucas Peruzzo, Jacson Prazeres, Fernando Trevisan, Luan Pereira, Keidima Leite, Jonatan Martins, Idaiane Ribeiro, Igor Jordão. Obrigada de coração!

Ao meu namorado Paulo Cesar, pela ajuda, incentivo e carinho.

Aos meus colegas e amigos Dalila, Dieni e Danilo, vocês são demais! Serão ótimos profissionais. Espero ter vocês sempre comigo!

Aos agricultores familiares, por continuarem propagando as sementes de variedades crioulas, fazendo de suas propriedades berços da biodiversidade.

A UFFS, por me proporcionar um curso de graduação de qualidade e anos incríveis de experiência e aprendizado.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar as alterações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas na germinação e no vigor de sementes de milho híbrido e crioulo submetidas a diferentes temperaturas. O estudo foi realizado nos Laboratórios de Crescimento e Fisiologia Vegetal da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Laranjeiras do Sul, Paraná. Foram utilizadas sementes de milho crioulo e híbrido. As sementes de milho crioulo (variedades MPA1 e Catarina) foram provenientes do MPA - Movimento dos Pequenos Agricultores, do município de Porto Barreiro, Paraná. As sementes de milho híbrido (cultivares Herculex® e Convencional) foram adquiridas da empresa Pioneer. Os experimentos realizados foram divididos em três ensaios. No primeiro ensaio foi utilizada temperatura de germinação de 25°C, recomendada para a espécie, no segundo a temperatura de germinação utilizada foi de 35°C e no terceiro a temperatura utilizada foi de 15°C. Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram realizados os seguintes testes: germinação e índice de velocidade de germinação, e tempo para ocorrência de 50% de germinação (T_{50}). Para a caracterização anatômica das plântulas foram observados o número de estômatos e diâmetro equatorial e polar dos estômatos. Para a avaliação bioquímica foram quantificadas as concentrações de clorofila, de açúcares solúveis totais, de açúcares redutores e amido, proteínas, a atividade das enzimas Superóxido dismutase - SOD e Ascorbato peroxidase - APX e o dano causado pela peroxidação lipídica no tecido foliar. A qualidade fisiológica das sementes híbridas foi superior, apesar da variedade crioula Catarina apresentar resultados semelhantes à variedade Convencional. A temperatura de 15 °C reduziu a velocidade do processo de germinação das sementes de milho, porém não afetou o processo em si. A temperatura de 35 °C afetou drasticamente o processo de germinação de todas as variedades. O parâmetro diâmetro polar de estômatos é sensível a temperatura de 35 °C, sendo influenciado pelo estresse causado pela temperatura. O conteúdo de clorofila a e b do milho foram alterados em função da temperatura. A temperatura influenciou na acumulação de açúcares, sendo que a concentração de amido foi maior em condições de estresse. As variedades híbridas são mais influenciadas pela temperatura quanto

a acumulação de proteínas e a peroxidação lipídica sendo que a variedade crioula MPA1 foi a que apresentou maior concentração de proteínas e menor dano por peroxidação lipídica nas diferentes temperaturas. As variedades Convencional e Catarina apresentaram maior adaptação a altas e baixas temperaturas já que apresentaram maior atividade da APX. A temperatura alta afetou a atividade da SOD diferentemente nas variedades híbridas e nas crioulas, sendo que reduziu a atividade nas crioulas e aumentou nas híbridas. Apesar de a qualidade fisiológica das sementes crioulas serem inferiores a das sementes híbridas, devido aos cuidados com a produção e armazenamento serem menos eficientes, observou-se que as variedades crioulas apresentam qualidade bioquímica semelhante as híbridas, podendo ter um desempenho no campo quando submetidas a estresse por temperatura, devido a estarem adaptadas ao clima onde são cultivadas.

Palavras-chave: *Zea mays*, variedades tradicionais, agricultura familiar, estresse por temperatura, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the anatomical, physiological and biochemical changes in the germination and vigor of hybrid and creole corn seeds submitted to different temperatures. The study was carried out at the Growth and Plant Physiology Laboratories of the Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Laranjeiras do Sul campus, Paraná. Seeds of Creole and hybrid corn were used. Creole corn seeds (MPA1 and Catarina varieties) came from the MPA – Movimento dos pequenos agricultores, from the city of Porto Barreiro, Paraná. Hybrid corn seeds (Herculex® and Conventional cultivars) were acquired from Pioneer. The experiments were divided into three trials. In the first experiment, the germination temperature was 25 °C, recommended for the species. In the second, the germination temperature was 35 °C and in the third, the temperature was 15 °C. In order to evaluate the physiological quality of the seeds, the following tests were performed: germination, and index of germination velocity, and time for 50% for germination ($T_{50\%}$). For the anatomical characterization of the plants were observed the number of stomata and equatorial and polar diameter of the stomata. For the biochemical evaluation, the concentrations of chlorophyll, total soluble sugars, reducing sugars and starch, proteins, the activity of the enzymes Superoxide dismutase - SOD and Ascorbate peroxidase - APX and the damage caused by lipid peroxidation (LPO) in leaf tissue were quantified. The physiological quality of the hybrid seeds was superior, although the creole variety Catarina presented similar results to the Conventional variety. The temperature of 15 °C reduced the speed of the germination of corn seeds, of general way, but did not affect the process itself. The temperature of 35 °C affected drastically the germination process of all the varieties. The parameter polar diameter of stomata is sensitive to the temperature of 35 °C, being influenced by the stress caused by the temperature. The corn chlorophyll *a* and *b* content were altered as a function of temperature. The temperature influenced the accumulation of sugars, as the starch concentration was higher under stress conditions. Hybrid varieties are more influenced by temperature in the protein accumulation and lipid peroxidation. The MPA1 creole variety showed the highest

protein concentration and lower damage by lipid peroxidation in the different temperatures. Conventional and Catarina varieties showed greater adaptation to high and low temperatures since they presented greater of the APX activity. The high temperature affected the SOD activity differently in the hybrids and creoles varieties, reducing activity in the creole and increasing in the hybrids. Although the physiological quality of the creole seeds is inferior to that of the hybrid seeds, due to the less efficient production and storage care, It was observed that the creole varieties present biochemical quality similar to the hybrids, and can perform well in the field when subjected to temperature stress, due to being adapted to the climate where they are cultivated.

Key words: *Zea mays*, traditional varieties, family farmer, temperature stress, oxidative stress, reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação anatômica das plântulas híbridas e crioulas de milho (<i>Zea mays</i>), para o número de estômatos, em função da temperatura.	36
Figura 2 - Avaliação anatômica das plântulas híbridas e crioulas de milho (<i>Zea mays</i>), para o diâmetro polar dos estômatos, em função da temperatura.	37
Figura 3 - Avaliação anatômica das plântulas híbridas e crioulas de milho (<i>Zea mays</i>), para o diâmetro equatorial dos estômatos, em função da temperatura.	38
Figura 4 - Concentração de clorofila total (mg/g de matéria seca) do tecido foliar, em plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de germinação de sementes de milho (<i>Zea mays</i>) híbridas e crioulas de milho em função da temperatura.	30
Tabela 2 - Índice de velocidade de germinação de sementes híbridas e crioulas de milho (<i>Zea mays</i>) em função da temperatura.	32
Tabela 3 - Tempo para ocorrência de 50% de germinação (T _{50%}) de sementes híbridas e crioulas de milho (<i>Zea mays</i>) em função da temperatura.	33
Tabela 4 - Concentração de clorofila a (mg/g matéria seca) do tecido foliar, em plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura. ...	40
Tabela 5 - Concentração de clorofila b (mg/g matéria seca) do tecido foliar, em plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura. ...	41
Tabela 6 - Concentração de açúcares solúveis totais (mg/g tecido foliar) de ..	43
Tabela 7 - Concentração de açúcares redutores (mg/g tecido foliar), em plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura.	44
Tabela 8 - Concentração de amido (mg/g de matéria seca) do tecido foliar de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura. ...	45
Tabela 9 - Conteúdo de proteínas (mg/mL) do tecido foliar de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbridas e crioulas em função da temperatura.	46
Tabela 10 - Peroxidação lipídica (LPO) (nmol MDA/g de tecido seco) no tecido foliar de plântulas híbridas e crioulas de milho (<i>Zea mays</i>) em função da temperatura.	48
Tabela 11 - Atividade específica da Ascorbato Peroxidase (APX) (mmoles de ascorbato oxidado/min/mg de proteína) no tecido foliar de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura.	50
Tabela 12 - Atividade específica da enzima Superóxido Dismutase (U/ μ g de proteína) no tecido foliar de plântulas de milho (<i>Zea mays</i>) híbrido e crioulo em função da temperatura.	52

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO GERAL	13
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
4	METODOLOGIA	20
4.1	AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS	20
4.1.1	Teste de Germinação e Índice de Velocidade de germinação	20
3.1.3	Teste de Emergência	22
4.2	AVALIAÇÕES MORFO-ANATÔMICAS	22
4.3	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	23
4.3.1	Amido	23
4.3.2	Açúcares redutores e açúcares solúveis totais	24
4.3.3	Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total	24
4.4	AVALIAÇÕES DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
4.4.1	Preparo dos homogenatos e extração proteica	25
4.4.2	Teor proteico	26
4.4.3	Superóxido dismutase (SOD).....	26
4.4.4	Ascorbato peroxidase (APX).....	27
4.4.5	Peroxidação lipídica (LPO).....	27
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos na agricultura nas últimas décadas levaram os agricultores familiares a substituir as práticas tradicionais pelos pacotes tecnológicos das indústrias. No entanto, esse processo conduziu a uma elevada dependência de insumos externos, perda de diversidade genética nos campos e a um endividamento crescente dos produtores. Frente a isso, diversas iniciativas têm sido realizadas na tentativa de recuperação de sistemas de produção tradicionais, incluindo o resgate e uso de sementes crioulas. As sementes crioulas são mais rústicas e adaptadas à natureza da região e às necessidades daqueles que ali habitam (TRINDADE, 2006; MAIA, NUNEZ, 2006; PELWING et al., 2008).

Ao longo do tempo as comunidades rurais (agricultores familiares e populações tradicionais) aprenderam a manejar as plantas e os animais diante dos recursos que a natureza lhes oferecia praticando o que se chama atualmente de agricultura tradicional. Este sistema e aqueles que o praticam exerceram e ainda exercem uma grande contribuição na domesticação e na manutenção da diversidade de plantas, especialmente as chamadas variedades crioulas, tradicionais ou nativas (CENTRO ECOLÓGICO, 2006; TRINDADE, 2006; CANCI, 2006).

As sementes crioulas são assim denominadas, pois são as que melhor se adaptam a cada região onde ocorrem, visto que seu manejo se desenvolve por comunidades tradicionais/rurais por meio da seleção natural (TRINDADE, 2006; MAIA, NUNEZ, 2006; PELWING et al., 2008). Estas variedades domesticadas (crioulas) precisam ser plantadas, colhidas e replantadas seguidamente para que se mantenham, demonstrando um alto grau de dependência aos cuidados humanos (CENTRO ECOLÓGICO, 2006; PELWING et al., 2008).

De maneira geral, as características de uma planta são a soma entre a base genética e a influência do ambiente onde ela é cultivada. A mesma variedade pode apresentar comportamentos diferentes em condições ambientais distintas. Frequentemente, as plantas estão expostas a estresses ambientais, bióticos e abióticos, que prejudicam o seu crescimento, desenvolvimento, e a sua

produtividade. O crescimento de uma planta é um parâmetro quantitativo relacionado a aumento de tamanho e massa. Desenvolvimento é um termo com um significado mais amplo, que abrange tanto o crescimento quanto a diferenciação dos tecidos e se refere as mudanças que a planta experimenta durante seu ciclo. Dentre os fatores climáticos, as variações de temperatura (extremos de frio e calor) a que as plantas estão sujeitas representam uma fonte importante de estresse (KERBAUY, 2008).

O estudo do comportamento das plantas frente a estresses ambientais (bióticos e abióticos) e o entendimento dos processos bioquímicos, fisiológicos e morfo-anatômicos envolvidos na capacidade de resposta e adaptação das mesmas representa um importante tópico de pesquisas. As flutuações de temperatura podem provocar modificações no metabolismo celular como aumentos ou reduções na transcrição de genes, síntese de proteínas, atividade de enzimas, alterações lipídicas e perturbações na integridade de membranas. Além disso, outra alteração bastante significativa provocada pelas variações de temperatura é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo (WAHID et al., 2007; GILL, TUTEJA, 2010). O estudo das alterações nos sistemas antioxidantes, isto é, no controle da produção e da destoxificação das EROs é de grande importância na compreensão da dinâmica do funcionamento das células vegetais e da capacidade de defesa frente a diferentes estresses.

Considerando que as variedades crioulas apresentam maior variabilidade genética, rusticidade e capacidade de adaptação às condições do ambiente em que são cultivadas em função do processo de seleção natural ao longo do tempo, elas podem servir como ferramentas importantes para o estudo e o entendimento dos mecanismos de resposta e adaptação frente à estresses ambientais, em especial aqueles oriundos de variação de temperatura. Até o momento poucos estudos foram realizados na tentativa de elucidar os mecanismos de adaptação e comprovar o conhecimento empírico dos agricultores na seleção natural dos cultivares, especialmente nas pequenas propriedades da agricultura familiar.

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do estresse por temperatura sobre o vigor e o potencial de germinação de sementes de milho híbrido e crioulo. Além disso, buscou-se caracterizar o envolvimento do estresse

oxidativo e as respostas de defesa das plântulas de milho frente às variações de temperatura.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas em plântulas de milho híbrido e crioulo submetidas a diferentes temperaturas de crescimento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a influência de diferentes temperaturas, mínima, máxima e ótima, sobre a germinação e o vigor das sementes de milho híbrido e crioulo;
- b) Avaliar a influência da temperatura na anatomia de plântulas de milho híbrido e crioulo;
- c) Avaliar e relacionar a capacidade de adaptação, tolerância e resistência das variedades de milho submetidas ao estresse por temperatura;
- d) Avaliar os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta ao estresse por temperatura em plântulas de milho híbrido e crioulo.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Desde o início da domesticação das plantas e do surgimento da agricultura, os seres humanos têm praticado a seleção e melhoramento dos cultivos de acordo com seus conceitos e estratégias de sobrevivência. A partir da década de 1950, iniciou-se um processo de modernização da agricultura, a chamada Revolução Verde, baseada em práticas mecânicas, no uso de variedades de alto rendimento e de insumos químicos. Esta modernização foi a resposta em relação às demandas internacionais que a produção de alimentos passou a ter após a Segunda Guerra Mundial (PINHEIRO et al., 2000). Como resultado, as práticas e insumos tradicionais foram sendo substituídos por práticas e insumos produzidos pela indústria de adubos químicos, agrotóxicos, máquinas e sementes, o que reduziu significativamente a autonomia das propriedades rurais. As variedades crioulas foram sendo substituídas por variedades industriais, na grande maioria híbridas, melhoradas e mais recentemente transgênicas, com um potencial produtivo elevado, no entanto mais dependentes de insumos externos e tecnologias intensivas (PINHEIRO et al., 2000; MAIA, NUNEZ, 2006; CENTRO ECOLÓGICO, 2006).

Estimativas indicam que por conta das alterações abruptas dos ecossistemas naturais e agrícolas, no último século se perdeu de 50% a 90% da agrobiodiversidade então existente em cultivo (MULVANY, BERGER, 2003). Segundo dados da FAO (1996) no período de 1950-1990 dez espécies desapareceram por ação humana a cada dia enquanto no período de 1990-2002 uma espécie foi eliminada por ação humana a cada hora. Além disso, de um total de 250000 espécies de plantas potenciais para uso agrícola, apenas 1500 são domesticadas. Destas, apenas cerca de 150 são consideradas do ponto de vista comercial, sendo que, somente de 3 espécies (trigo, milho e arroz) provém 60% das calorias e 56% das proteínas derivadas de plantas em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA, 1996). Em paralelo a esta perda da diversidade genética nos campos, houve uma ampliação dos riscos de perdas provocadas por pragas e um aumento constante do uso de pesticidas e, por conseguinte, uma diminuição na qualidade da alimentação (CANCI, 2006).

Embora a Revolução Verde tenha sido responsável pela perda de grande parte da diversidade e variabilidade das plantas cultivadas, em função da transformação de agroecossistemas em monocultivos de variedades de estreita base genética, muitas propriedades mantiveram, em parte ou no todo, o sistema de produção original. Este sistema é baseado em plantas cultivadas que só foram melhoradas pelas mãos de agricultores, as variedades tradicionais ou crioulas. Entre os motivos que levaram os agricultores a manter os sistemas locais de produção estão a preservação da cultura, as características específicas de espécies e cultivares que lhes interessam e a autonomia em relação ao sistema de produção (MENEGETTI et al., 2002; TRINDADE, 2006; CENTRO ECOLÓGICO, 2006).

Por terem sido selecionadas pela natureza e pela ação humana ao longo das gerações, as variedades crioulas são mais rústicas (apresentando grande variabilidade) e adaptadas à natureza e as necessidades daqueles que ali habitam. A diversidade genética produz plantas diferentes na cor, na altura, na espessura das folhas e também na capacidade de retirar nutrientes e água do solo, resistir à seca, doenças e insetos. No caso de acontecer algum problema, este irá atingir as plantas de forma diferente e os riscos de perda serão menores (CENTRO ECOLÓGICO, 2006; MENEGETTI et al., 2002; MAIA, NUNEZ, 2006). Por outro lado, a pouca variabilidade genética pode aumentar os riscos quando se consideram lavouras de variedades industriais e problemas como seca, insetos e doenças são mais graves nestas lavouras, uma vez que a uniformidade genética diminui a resistência das plantações (PINHEIRO, 2000; CENTRO ECOLÓGICO, 2006).

As flutuações de temperatura podem provocar modificações anatômicas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas, como: presença ou ausência de pubescência, senescência e/ou abscisão foliar, alterações na área foliar, inibição do crescimento das raízes e brotos, descoloração e danos aos frutos, perda de vigor e taxas de emergência reduzida. Ainda, variações no tamanho das células, na densidade de estômatos, na deposição de ceras foliares, no número e tamanho das células do mesófilo e aumentos na espessura das folhas. Em nível sub-celular, alterações na arquitetura da parede celular e na fluidez das membranas, rearranjos do citoesqueleto, modificações na

organização estrutural dos tilacóides e na composição dos pigmentos fotossintéticos, alterações no ciclo celular, aumentos ou reduções na transcrição de genes, na síntese de proteínas e na atividade de enzimas. Outro fator metabólico influenciado pelas variações de temperatura são os teores e a produção de açúcares solúveis totais, redutores e amido, tanto intracelular quanto extracelular (WAHID et al., 2007; ROSA et al., 2009; GILL, TUTEJA, 2010; KRASENSKY, JONAK, 2012; THEOCHARIS et al., 2012). Além disso, outra alteração bastante significativa provocada pelas variações de temperatura é a geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (WAHID et al., 2007; GILL, TUTEJA, 2010).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas durante o metabolismo aeróbico normal, pela interação do O_2 e elétrons provindos da fotossíntese e da respiração celular (APEL, HIRT, 2004; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Organelas com alta atividade metabólica oxidativa ou com intenso fluxo de elétrons, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos são as maiores fontes de produção de EROs nas células vegetais (MITTLER, 2002).

As EROs incluem espécies radicalares e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}), o oxigênio singlete (1O_2) dentre outras (MITTLER, 2002; APEL, HIRT, 2004; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). As EROs são moléculas altamente reativas e podem causar danos a organelas celulares, provocar a oxidação de moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, acarretando redução no crescimento, colapso no metabolismo celular e desencadear o processo de morte celular programada, além de ocasionar mutações no DNA celular (APEL, HIRT, 2004; KOTCHONI, GACHOMO, 2006; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

A susceptibilidade ao estresse oxidativo depende do balanço global entre a produção de oxidantes e a capacidade antioxidante da célula (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Durante condições normais de crescimento, a produção de EROs é baixa. Entretanto, diante de diversos tipos de estresse, quando a homeostase celular é rompida, ocorre aumento da produção destas espécies. Embora esse aumento seja uma ameaça à célula, essas espécies podem também agir como sinalizadores para a ativação da resposta ao estresse e vias

de defesa do vegetal (MITTLER, 2002; GILL, TUTEJA, 2010). Portanto, as EROs podem ser vistas como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002; KOTCHONI & GACHOMO, 2006; GILL, TUTEJA, 2010).

Dentre alguns dos fatores ambientais que podem estimular a produção de EROs e, conseqüentemente, um estresse oxidativo nas plantas são as variações de temperatura, sendo que as plantas podem sofrer influências de extremos de frio ou calor (WAHID et al., 2007; GILL, TUTEJA, 2010).

As adaptações das plantas frente às flutuações de temperatura podem ocorrer através da seleção de genótipos mais apropriados em termos de morfologia, fisiologia e bioquímica entre várias gerações. Entretanto, mudanças significativas podem ser vistas dentro do ciclo de vida de uma mesma geração estimulando mecanismos de defesa e adaptação mais rápidos (WAHID et al., 2007; GILL, TUTEJA, 2010).

Alterações por calor ou frio incluem mudanças no metabolismo e na fisiologia como o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, alteração da expressão e atividade de enzimas antioxidantes, desnaturação de proteínas, lipoperoxidação, alteração da integridade de membranas, alterações nos processos de fotossíntese e respiração celular entre outros (WAHID et al., 2007; GILL, TUTEJA, 2010). Diversos estudos têm demonstrado que a alteração dos mecanismos antioxidantes está correlacionada com a capacidade de defesa das plantas frente às alterações de temperatura. Plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) expostas ao estresse por temperaturas elevadas apresentaram alterações nas atividades antioxidantes e na atividade dos fotossistemas. O crescimento das plântulas acima dos 25 °C provocou alterações nas atividades dos fotossistemas I e II das folhas primárias, com inativação do PS II e aumento da geração de ERO's. O estresse por temperatura levou ao estímulo da atividade da superóxido dismutase indicando que a formação de seu substrato, o radical superóxido, foi aumentado. Também, a atividade da ascorbato peroxidase, uma enzima que sequestra H₂O₂, foi elevada de forma dependente do aumento da temperatura (DASH, MOHANTY, 2002). Ainda, foram observados aumentos nas concentrações de ascorbato e glutatona em resposta às altas temperaturas. O aumento nas atividades das enzimas do metabolismo do H₂O₂ sugere que esta

molécula possui um papel essencial na sinalização das alterações provocadas pelo choque térmico e contribua, juntamente com o sistema antioxidante para o potencial de tolerância dos cultivares de trigo ao estresse por temperatura (DASH, MOHANTY, 2002). As linhagens de trigo que apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes também apresentaram menores danos às membranas e maior conteúdo de clorofilas, o que demonstra maior tolerância ao estresse por calor (ALMESELMANI et al., 2006).

Além do calor, o frio também pode provocar alterações nos níveis de EROs e nos sistemas antioxidantes das plantas. Como o milho (*Zea mays* L.) é uma planta sensível ao frio, este tipo de estresse ambiental durante os primeiros estágios do desenvolvimento pode prejudicar a produtividade. Plântulas de milho foram sujeitas a aclimação ao frio e o perfil antioxidante foi avaliado. As atividades da superóxido dismutase nos mesocótilos estava aumentada durante a aclimação. Além disso, também se observou um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio em ambos os grupos, plântulas previamente aclimatadas ou não (PRASAD et al., 1994). Mais tarde, este comportamento foi comprovado quando plântulas de milho de 3 dias não sobreviveram a 7 dias de estresse a 4 °C (sem aclimação). Apenas aquelas que primeiro foram aclimatadas a 14 °C por um dia sobreviveram às condições de baixa temperatura. Além disso, o conteúdo de proteínas carboniladas, um indicador de estresse oxidativo, estava aumentado nas plantas não aclimatadas. Estes resultados indicam que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes está relacionado ao desenvolvimento da aclimação ao frio em plântulas de milho (PRASAD, 1997).

Em plantas de pepino, o estresse por frio provocou um aumento na produção de EROs que refletiu em elevações das defesas antioxidantes, em especial nas atividades da Superóxido dismutase (SOD) e Ascorbato peroxidase (APX) em cloroplastos e mitocôndrias (HU et al., 2008).

Dentre as diferentes espécies e até mesmo dentre diferentes variedades da mesma espécie pode-se observar uma grande variação em termos de respostas ao estresse por altas ou baixas temperaturas. No entanto, de maneira geral a formação das ERO's está relacionada à indução de sinais intracelulares que levam ao aumento das defesas antioxidantes da célula sendo que as enzimas apresentam um comportamento diferencial nas suas atividades. Além disso, as

EROs ainda podem estar relacionadas ao dano celular quando esta resposta de proteção não atinge eficientemente seus objetivos podendo levar até a morte das plantas afetadas.

Diante do exposto, pretende-se estudar as alterações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas em plântulas de milho híbrido e crioulo submetidas a diferentes temperaturas.

4 METODOLOGIA

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Germinação e Crescimento, Fisiologia Vegetal e Bioquímica experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Laranjeiras do Sul, Paraná. As sementes híbridas foram adquiridas da empresa Pioneer, enquanto que as sementes crioulas foram provenientes do MPA - Movimento dos Pequenos Agricultores, do município de Porto Barreiro, PR.

Foram realizados dois experimentos. Um para germinação das sementes e outro para crescimento de plântulas. Os experimentos realizados foram divididos em três ensaios. No primeiro foi utilizada temperatura de germinação e crescimento de 25°C, recomendada para a espécie (Brasil, 2009). No segundo ensaio a temperatura de germinação utilizada foi de 35°C e no terceiro ensaio, a temperatura utilizada foi de 15°C, sendo os ensaios a 15 e 35 °C fontes de estresse para as plântulas de milho.

4.1 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram realizados os seguintes testes: germinação e índice de velocidade de germinação e tempo para ocorrência de 50% de germinação (T_{50}).

4.1.1 Teste de Germinação e Índice de Velocidade de germinação

Os testes de germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foram realizados em 4 repetições de 50 sementes, as quais foram semeadas sobre papel germiteste umedecido com água 2,5 vezes o peso do papel. Todos os ensaios foram conduzidos em câmara de germinação do tipo Mangelsdorf, sendo que, no primeiro ensaio (25 °C) a contagem de plântulas normais, sementes mortas e plântulas anormais foram efetuadas no sétimo dia após a

semeadura (Brasil, 2009). No segundo e terceiro ensaios (35 e 15 °C) estes parâmetros foram avaliados quando ocorreu a estabilização da germinação.

O índice de velocidade de germinação foi avaliado conjuntamente com o teste de germinação. As contagens do número de plântulas normais foram realizadas diariamente, à mesma hora, a partir do dia em que surgiram as primeiras normais. Posteriormente, foi calculado o índice de velocidade de germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962), citado por Vieira & Carvalho (1994).

$$\text{IVG: } G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$$

em que:

IVG: índice de velocidade de germinação;

G1, G2, ... Gn = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda, ... , última contagem;

N1, N2, ... , Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem.

3.1.2 Tempo para ocorrência de 50% de germinação (T₅₀)

O tempo para ocorrência de 50% de germinação (T₅₀) foi avaliado conjuntamente com o teste de germinação e índice de velocidade de germinação, de acordo com a fórmula proposta por Guimarães (2000).

$$T_{50}: [(G-G_1)/(G_2-G_1)]+T$$

em que:

T₅₀: tempo de ocorrência de 50% de emergência

G: metade do valor máximo de emergência

G₁: valor de emergência igual ou imediatamente inferior a G

G₂: valor de emergência imediatamente superior a G

I: intervalo entre as contagens

T: tempo para a ocorrência de G₁

3.1.3 Teste de Emergência

Foram realizadas em 4 repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes, as quais foram semeadas a 3 cm de profundidade, em bandejas plásticas com dimensões de 45,0 x 30,0 x 6,5 cm, utilizando como substrato uma mistura de solo e areia em uma proporção de 3:1. As bandejas foram mantidas em estufas climatizadas do tipo B.O.D, previamente reguladas a temperaturas de 25 °C, 15°C e 35 °C, a critério do tratamento, em regime alternado de luz/escuro (12 horas), durante quinze dias. As bandejas foram irrigadas quando necessário, com o mesmo volume de água. As plântulas geradas no teste de Emergência foram posteriormente coletadas para que fossem realizadas as avaliações bioquímicas nas variedades de milho híbrido e crioulo.

4.2 AVALIAÇÕES MORFO-ANATÔMICAS

Para o estudo anatômico, foram utilizadas 10 folhas totalmente desdobradas e tomadas ao acaso, por repetição de cada tratamento, provenientes do teste de emergência de plântulas. As folhas foram fixadas em FAA 70% composto de formaldeído (5% da solução), ácido acético glacial (90% da solução) e álcool etílico (5% da solução) por 24 horas e, posteriormente conservadas em álcool etílico 70°GL, conforme metodologia de Johansen (1940).

Para as avaliações morfo-anatômicas, cortes manuais, com lâmina de barbear, foram realizados num total de 10 folhas por tratamento, repetindo três cortes por folha. Esses cortes foram realizados nas regiões basal, mediana e apical das folhas e com eles foi realizada a confecção de lâminas semi-permanentes. Em cada corte foram observados quatro campos aleatórios. Os cortes foram em seguida observados com auxílio de câmara clara em um microscópio tipo Olympus CBB, avaliando-se o diâmetro polar e equatorial e o número médio de estômatos por mm² das folhas.

4.3 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Para as avaliações bioquímicas, 10 folhas por repetição, de cada tratamento, foram coletadas aleatoriamente, picadas, congeladas em freezer a 18 °C e em seguida liofilizadas. Após este procedimento, as folhas foram divididas em duas partes: uma delas usada para a extração e a quantificação de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e clorofila e a outra parte para determinação do conteúdo de proteínas, atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.

4.3.1 Amido

Para a extração do amido, 0,5 g de tecido foliar liofilizado foi colocado em tubo de centrífuga, homogeneizado em 10 mL de etanol 80% e incubado a 40°C por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 5000 xg por 20 min e o sobrenadante separado do precipitado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes unidos e armazenados para a quantificação de açúcares solúveis totais e redutores.

Ao precipitado foi adicionado 2,5 mL de ácido perclórico a 30% para a sua ressuspensão e, posteriormente, colocado em banho de gelo por 40 min. Após tal procedimento, as amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 20 min, foi retirado o sobrenadante e completado seu volume para 10 mL com água destilada para a quantificação do conteúdo de amido.

A quantificação do conteúdo de amido, em equivalentes de glicose, foi realizada pelo método de Antrona como descrito por Yemm & Willis, (1954). A reação de antrona se baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico concentrado sobre os carboidratos. Quando ocorre a reação de Antrona em uma solução com carboidratos que tenham ligações glicosídicas como o amido, estas ligações são hidrolisadas e os açúcares simples são então desidratados, se condensam com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) gerando um produto de coloração azul petróleo. Foram utilizadas as amostras de padrão de glicose para obtenção da curva padrão. Uma alíquota do reagente de antrona foi adicionado

às amostras nos tubos de ensaio contendo o extrato aquoso. As análises foram realizadas em duplicata. O conteúdo de amido foi quantificado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620nm e os resultados expressos como mg amido/g tecido seco.

4.3.2 Açúcares redutores e açúcares solúveis totais

As quantificações de açúcares solúveis totais e açúcares redutores foram realizadas nos sobrenadantes da extração foliar conforme descrito anteriormente (item 4.3.1) pelos métodos colorimétricos de Antrona (Yemm & Willis, 1954) e ácido dinitrossalicílico – DNS (Miller, 1959), respectivamente. Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria em comprimento de onda de 540nm, utilizando-se uma curva padrão de glicose e os resultados foram expressos como mg/g tecido seco.

Para a determinação do teor de açúcares solúveis totais foi utilizado o método de Antrona. Após a obtenção do homogenato, adicionou-se 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Em seguida a amostra foi incubada em banho-maria a 60 °C por 10 minutos. Após, a solução foi neutralizada com NaOH 6N e resfriou-se rapidamente em banho de gelo até a temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada e separados os sobrenadantes. Os açúcares solúveis totais foram quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620nm utilizando-se uma curva padrão de glicose e os resultados foram expressos como mg/g tecido seco.

4.3.3 Clorofila *a*, *b* e total

A extração da clorofila foi realizada com a homogeneização de 0,5g de tecido foliar liofilizado em acetona 80%, o homogenato foi filtrado e em seguida o filtrado foi diluído em acetona 80% até completar um volume de 10mL. A quantificação dos teores de clorofila *a*, *b* e clorofila total (mg.L^{-1}) foi realizada por espectrofotometria de emissão nos comprimentos de onda de 470 nm, 647 nm e

663 nm, conforme equação proposta por Arnon (1949), onde A é a absorbância no comprimento de onda utilizado, Ca (conteúdo de clorofila a), Cb (conteúdo de clorofila b) e CT (conteúdo de clorofila total). Os resultados obtidos foram expressos em mg clorofila/g matéria seca.

$$Ca = (12,7 \times A_{663\text{nm}}) - (2,64 \times A_{645\text{nm}}) \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$$

$$Cb = (22,9 \times A_{645\text{nm}}) - (4,68 \times A_{663\text{nm}}) \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$$

$$CT = Ca + Cb \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$$

4.4 AVALIAÇÕES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para as avaliações do estresse oxidativo, 10 plântulas emergidas, por repetição, de cada tratamento, provenientes do teste de emergência de plântulas foram coletadas e imediatamente seccionadas, separando o tecido foliar do radicular. Após realizado este procedimento, os tecidos foliares foram congelados em freezer a -18 °C e em seguida liofilizados. Após a liofilização do material vegetal foi realizada a homogeneização das amostras e a extração proteica para a quantificação de proteínas e avaliação das atividades enzimáticas.

4.4.1 Preparo dos homogenatos e extração proteica

Para o preparo dos homogenatos e a extração proteica 200 mg de tecido foliar, por repetição de cada tratamento, foram macerados e homogeneizados em 800 µL de tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 1 mM. Os homogenatos foram centrifugados a 13000 xg, por 15 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante para a quantificação do teor proteico e para as análises enzimáticas da superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX).

4.4.2 Teor proteico

Para a quantificação da concentração de proteínas no tecido foliar foi utilizada a metodologia de Bradford (1976) usando albumina bovina como padrão.

4.4.3 Superóxido dismutase (SOD)

A quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo sua capacidade de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), de acordo com a metodologia descrita por Giannopolitis & Ries (1977). Os resultados da atividade específica da enzima SOD são expressos como U/ μ g de proteína. O meio de reação era composto por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, EDTA 100 μ M, NBT 60 μ M, riboflavina 200 μ M, extrato proteico (amostra) e água destilada. Para a obtenção dos brancos são adicionados a 2,4 mL do meio de reação 100 μ L de um pool das amostras que são incubadas por 10 minutos no escuro para que ocorra a reação de foto-inibição. Para a obtenção dos controles em duplicata, são adicionados a 2,4 mL do meio de reação 100 μ L de tampão fosfato 50 mM pH 7,8. Os tubos com 2,4 mL do meio de reação e 100 μ L de amostra foram iluminados por 10 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O tubo de ensaio com o branco foi mantido no escuro. A reação iniciou-se quando ligou a luz e finalizou-se quando a mesma foi apagada. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm.

Uma unidade (U) de SOD é definida como a atividade da enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considera-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra conforme as fórmulas abaixo:

- Porcentagem de inibição:

$$\% \text{ inibição} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

- Cálculo da atividade específica da SOD (U/ μg proteína):

$$\text{Atividade específica da SOD} = (\% \text{ de inibição} \times \text{volume da amostra}(\mu\text{L})) / (50\% \times \text{concentração de proteína}(\mu\text{g} / \mu\text{L}))$$

4.4.4 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi quantificada conforme metodologia de Nakano & Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação com volume final de 2 mL contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM, peróxido de hidrogênio 0,1mM, água destilada e extrato proteico (amostra) foi incubado a 28 °C por 10 minutos. A taxa de oxidação do ascorbato foi monitorada durante 2 minutos, a cada 10 segundos e a atividade da enzima expressa em μmol de ascorbato oxidado por minuto.

4.4.5 Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação de lipídios foi mensurada em relação à quantidade de malondialdeído (MDA) presente no tecido foliar das plântulas, o qual foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico, de acordo com a metodologia descrita por Heath & Packer (1968). Amostras de 0,5 g de tecido foliar foram macerados em 1,6 mL de TCA 1%. Após completa homogeneização, 1,5 mL dos homogenatos foram transferidos para microtubos e centrifugados a 17696 xg a 4 °C por 10 minutos. Dos sobrenadantes foram retiradas alíquotas de 0,5 mL às

quais foram adicionados 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (p/v) + TCA 20% (p/v). Concluído esse procedimento, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 95 °C por 30 minutos e, em seguida, colocados em gelo, por 10 minutos, para a paralisação da reação. Após o resfriamento, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 532 nm e 600 nm, cujos valores foram posteriormente subtraídos. O conteúdo de MDA foi estimado utilizando um coeficiente de extinção de 155 ($\text{mmol} / \text{L}^{-1} \text{cm}^{-1}$) conforme descrito por Meriga et al. (2004). A quantidade de MDA foi expressa em nmol.g^{-1} de tecido seco.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o sistema SISVAR, desenvolvido por Ferreira (2006), que analisou as interações entre as variedades e temperaturas utilizadas durante os ensaios, assim como seus valores separadamente.

O modelo de delineamento experimental utilizado foi o Delineamento inteiramente casualizado (DIC), fatorial 4X3, sendo quatro variedades de milho, duas híbridas e duas crioulas e 3 temperaturas de germinação e crescimento de plântulas. Foram analisadas pelo programa citado as médias e os resultados foram expressos pelas médias \pm Desvio padrão (DP).

Para testar a normalidade e a homocedasticidade dos dados referentes às concentrações de proteínas e atividade das enzimas antioxidantes foram utilizados os testes de Lilliefors e de Bartlett, respectivamente. Os resultados para as variedades e as temperaturas e a interação dos resultados para temperatura e variedade foram testadas através da ANOVA e do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações de temperatura a que as plantas são expostas frequentemente podem causar diversas alterações, tanto na fisiologia como na

anatomia e nos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta ao estresse causado por temperaturas diferentes do ideal. Uma semente com melhor vigor e conseqüentemente plantas com um desempenho fisiológico mais favorável podem sofrer menos danos em suas estruturas, como membranas biológicas ou em seus mecanismos antioxidantes, seu aparato fotossintético, entre outros quando submetidas à condições de estresse ambiental. A fim de verificar a qualidade fisiológica das sementes híbridas e crioulas frente ao estresse por temperatura foram realizados os ensaios de germinação e índice de velocidade de germinação e tempo para ocorrência de 50% de germinação (T_{50}).

Observa-se na tabela 1 que à 25°C as sementes híbridas apresentaram germinação superior ao das sementes crioulas. A cultivar Herculex® apresentou germinação de 99%, seguida pela cultivar Convencional com 92,5%, cultivar Catarina 83,5% e variedade MPA1 com 65%, sendo que as quatro variedades diferiram significativamente entre si.

Quando submetidas à uma condição de estresse por baixa temperatura, a 15°C, as sementes híbridas Herculex e Convencional e a variedade crioula Catarina mantiveram a porcentagem de germinação apresentada a 25 °C (98, 89,5 e 85%, respectivamente), indicando não serem afetadas pelo estresse causado por baixa temperatura. Por outro lado, a variedade crioula MPA1 apresentou um incremento na média de germinação em relação ao ensaio à 25°C, atingindo 80%, apresentando um bom desempenho germinativo quando submetida a baixas temperaturas. Os resultados indicam que nenhuma das variedades teve sua capacidade de germinação prejudicada pela temperatura mais baixa.

Por outro lado, quando as quatro variedades foram submetidas à estresse por temperaturas elevadas, todas elas apresentaram uma queda significativa na porcentagem de germinação sendo que a cultivar Herculex® ainda foi a variedade que apresentou maior porcentagem de germinação em relação às demais na temperatura de 35 °C, demonstrando que foi a variedade menos afetada pela alta temperatura quanto à sua capacidade germinativa inicial. A variedade crioula MPA1 apresentou o menor desempenho germinativo, nas três temperaturas, quando comparado ao das demais variedades, não diferindo de Catarina a 15 °C (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de germinação de sementes de milho (*Zea mays*) híbridas e crioulas de milho em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	98 ± 1,63 ^{Aa}	99 ± 0,53 ^{Aa}	37,5 ± 13,68 ^{Ab}
Convencional	89,5 ± 3,00 ^{Ba}	92,5 ± 0,33 ^{Ba}	13 ± 11,26 ^{Bb}
Catarina	85 ± 6,21 ^{Ca}	83,5 ± 1,91 ^{Ca}	4,0 ± 2,82 ^{Cb}
MPA1	80 ± 1,63 ^{Ca}	65 ± 8,08 ^{Db}	0 ± 0,00 ^{Dc}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=200 para cada tratamento.

De maneira geral, os testes de germinação de sementes são utilizados em laboratório para determinar o potencial germinativo máximo de um lote de sementes (BRASIL, 2009). Além do teste de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG) e o teste de T_{50%} são parâmetros adicionais importantes na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes podendo ser usados para comparar o vigor de lotes de sementes com germinação semelhante e também estimar o desempenho da semeadura a campo, uma vez que levam em consideração o grau de deterioração da semente.

O índice de velocidade de germinação (IVG) é considerado um teste de vigor, uma vez que avalia a velocidade com que as sementes germinam. Quanto maior esse índice, menor o tempo que aquele lote de sementes leva para germinar, ou seja, este lote tem um vigor maior e conseqüentemente maior qualidade fisiológica. Como pode ser observado na tabela 2, o índice de velocidade de germinação (IVG) a 25°C para as variedades híbridas Herculex® foi de 6,92 e Convencional de 6,51. Já as variedades crioulas apresentaram um índice de velocidade de germinação de 10,09 para MPA1 e de 13,92 para Catarina, respectivamente. Esse resultado indica que as variedades crioulas, apesar de apresentarem resultados de germinação inferiores aos resultados alcançados

pelas variedades híbridas, tem um vigor superior ao das híbridas pois apresentam um IVG superior nesta temperatura.

Em condições de baixa temperatura, o IVG de todas as variedades apresentou reduções significativas quando comparados com a temperatura de 25 °C (Herculex® - 5,98; Convencional- 5,14; MPA1 - 4,67 e Catarina – 5,04). Percebe-se que a porcentagem de germinação das variedades se manteve quando submetidas a estresse por baixa temperatura, já a velocidade com que essas sementes germinam foi afetada, ou seja, a baixa temperatura reduz a velocidade de germinação da semente do milho, mas não afeta o processo de germinação em si. Isso ocorre devido ao fato de a baixa temperatura reduzir a velocidade das reações, a germinação ocorre, mas em uma velocidade menor, portanto o IVG tende a cair, já que é um índice de velocidade e é um teste muito mais sensível que o de germinação.

Já na condição de estresse por altas temperaturas o IVG foi ainda mais afetado, apresentando valores muito inferiores e significativamente diferentes aos observados nas temperaturas de 25 e 15 °C (Herculex® - 3,03; Convencional – 0,69; MPA1 – 0,00 e Catarina – 0,66). A alta temperatura afetou o IVG das variedades de milho devido a temperatura ser muito prejudicial a integridade de membranas, a integridade de enzimas, componentes extremamente importantes na célula, que possibilitam o processo de germinação em si.

Esses resultados do IVG demonstram que todas as variedades tiveram uma queda no seu vigor quando submetidas a estresse por temperaturas baixas e elevadas indicando que sob condições de estresse a semente tem uma maior dificuldade na germinação, levando a um maior tempo no solo e uma probabilidade maior de serem acometidas de doenças e atacadas por pragas sendo este efeito mais visível em temperatura mais elevada.

Tabela 2 - Índice de velocidade de germinação de sementes híbridas e crioulas de milho (*Zea mays*) em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	5,98 ± 0,13 ^{Ab}	6,92 ± 0,53 ^{Ca}	3,03 ± 0,74 ^{Ac}
Convencional	Bb	6,51 ± 0,33 ^{Da}	0,69 ± 0,61 ^{Bc} 5,14 ± 0,20
Catarina	Cb	13,92 ± 0,19 ^{Aa}	0,66 ± 0,47 ^{Cc} 5,04 ± 0,36
MPA1	4,67 ± 0,10 ^{Db}	10,09 ± 1,27 ^{Ba}	0 ± 0,00 ^{Dc}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=200 para cada tratamento.

Ainda considerando a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, o teste de $T_{50\%}$ quantifica o tempo necessário para que 50% das sementes germinem, sendo que quanto menor o valor de $T_{50\%}$ mais rapidamente as sementes do lote avaliado germinam.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do tempo de ocorrência de 50% de germinação ($T_{50\%}$). Pode-se observar que todas as variedades estudadas apresentam $T_{50\%}$ significativamente maior em 15 °C comparado com as demais temperaturas, ou seja, as sementes levaram mais tempo para que 50% da germinação ocorresse. Por outro lado, as variedades estudadas não diferiram entre si nesta faixa de temperatura. Estes dados estão de acordo com os resultados dos valores de IVG para temperatura de 15 °C (Tabela 2) indicando que as sementes apresentaram maior lentidão para germinação em temperatura baixa, no entanto esta característica não afetou a porcentagem de germinação (acima de 80% para todos os grupos).

Tabela 3 - Tempo para ocorrência de 50% de germinação ($T_{50\%}$) de sementes híbridas e crioulas de milho (*Zea mays*) em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	7,89 ± 0,12 ^{Ab}	3,18 ± 0,24 ^{Aa}	3,4 ± 0,05 ^{Ba}
Convencional	Ac	3,19 ± 0,17 ^{Aa}	4,4 ± 0,15 ^{Cb} 8,04 ± 0,20
Catarina	8,1 ± 0,18 ^{Ab}	2,51 ± 0,01 ^{Aa}	1,87 ± 1,25 ^{Aa}
MPA1	7,9 ± 0,05 ^{Ab}	2,66 ± 0,03 ^{Aa}	0 ± 0 ^{Dc}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=200 para cada tratamento.

Já a 25 °C foram observados valores de $T_{50\%}$ mais baixos para todas as variedades estudadas e este resultado está de acordo com o maior IVG apresentado tanto pelas variedades híbridas quanto pelas crioulas, indicando que a melhor temperatura para germinação das sementes é a 25 °C, conforme Brasil, 2009. Segundo MAGALHÃES et al. (2003) a baixa temperatura no plantio geralmente restringe a absorção de nutrientes do solo e causa lentidão no crescimento. A lentidão na germinação predispõe a semente e a plântula às condições ambientais e ao ataque de patógenos e as sementes que realizam o processo de germinação mais rapidamente tem vantagem na competição entre plantas. Ainda, CRUZ et al. (2007) ressalta em seu trabalho que a baixa temperatura do solo na semeadura retarda a germinação da semente de milho já que diminui a mobilização de reservas e a velocidade de emergência das plântulas de milho. Também conclui que temperaturas de 10 °C, em alguns genótipos de milho, além de reduzir a germinação também ocasiona um dano as plântulas, chamado dano de embebição ao frio que é o dano causado pela água que entra pelas membranas sem que os componentes desta apresentem por exemplo as características de permeabilidade seletiva e mosaico fluído. Portanto

fenótipos de milho não adaptados a baixas temperaturas podem ter seu desempenho muito prejudicado nestas condições.

Quando submetidas a estresse por alta temperatura, Herculex® e Catarina não diferiram significativamente do resultado a 25 °C, ou seja, apresentaram valor de $T_{50\%}$ semelhante em 25 e 35 °C. Já a cultivar Convencional teve um acréscimo significativo no seu valor de $T_{50\%}$ a 35 °C quando comparada à temperatura de 25°C. Por outro lado, comparando-se as cultivares entre si, a variedade crioula MPA1 apresentou o menor resultado de $T_{50\%}$ a 35°C.

Analisando os resultados de $T_{50\%}$ isoladamente, pode-se sugerir que a variedade crioula Catarina foi a menos afetada pela alta temperatura na mobilização de reservas e absorção de umidade para que ocorresse o processo de germinação, no entanto quando comparado aos demais testes de qualidade fisiológica, os resultados são conflitantes e merecem um estudo mais aprofundado para se ter certeza de que as variedades crioulas sejam realmente capazes de germinar em menor tempo que as outras variedades, em especial em altas temperaturas.

Em um estudo realizado por Durães (2007), analisando o efeito de temperaturas extremas e uso de diferentes inseticidas na germinação de milho, foi observado que as menores médias de germinação foram obtidas para temperaturas extremas, tanto altas quanto baixas, assim como o maior número de plantas anormais e sementes mortas. Ainda, a temperatura que mais afetou a germinação foi a temperatura baixa de 10 °C, diferente dos resultados obtidos neste trabalho, em que as menores médias de germinação foram obtidas em altas temperaturas (40 °C). Esse resultado pode estar relacionado à hipótese de que as sementes, em especial as crioulas, apresentem maior adaptação ao frio que ao calor, sendo por este motivo mais prejudicadas nas temperaturas altas de germinação. Durães (2007) comenta em seu trabalho que genótipos de milho melhor adaptados poderiam ser mais eficientes e efetivos se os atributos que conferem rendimento sob condições subótimas, como a temperatura, pudessem ser usadas como critério de seleção.

A qualidade da semente é pré-requisito para um bom desempenho no campo, por possibilitar uma germinação mais rápida e uniforme, sendo

características importantes para o sucesso da lavoura. Em trabalho realizado por ANDREOLI et al. (2002), a população de plantas de milho foi significativamente afetada pela qualidade da semente, e o autor ainda ressalta que os produtores de milho deveriam somente utilizar sementes para plantio com germinação superior a 80%, evidenciando que a qualidade da semente é fundamental para o estabelecimento da cultura e a obtenção de uma boa produtividade.

Após a germinação, a formação das estruturas foliares é de suma importância para o bom desenvolvimento da planta, sendo que as características anatômicas das folhas são determinadas geneticamente, mas as condições ambientais, como variações de temperatura, têm influência sobre estas estruturas (MAJADA et al., 2000).

Segundo Aoyama e Mazzoni-Viveiros (2006), as alterações causadas pelas variações no ambiente, como as variações de temperatura, podem ocorrer em estruturas vegetativas como as folhas. As mesmas podem sofrer adaptações fenotípicas como por exemplo com relação aos seus mecanismos de prevenção ou redução da perda de água, apresentando uma maior camada de cutícula em suas folhas, reduzindo o diâmetro e o posicionamento de seus estômatos, apresentando maior número de estômatos na superfície abaxial das folhas. Além disso, as folhas também podem apresentar tricomas específicos que reduzem a transpiração.

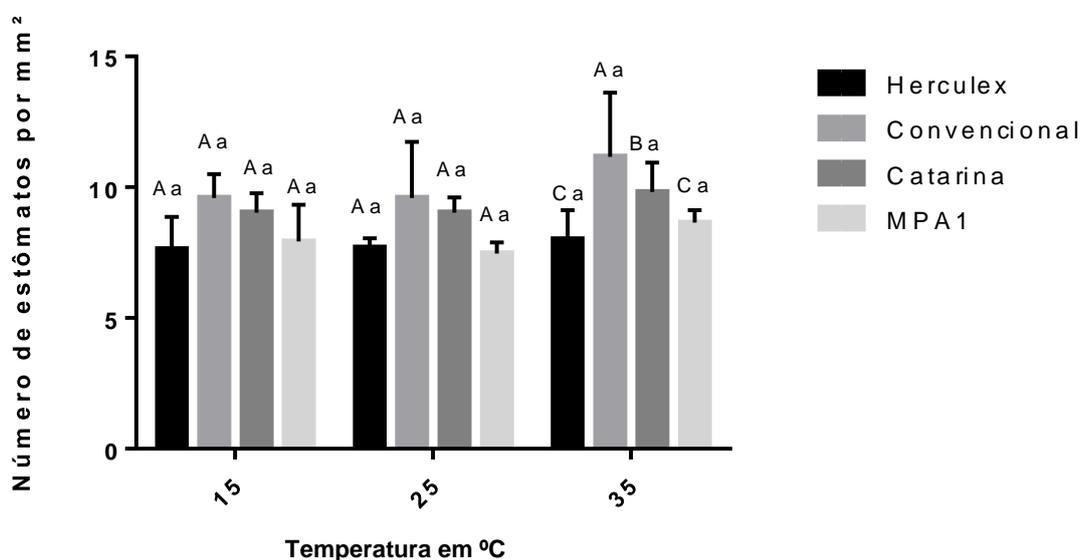
Os estômatos são estruturas importantes para a produção vegetal, pois representam a porta de entrada e saída dos gases para a fotossíntese. As diferentes espécies de plantas variam quanto ao número, frequência, tamanho, distribuição, forma e a mobilidade dos estômatos, o que conseqüentemente interfere na capacidade fotossintética destas. (SILVA, ALQUINI, CAVALLET, 2005). Mesmo em uma única planta, as folhas variam relativamente quanto aos estômatos, dependendo de sua forma e posição (SILVA, ALQUINI, CAVALLET, 2005). Ainda, o maior número de estômatos por área ajuda a explicar as maiores taxas transpiratórias e fotossintéticas das plantas. Cultivares da mesma espécie e espécies de mesmo gênero podem diferenciar quanto à densidade estomática (SILVA, ALQUINI, CAVALLET, 2005). Assim, uma variedade de milho com estômatos de maior diâmetro e em maior número pode apresentar uma maior

capacidade de captação de CO₂ e assim uma maior acumulação de carbono, convertido posteriormente em matéria seca.

Como as condições ambientais podem influenciar nas características morfoanatômicas das folhas, a sua observação e análise podem trazer informações importantes em relação as variedades crioulas e híbridas, como a capacidade de adaptação, capacidade de acúmulo de biomoléculas como açúcares, proteínas e enzimas que podem auxiliar a planta a resistir em condições de estresse as quais são submetidas, como as variações de temperatura. Em função disto, foram realizadas as medições dos diâmetros polar e equatorial dos estômatos e a contagem de estômatos das folhas de milho híbrido e crioulo.

As diferentes temperaturas não influenciaram o número de estômatos de nenhuma das variedades (Figura 1). Por outro lado, quando comparadas entre si, somente a 35 °C as variedades apresentaram diferença significativa no número de estômatos, sendo que a variedade Convencional foi a que apresentou maior quantidade de estômatos nesta temperatura.

Figura 1 – Densidade estomática em folhas de plântulas híbridas e crioulas de milho (*Zea mays*), em função da temperatura.

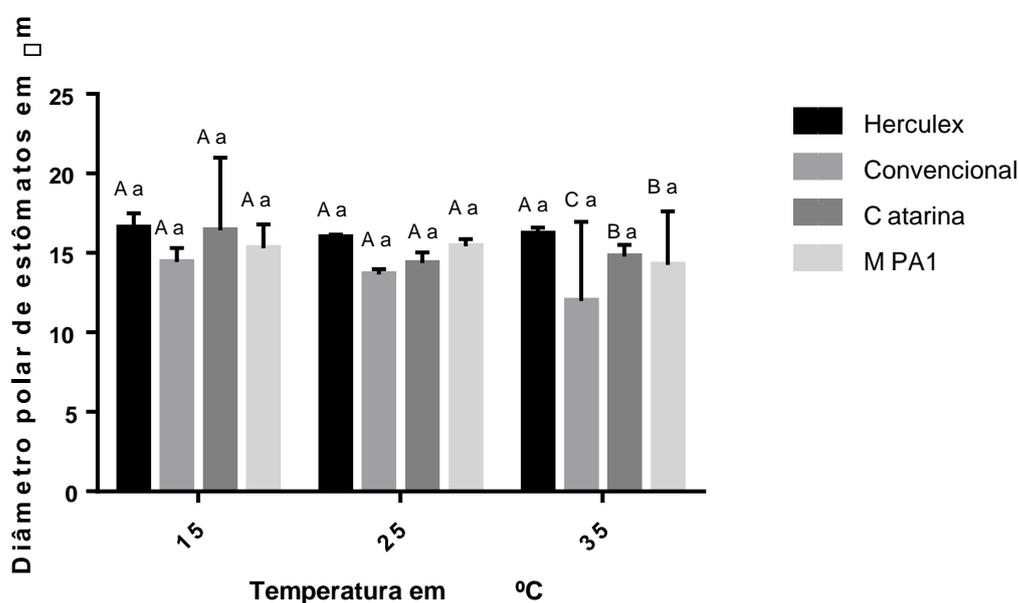


Fonte: Da autora

Nota: Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) com n=120 para cada tratamento.

O parâmetro diâmetro polar de estômatos indica o tamanho do estômato, que pode variar em função de fatores ambientais e pela constituição genética da espécie ou variedade (SOUZA et al., 2010). As diferentes temperaturas também não afetaram o diâmetro polar dos estômatos de nenhuma das variedades e quando se comparou as variedades entre si, somente a 35 °C foi observado diferenças entre as variedades, sendo que Convencional, Catarina e MPA1 apresentaram reduções significativas de diâmetro polar comparadas à variedade Herculex (Figura 2).

Figura 2 – Diâmetro polar de estômatos de folhas de plântulas híbridas e crioulas de milho (*Zea mays*), em função da temperatura.



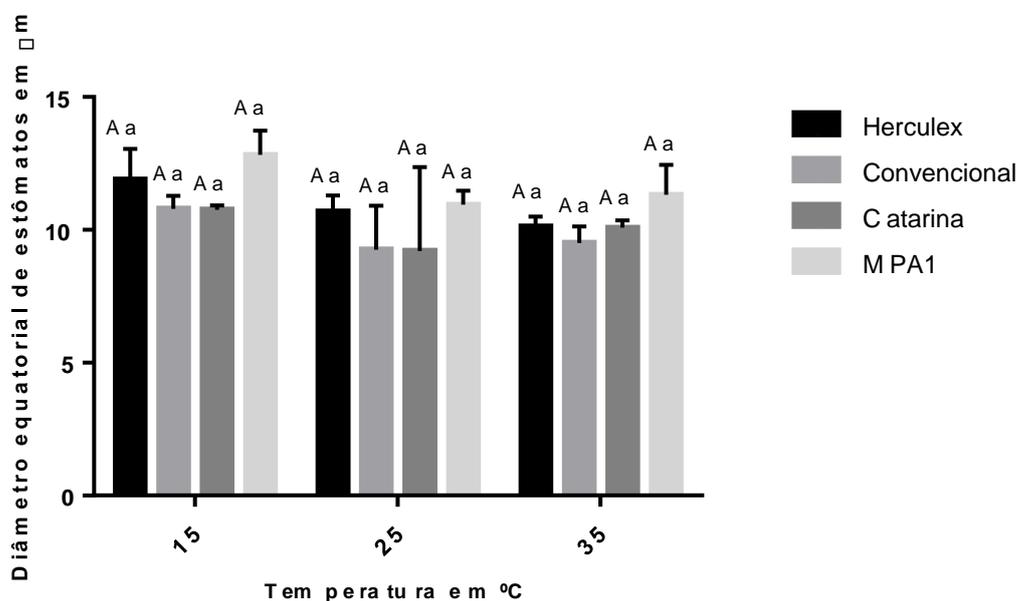
Fonte: Da autora

Nota: Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) com n=120 para cada tratamento.

Já em relação ao diâmetro equatorial dos estômatos não houve influência das temperaturas em quaisquer das variedades. Além disso, comparando-se as variedades entre si, não foram observadas diferenças significativas no diâmetro equatorial (Figura 3). O fato das plântulas apresentarem maior densidade de estômatos quando submetidas a altas temperaturas poderia estar relacionado a maior atividade fotossintética que deve ocorrer para compensar a maior atividade respiratória e a maior taxa de transpiração por parte dessas folhas, resultando na maior necessidade de trocas gasosas e liberação de vapor de água pelos

estômatos (BALDO, 2007). Por outro lado, estômatos menores podem reduzir a transpiração conferindo tolerância a perda de água resultante da alta taxa transpiratória que ocorre quando em condições de altas temperaturas. A densidade estomática está diretamente relacionada as trocas gasosas foliares e tem influência na transpiração e captação de CO₂ (CASTRO et al. 2009). O fato da variedade convencional apresentar maior número de estômatos, mas em tamanho menor pode ser um indicativo do processo de adaptação à altas temperaturas.

Figura 3 – Diâmetro equatorial dos estômatos de folhas de plântulas híbridas e crioulas de milho (*Zea mays*), em função da temperatura.



Fonte: Da autora

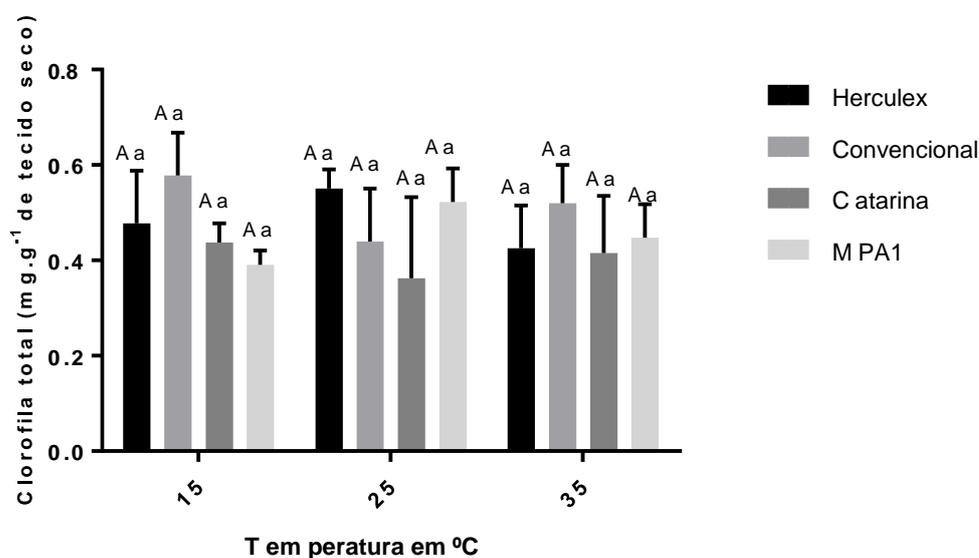
Nota: Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) com n=120 para cada tratamento.

Além da relação entre a densidade estomática e a capacidade fotossintética da planta, é fator extremamente importante na fotossíntese o número de cloroplastos e mais especificamente o conteúdo de clorofila para garantir a eficiência do processo fotossintético da planta em crescimento.

Segundo Streit et al. (2005), as clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas, em especial nos cloroplastos das folhas onde

desempenham papel importante na fotossíntese, sendo estes pigmentos os principais responsáveis pela captação de energia luminosa e transferência de elétrons (TAIZ, ZEIGER, 2013). Como pode ser observado na figura 4, não houve alteração significativa do conteúdo total de clorofila em nenhuma das variedades em quaisquer das temperaturas avaliadas, demonstrando que os fenótipos de milho em termos de conteúdo total de clorofila estudados no presente trabalho não sofreram alteração devido às diferentes temperaturas de desenvolvimento.

Figura 4 - Concentração de clorofila total (mg/g de matéria seca) do tecido foliar de plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.



Fonte: Da autora

Nota: Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Ainda, foi avaliado o conteúdo das clorofilas *a* e *b* nas amostras foliares das variedades estudadas. Os cloroplastos sempre contêm tanto clorofila *a* quanto clorofila *b*. Embora ambas sejam verdes, seus espectros de absorção são diferentes, de modo a complementarem a faixa de absorção de luz uma da outra na região visível. A maioria das plantas contém duas vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b* (NELSON e COX, 2011; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Como pode ser observado na tabela 4, a 25°C, obteve-se maior concentração de clorofila *a* para as variedades Herculex®, Convencional e MPA1, que não diferiram entre si e menor para a variedade Catarina. A variedade

Herculex® apresentou maior concentração a 25°C e menor a 35°C, demonstrando que apresenta maiores concentrações de clorofila na temperatura ideal para a espécie. Já a variedade MPA1, apresentou maior concentração de clorofila a nas temperaturas de estresse que a temperatura ideal para a espécie do milho, demonstrando ser influenciada de maneira diferente pela temperatura, na produção de clorofila a, do que a variedade híbrida Herculex®.

Tabela 4 - Concentração de clorofila a (mg/g matéria seca) do tecido foliar, em plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	0,20 ± 0,05 ^{Ab}	0,17 ± 0,01 ^{Ac}	0,24 ± 0,02 ^{Aa}
Convencional	0,24 ± 0,04 ^{Aa}	0,22 ± 0,05 ^{Aa}	0,16 ± 0,03 ^{Ab}
Catarina	0,17 ± 0,07 ^{Aa}	0,16 ± 0,03 ^{Ba}	0,15 ± 0,03 ^{Aa}
MPA1	0,23 ± 0,02 ^{Aa}	0,15 ± 0,07 ^{Bb}	0,24 ± 0,14 ^{Aa}

Fonte: Da autora.

Nota: Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Na Tabela 5, no ensaio a 15°C houve diferença significativa na concentração de Clorofila b, sendo que a variedade Convencional apresentou maior concentração, seguida de Catarina, Herculex® e MPA1, que não diferiram entre si. Este resultado demonstra que quando submetidas a estresse por baixa temperatura, a variedade crioula Catarina apresenta resultados de concentração de clorofila b semelhantes a uma variedade híbrida.

A variedade MPA1 apresentou menores concentração de clorofila b nos ensaios a 15 e a 25 e a 25 C, onde não diferiu de Convencional e apresentou maior concentração a 35 °C, como demonstrado na tabela 5, comparando as três as temperaturas. Os outros resultados não apresentaram diferença estatística.

Tabela 5 - Concentração de clorofila *b* (mg/g matéria seca) do tecido foliar, em plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	0,27 ± 0,06 ^{Ba}	0,24 ± 0,02 ^{Aa}	0,35 ± 0,06 ^{Aa}
Convencional	0,30 ± 0,05 ^{Aa}	0,30 ± 0,06 ^{Aa}	0,27 ± 0,05 ^{Aa}
Catarina	0,22 ± 0,02 ^{Ba}	0,22 ± 0,04 ^{Aa}	0,20 ± 0,04 ^{Aa}
MPA1	0,31 ± 0,02 ^{Aa}	0,27 ± 0,10 ^{Aa}	0,23 ± 0,07 ^{Ab}

Fonte: Da autora

Nota: Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Segundo Durães (2007), a temperatura é o mais importante dentre todos os fatores ambientais que influenciam a taxa de desenvolvimento da planta sendo que a fotossíntese foliar na espécie do milho tem uma temperatura mínima entre 0 °C e 10 °C, um ótimo na faixa dos 30 °C e um máximo de cerca de 45 °C. Ou seja, a fotossíntese é um processo que tem influência da temperatura, sendo que a produção de clorofila e a concentração de clorofila no cloroplasto é importante para que este processo ocorra de maneira eficiente.

Maiores temperaturas ocorrem nos momentos de maior radiação solar e igualmente nos momentos em que ocorrerão as maiores atividades fotossintéticas. Nesse caso, temperaturas elevadas, em condições de campo, ocasionarão maiores atividades fotossintéticas e conseqüentemente maior demanda por clorofila. Uma maior concentração de clorofila a alta temperatura, como ocorreu com a variedade Herculex® demonstra que a alta temperatura não ocasionou diminuição na produção de clorofila, assim como na variedade MPA1 que a 35 °C apresentou maior concentração de clorofila *a*, e menor de *b*.

Durante a fotossíntese, a energia luminosa é convertida em energia química e esta é utilizada para fixação de carbono na forma de açúcares. A partir dos açúcares ou de intermediários metabólicos originados a partir deles são sintetizadas outras biomoléculas com inúmeras funções no organismo vegetal (TAIZ, ZEIGER, 2013). Os carboidratos são os constituintes bioquímicos mais

abundantes nos vegetais, chegando a representar 50 a 80% do peso seco total destes. Eles são importantes fontes de energia e compõem a parte estrutural das células (CINIATO et al. 2007).

Dosar os carboidratos no tecido foliar é importante para inferir sobre a capacidade de sintetizar e armazenar energia nas plantas, sendo que quanto maior a eficiência fotossintética maior o acúmulo de carboidratos no tecido da planta. O milho é uma das plantas mais eficientes em termos de armazenamento de energia na forma de carboidratos existentes na natureza (MAGALHÃES et al., 2002).

A fim de avaliar a influência das diferentes temperaturas sobre capacidade de síntese de carboidratos e a disponibilidade energética das variedades de milho, foram quantificados os conteúdos de açúcares redutores, açúcares solúveis totais e amido nas folhas das plântulas.

Para a concentração de açúcares solúveis totais as variedades não diferiram significativamente entre si em quaisquer das temperaturas avaliadas (Tabela 6). No entanto, a variedade Catarina apresentou uma maior quantidade de açúcares solúveis a 25 °C, diferindo significativamente da acumulação em 15 e 35 °C, demonstrando que as temperaturas sub e supra ótima influenciaram na acumulação destes açúcares nesta variedade, o que não ocorreu com as demais.

Tabela 6 - Concentração de açúcares solúveis totais (mg/g tecido foliar) em folhas de plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	28,3 ± 0,44 _{Aa}	29,0 ± 0,37 _{Aa}	25,7 ± 0,55 _{Aa}
Convencional	30,0 ± 0,35 _{Aa}	33,9 ± 0,73 _{Aa}	28,7 ± 0,14 _{Aa}
Catarina	26,7 ± 0,52 _{Ab}	36,5 ± 0,30 _{Aa}	22,2 ± 0,12 _{Ab}
MPA1	27,5 ± 0,35 _{Aa}	29,4 ± 0,20 _{Aa}	26,3 ± 0,33 _{Aa}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ± DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Os açúcares solúveis totais, que compreendem o conjunto de todos os carboidratos presentes nas células (mono, oligo e polissacarídeos), além do seu papel central no metabolismo também regulam muitos outros processos fisiológicos (GIBSON, 2003). Essa função implica que a concentração desses açúcares nos tecidos pode direcionar a produção ou não de proteínas e/ou enzimas que possam ter funções de proteção ou adaptação da planta contra estresses ambientais, já que podem agir como sinalizadores celulares. Segundo Durães (2007), o genótipo do milho influencia a quantidade de energia fixada na planta, bem como sua distribuição para as várias partes da planta e dessa forma o armazenamento dos carboidratos na célula vegetal.

Segundo Durães (2007), a eficiência máxima de conversão da radiação solar em biomoléculas é afetada pela temperatura diurna e noturna reinante no período, bem como pela amplitude térmica, portanto uma alta temperatura, quando associada a uma alta taxa de radiação solar promove uma maior assimilação de carbono e conseqüente produção de biomoléculas, como os açúcares nas plantas.

Dentre os açúcares solúveis totais encontram-se os chamados açúcares redutores que são aqueles capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Pertencem a esse grupo os monossacarídeos como a glicose e a frutose (SILVA et al., 2003).

Para o parâmetro concentração de açúcares redutores houve diferença significativa, sendo que Herculex® apresentou maior concentração a 15 °C, seguida de Convencional, Catarina e MPA1. A 25 °C, Convencional apresentou maior concentração seguida de MPA1, Catarina e Herculex. A 35 °C não houve diferença estatística entre as variedades. As variedades Convencional e MPA1 apresentaram as menores concentrações de açúcares redutores a 15 e 35 °C e maiores a 25 °C. (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração de açúcares redutores (mg/g tecido foliar) em folhas de plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	1,09 ± 0,23 ^{Aa}	0,61 ± 0,20 ^{Db}	0,61 ± 0,21 ^{Ab}
Convencional	0,98 ± 0,17 ^{Bb}	1,13 ± 0,13 ^{Aa}	0,84 ± 0,007 ^{Ac}
Catarina	0,57 ± 0,03 ^{Ca}	0,80 ± 0,13 ^{Ca}	0,62 ± 0,11 ^{Aa}
MPA1	0,82 ± 0,12 ^{Db}	0,93 ± 0,03 ^{Ba}	0,65 ± 0,17 ^{Ac}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Esses resultados indicam que a 35 °C as variedades têm maior consumo de açúcares redutores o que pode estar associado a um menor desempenho fotossintético. O estudo de Grossi et al. (2011) demonstrou que temperaturas elevadas no cultivo do milho podem prejudicar seu rendimento, pois nesta condição ocorre um aumento da taxa respiratória, em detrimento da fotossíntese, reduzindo assim o acúmulo de fotoassimilados.

Além dos açúcares solúveis e dos açúcares redutores, o amido, formado a partir da ligação do monossacarídeo glicose, desempenha função de reserva nas plantas, sendo também o carboidrato mais comumente encontrado nas sementes (AMARAL, PEREIRA, CORTELAZZO, 2001). Foi quantificada a concentração de amido para avaliar a capacidade de armazenamento dos fotoassimilados pelas folhas das plântulas de milho.

Para o conteúdo de amido, a variedade Convencional apresentou diferença entre as temperaturas, com maiores concentrações a 15°C e 25 °C e menor a 35°C. Entre as variedades, a Convencional apresentou maior concentração de amido a 15°C. Isso possivelmente ocorreu devido a essas variedades terem utilizado as reservas de amido para suprir a demanda por açúcares utilizados na respiração, aumentada com a alta temperatura, como discutido anteriormente. As demais variedades não diferiram estatisticamente entre si nas temperaturas estudadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração de amido (mg/g de matéria seca) do tecido foliar de plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	2,84 ± 0,18 ^{Ba}	2,92 ± 0,19 ^{Aa}	2,68 ± 0,27 ^{Aa}
Convencional	3,85 ± 0,62 ^{Aa}	3,54 ± 0,58 ^{Aa}	2,60 ± 0,04 ^{Ab}
Catarina	2,74 ± 0,60 ^{Ba}	3,05 ± 0,40 ^{Aa}	2,73 ± 0,20 ^{Aa}
MPA1	2,98 ± 0,34 ^{Ba}	2,94 ± 0,23 ^{Aa}	3,11 ± 0,30 ^{Aa}

Fonte: Da autora

Nota: Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre as variedades nas diferentes temperaturas e letras minúsculas iguais na linha não diferem na variedade entre as temperaturas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ± DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Além dos carboidratos, o metabolismo de proteínas também é fator determinante na capacidade de crescimento e adaptação das plantas às condições ambientais. As proteínas constituem cerca de 30% do peso seco total das células vegetais. Uma das principais funções das proteínas no metabolismo é a sua ação como enzimas, catalizadores biológicos que aumentam a velocidade das reações bioquímicas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Além disso, as proteínas podem atuar também como hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares e outros (ZAIA et al., 1998).

À temperatura de 25 °C, considerada ideal para a espécie do milho, a variedade crioula MPA1 apresentou a maior concentração de proteínas no tecido foliar, seguida de Herculex e Convencional, que não diferiram entre si e Catarina, como o menor valor para proteínas (Tabela 9). Por outro lado, quando analisada a concentração de proteínas em condições de estresse por baixa temperatura, observa-se que as variedades não diferiram entre si, como ocorre também em condições de estresse por altas temperaturas.

Os resultados também demonstram que as variedades crioulas não sofreram alteração significativa na concentração de proteínas nas diferentes temperaturas. Já as variedades híbridas, quando submetidas tanto a estresse por alta quanto por baixa temperatura apresentaram menores concentrações de proteína em seus tecidos quando comparadas às condições ótimas de

desenvolvimento, ou seja, a 25 °C, demonstrando que sofrem influência da temperatura na concentração de proteínas.

Este fato pode ser explicado por Durães (2007), que destacou em seu trabalho que o rendimento do milho pode ser reduzido bem como pode ser alterada a composição proteica, quando da ocorrência de temperaturas acima de 35-37 °C por mais de três horas. O autor conclui ainda que este efeito pode estar relacionado à redução da atividade da redutase do nitrato, a qual afeta o processo de transformação do nitrogênio disponível para a planta, já que esta enzima é muito influenciada por fatores de estresse, sendo utilizada como indicadora de estresse em plantas. Visto isso, uma alta temperatura poderia influenciar negativamente o metabolismo de aminoácidos e proteínas nas plântulas de milho.

Tabela 9 - Conteúdo de proteínas (mg/mL) do tecido foliar de plântulas de milho (*Zea mays*) híbridas e crioulas em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	0,5680 ± 0,08 ^{Ab}	0,6817 ± 0,05 ^{Ba}	0,5050 ± 0,10 ^{Ab}
Convencional	0,5605 ± 0,05 ^{Ab}	0,6737 ± 0,05 ^{Ba}	0,4285 ± 0,06 ^{Ac}
Catarina	0,3820 ± 0,12 ^{Aa}	0,4900 ± 0,06 ^{Ca}	0,4085 ± 0,04 ^{Aa}
MPA1	0,5982 ± 0,11 ^{Aa}	0,8067 ± 0,11 ^{Aa}	0,5675 ± 0,14 ^{Aa}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Assim como a fotossíntese, o metabolismo e crescimento das plantas depende da respiração aeróbica que exige oxigênio. O oxigênio constitui 21% da composição do ar e é indispensável para a produção de energia pelos organismos vivos visto que participa como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Entretanto, o oxigênio pode causar efeitos deletérios reversíveis e irreversíveis nas células, pois o seu metabolismo pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses efeitos variam conforme o tipo de organismo, seu estado fisiológico e suas defesas antioxidantes, como também diferentes tecidos

de um ser vivo reagem e são afetados de maneira diferente por esses efeitos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O metabolismo do oxigênio pode gerar as espécies reativas do oxigênio (EROs), como o oxigênio singleto, o radical superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Em concentrações elevadas, as EROs podem gerar um estado de estresse oxidativo, resultado de sua ação sobre proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA provocando danos e injúrias celulares que podem estar relacionadas ao aparecimento de estados patológicos (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Em sistemas aeróbicos o equilíbrio entre agentes óxido-redutores como as EROs e o sistema de defesa antioxidante é essencial para evitar o estresse oxidativo e pode ser dividido em enzimático e não enzimático e atua em duas linhas, uma que evita a lesão e outra em que o dano oxidativo é reparado (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Através da ação de enzimas antioxidantes o organismo mantém as concentrações de ERO's dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO *et al.*, 2005), evitando assim o estresse oxidativo, que ocorre quando os mecanismos antioxidantes, tanto os enzimáticos quanto os não enzimáticos não são suficientes para neutralizar a geração de ERO's dentro das células.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de espécies reativas de oxigênio, porém a membrana é um dos componentes celulares mais atingidos através do processo de peroxidação dos lipídeos, definido como a deterioração oxidativa dos lipídeos poli-insaturados que são os ácidos graxos que contem ligações duplas entre carbonos. A molécula de oxigênio singleto (1O_2) é um dos principais responsáveis pela peroxidação lipídica nos cloroplastos. (TRANTAPHYLIDES & HAVAUX, 2009 *apud* BARBOSA *et al.*, 2014).

A integridade da membrana celular é importante para que a célula mantenha propriedades como a permeabilidade seletiva e a sua estrutura característica. Na presença das ERO's, a peroxidação lipídica acaba acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO FILHO *et al.*, 1983) levando a alterações no funcionamento e na homeostasia das células e tecidos.

Assim, se uma variedade de milho possui um mecanismo antioxidante eficiente, principalmente sofrendo menos com a peroxidação dos lipídeos de

suas membranas, pode ter um melhor desempenho em condições de estresse ambiental, como o estresse causado pela variação de temperatura. Para avaliação da capacidade de defesa e/ou resposta adaptativa das variedades de milho frente ao estresse por temperatura e a geração de espécies reativas e estresse oxidativo foi avaliado o dano causado pela peroxidação lipídica no tecido foliar.

Pode-se observar na Tabela 10, que a variedade MPA1 foi a variedade que menos sofreu danos pela peroxidação lipídica a 15 °C, seguida de Catarina, Convencional e Herculex. Os resultados demonstram que as variedades híbridas, quando submetidas a estresse, foram as que sofreram os maiores danos em suas membranas. A 25 °C as variedades Herculex®, Convencional e Catarina apresentaram menor dano, não diferindo entre si. MPA1 apresentou o maior dano a 25 °C. Em condição de estresse por alta temperatura, novamente a variedade MPA1 se destacou, apresentando o menor dano por peroxidação lipídica, seguida de Herculex®, Catarina e Convencional. Pode-se observar também que as variedades híbridas, de maneira geral, apresentaram menor dano por peroxidação na temperatura ideal para o desenvolvimento do milho (25 °C) e maior dano quando submetidas a estresse. Já as variedades crioulas apresentaram menor dano por peroxidação lipídica quando submetidas a estresse, tanto por alta quanto por baixa temperatura e maior quando na temperatura ideal.

Tabela 10 - Peroxidação lipídica (LPO) (nmol MDA/g de tecido seco) no tecido foliar de plântulas híbridas e crioulas de milho (*Zea mays*) em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	4,1812 ± 1,36 ^{Db}	2,4817 ± 0,73 ^{Aa}	2,7935 ± 1,27 ^{Ba}
Convencional	3,7987 ± 1,12 ^{Cb}	2,6570 ± 0,87 ^{Aa}	4,4937 ± 2,84 ^{Cc}
Catarina	1,7837 ± 0,56 ^{Ba}	2,9400 ± 1,55 ^{Ab}	2,3022 ± 0,99 ^{Ba}
MPA1	1,3667 ± 1,11 ^{Aa}	4,4367 ± 0,37 ^{Bb}	1,7380 ± 0,71 ^{Aa}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Estes resultados sugerem que as variedades crioulas possam apresentar mecanismos de defesa antioxidantes mais eficientes quando em condições de estresse por baixas e por altas temperaturas. No entanto, foi observado que a 25 °C as variedades crioulas MPA1 e Catarina apresentaram um aumento na peroxidação lipídica, quando comparadas entre as temperaturas estudadas e MPA1 apresentou maior peroxidação lipídica comparada entre as temperaturas e entre as variedades, indicando menor capacidade de defesa a esta temperatura. Em condições de estresse, pode-se sugerir que as crioulas foram as variedades que menos foram danificadas pela ação das EROs que atuam sobre as membranas celulares. Cruz et al. (2007), encontrou resultado semelhante em seu trabalho, onde a 10 °C, temperatura que ocasiona estresse por baixa temperatura, a peroxidação lipídica nas membranas de cultivares de milho foi maior devido aos danos causados pela embebição da semente a frio, como ocorreu também com as variedades híbridas neste trabalho, sugerindo que estas variedades tem uma menor adaptação a temperaturas baixas, sendo prejudicadas quando submetidas a baixas temperaturas.

Quando os mecanismos antioxidantes não atuam de forma eficiente na eliminação das EROs geradas nas células, a peroxidação lipídica se torna um dos principais danos atribuídos ao estresse oxidativo e frequentemente é utilizada como um marcador de danos às membranas celulares (HERNANDEZ et al., 2000 apud CARNEIRO et al. 2011). Dessa forma, um sistema antioxidante eficiente deve contar com a participação das várias enzimas responsáveis pela neutralização de agentes oxidantes, sendo que as enzimas agem em conjunto, uma em seguida da outra, para a eliminação destes agentes das células. Frente a isso, a fim de complementar a avaliação dos mecanismos antioxidantes das variedades híbridas e crioulas frente ao estresse por temperatura, foram estudadas as atividades de algumas enzimas do sistema de defesa antioxidante enzimático do tecido foliar.

A ascorbato peroxidase (APX) é uma das enzimas antioxidantes responsáveis pela degradação do H₂O₂(Peróxido de hidrogênio) utilizando o ascorbato como substrato. Esta enzima é importante na defesa de tecidos fotossintéticos contra o estresse oxidativo, no entanto também é encontrada no

citossol das células não fotossintetizantes atuando na redução dos níveis de EROs (ASADA, 1992 *apud* ROSSI, 2012). O H_2O_2 é removido da célula em uma série de reações enzimáticas que envolvem, dentre outras enzimas, a glutathione redutase e a APX (LOPES *et al.*, 2006).

Quanto à atividade da enzima APX no tecido foliar das plântulas de milho, de acordo com os dados da Tabela 11, a variedade híbrida Convencional e a crioula Catarina apresentaram aumento significativo de atividade da APX a 35 °C comparado com as demais temperaturas. Ainda, cabe ressaltar que todas as variedades apresentaram aumentos de atividade (não significativo) da APX tanto em temperatura alta (35 °C) quanto em temperatura baixa (15 °C) comparados à condição ótima de cultivo (25 °C).

A enzima APX utiliza o ascorbato para reduzir o H_2O_2 à água, gerando monodehidroascorbato que é regenerado novamente a ascorbato, mantendo o sistema antioxidante ativo. A APX desempenha seu papel nos cloroplastos e citossol e mudanças na atividade desta enzima estão estritamente correlacionadas com a tolerância das plantas ao estresse oxidativo (Lee *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 2001 *apud* CARNEIRO *et al.* 2011).

Portanto, a atividade da APX possivelmente é maior em condições em que estejam ocorrendo danos aos tecidos, como em situações de estresse por temperatura. Pode-se observar esse comportamento quando se observa que a atividade da APX na variedade Convencional e Catarina, que foi maior quando em estresse tanto por alta quanto por baixa temperatura. As outras variedades não apresentaram diferença significativa entre as temperaturas.

Tabela 11 - Atividade específica da Ascorbato Peroxidase (APX) (mmoles de ascorbato oxidado/min/mg de proteína) no tecido foliar de plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	1,3762 ± 0,14 _{Aa}	0,9837 ± 0,27 _{Aa}	1,0795 ± 0,67 _{Ca}
Convencional	3,1355 ± 1,92 _{Ab}	1,7360 ± 0,63 _{Ac}	4,6595 ± 1,33 _{Ba}
Catarina	2,1732 ± 0,68 _{Ab}	1,6610 ± 0,87 _{Ab}	5,1970 ± 0,15 _{Aa}
MPA1	1,4135 ± 0,49 _{Aa}	0,9082 ± 0,18 _{Aa}	0,4690 ± 0,64 _{Ca}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média ±DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

Sendo assim, pode-se sugerir que uma maior atividade da enzima APX estaria relacionada à um maior potencial de resposta à ERO (peróxido de hidrogênio) e adaptação da variedade à condição de estresse por extremos de temperatura, em especial das variedades Catarina e Convencional

Outra enzima importante do sistema de defesa antioxidante é a enzima Superóxido Dismutase (SOD). Esta foi a primeira enzima envolvida na defesa antioxidante descoberta e pertence à uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição, podendo apresentar duas formas, uma que está presente principalmente no citosol e outra localizada primariamente na mitocôndria das células. A SOD catalisa a reação de neutralização do radical superóxido transformando-o em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Para a atividade da SOD no tecido foliar os resultados (Tabela 12) demonstraram que as variedades diferiram significativamente entre si, sendo que Catarina foi a que apresentou a maior atividade a 15 °C e a 25 °C comparada com as demais variedades.

Além disso, nas variedades híbridas ocorreu um aumento significativo da atividade da SOD nos extremos de temperatura (15 °C e 35 °C) comparado com a condição ótima (25 °C) enquanto que nas variedades crioulas foi observado uma maior atividade da SOD apenas na temperatura mais baixa (15 °C).

Tabela 12 - Atividade específica da enzima Superóxido Dismutase (U/ μ g de proteína) no tecido foliar de plântulas de milho (*Zea mays*) híbrido e crioulo em função da temperatura.

Variedades	Temperaturas (°C)		
	15	25	35
Herculex®	0,3420 \pm 0,05 ^{Ba}	0,2175 \pm 0,02 ^{Cc}	0,2802 \pm 0,03 ^{Bb}
Convencional	0,3347 \pm 0,04 ^{Bb}	0,2237 \pm 0,01 ^{Cc}	0,3790 \pm 0,06 ^{Aa}
Catarina	0,5182 \pm 0,18 ^{Aa}	0,3572 \pm 0,07 ^{Ab}	0,3077 \pm 0,13 ^{Bb}
MPA1	0,2875 \pm 0,07 ^{Ca}	0,2335 \pm 0,03 ^{Bb}	0,1640 \pm 0,11 ^{Cc}

Fonte: Da autora

Nota: Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores são expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) com n=10 para cada tratamento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- A qualidade fisiológica das sementes híbridas foi superior, apesar da variedade crioula Catarina apresentar resultados semelhantes à variedade Convencional. A temperatura de 15 °C reduziu a velocidade do processo de germinação das sementes de milho, porém não afetou o processo em si. A temperatura de 35 °C afetou drasticamente o processo de germinação de todas as variedades.
- O parâmetro diâmetro polar de estômatos é sensível a temperatura de 35 °C, sendo influenciado pelo estresse causado pela temperatura.
- O conteúdo de clorofila *a* e *b* do milho foram alterados em função da temperatura.
- A temperatura influenciou na acumulação de açúcares, sendo que a concentração de amido foi maior em condições de estresse.

- As variedades híbridas são mais influenciadas pela temperatura quanto a acumulação de proteínas e a peroxidação lipídica sendo que a variedade crioula MPA1 foi a que apresentou maior concentração de proteínas e menor dano por peroxidação lipídica nas diferentes temperaturas.
- As variedades Convencional e Catarina apresentaram maior adaptação a altas e baixas temperaturas já que apresentaram maior atividade da APX.
- A temperatura alta afetou a atividade da SOD diferentemente nas variedades híbridas e nas crioulas, sendo que reduziu a atividade nas crioulas e aumentou nas híbridas.
- Apesar de a qualidade fisiológica das sementes crioulas serem inferiores a das sementes híbridas, observou-se que as variedades crioulas apresentam um bom desempenho quando submetidas a estresse por temperatura, devido a sua adaptação ao clima onde são cultivadas.

7 REFERÊNCIAS

ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipooxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p. 213 – 223, 2005.

ALMESELMANI, M.; DESHMUKH, P.S.; SAIRAM, R.K.; KUSHWAHA, S.R.; SINGH, T.P. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science**, v. 171, p. 382 – 388, 2006.

AMARAL, L. I. V.; PEREIRA, M. F. D. A.; CORTELAZZO, A. L. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.- Bixaceae). **Revista Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.15, n.1, p. 125-132, 2001.

ANDERSON, M.P.; GRONWALDS, J.W. Atrazine resistance in velvet leaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiology**, v.96, p. 107-109, 1991.

- ANDREOLI, C. et al. Influência da germinação da semente e da densidade de semeadura no estabelecimento do estande e na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Sementes**. v.24, n.2, p. 1-5, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 55, p. 373 – 399, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. 88 p. (Contribution, 32).
- AOYAMA, E. M.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C. **Adaptações estruturais das plantas ao ambiente**. São Paulo, 2006.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.44, n.3, p.453460, 2014.
- BALDO, M. N. **Comportamento anatômico, fisiológico e agrônomo do milho submetidos a estresse de ambientes em diferentes estágios fenológicos**. 2007. F. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia) ESALQ – Piracicaba, SP, 2007.
- BERMEJO, H.J.E; LEON, J. **Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492**. Roma: FAO, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análises de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, nov. 1991.
- CANCI, I.J. **Relações dos sistemas informais de conhecimento no manejo da agrobiodiversidade no Oeste de Santa Catarina**. 2006. f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2006.
- CANIATO, F.F. et al. Quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido nos grãos verdes de cultivares de milho na colheita. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.6,p. 1893-1896, 2007.
- CENTRO ECOLÓGICO (Brasil). Biodiversidade: passado, presente e futuro da humanidade. **Cartilha**, 2006, 83 p.

CHAGAS, R. M. **Alterações fotossintéticas e respostas oxidativa em plantas de cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.) tratadas com paraquat.**

Dissertação (Mestrado) ESALQ, Piracicaba, 2007, 82p.

CONN, E. C.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica.** São Paulo: Edgard Bliicher, 1980, p.451.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al.. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 4 p. 752 - 761, 2011.

CRUZ, I.; GONÇALVES, E. P. **Influência da temperatura sobre a germinação de diferentes genótipos de milho, em diferentes épocas de avaliação, após o tratamento químico com diferentes inseticidas.** CNPMS, Sete Lagoas, 1988.

CRUZ, H. L. et al. Avaliação de genótipos demilho para semeadura precoce sob influencia de baixa temperatura. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, Londrina, 2007.

DASH, S.; MOHANTY, N. Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: growth temperature-dependent differential modulation of photosystem 1 and 2 activity, and foliar antioxidant defense capacity. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 49 – 59, 2002.

DURÃES, F. O. M. **Limitações fisiológicas do milho nas condições de plantio nas regiões tropicais baixas.** 2007. Artigo em hipertexto. Disponível em: http://www.infobios.com/artigos/2007_1/limitemilho/index.htm Acesso em 29/11/2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Ass Med Brasil**, Botucatu, v.43, n. 1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, D. F. **Sisvar** – Sistema de Análise de Variância. 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **PlantPhysiologyandBiochemistry**, v. 48, p. 909 – 930, 2010.

GROSSI et al. Influência da radiação solar e da temperatura do ar na produtividade potencial simulada do milho (*Zea mays*) em Sete Lagoas – MG. In XVII Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, Guarapari – ES. **Anais...** 2011.

GUIMARÃES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (Coffea arábica, L.)**. 2000. 180 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

GULEN, H.; ERIS, A. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. **Plant Science**, v.166, p. 739 – 744, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 4. ed. USA: Oxford University Press, 2007. 704p.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. 3rd. ed. Zurich: ISTA, 1995. 117 p.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photo peroxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HU, W.H.; SONG, X.S.; SHI, K.; XIA, X.J.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. **Photosynthetica**, v. 46, p. 581 – 588, 2008.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940. 523p.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Guanabara Koogan, 2008. 446p.

KOTCHONI, S.O.; GACHOMO, E.W. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquire disease resistance in plants. **Journal of Bioscience**, v. 31, n.3, p.389-404, 2006.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, p.1-16, 2012.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D. V.; NETO J. B. F. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. C.; SALGADO-LABORIAU, M. L. Transpiração de *Shizolobium parahyba* (Vell.). TOLEDO, J. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-257, 1961.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de **Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LOPES, M. J. C. et al. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em plântulas de diferentes ciclos de seleção do milho 'saracura' sob encharcamento contínuo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Sete Lagoas, , MG. Anais... Sete Lagoas, 2006.

MAIA, A. S., NUNEZ, P. B. P. Sementes crioulas: um banco de biodiversidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.1, n.2, p.4, 2006.

MAGALHÃES, P. C. et al. **Fisiologia do milho**. Circular técnica 22. Embrapa, Sete Lagoas, 2003.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MENEGUETTI, G.A.; GIRARDI, J.L.; REGINATTO, J.C. Milho Crioulo: Tecnologia Viável e Sustentável. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 3, p.12-17, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
PELWING, A.B.; FRANK, L.B.; BARROS, I.I.B. Sementes crioulas: o Estado da Arte no Rio Grande do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.46, n.2, p. 391-420, 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p. 405-410, 2002.

MULVANY, P.; BERGER, R. Biodiversidad agrícola: cuando los agricultores mantienen la red de la vida. In: CIP-UPWARD. **Consercación y uso Sostenible de la Biodiversidad Agrícola**: Libro de consulta. Los Baños, Filipinas: Centro Internacional de la Papa, vol. 01, p. 14-21, 2003.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbatospecific peroxidase. In spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p.867-880, 1981.

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of structure principles and selected methods**. Melbourne: Termercarphi Pty, 1981. 280 p.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA. **Situação mundial de conservação dos recursos genéticos das espécies alimentares**. FAO, 1996.

PELWING, A.B.; FRANK, L.B.; BARROS, I.I.B. Sementes crioulas: o estado da arte no Rio Grande do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.46, n.2, p.391-420, 2008.

PINHEIRO, S.; NASR, N. Y.; LUZ, D. **A agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil**. Porto Alegre: Edição dos Autores, 2000. p. 356.

PRASAD, T. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v.6, p. 65-74, 1994.

PRASAD, T.K. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. **Plant Physiology**, v.114, p.1369 – 1376, 1997.

ROSA, M. et al. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.5, p.388-393, 2009.

SCANDALIOS, J.G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v.156, p. 103 – 110, 2000.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasileira**. V. 19, n. 1, p. 183194, 2005.

STEVENS, R. et al. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. **Plant Cell Environment**, v.31, p. 1086 – 1096, 2008.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Revista Ciência Rural**, v.35, n.3, 2005, p.748-755.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre : Artmed, 2004. p.693.

THEOCHARIS, A.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. **Planta**,v.235, p.1091–1105, 2012.

TRINDADE, C. C. Sementes Crioulas e Transgênicas, uma reflexão sobre sua relação com as comunidades tradicionais. In: XV Congresso Nacional do Conpedi, Manaus, AM. 2006. **Anais...** 2006.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

WAHID, A. et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, v.61, p.199 – 223, 2007.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v.57, n.3, p. 508-514, 1954.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**. São Paulo, USP, v.21, n.6,p.787-793.1998.