COMPORTAMENTO DE SEMENTES DE MILHO HÍBRIDO PRECOCE E
NORMAL DURANTE O ARMAZENAMENTO

DENISE AUGUSTA CAMARGO BILIA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO LUIZ FANCELLI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
concentração: Fitotecnia

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
NOVEMBRO - 1992

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP**

B595c Bilia, Denise Augusta Camargo
 Comportamento de sementes de milho híbrido preco-
 ce e normal durante o armazenamento. Piracicaba.
 1992.
 96p.

 Diss.(Mestre) - ESALQ
 Bibliografia.

 1. Milho - Semente - Armazenamento 2. Semente -
 Armazenamento - Comportamento I. Escola Superior
 de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba

CDD 633.15

COMPORTAMENTO DE SEMENTES DE MILHO HIBRIDO PRECOCE E
NORMAL DURANTE O ARMAZENAMENTO

DENISE AUGUSTA CAMARGO BILIA

Aprovada em: 07.12.1992

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Luiz Fancelli

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sílvio Moure Cícero

ESALQ/USP

Dr. Joaquim A. Machado

AGROCERES S/A

Prof. Dr. Antonio Luiz Fancelli

Orientador

A Deus
pela benção da vida
agradeço

A meu Pai Waldemar, à minha Mãe Maria
Augusta e ao meu irmão Fernando
pelo amor que me dedicam
ofereço

A meu Pai e ao Juba
pelas lições e a certeza de tê-los
sempre por perto
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antonio Luiz Fancelii, pela orientação e amizade.

Ao professor Júlio Marcos Filho pela auxílio na orientação e atenção.

Ao Engenheiro Agrônomo Joaquim A. Machado pela ajuda técnica, incentivo e principalmente pelo seu entusiasmo constante pelas descobertas.

Ao professor Décio Barbin pela colaboração no planejamento da análise estatística, e a João Carlos de O. Vianna pelo auxílio na execução da mesma e pela sua prontidão em ajudar.

Ao professor Walter Rodrigues da Silva pela amizade tranquila e incentivo constante.

Ao professor Silvio Moure Cícero por me ensinar que as críticas podem ser imparciais.

Aos amigos agrônomos Maria Laene Carvalho, Denise e Luis Antonio Dias, Francine Cuquel, Eloisa Jendiroba, Carlos Eduardo Pulcinelli, Elmar Floss, Helena Pescarin Chamma, Amarildo Pasini e Ana Novembre, pela amizade e apoio durante o curso.

A Sementes Agrocere, na pessoa de Joaquim A. Machado, pela utilização do laboratório de pesquisa e facilidades proporcionadas.

A Sementes Pioneer, na pessoa de Geraldo Davanzo, pelo fornecimento das sementes utilizadas.

Ao CNPQ pela bolsa de estudo concedida.

Aos amigos Touchê, Anna Cândida, Marcio, Mel, Cris, Marisa, Nando e à todas as crianças do Centro de Reabilitação e do CRAMI, por tudo que me ajudaram a descobrir, e que tornou essa caminhada mais e clara e alegre.

À todos que me ajudaram a realizar esse trabalho e a enfrentar os momentos difíceis.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Deterioração de sementes.....	3
2.2. Armazenamento de sementes.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Híbridos.....	22
3.2. Condições de armazenamento.....	23
3.3. Tratamentos.....	24
3.4. Testes comuns de laboratório.....	26
3.4.1. Teste de germinação.....	26
3.4.2. Teste de primeira contagem da germinação	26
3.4.3. Teste de envelhecimento.....	27
3.4.4. Teste de frio com a utilização de solo	27
3.4.5. Teste de frio sem a utilização de solo	28
3.4.6. Teste de condutividade elétrica.....	28
3.5. Teste de campo.....	29
3.6. Análises eletroforéticas.....	29
3.6.1. Análise da expressão de proteínas do	
endosperma.....	29
3.6.1.1. Soluções , tampões e reagentes	30
3.6.1.2. Procedimentos.....	31
3.6.1.3. Eletroforese SDS-PAGE.....	32
3.6.1.4. Comparação dos perfis.....	34
3.6.2. Análise da expressão da isoenzima	
esterase.....	34
3.6.2.1. Soluções, tampões e reagentes	35

3.6.2.2. Procedimentos.....	35
3.6.2.3. Comparação dos perfis.....	36
3.7. Métodos Estatísticos.....	36
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Caracterização inicial dos híbridos.....	39
4.2. Híbridos.....	41
4.3. Ambientes de armazenamento.....	46
4.4. Estresse.....	51
4.5. Épocas de avaliação.....	56
4.6. Quarto período de avaliação.....	57
4.7. Análises eletroforéticas.....	64
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Guia de preparação de eletroforese SDS- gel. .	33
2. Esquema de análise de variância dos dados obtidos nos testes de avaliação da qualidade das sementes, para cada época.	37
3. Esquema da análise de variância na comparação entre épocas de avaliação da qualidade das sementes.	38
4. Resultados médios relativos à caracterização inicial dos híbridos, obtidos nos testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes no início do armazenamento.	40
5. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, em função de cada época de avaliação.	42
6. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, em função de três épocas biemstrais.	43
7. Valores médios (%) obtidos para híbridos estudados em 3 ambientes aos 6 meses de armazenamento no teste de envelhecimento acelerado.....	45

8. Valores médios (%) obtidos para híbridos estudados em 3 ambientes aos 6 meses de armazenamento, no teste de frio sem solo.....	46
9. Resultados médios obtidos nos testes de avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido armazenadas em diferentes ambientes de conservação em função de cada época de avaliação.	49
10. Resultados médios obtidos nos testes de avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido armazenadas em diferentes ambientes de conservação em função de três épocas bimestrais.	50
11. Valores de F para efeito de estresse, nas determinações realizadas em função de cada época de avaliação.	52
12. Valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho híbrido, submetidas ou não a estresse no momento dos testes, em função de três épocas bimestrais.	53
13. Valores médios (%) obtidos para ambientes e estresses aos 2 meses de armazenamento, no teste de primeira contagem de germinação..	54
14. Valores médios (%) obtidos para ambientes e estresses aos 4 meses de armazenamento, no teste de frio com solo.....	55

15. Valores médios (%) obtidos para ambientes e estresses aos 6 meses de armazenamento, no teste de frio com solo.	55
16. Valores médios obtidos em testes de germinação e vigor em função de três épocas bimestrais de avaliação.	57
17. Valores médios obtidos nos testes de avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido armazenadas em diferentes ambientes de conservação, realizada aos 8 meses de armazenamento.	59
18. Valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido, submetidas ou não à estresse, realizada aos 8 meses de armazenamento.	60
19. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, realizadas aos 8 meses de armazenamento.	61
20. Valores médios (%) obtidos para híbridos e estresses no teste de frio com solo aos 8 meses de armazenamento.	63
21. Valores médios para interação híbridos e ambientes no teste de frio sem solo, aos 8 meses de armazenamento.	63

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Variação de temperatura e umidade relativa do ar em Piracicaba, durante o experimento.	24
2. Perfil eletroforético da expressão das proteínas totais do endosperma de milho.	64
3. Esquema representativo do perfil eletroforético da expressão de proteínas totais do endosperma...	65
4. Expressão das bandas proteicas e intensidade de coloração para o híbrido Pioneer 3072.	66
5. Expressão das bandas proteicas e intensidade de coloração para o híbrido Pioneer 3210.	67
6. Perfil eletroforético da expressão da isoenzima esterase nos 6 primeiros meses de armazenamento...	68
7. Perfil eletroforético da expressão da isoenzima esterase na avaliação aos 8 meses de armazenamento	69

**COMPORTAMENTO DE SEMENTES DE MILHO HÍBRIDO PRECOCE E
NORMAL DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Autor: Denise Augusta Camargo Bilia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Fancelli

RESUMO:

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de análise de sementes e campo experimental do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, em Piracicaba-SP, e no laboratório de biotecnologia da Companhia de Sementes Agrocere S.A., localizado em Santa Cruz das Palmeiras - SP. Tendo objetivo avaliar o comportamento de sementes de milho híbrido de ciclo precoce e normal durante o armazenamento.

Para tanto, foram utilizadas sementes dos híbridos Pioneer 3072 e 3210, as quais foram armazenadas sob três condições distintas: câmara seca, câmara fria e condição ambiente, durante 8 meses, e avaliadas quanto a qualidade fisiológica, em quatro épocas bimestrais, sendo parte das mesmas submetidas à estresse adicional no momento de realização dos testes.

Para detecção da diferença de comportamento dos materiais estudados foram empregados os testes de

germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, teste de frio (com e sem solo), condutividade elétrica, emergência de plântulas em campo e análises eletroforéticas de proteínas totais do endosperma e da isoenzima esterase.

As análise dos dados e a interpretação dos resultados permitiram concluir que:

- Híbridos de milho de ciclo de maturação mais precoce apresentam tendência a perdas de qualidade mais aceleradas durante o armazenamento, principalmente se conservados em condição ambiente (sem controle de temperatura e umidade relativa do ar).

- A análise eletroforética viabiliza a utilização potencial de marcas moleculares na avaliação da qualidade das sementes em processo de deterioração.

A região de expressão proteica similar à proteína de peso molecular 43kD (ovoalbumina) e a posição R₄ da expressão do gene de esterase são possíveis marcas moleculares relacionadas a alterações metabólicas das sementes em processo de deterioração.

- A condição ambiente proporciona menor eficácia na conservação da qualidade das sementes, independentemente do ciclo de maturação dos híbridos de milho.

- O estresse influencia o desempenho das sementes, sendo responsável por perdas a partir dos 6 meses de armazenamento.

- Os testes mais sensíveis na detecção de alterações da qualidade fisiológica de sementes são os testes de frio com e sem solo e o teste de envelhecimento acelerado.

**PERFORMANCE OF EARLY- AND NORMAL-MATURING HYBRID CORN
SEEDS DURING STORAGE.**

Author: Denise Augusta Camargo Bilia

Adviser: Prof Dr. Antonio Luiz Fancelli

SUMMARY:

The present study was carried out at the seed analysis laboratory and experimental field belonging to the Department of Agriculture of Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil, and at the biotechnology laboratory of Companhia de Sementes Agroceres S.A., situated in Santa Cruz das Palmeiras, State of São Paulo, Brazil. It was to evaluate the performance early- and normal-maturing hybrid corn seeds during storage.

Pioneer 3072 and 3210 hybrid seeds were employed in the research, having been stored under three distinct conditions: dry chamber, cold chamber and environmental conditions, for eight months; evaluations were carried out on the physiological quality, in four bimonthly

periods, having part of the seeds been submitted to additional stress at time the tests were conducted.

The detection of performance differences between the studied material was achieved through the employment of germination test, germination first count, accelerated aging, cold test (with and without soil), electrical conductivity, seedling field emergence, and electrophoretic analysis.

Data analysis and results interpretation allow one to conclude that:

- Early maturing corn hybrids present tendency to more accelerated quality losses during storage, mainly if maintained in environmental condition.

- Results for eletrophoretic analysis indicate the feasibility of molecular markes for seed quality evaluation.

- Proteic expression region similar to 43 kD molecular weight protein (Ovoalbumine) the R₄ position of esterase gene expression are propably molecular marker related to seed metabolical alterations relationed to seed deterioration.

- Environmental conditions allow less efficacy on the seed quality conservation, independently of the corn hybrid maturing cycle.

- Stress influences seed performance, being responsible for losses ocurred after the sixth months of storage.

- The most sensible tests for the detection of seed physiological quality alteration are the cold test (with and without soil) and the accelerated aging test.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de sementes de boa qualidade na instalação de lavouras de milho é fundamental para o estabelecimento da cultura no campo, com significativos benefícios no rendimento.

Dentro das atividades do processo produtivo, etapas como a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes se encontram bastante desenvolvidas, enquanto outras, como o armazenamento, requerem maiores estudos.

A deterioração das sementes se constitui em grande problema para a agricultura, sendo responsável por sérias perdas no mundo inteiro e, principalmente, nos trópicos onde, de maneira geral, elevadas temperaturas e umidades relativas do ar prevalecem durante o período de maturação e armazenamento do produto.

Conforme LOZANO & LEOPOLD (1988), com a introdução de milho para alta produção em países em desenvolvimento, as perdas pós-colheita tem evidenciado tendência de aumento devido aos novos cultivares não serem

tão adaptados à tais condições como os materiais tradicionais.

Entre linhagens e materiais básicos de sementes há diferenças marcantes quanto à sobrevivência durante o armazenamento (MORENO *et al.*, 1978), embora seja escasso o conhecimento efetivo dos mecanismos condicionantes dessa diferença.

O estudo do comportamento de sementes de milho, relativo à diferentes ciclos de maturação, reveste-se de importância para o emprego adequado do armazenamento na preservação da qualidade do material destinado à semeadura, em vista da grande diferença de ciclo dos materiais existentes no mercado.

Assim, o presente trabalho objetiva avaliar o comportamento de sementes de milho híbrido de ciclo precoce e normal durante o armazenamento, submetidos ou não à estresse, sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar; bem como verificar a possibilidade de utilização da análise eletroforética de marcas moleculares na detecção de modificações na expressão proteica total do endosperma do milho e, na expressão da isoenzima esterase para avaliação da qualidade de sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Deterioração das sementes

A deterioração é definida como toda e qualquer transformação degenerativa da semente, podendo ser de origem bioquímica, física, fisiológica ou genética. Constitui-se em um processo contínuo e universal, com direção progressiva, em níveis variáveis, rumo a perda de viabilidade e mudanças nas propriedades fisiológicas e bioquímicas. A deterioração pode começar cedo, quando a semente atinge a maturidade fisiológica e continuar até a morte da semente, sendo a perda da capacidade germinativa uma das manifestações finais da deterioração.

Embora a deterioração seja irreversível e inevitável, a velocidade do processo pode, até certo ponto, ser controlada pelo emprego de técnicas adequadas de colheita, secagem, beneficiamento, manuseio e armazenamento (POPINIGIS, 1977).

Para CHING & SCHOOLCRAFT (1968), o mecanismo de envelhecimento ou deterioração era ainda um enigma, sendo

necessário entender esse processo, em seqüência, para garantir condições e prescrições adequadas para o armazenamento das sementes.

DELOUCHE & BASKIN (1973), entendiam a deterioração como uma seqüência hipotética de eventos, que se inicia com a desorganização de membranas e perda de sua permeabilidade, e culmina, com a redução do poder germinativo e morte da semente. A queda do potencial de armazenamento também é considerada nessa seqüência, bem como o decréscimo da velocidade de germinação, da percentagem de emergência de plântulas e a ocorrência de anormalidades nas mesmas. Essas mudanças fisiológicas e estruturais ocorrem independentemente dos microrganismos, mas os patógenos produzem metabólitos (proteases e toxinas), que aumentam notadamente o nível de deterioração da estrutura celular (CHERRY, 1983).

O mecanismo preciso de deterioração e a relação entre causa e efeito, segundo GILL & DELOUCHE (1973), não são ainda bem estabelecidos, embora diversas teorias tenham sido enunciadas.

As teorias consideradas sobre a deterioração e perda de viabilidade incluíam: a) o esgotamento das reservas do embrião, abandonada precocemente pelas evidências de que sementes mortas apresentavam amplo suprimento de alimentos; b) modificações proteicas, sem base teórica sólida para comprovação; c) inativação de enzimas e respiração e d) desenvolvimento de ácidos graxos (JAMES, 1967). Ainda,

POPINIGIS (1977), cita o ataque por fungos e a presença de substâncias tóxicas devido ao acúmulo de produtos da respiração, embora com resultados experimentais inconsistentes.

VILLIERS (1973), associou a degradação das membranas como causa primordial da deterioração e propôs que o mecanismo de degeneração das membranas refere-se a produção de radicais livres na cadeia dos ácidos graxos insaturados, na presença de oxigênio.

Essa desestruturação da membrana teria reflexo sobre sua capacidade de regular o fluxo de solutos, tanto numa célula como numa organela. Assim, a peroxidação dos lipídeos teria efeito acentuado inicialmente sobre a permeabilidade das membranas, seguida da alteração da atividade respiratória (WILSON & McDONALD, 1986). Para BEWLEY (1983) é de concordância geral que algum declínio nos fosfolipídeos das membranas ocorre em resposta ao envelhecimento acelerado, e discorda-se sobre alterações que acompanham as trocas nos ácidos graxos. De acordo com o mesmo autor, há pequena evidência de que a deterioração da membrana seja o evento primário no curso da perda de viabilidade. ROSS (1983), acrescenta que a deterioração pode ser explicada pelas alterações na solubilidade e digestibilidade das proteínas durante o armazenamento; alterações nas enzimas, ou outra causa cujo efeito seja a perda da atividade enzimática.

Para MCGEE (1983), as causas básicas da

deterioração podem ser incluídas em duas categorias: a primeira agrupa os danos causados por invasão dos tecidos por microrganismos, insetos e roedores ou deterioração natural dos tecidos durante o envelhecimento. A segunda abrange causas fisiológicas e bioquímicas ligadas ao metabolismo incluindo danos cromossômicas em macromoléculas, que podem levar à desnaturação de enzimas e inativação dos ácidos nucleicos e membranas não funcionais; diminuição na eficiência metabólica de organelas, células e órgãos devido ao aumento de uso, e a elevação nos níveis de mutações somáticas com o aumento de idade do tecido, acarretando aumento de mutações indesejáveis que conduzem a disfunções metabólicas.

Para CÔME (1983), contrariamente ao que vários autores têm assumido, não parece ser possível atribuir a perda de viabilidade à degradação ou exaustão de reservas das sementes, à destruição ou desnaturação de moléculas essenciais para a vida das sementes, como vitaminas, hormônios e enzimas ou a produção de substâncias tóxicas, ou a ação de microrganismos. No seu ponto de vista as teorias que prevalecem no momento atual referem-se ao acúmulo de danos no núcleo e nas organelas citoplasmáticas.

Resultados obtidos por ABDALLA & ROBERTS (1968) mostraram que a redução da qualidade fisiológica das sementes é acompanhada pelas mutações cromossômicas.

De acordo com ROSS (1983), durante o armazenamento pode-se considerar o fator genético sob dois

aspectos: o primeiro é a óbvia diferença genética entre cultivares, espécies e grupos taxonômicos. O segundo é referente ao dano real causado ao DNA da semente durante o armazenamento.

Existem evidências de que a perda de viabilidade é acompanhada por redução na capacidade de sintetizar proteínas, devido ao declínio num componente fundamental da síntese de proteína, como o ribossomo, RNA mensageiro e fatores citoplasmáticos (CHERRY & SKADSEN, 1983). Para Strehler & Freeman (1980) , citados por CHERRY & SKADSEN, 1983), mudanças associadas ao envelhecimento em proteínas cotiledonares podem resultar de erros na transcrição e tradução. Pode ainda resultar da ativação de genes para um envelhecimento programado, ou da repressão de genes (MARTIN & THINANN, 1972).

Segundo TOLEDO & MARCOS FILHO (1977), a queda do poder germinativo é a manifestação mais acentuada da deterioração. Os testes de vigor são considerados importantes por revelarem pequenas diferenças no estágio de deterioração de lotes de sementes; por outro lado, os testes de germinação geralmente acusam apenas grandes diferenças de deterioração.

Para GILL & DELOUCHE (1973) a observação da deterioração de sementes por intermédio do vigor, pode ser entendida como componente importante na avaliação da qualidade , tornando-se útil na solução de problemas da indústria de sementes, tal como a armazenabilidade de estoques.

As pesquisas relativas a testes de vigor consistem na identificação de parâmetros comuns a deterioração das sementes, de modo que, quanto mais distante da perda de germinação (última etapa do processo degenerativo) estiver o parâmetro, mais sensível será o teste (AOSA, 1983).

Considerando a deterioração em nível de uma semente, a primeira evidência se dá pela redução da velocidade de germinação. Outras consequências imediatas sobre a semente se referem ao aumento na condutividade de soluções aquosas obtidas a partir de exsudatos das sementes, bem como ao aumento de áreas mortas e à redução na capacidade de germinação (PERRY, 1978).

O teste de primeira contagem de germinação, conduzido sob as mesmas condições do teste de germinação, apresenta de acordo com a AOSA (1983), vantagens importantes para sua utilização em laboratórios de sementes: é barato, relativamente rápido, não requer equipamentos especializados nem treinamento tecnológico adicional. Entretanto , vem recebendo críticas como teste de vigor devido ,primeiramente, à dificuldade de padronização entre laboratórios, de variáveis como umidade e temperatura, e que influenciam a velocidade de germinação; e também por depender da habilidade do analista, que precisa ter um conceito bem definido de uma semente germinada (McDONALD, 1975; AOSA, 1983).

A condutividade elétrica baseia-se no

conceito de que, quando as sementes são imersas em água, as de baixo vigor liberam maior quantidade de eletrólitos na solução, refletindo perda de integridade das membranas celulares (WOODSTOCK, 1973; GRABE, 1976), e consequente perda de vigor. A aplicação desse teste na avaliação da qualidade de sementes de milho é recente, havendo ainda controvérsias quanto à sua capacidade de diferenciar níveis de vigor em sementes de milho (FRATIN, 1987).

De acordo com CARVALHO (1986), apenas alguns testes de vigor foram considerados mais indicados, simultaneamente, pela ISTA (1981) e pela AOSA (1983), incluindo o teste de envelhecimento acelerado, o teste de frio e o de condutividade elétrica.

O teste de frio é o teste de vigor mais antigo e mais pesquisado nos Estados Unidos e, de eficiência comprovada por vários pesquisadores (AOSA, 1983). Nesse teste, considera-se que as sementes resistentes à condições desfavoráveis são mais vigorosas, assim a combinação de baixas temperaturas e excesso de água no solo é utilizada para permitir apenas a sobrevivência de sementes vigorosas.

O teste de frio sem a utilização de solo é utilizado para minimizar a variabilidade dos resultados devido ao solo, sendo recomendado por BURRIS & NAVRATIL (1979) e LOEFFLER *et al.*, (1985).

O teste de envelhecimento acelerado foi desenvolvido para avaliar o potencial relativo de

armazenamento de lotes de sementes (DELOUCHE , 1965). Segundo GRABE (1976) é um dos testes mais utilizados nos Estados Unidos devido à simplicidade, facilidade de condução e capacidade de produzir informações consistentes. Sendo considerado por ZINK (1970) como mais apropriado às condições brasileiras de clima tropical e subtropical do que o teste de frio. Ressaltando ainda que , de acordo com o comentário emitido por DELOUCHE (1976), ao contrário do teste de frio, nenhuma das variáveis desse teste é incontrolável, permitindo a possibilidade de se alcançar elevada padronização de resultados.

Inicialmente, com relação às sementes de milho, as pesquisas visaram associar diferenças de vigor de lotes com germinações semelhantes à capacidade de armazenamento. Também foi empregado com outras finalidades, sendo uma delas verificar as diferenças genotípicas de sementes para capacidade de armazenamento (SCOTT, 1981).

Existem dificuldades no estabelecimento de resultados de um teste de vigor com um provável desempenho no campo (DELOUCHE, 1976); o vigor influencia a emergência de plântulas no campo, mas a amplitude dessa influência poderá ser modificada de acordo com as condições em que a lavoura será implantada (BURRIS, 1976).

Outros parâmetros, além dos testes de vigor mais comuns, estão sendo pesquisados visando a avaliação da qualidade das sementes.

Para COPELAND & McDONALD (1985) a respiração

é uma expressão da atividade de um grande número de enzimas, que atuam na metabolização de reservas. À medida que se processa a deterioração, a taxa respiratória diminui, tendo como conseqüência final a perda da germinação. Assim, para medir a deterioração no seu princípio, os testes mais sensíveis são aqueles que medem a atividade de certas enzimas associadas com metabolização ou biossíntese em tecidos novos.

A eletroforese mostra-se como uma técnica adequada para esse fim, a qual tem sido empregada com sucesso para o fracionamento de proteínas, e ácidos nucleicos. Para tanto, os géis de amido e poliacrilamida apresentam características tais que proporcionam bons resultados em pesquisa dessa natureza (THORUN & MAURER, 1971).

Algumas companhias de sementes já instituíram que a eletroforese pode ajudá-las a economizar no custo de produção, a realizar pesquisas e auxiliar nos testes de qualidade de seus produtos do campo até a embalagem final (MARTINEZ, 1990).

Os perfis eletroforéticos de proteínas mostram grande número de polipeptídeos possíveis de serem analisados, possibilitando a identificação de grupos característicos e suas alterações, as quais permitem estabelecer correlações com o envelhecimento e eventos fisiológicos. A eletroforese, através da detecção de alterações na composição proteica e de enzimas específicas,

pode ser eficiente ferramenta para o acompanhamento da qualidade das sementes durante o armazenamento (CARRARO, 1990).

CHAUHAN et al (1985), estudando variação eletroforética de proteínas e enzimas de soja e cevada em relação à qualidade das sementes, observou que as bandas de proteína e enzima (esterases, fosfatases e transaminases) funcionam como marcas moleculares na avaliação da qualidade.

A eletroforese é um processo de difusão forçada, sob o efeito de um campo elétrico (PEIRCE & BREWBAKER, 1973). Basicamente, segundo HEIDRICH -SOBRINHO (1982), consiste na separação de moléculas por sua carga elétrica, tamanho e forma através da migração em um meio suporte e tampões adequados, sob a influência de um campo elétrico.

A técnica baseia-se no princípio da migração de um íon em solução, em direção ao eletrodo de sinal contrário, quando submetido a ação de um campo elétrico unidirecional. Desse modo, aplicando-se uma corrente contínua num meio apropriado, contendo moléculas de proteína em solução, dar-se-á a migração das partículas em direção aos eletrodos de carga contrária. As partículas com cargas de mesmo sinal, porém de magnitudes diferentes, migrarão num mesmo sentido, mas em velocidades diferentes, acarretando na separação das mesmas.

Conforme CARRARO (1990), dentre as técnicas

mais utilizadas, está a SDS-PAGE, onde o sódio dodecil sulfato (SDS), um detergente aniônico, liga-se às regiões hidrofóbicas de proteínas para separar a maioria em suas unidades componentes (polipeptídeos), e faz com que as proteínas percam seu efeito de carga específica, separando-se devido às suas diferenças de pesos moleculares. Esta técnica está entre as que permitem melhor resolução de bandas, tornando possível a avaliação em nível qualitativo (ausência/presença) e quantitativo (diferença de concentração) dos polipeptídeos existentes em uma amostra.

A eletroforese permite o exame dessas diferenças em quantidade relativamente pequena de tecido (HAMIL & BREWBAKER, 1969). Essa técnica tornou-se poderoso instrumento na separação e identificação de enzimas quando foi combinada com o uso de corantes, ou seja, após a separação física, as enzimas passaram a ser identificadas por uma reação de coloração baseada em suas atividades catalíticas (HUNTER & MARKET, 1957 e GOTTLIEB, 1977). Esta combinação da eletroforese com um processo de coloração específica tornou possível a identificação de enzimas particulares entre centenas que poderiam estar presentes em um extrato de tecido.

As proteínas são detectadas através de procedimentos de coloração apropriada formando padrões de bandas ou manchas coloridas. Estes procedimentos compreendem substâncias que coram proteínas de todos os tipos e outras

para proteínas com atividade enzimática específica. As enzimas com mesma atividade catalítica, mas com diferentes configurações espaciais são denominadas isoenzimas (MARKET & MOLLER, 1959).

Embora limitado número de enzimas possa ser detectado com os processos de coloração dos géis, muitos tipos de pesquisas com plantas superiores podem ser realizados.

O padrão de bandas obtido para uma determinada isoenzima - número, distância percorrida e intensidade de coloração, representa a expressão do sistema enzimático analisado e seu modo de herança (GOTTLIEB, 1977). Salienta-se que interpretações dos géis sem dados genéticos podem ser enganosas (HEIDRICH-SOBRINHO, 1972).

Assim, qualquer que seja o tipo utilizado, para que os dados sejam reproduzíveis, é indispensável observar cuidados especiais, pois uma pequena variação da técnica é capaz de afetar os resultados. De acordo com GOTTLIEB (1971), a maior vantagem da eletroforese está no fato de que a variação no padrão de bandas pode ser diretamente associada com a variação dos genes que codificam as proteínas variantes. Desta feita, comparando com as outras técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida requer somente pequena quantidade de amostra, permite a análise simultânea de diversas amostras e confere rápida separação com alta resolução (BOULTER et al., 1976).

2.2 Armazenamento de sementes

A capacidade de armazenamento das sementes num ambiente específico é largamente determinada pela sua herança e história de pré-armazenamento. Diferenças próprias na longevidade entre espécies e cultivares são fatores biológicos sobre os quais os especialistas não têm controle. Essas diferenças podem ser reconhecidas e avaliadas no planejamento do armazenamento (DELOUCHE *et al.*, 1973).

Segundo Ewart (1980) citado por CÔME (1983), o milho estaria posicionado dentro da classificação de sementes mesobióticas, com vida de 3 à 15 anos, onde também está incluída a grande maioria das espécies.

Fatores genéticos que conferem maior ou menor longevidade às sementes não estão limitados apenas à espécie pois, segundo JUSTICE & BASS (1978), tem sido comprovado em algumas plantas cultivadas que pode haver diferenças quanto a longevidade entre cultivares da mesma espécie.

Lindstron (1943), citado por JUSTICE & BASS (1978), observou que algumas linhagens de milho, armazenadas por 12 anos em ambiente controlado, apresentaram 90% de germinação, enquanto outras linhagens tiveram suas sementes mortas após esse período.

MAEDA *et al.* (1987), estudando o armazenamento de sementes de milho, verificaram que a diferença genética entre cultivares mostrou diferença

quanto à tolerância ao armazenamento, com variação na longevidade das mesmas.

Ainda, diversos fatores conhecidos afetam o desempenho do milho, podendo ser também associados com o vigor, por afetarem a fisiologia do protoplasto e sua permeabilidade, estando entre eles o envelhecimento da semente, as linhagens e o tipo de híbrido (TATUM, 1954).

GILL & DELOUCHE (1973) verificaram que o armazenamento de milho em condições de 30°C-55% UR e 30°C-75% UR se mostraram inadequados para manutenção de sementes de milho por longo tempo. Deterioração significativa ocorreu após 2 meses de armazenamento e progrediu rapidamente até as sementes estarem mortas no final de 10 meses sob 30°C-75% UR e após 18 meses sob 30°C-55% UR. Observaram que sob 30°C-32% UR não ocorreu deterioração significativa que afetasse a performance até 16 meses para o híbrido "flint" e 18 meses para o dentado.

O comportamento de diferentes tipos de híbridos, submetidos a outro tipo de estresse levou a resultados não concordantes. No estudo da germinação e o vigor de sementes de milho, em condições de baixa temperatura e elevada umidade de solo, BORJARCZUK *et al.* (1973) verificaram grande diferença na resposta de cultivares de milho, sendo que os tipos "flint" (duros) tenderam a ser mais resistentes que os dentados.

Para sementes de soja EGLI *et al.* (1978) e MINOR & PASCHAL (1982) consideraram que o genótipo

influenciou a velocidade de deterioração durante o armazenamento, no entanto, não estabeleceram comparações diretas entre os cultivares precoces e tardios.

MARCOS FILHO et al. (1985), estudando o comportamento de dois cultivares de soja, colhidos em épocas diferentes e armazenados em condições diversas (câmara seca, câmara fria e condição ambiente), observaram que as sementes do cultivar semi-tardio apresentaram qualidade superior aos do cultivar precoce, mas associaram esse comportamento, principalmente, às condições climáticas predominantes durante a fase final da maturação e nos períodos de colheita.

Poucos estudos compararam cultivares precoces e tardios quanto ao seu comportamento, necessitando maior pesquisa em vista da grande variabilidade atual de híbridos de diferentes ciclos existentes no mercado.

Quando um lote é destinado ao armazenamento ele apresenta um nível de qualidade que resulta da ação isolada, bem como da interação de fatores como qualidade inicial das sementes; vigor das plantas ascendentes; condições climáticas durante a maturação; grau de maturação no momento de colheita; grau de injúria mecânica e secagem (CARVALHO & NAKAGAWA, 1983). A manutenção da viabilidade do lote, a partir daí, dependerá da umidade relativa do ar, do conteúdo de umidade das sementes, da temperatura, da ação de fungos e insetos de armazenamento.

Para Roberts & Ellis, citados por GOEDERT

(1988), o genótipo e as condições de pré-armazenamento afetam o potencial de armazenamento e, as condições do ambiente de armazenamento modificam este potencial. Para o autor, embora lotes de sementes demonstrem diferentes períodos médios de sobrevivência em idênticas condições, o efeito de diferentes condições de armazenamento, em qualquer lote, é mais drástico.

A longevidade das sementes é variável em função da espécie, mas depende muito das condições predominantes durante o período de armazenamento (MARCOS FILHO, 1976).

Trocas fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento, como indução ou perda de dormência, ocorrência de plântulas anormais, perda de vigor, perdas ou redução de enzimas, perda na integridade das membranas, auto-oxidação de lipídeos e outras, são todos fenômenos influenciados pelas condições de ambiente (TOLLE, 1986).

A umidade relativa do ar, que é diretamente relacionada com o conteúdo de umidade da semente, e a temperatura no ambiente de armazenamento são os fatores mais importantes que afetam a manutenção da qualidade durante o período de armazenamento (HARRINGTON, 1973; DELOUCHE et al., 1973; ROSS, 1980).

A temperatura ambiente e a umidade relativa nos trópicos são, de modo geral, suficientemente adversas para o armazenamento de sementes, necessitando algumas condições controladas para que se obtenha boa conservação

da qualidade das mesmas (DELOUCHE et al., 1973).

As sementes que podem ser armazenadas em condições de baixa umidade são chamadas ortodoxas e sua viabilidade pode ser mantida conforme algumas regras gerais.

HARRINGTON (1972) propôs duas regras empíricas, que servem como orientação para prever os efeitos da temperatura e do conteúdo de umidade sobre a longevidade das sementes armazenadas: 1) Para cada 1% de redução do conteúdo de umidade das sementes, sua longevidade é dobrada, isso se aplica a sementes com conteúdo de umidade entre 5% e 14% . 2) Para cada 5°C de redução de temperatura de armazenamento, a longevidade da semente é duplicada, considerando valores entre 0°C e 50°C.

No tocante à temperatura, quanto maior seu valor, maior será a taxa de respiração e, conseqüentemente, maiores perdas do produto armazenado ocorrerão; perdas essas associadas também ao maior desenvolvimento de bactérias, fungos e insetos (BOSSER, 1982).

Para JAMES (1967) as causas propostas para a deterioração são todas relacionadas com a respiração, que pode ser a causa primária de todas as outras relacionadas ao processo; e os requisitos para preservação satisfatória das sementes podem ser alcançados pela redução da temperatura, da umidade, ou de ambos. A interação entre a umidade relativa do ar e a temperatura de armazenamento na viabilidade de sementes e no vigor foi claramente mostrada

no experimento realizados por CHING & SCHOOLCRAFT (1968) com sementes de trevo. Tais autores verificaram incrementos importantes em aminoácidos livres com o aumento de umidade e da temperatura; consideraram também que a protease é ativa em sementes armazenadas, sendo sua atividade relacionada com a hidratação e temperatura, bem como pode estar associada com o envelhecimento e degradação de estruturas vitais, além das proteínas solúveis das membranas, das organelas, nucleoproteínas, ribossomos e enzimas.

CHRISTENSEN (1966) estudou a deterioração em sementes de milho armazenadas durante 2, anos em condições de temperatura controlada, e verificou que as sementes que apresentavam teor de água de 14,5% não se alteraram após 24 meses a 12°C; alteraram-se levemente após 18 meses a 20°C e acentuadamente após 6 meses de armazenamento a 25°C. Enquanto que, sementes com teor de água de 15,2% apresentaram deterioração após 6 meses, mesmo à 12°C, com relativo acréscimo após 6 meses.

A ação de insetos sobre as sementes também constitui problema para o armazenamento, acarretando perda de qualidade. Segundo CARVALHO & NAKAGAWA (1983), destacam-se entre as espécies de insetos de armazenamento aquelas das ordens Coleoptera e Lepidoptera, sendo a temperatura e umidade condicionantes da severidade dos danos, cujas faixas de 23 a 35°C e 12 a 15% UR são favoráveis aos insetos.

A aplicação de um inseticida ou da mistura de inseticidas é indispensável para evitar a infestação por carunchos e traças, que se constituem em grandes problemas de armazenagem de sementes de milho. Da mesma forma, a aplicação de fungicidas vem sendo adotada pelas companhias produtoras de sementes, havendo produtos bastante eficientes para a preservação da qualidade das sementes.

Face ao exposto, observa-se que poucos estudos buscaram verificar o comportamento de cultivares de milho híbrido de diferentes ciclos de maturação, durante o armazenamento em condições diversas. Em vista da grande variação no ciclo de maturação dos híbridos existentes no mercado, mostra-se premente o desenvolvimento de maior número de pesquisas e, conseqüentemente, maiores conhecimentos nessa área.

Assim, o presente trabalho visa, através do levantamento de subsídios, dar continuidade às investigações científicas nesse campo do conhecimento agronômico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no laboratório de análise de sementes e no campo experimental do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP, em Piracicaba-SP, e no laboratório de biotecnologia da Unidade de Produção de Sementes da Companhia de Sementes Agrocere S.A., localizada em Santa Cruz das Palmeiras-SP.

3.1. Híbridos

Foram utilizadas sementes da empresa Pioneer, valendo-se para tanto dos cultivares P3072 e P3210.

O cultivar P3072 é um híbrido simples modificado, de grão duro alaranjado, com peso de mil sementes em torno de 412 gramas, com altura de planta de 2,00 a 2,20 metros, superprecoce (somatória calórica 807°C), de ciclo vegetativo médio de 115 dias.

O cultivar P3210 constitui-se em um híbrido triplo, de grão semi-dentado alaranjado, com peso de mil sementes ao redor de 386 gramas, com altura de planta de

2,50 a 2,65 metros, de ciclo normal (somatória calórica 865°C), e ciclo vegetativo médio de 145-150 dias.

Tais sementes foram obtidas no Rio Grande do Sul e transportadas para Piracicaba em setembro de 1990. Os materiais se encontravam tratados com os produtos CAPTAN, K-OBIOL e ACTELIC.

Após a recepção dos lotes procedeu-se a homogeneização em divisor de solos e retirou-se uma amostra de sementes para a avaliação da qualidade inicial das mesmas, sendo para isso conduzidos testes de germinação, primeira contagem da germinação, teste de envelhecimento acelerado, teste de frio (com e sem a utilização de solo), teste de condutividade elétrica, emergência em campo e análises eletroforéticas.

3.2. Condições de armazenamento

A seguir as sementes foram acondicionadas em sacos de papel 'kraft' e armazenadas em condições distintas a saber:

Câmara fria: câmara com controle de temperatura próxima a 10°C e umidade do ar de aproximadamente 80%.

Câmara seca: câmara regulada para manutenção de umidade relativa do ar de aproximadamente 35-45% e temperatura de 22°C .

Condições de ambiente: condições locais do

laboratório de análise de sementes da ESALQ/USP, os dados referentes a temperatura e umidade relativa do ar registrados diariamente encontram-se na figura 1.

Figura 1. Variação de temperatura e umidade relativa do ar em Piracicaba-SP, durante o experimento.

3.3. Tratamentos

Após a realização da caracterização inicial, as sementes foram armazenadas e avaliadas periodicamente, sendo que parte das sementes, antes da realização dos testes foi submetida ao envelhecimento por 24 horas à 42°C, em recipiente tipo "gerbox" com 40 ml de água; o restante não foi submetido a estresse adicional.

Tal procedimento contribuiu para a constituição dos 12 tratamentos e 4 repetições estudados, conforme segue no esquema:

Os tratamentos foram submetidos aos testes em 3 épocas bimestrais a saber: fevereiro/março/92 (2 meses de armazenamento), abril/maio/92 (4 meses de armazenamento), julho/92 (6 meses de armazenamento).

Ainda, foi realizado um quarto período de

avaliação, onde os tratamentos envolvendo estresse foram realizados com a utilização de sementes estressadas aos 4 meses de armazenamento.

3.4. Testes comuns de laboratório

Os testes foram conduzidos no laboratório de análise de sementes do Departamento de Agricultura, ESALQ/USP.

3.4.1. Teste de germinação (TG)

O referido teste foi realizado com 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento, semeadas em papel toalha, no sistema de rolo, e colocadas em germinador regulado para manter temperatura constante de 30°C; as contagens foram efetuadas aos 4 e 7 dias após a semeadura, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, M. A., 1980), cujos resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais por tratamento.

3.4.2. Teste de primeira contagem de germinação (PCG)

Tal teste foi conduzido conjuntamente com o teste padrão de germinação e consistiu no registro da porcentagem de plântulas normais constatadas no quarto dia após a instalação do teste de germinação (BRASIL, M. A.,

1980), sendo os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais por tratamento.

3.4.3. Teste de envelhecimento acelerado (EA)

O presente teste foi realizado com o acondicionamento das sementes em caixa tipo "gerbox", funcionando como compartimento individual (mini-câmaras), como proposto por TAO (1980), contendo no seu interior uma bandeja de tela de alumínio, onde cerca de 120 sementes de cada tratamento foram distribuídas. No fundo de cada mini-câmara colocou-se 40ml de água, e a seguir, os "gerbox" adaptados foram mantidos em incubadora a 42°C, por 96 horas. Decorrido o tempo de permanência na incubadora, as quatro repetições foram colocadas para germinar, conforme as condições do teste de germinação anteriormente descrito e avaliadas aos 4 dias após a semeadura, computando-se a porcentagem média de plântulas normais por teste.

3.4.4. Teste de frio com a utilização de solo (TFS)

O teste de frio foi conduzido com quatro repetições de 100 sementes de cada tratamento e instalado em caixas plásticas (60 x 30 x 10 cm) contendo uma mistura de areia e solo proveniente de área que havia sido cultivada com milho, nas proporções respectivas em peso, de 2/3 e 1/3.

Foi adicionada água até que fosse atingida 60% da capacidade de campo do substrato.

As caixas contendo as sementes permaneceram em câmara fria (10°C) por sete dias e, posteriormente, foram mantidas em ambiente de laboratório por sete dias, quando as plantas emergidas foram contadas e os resultados expressos em porcentagem média por tratamento.

3.4.5. Teste de frio sem a utilização de solo (TF)

Este teste constou na semeadura de quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, em papel toalha umedecidos. A seguir os rolos foram colocados em caixas plásticas que, tampadas e vedadas, foram mantidas em câmara regulada a 10°C , durante 7 dias; em seguida, os rolos permaneceram em germinador regulado para temperatura constante de 30°C , após 4 dias foi efetuada a avaliação de plântulas normais de cada repetição e os resultados foram expressos em porcentagem média por lote.

3.4.6. Teste de condutividade elétrica (CE)

O referido teste foi efetuado com 25 sementes escolhidas com auxílio de uma lupa, e pesadas com precisão de 0,01g e, a seguir, colocadas em copos plásticos contendo 75ml de água destilada. Nessas condições as sementes permaneceram em embebição em germinador, regulado em

temperatura constante de 20°C. Decorridas 24 horas procedeu-se a leitura da condutividade elétrica da solução, utilizando-se aparelho DIGIMED CD-20 (FRATIN, 1987). Os resultados obtidos foram expressos em micro-mhos por grama de sementes, obtendo-se a condutividade média por tratamento.

3.5. Teste de campo

Como teste de campo, apenas foi empregado emergência das plântulas em campo (EM), com 4 repetições, sendo cada parcela constituída por uma linha de 4 metros de comprimento, onde foram distribuídas 100 sementes. Para tanto utilizou-se espaçamento entre sulcos de 0,40 m, com 0,70 m de profundidade, sendo as sementes cobertas com 0,02 m de solo. A contagem do número de plântulas emergidas foi efetuada 15 dias após a semeadura.

3.6. Análises eletroforéticas

As análises eletroforéticas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Sementes Agrocere S.A.

3.6.1. Análise da expressão de proteínas totais do endosperma

3.6.1.1. Soluções, tampões e reagentes

- A- tampão de extração: solução de trisma 10mM, com valor de pH ajustado para 8,0 com HCl.
- B- reagente para quantificação de proteínas: 100g de COOMASSIE-BRILLIANT-BLUE G-250, diluído em 50ml de etanol 95%, adicionado a 100ml de ácido fosfórico 85% e ajustado para 100 ml com água destilada (BRADFORD, 1976).
- C- solução padrão: solução estoque contendo 0,1g de um composto proteico (Pharmacia) com pesos moleculares de (94,0; 67,9; 43,0; 30,0; 20,1 e 14,4 kD) em 100 ml de água.
- D- solução de acrilamida/bis-acrilamida
acrilamida.....30 g/100 ml água DD
bis-acrilamida.....0,8 g/100 ml água DD
- E- tampão do gel inferior: solução trisma 1,5M ajustado o pH para 8,8 com ácido clorídrico
- F- tampão do gel superior: solução trisma 0,5M, ajustado o pH para 6,7 com ácido clorídrico.
- G- solução SDS 10% (sódio dodecil sulfato), 1g de SDS, em 10 ml de água.
- H- solução de persulfato de amônio (PSA)- 10% .

I- tampão de corrida (solução estoque)

trisma.....12 g/l

glicina.....57,6 g/l

pH = 8,3

J- tampão da amostra

1,25 ml da solução tampão do gel superior

2,0 ml de glicerol

em 6 ml de água destilada e deionizada.

K- tampão de amostra desnaturante

500 μ l 2-mercaptoetanol

250 μ l solução de bromofenol 0,1%

4 ml solução SDS 10%

5,3 ml solução tampão de amostra

L- solução corante

0,05% de COOMASSIE BRILLIANT BLUE, em solução metanol:

ácido acético: água, na proporção de 30:7:63 (V:V:V).

M- solução descolorante

metanol : ácido acético : água , na proporção 30:7:63

(V:V:V).

3.6.1.2. Procedimentos

a) Extração e preparo da proteína solúvel

Foram homogeneizados 20 g de endosperma livre

de pericarpo. O macerado foi filtrado e as proteínas precipitadas com 1,5 volumes de acetona -20°C , durante 2 horas em refrigerador. A suspensão foi centrifugada a 7000 rpm por 5 minutos; a seguir os tubos foram invertidos sobre papel toalha para remoção total da acetona. O precipitado foi ressuspendido em 300 μl do mesmo tampão de extração, sendo em seguida centrifugado a 15000 rpm por 2 minutos, com posterior utilização do sobrenadante.

b) Preparação da amostra desnaturada

As amostras de proteína solúvel foram ajustadas com tampão de extração para obtenção da concentração final de 70 $\mu\text{g}/50 \text{ ul}$ de solução proteica. As amostras foram preparadas colocando-se 50 μl de proteína solúvel em 50 ul de tampão da amostra desnaturante. As amostras foram submetidas à temperatura de 100°C por 5 minutos.

3.6.1.3. Eletroforese SDS-PAGE

Para eletroforese de proteínas totais utilizou-se o sistema bifásico de gel de poliacrilamida (PAGE), segundo metodologia de LAEMMLI (1970). Este sistema caracteriza-se pela utilização de um gel superior (espaçador) com baixa concentração de acrilamida (4,5%) e pH 6,7 com função básica de concentrar as proteínas; e um

gel inferior (separador) com alta concentração de acrilamida (12%) e pH 8,9 , no qual os polipeptídeos são separados de acordo com o seu peso molecular.

No presente trabalho, foram utilizados géis com 11,0 x 13,0 cm e 0,10 cm de espessura, sendo 8,5 cm de gel separador e 2,5 cm de gel espaçador. As placas foram seladas com solução de agár 1,0%. Os géis foram preparados a partir de soluções estoques de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1-Guia de preparação de eletroforese SDS

	Gel inferior 12 % de acrilam.	Gel superior 4,5 % de acrilam.
Tampão superior	-----	2,5 ml
Tampão inferior	10,0 ml	-----
Solução A/B	16,0 ml	1,5 ml
Água deionizada	12,5 ml	6,5 ml
Solução SDS	400 µl	50 µl
Solução PSA	400 µl	50 µl
Temed	10 µl	5 µl

Antes de sua utilização, o tampão de corrida foi diluído 1:4 (V:V) e ajustado para 0,1% de SDS, acrescentando-se 10 ml de SDS 10% por litro. Foram colocados 50 µl de mistura proteica em cada canaleta do gel. As corridas foram desenvolvidas a 70 volts até o corante atingir o gel separador, e 150 volts até o final.

Para estimativa dos pesos moleculares, foi

aplicado em cada gel uma amostra padrão de pesos moleculares (Pharmacia) com os polipeptídeos de 94,0; 67,0; 43,0; 30,0; 20,1; 14,4 kD.

Após a corrida os géis foram corados e fixados simultaneamente com a solução corante durante 12 horas, sendo então descorados com várias trocas da solução descolorante.

3.6.1.4. Comparação dos perfis eletroforéticos e avaliação das alterações ocorridas durante o armazenamento do milho.

As alterações no perfil eletroforético foram avaliadas pela leitura visual dos géis correspondentes. As alterações de bandas detectadas foram confirmadas nas repetições.

3.6.2. Análise da expressão de isoenzima

A metodologia proposta por STUBER (1988) utiliza géis de amido. Entretanto, neste estudo foram realizadas modificações na metodologia, adequando-a ao uso de géis de poliacrilamida; a modificação apresenta a vantagem de uma melhor definição das bandas e facilidades quanto à manipulação e armazenamento dos géis.

3.6.2.1. Soluções, tampões e reagentes

A- Tampão de extração: tampão fosfato pH 6,0

B- Solução reveladora

50 μ l tampão fosfato pH 6,0

2,5 ml de propanol

20,0 mg de β -Naphthyl-acetato; 30 mg de α -Naphthyl-acetato

25,0 mg de Fast Garnet GBC

C- Solução Fixadora

Ácido acético glacial, metanol e água destilada - 1:5:5

(V:V:V)

3.6.2.2. Procedimentos

Cinco sementes de cada híbrido foram germinadas em papel de germinação, com o dobro de seu peso em água, durante 3 dias na ausência de luz, em germinador a 30°C. Os coleóptilos foram excisados e livres das plúmulas foram macerados e homogeneizados em tampão de extração, utilizando-se bastões de vidro abrasivos. A suspensão foi centrifugada em tubos eppendorf a 6000 rpm em micro-centrífuga INCIBRÁS, à temperatura ambiente, por 3 minutos. Posteriormente 40 μ l do sobrenadante foram então transferidos para os géis de poliacrilamida. Os tempos de corrida e voltagens foram semelhantes aos utilizados com proteína total.

Os géis retirados da cuba foram colocados em 100 ml de solução reveladora e colocados em câmaras BOD por 30 minutos à 35⁰C. Logo após, foram fixados com 200 ml de solução fixadora.

3.6.2.3. Comparação dos perfis eletroforéticos da esterase e avaliação das alterações ocorridas durante o armazenamento do milho.

As alterações no perfil eletroforético foram avaliadas pela leitura visual dos géis correspondentes. As alterações de bandas detectadas foram confirmadas nas repetições.

3.7. Métodos estatísticos

Para a análise da variância, os dados observados nos diferentes testes, exceto o teste de condutividade elétrica, sofreram transformação em arco sen $(x/100)^{1/2}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, com 12 tratamentos e 4 repetições.

Para cada época de avaliação o esquema de análise foi como se segue na Tabela 2.

Tabela 2. Esquema de análise de variância dos dados obtidos nos testes de avaliação de qualidade das sementes para cada época.

Causa de variação	GL
Ambientes (A)	2
resíduo (a)	9
(parcelas)	(11)
Híbridos (C)	1
interação A x C	2
resíduo (b)	9
(subparcelas)	(23)
estresse (S)	1
interação A x S	2
interação C x S	1
interação A x C x S	2
resíduo (c)	18
Total	47

Contudo, o esquema de análise estatística incluindo as épocas de avaliação e suas respectivas interações é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Esquema da análise de variância na comparação entre épocas de avaliação da qualidade das sementes.

Causa de variação	GL
Ambiente (A)	2
resíduo (a)	9
parcelas	(11)
Híbridos (C)	1
interação A x C	2
resíduo (b)	9
subparcelas	(23)
Épocas (E)	2
interação A x E	4
interação C x E	2
interação A x C x E	4
resíduo (c)	36
(sub-parcelas)	(71)
Estresse (S)	1
interação A x S	2
interação C x S	1
interação E x S	2
interação A x C x S	2
interação A x E x S	4
interação C x E x S	2
interação A x C x E x S	4
resíduo (d)	54
Total	143

4. RESULTADOS

A apresentação dos resultados dos testes, relativos à caracterização inicial dos materiais foi feita separadamente para cada um dos híbridos.

Os dados foram apresentados na forma de números inteiros (exceto a condutividade elétrica), sendo as aproximações efetuadas para valor inferior quando a parte fracionária era menor que cinco décimos (0,50) e para valor superior, quando essa fração era igual ou maior a cinco décimos. Dessa forma, possíveis discrepâncias entre as médias e a significância das médias devem ser atribuídas a esse fato; porém, as letras representam as variações significativas acusadas pela análise estatística.

Os resultados da análise eletroforética foram apresentados e discutidos à parte para melhor compreensão do assunto.

4.1 Caracterização inicial dos híbridos:

Com a finalidade de verificar a qualidade inicial de cada um dos híbridos antes do armazenamento,

foi realizada a caracterização dos mesmos. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados médios relativos à caracterização inicial dos híbridos, obtidos nos testes de germinação, primeira contagem da germinação, emergência em campo, envelhecimento acelerado, frio com solo, frio sem solo e condutividade elétrica no início do armazenamento.

TESTE	Cultivar	
	3072	3210
Germinação (%)	100	100
Primeira contagem (%)	95	95
Emergência (%)	91	90
Env. Acelerado (%)	96	95
Frio com solo (%)	96	96
Frio sem solo (%)	96	95
Condutividade (μ mhos/g)	12,67	15,63

Pela tabela 4 se observou que os dois materiais estudados possuíam boas características fisiológicas e elevada qualidade quando do início do armazenamento, sendo considerados de alta viabilidade inicial.

4.2. Híbridos

A Tabela 5 apresenta os dados médios, obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, realizada em função de cada época de avaliação. Salienta-se que, nesse caso, os ambientes e os estresses foram considerados como causa única de variação.

Na Tabela 6 são apresentados os valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho híbrido Pioneer 3072 e 3210, em função de três épocas bimestrais distintas.

Os dados da Tabela 5 indicaram, de forma global, desempenho inferior do híbrido P3072, evidenciado em função do tempo de armazenamento, principalmente detectado pelo teste de envelhecimento acelerado e testes de frio com e sem solo.

No teste de primeira contagem as sementes do híbrido P3072 tiveram desempenho inferior aos 2 meses de armazenamento (Tabela 5), tendência essa observada também no transcorrer do armazenamento (Tabela 6).

Para o teste de envelhecimento acelerado, aos 6 meses de armazenamento, as sementes do híbrido P3072 exibiram desempenho inferior (Tabela 5), embora essa tendência não tenha sido mostrada durante o armazenamento para esse parâmetro (Tabela 6).

Tabela 5. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, em função de cada época de avaliação.

Épocas Cultivares		Testes							
		<u>TG</u> (%)	<u>PCG</u> (%)	<u>EM</u> (%)	<u>EA</u> (%)	<u>TFS</u> (%)	<u>TF</u> (%)	<u>CE</u> ($\mu\text{mhos/g}$)	
2 meses	P3072	98a	93b	97a	94a	96a	94a	9,22a	-
	P3210	97a	95a	94b	93a	96a	93a	11,92b	
CV(%)		4,86	3,66	4,53	4,45	2,47	2,76	7,51	
4 meses	P3072	97a	90a	95a	93a	90b	91b	9,68a	
	P3210	96b	92a	96a	93a	93a	94a	11,44b	
CV(%)		2,95	4,29	6,02	3,46	3,43	3,43	7,04	
6 meses	P3072	96a	91a	95a	87b	87b	91b	10,11a	
	P3210	96a	92a	93b	89a	89a	92a	12,78b	
CV(%)		4,20	4,29	4,94	5,58	3,38	3,14	8,10	

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, em função de três épocas bimestrais.

Cultivar	Testes						
	TG (%)	PCG (%)	EM (%)	EA (%)	TFS (%)	TF (%)	CE ($\mu\text{mhos/g}$)
P 3072	97,43a	91b	95a	92a	91b	92a	9,67b
P 3210	96,53b	93a	94b	92a	93a	93a	12,53a
CV(%)	4,09	4,08	5,21	4,54	3,09	3,07	7,57

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 5 , para os testes de frio com e sem solo, a diferença no comportamento dos híbridos foi evidenciada, a partir dos 4 meses de armazenamento, com desempenho inferior das sementes do híbrido P3072, tendência essa mostrada durante o armazenamento no teste de frio sem solo (Tabela 6).

Todavia, de forma global, foi verificado desempenho superior do híbrido P3072 aos 4 meses de armazenamento, para o teste de germinação , que não mais se repetiu. O teste de condutividade também exibiu valores que indicam melhor qualidade para o híbrido precoce, dentro e entre as épocas (Tabela 5 e 6).

O teste de emergência em campo indicou desempenho superior do híbrido P3072 aos 2 e 6 meses de armazenamento (Tabela 5), comportamento não verificado nos testes de vigor, e que levaram ao desempenho superior desse híbrido na análise entre épocas (Tabela 6).

Na Tabela 7 são apresentados os dados médios, obtidos para híbridos estudados em 3 ambientes de armazenamento aos 6 meses de armazenamento, para o teste de envelhecimento acelerado.

Tabela 7. Valores médios (%) obtidos para híbridos estudados em 3 ambientes aos 6 de armazenamento, no teste de envelhecimento acelerado.

Ambiente	Híbrido		cv(%) amb
	P3072	P3210	
CS	92 ^{Aa}	93 ^{Aa}	5,62
CF	92 ^{Aa}	90 ^{Ba}	3,59
CA	76 ^{Bb}	84 ^{Ca}	7,41
cv(%) hibr	5,17	5,94	

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados apresentados na Tabela 7, pode-se observar que, em relação ao cultivar P3210, houve distinção entre os ambientes, com desempenho superior das sementes armazenadas em câmara seca sobre às da câmara fria e dessas, por sua vez, sobre às da condição ambiente. Enquanto para o cultivar P3072 o desempenho das sementes armazenadas apenas em condição ambiente foi inferior aos demais. Ainda, por essa Tabela foi verificado desempenho inferior das sementes do híbrido P3072, quando armazenadas em condição ambiente.

Na Tabela 8 são apresentados, para o teste de frio sem solo, os dados médios obtidos para híbridos estudados em 3 ambientes aos 6 meses de armazenamento.

Tabela 8. Valores médios (%) obtidos para híbridos estudados em 3 ambientes aos 6 meses de armazenamento no teste de frio sem solo.

Ambiente	Híbrido		cv(%) amb
	P3072	P3210	
CS	95 ^{Aa}	94 ^{Aa}	2,55
CF	92 ^{Ba}	91 ^{Ba}	3,99
CA	84 ^{Cb}	91 ^{Ba}	2,63
cv(%) hibr	4,07	1,83	

Na mesma coluna, medias seguidas pela mesma letra maiuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, medias seguidas pela mesma letra minuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Através da análise da Tabela 8 foi observado que o híbrido P3072 foi mais sensível ao efeito dos diferentes ambientes de armazenamento. Ressalta-se que o armazenamento em condição ambiente levou ao desempenho inferior do híbrido P3072, sendo responsável pelo comportamento distinto entre os híbridos.

4.3. Ambientes de armazenamento.

A Tabela 9 apresenta os resultados médios obtidos nos testes de avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido, armazenadas em três ambientes

diversos, em função de cada época de avaliação. Salienta-se que , nesse caso, os híbridos e os estresses foram considerados como fator único.

Na Tabela 10 são apresentados os valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido, armazenadas em três ambientes diversos, em função das três épocas bimestrais distintas.

Os resultados presentes nas tabelas 9 e 10 indicaram que, de modo geral, no transcorrer do armazenamento, a câmara seca mostrou maior eficácia na conservação das sementes, seguida da câmara fria e esta da condição ambiente.

Ainda, pelas Tabelas 9 e 10, evidenciou-se a não existência de diferenças significativas entre os tratamentos, no que se refere a ambiente de conservação dentro de cada época, para os parâmetros germinação e emergência em campo. Mas no transcorrer do armazenamento, a germinação das sementes mantidas em câmara seca foi superior à das conservadas em condição ambiente. As variações foram bastante pequenas e o índice de germinação se manteve em padrões elevados. Para o teste de primeira contagem de germinação, na avaliação aos 2 meses de armazenamento, as sementes mantidas em câmara fria tiveram desempenho superior às demais. A condutividade elétrica nessa avaliação indicou maior valor para as sementes mantidas em câmara seca (Tabela 9).

Na Tabela 9, para o teste de envelhecimento acelerado, aos 2 meses de armazenamento, o desempenho das sementes mantidas em câmara seca foi superior aos das sementes conservadas em condição ambiente e o dessa superior aos das mantidas em câmara fria. Aos 6 meses foi observado que as sementes armazenadas sob condição ambiente tiveram desempenho inferior às demais, apresentando redução considerável das médias. No transcorrer do armazenamento (Tabela 10) verificou-se distinção na eficácia de conservação entre os ambientes de armazenamento, com maior eficiência da câmara seca, seguido da câmara fria e da condição ambiente.

Em relação ao teste de frio com solo aos 4 meses de armazenamento, os resultados apontaram desempenho inferior das sementes armazenadas em condição ambiente (Tabela 9); aos 6 meses as diferenças se acentuaram, havendo distinção entre os ambientes quanto à capacidade de manutenção da qualidade das sementes, com maior eficiência da câmara seca, seguido da câmara fria e da condição ambiente. A análise entre épocas, Tabela 10, confirma essa tendência.

Tabela 9. Valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho híbrido armazenados em diferentes condições de armazenamento: câmara seca (CS), câmara fria (CF) e condição ambiente (CA), em função de cada época de avaliação.

Épocas	Ambientes	Testes							
		TG (%)	PCG (%)	EM (%)	EA (%)	TFS (%)	TF (%)	CE (%)	CE ($\mu\text{mhos/g}$)
2 meses	CS	98a	94b	96a	96a	96a	94a	11,17	b
	CF	97a	96a	96a	91c	96a	94a	10,27a	
	CA	97a	93b	94a	93b	96a	92b	10,27a	
	CV(%)	4,86	3,66	4,53	4,45	2,47	2,76	7,51	
4 meses	CS	97a	92a	96a	93a	94a	94a	11,76a	
	CF	97a	92a	94a	93a	94a	93a	11,07a	
	CA	96a	92a	96a	93a	87b	90b	11,09a	
	CV(%)	2,95	4,29	6,02	3,46	3,43	3,30	7,04	
6 meses	CS	96a	93a	95a	92a	95a	95a	11,29a	
	CF	96a	90a	94a	91a	88b	92b	10,95a	
	CA	95a	91a	93a	80b	80c	88c	12,11a	
	CV(%)	4,20	4,29	4,94	5,58	3,38	3,14	8,10	

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10. Valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho híbrido armazenados em diferentes condições de armazenamento: câmara seca (CS), câmara fria (CF) e condição ambiente, em função de três épocas bimestrais de avaliação.

Ambientes	Testes						
	<u>TG (%)</u>	<u>PCG (%)</u>	<u>EM (%)</u>	<u>EA (%)</u>	<u>TFS (%)</u>	<u>TF (%)</u>	<u>CE (μmhos/g)</u>
CS	98a	93a	95a	94a	95a	94a	11,40b
CF	97ab	93a	95a	92b	93b	93b	10,47a
CA	96b	92a	94a	89c	88c	90c	11,46ab
CV(%)	4,09	4,08	5,21	4,54	3,09	3,07	7,57

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Para o teste de frio sem solo, já a partir da primeira época de avaliação, aos 2 meses de armazenamento, mostrou que os ambientes de conservação levaram a resultados diferentes, indicando a menor eficácia na manutenção da qualidade das sementes armazenadas em condição ambiente (Tabela 9). Aos 6 meses os resultados confirmaram o desempenho inferior das sementes mantidas em condição ambiente e evidenciaram a superioridade da manutenção da qualidade das sementes conservadas em câmara seca, quando comparadas à câmara fria. Essa mesma distinção na eficácia de conservação foi observada no transcorrer do armazenamento (Tabela 10).

4.4. Estresse

Na Tabela 11 são apresentados os valores de F, para efeito de estresse, nas determinações realizadas dentro de cada época de avaliação.

A observação da influência dos estresse no desempenho das sementes foi averiguada aos 6 meses de armazenamento, através dos testes mais sensíveis como o teste de envelhecimento acelerado e os testes de frio com e sem solo.

Tabela 11. Valores de F, para efeito de estresse, nas determinações realizadas em função de cada época avaliação.

TESTE	ÉPOCA		
	2 MESES	4 MESES	6 MESES
Germinação (%)	0,25	0,42	0,57
Primeira contagem (%)	1,24	2,53	3,79
Emergência(%)	0,26	1,59	0,20
Env. Acelerado (%)	0,17	0,00	20,42 *
Frio com solo (%)	0,74	1,18	17,75 *
Frio sem solo (%)	02,88	3,71	8,19 *
Condutividade (μ mhos/g)	0,00	1,71	0,49

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade (Tukey)

A Tabela 12 apresenta os valores médios obtidos na avaliação da qualidade das sementes de milho híbrido, submetidas ou não à estresse, em três épocas bimestrais distintas. Salienta-se que para a avaliação isolada do efeito de estresse, híbridos e ambientes de conservação foram considerados como fator único de variação.

Os resultados das Tabelas 11 e 12 mostraram que para os testes de germinação, emergência em campo e condutividade elétrica o estresse não proporcionou alteração significativa no desempenho das sementes, dentro de cada época de avaliação, e nem mesmo durante o transcorrer do armazenamento.

Tabela 12. Valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas ou não à estresse no momento dos testes, em função de três épocas bimestrais.

Estresse	Testes						
	<u>TG</u> (%)	<u>PCG</u> (%)	<u>EM</u> (%)	<u>EA</u> (%)	<u>TFS</u> (%)	<u>TF</u> (%)	<u>CE</u> ($\mu\text{mhos/g}$)
Sem	97a	93a	95a	92a	93a	93a	11,12a
Com	97a	92b	94a	91b	92b	92b	11,09a
CV(%)	4,09	4,08	5,21	4,54	3,09	3,07	7,57

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

No teste de primeira contagem da germinação não houve variação significativa dentro de época (Tabela 11), mas com o transcorrer do armazenamento, o efeito do estresse acentuando as perdas foi verificado (Tabela 12).

Os efeitos da ação conjunta de estresse e ambiente observada no presente experimento são evidenciados nas tabelas 13, 14 e 15, apresentadas a seguir.

Tabela 13. Valores médios (%) obtidos para ambientes e estresses aos 2 meses de armazenamento no teste de primeira contagem de germinação.

Ambiente	Sem Estresse	Com	CV (%) amb
CS	94 ^{Ba}	93 ^{Ba}	4,15
CF	97 ^{Aa}	94 ^{Aa}	3,93
CA	92 ^{Ba}	94 ^{Aa}	2,69
CV (%) estr	3,84	4,86	

Na mesma coluna, medias seguidas pela mesma letra maiuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, medias seguidas pela mesma letra minuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Os resultados da Tabela 13 mostraram que nas sementes não estressadas o melhor desempenho foi observado nas sementes mantidas em câmara fria.

Tabela 14. Valores médios obtidos para ambientes e estresses aos 4 meses de armazenamento, para o teste de frio com solo.

Ambiente	Estresse		cv(%) amb
	sem	com	
CS	95 ^{Aa}	92 ^{Aa}	3,81
CF	94 ^{Aa}	92 ^{Ab}	2,61
CA	85 ^{Bb}	89 ^{Aa}	3,78
cv(%) estr	3,36	2,81	

Na mesma coluna, medias seguidas pela mesma letra maiuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, medias seguidas pela mesma letra minuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Tabela 15. Valores médios (%) relativos ao teste de frio com solo obtidos para ambientes e estresses aos 6 de armazenamento.

Ambiente	Estresse		cv(%) amb
	sem	com	
CS	96 ^{Aa}	94 ^{Aa}	2,69
CF	87 ^{Ba}	88 ^{Ba}	3,14
CA	85 ^{Ba}	74 ^{Cb}	4,32
cv(%) estr	4,10	3,25	

Na mesma coluna, medias seguidas pela mesma letra maiuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, medias seguidas pela mesma letra minuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Os dados da Tabela 14 indicaram que, na câmara fria o estresse levou à redução no desempenho das sementes, ao passo que na condição ambiente foi verificado efeito contrário; e que as sementes não estressadas, mantidas em condição ambiente apresentaram desempenho inferior às demais.

Pela Tabela 15 foi possível verificar que o desempenho inferior das sementes armazenadas em condição ambiente foi acentuadamente influenciado pela aplicação do estresse, que reduziu significativamente as médias. E que sementes estressadas mostraram distinção no desempenho entre cada ambiente de conservação

4.5. Épocas de avaliação

Na Tabela 16 são apresentados os valores médios obtidos em testes de germinação em três épocas bimestrais, sendo que híbridos, ambientes e estresses foram considerados como causa única de variação.

A análise entre as épocas, Tabela 16, indicou que, para a germinação e primeira contagem da germinação e condutividade elétrica houve variação significativa dos resultados, com a primeira época apresentando médias superiores às demais. Pela mesma Tabela 16 foi possível verificar que durante o armazenamento houve redução dos valores da emergência em campo, do envelhecimento acelerado e do frio sem solo, que se mostraram inferiores aos 6 meses em relação às demais avaliações.

Tabela 16. Valores médios obtidos em testes de germinação e vigor em função de três épocas bimestrais de avaliação.

TESTE	ARMAZENAMENTO			
	2 MESES	4 MESES	6 MESES	CV (%)
Germinação (%)	98 ^a	97 ^b	96 ^b	4,09
Primeira contagem (%)	94 ^a	92 ^b	91 ^b	4,08
Emergência(%)	95 ^a	95 ^a	94 ^b	5,21
Env. Acelerado (%)	93 ^a	93 ^a	88 ^b	4,54
Frio com solo (%)	96 ^a	92 ^b	88 ^c	3,09
Frio sem solo (%)	93 ^a	93 ^a	91 ^b	3,07
Condutividade (μ mhos/g	10,57 ^a	11,29 ^b	11,45 ^b	7,57

Na mesma linha, médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Para o teste de frio com solo, no transcorrer do armazenamento, foi detectada variação significativa das médias entre as épocas, verificando-se decréscimo contínuo e progressivo nos resultados do teste à partir dos 2 meses (Tabela 16).

4.6. Quarto período de avaliação

Em vista dos resultados obtidos aos 6 meses de armazenamento indicarem uma possível distinção no comportamento das sementes dos diferentes cultivares, as sementes foram mantidas por mais 2 meses armazenadas, nas

mesmas condições citadas para realização de mais uma etapa de avaliação.

Devido ao fato de não existir quantidade de sementes suficiente para aplicação do estresse no momento da nova época de testes, foram utilizadas sementes estressadas aos 4 meses de armazenamento, não se constituindo, portanto, o mesmo tratamento com estresse das épocas anteriores e impossibilitando a comparação dos dados com as outras épocas.

Os dados obtidos nessa avaliação adicional aos 8 meses de armazenamento, encontram-se nas tabelas 17, 18 e 19.

Os dados correspondentes a essa época complementar vêm confirmar a inferioridade da conservação da qualidade de sementes em condição ambiente. Nesse período de avaliação as diferenças quanto a eficácia de conservação dos ambientes foram indicadas pelos diversos parâmetros avaliados. Conforme Tabela 17, foi observado nos testes de germinação e primeira contagem o desempenho superior das sementes armazenadas em câmara seca em relação às mantidas em condição ambiente, já apontado pelos testes de vigor em épocas anteriores. No teste de envelhecimento acelerado, as sementes da câmara seca mostraram desempenho superior às demais.

Tabela 17. Valores médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho híbrido armazenados em diferentes condições de armazenamento: câmara seca (CS), câmara fria (CF) e condição ambiente (CA) aos 8 meses de armazenamento.

Ambientes	Testes						
	<u>TG</u> (%)	<u>PCG</u> (%)	<u>EM</u> (%)	<u>EA</u> (%)	<u>TFS</u> (%)	<u>TF</u> (%)	<u>CE</u> ($\mu\text{mhos/g}$)
CS	98a	93a	89a	95a	88a	92a	11,56a
CF	96ab	92ab	88a	91b	82b	85b	11,52a
CA	95b	90b	87a	89b	69c	77c	11,50a
CV(%)	6,20	6,22	7,56	3,15	5,83	4,45	4,75

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 18. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido, submetidos ou não à estresse no momento dos testes, realizada aos 8 meses de armazenamento.

Estresse	Testes						
	<u>TG</u> (%)	<u>PCG</u> (%)	<u>EM</u> (%)	<u>EA</u> (%)	<u>TFS</u> (%)	<u>TF</u> (%)	<u>CE</u> ($\mu\text{mhos/g}$)
Sem	95a	91a	89a	91b	81a	86a	11,62a
Com	97a	92a	87a	92a	78a	84b	11,43a
CV(%)	6,20	6,22	7,56	3,15	5,83	4,45	4,75

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19. Dados médios obtidos na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho híbrido dos cultivares Pioneer 3072 e 3210, realizada aos 8 meses de armazenamento.

Cultivar	Testes					
	<u>TG</u> (%)	<u>PCG</u> (%)	<u>EM</u> (%)	<u>EA</u> (%)	<u>TFS</u> (%)	<u>TF</u> (%)
P3072	98a	93a	91a	91a	74b	83b
P3210	96b	90a	85b	89a	84a	87a
CV(%)	6,20	6,22	7,56	3,15	5,83	4,75

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos testes de frio, os resultados ratificaram aqueles obtidos nas avaliações anteriores indicando a inferioridade da conservação em condição ambiente, bem como a superioridade da câmara seca sobre à câmara fria (Tabela 17).

Os resultados da Tabela 18 não mostram uma tendência definida de comportamento dos tratamentos.

Quanto ao comportamento dos híbridos, conforme relatado na Tabela 19, o teste de emergência em campo continuou, nessa avaliação, evidenciando a superioridade do cultivar P3072, enquanto nos testes de frio, o híbrido P3072 exibiu desempenho inferior ao do P3210, com drástica redução de vigor no teste de frio com solo.

A dados obtidos, aos 8 meses, para a ação conjunta de híbridos e ambientes no teste de frio com solo são apresentados na Tabela 20 e no teste de frio sem solo na Tabela 21.

Os dados presentes nas Tabela 20 e 21 indicam que o comportamento distinto dos cultivares nesses testes se deveu principalmente às diferenças proporcionadas pelo armazenamento em condição ambiente, com reduções significativas de vigor.

Tabela 20. Valores médios (%) obtidos para a ação conjunta de híbridos e estresses no teste de frio com solo aos 8 meses de armazenamento.

Ambiente	Híbrido		CV (%) amb
	P3072	P3210	
CS	84 ^{Ab}	91 ^{Aa}	6,39
CF	80 ^{Aa}	84 ^{Ba}	4,80
CA	58 ^{Bb}	76 ^{Ca}	6,39
CV (%) hibr	6,47	5,25	

Na mesma coluna, medias seguidas pela mesma letra maiuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, medias seguidas pela mesma letra minuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Tabela 21. Valores médios (%) obtidos no teste de frio sem solo aos 8 meses de armazenamento para a ação de híbridos e ambientes.

Ambiente	Híbrido		CV (%) amb
	P3072	P3210	
CS	91 ^{Aa}	93 ^{Aa}	5,52
CF	85 ^{Ba}	85 ^{Ba}	2,32
CA	70 ^{Cb}	83 ^{Ba}	5,24
CV (%) hibr	3,67	5,05	

Na mesma coluna, medias seguidas pela mesma letra maiuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Na mesma linha, medias seguidas pela mesma letra minuscula nao diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

4.7. Análises eletroforéticas

A- Proteínas totais do endosperma

O perfil eletroforético das proteínas totais do endosperma é apresentado na figura 2 abaixo, seguido do esquema representativo das bandas (Figura 3).

As figuras 4 e 5 mostram , para o híbrido P3072 e P3210, respectivamente, a expressão das bandas proteicas e a intensidade de coloração das bandas.

Figura 2. Perfil eletroforético da expressão das proteínas totais do endosperma de milho.

Figura 3. Esquema do perfil eletroforético da expressão das proteínas totais do endosperma de milho.

Os resultados da análise eletroforética de proteínas totais do endosperma permitiram afirmar que 19 bandas estavam presentes entre os padrões de peso molecular utilizados.

Foram observadas alterações predominantemente na expressão de proteínas de peso molecular similar a ovalbumina (bandas de nº 7, 9 e 10), utilizada como um dos padrões na eletroforese (peso molecular = 43 kD).

B- Esterase

As figuras 6 e 7 mostram a variação no perfil eletroforético da isoenzima esterase.

Figura 6. Perfil eletroforético da expresssão da isoenzima esterase de milho nos seis primeiros meses de armazenamento.

Figura 7. Perfil eletroforético da expressssão da isoenzima esterase de milho aos oito meses de armazenamento.

Os resultados demonstraram que, para os cultivares P3072 e P3210, a expressão do gene de esterase da posição R₄ (MACHADO & MONELLI, 1991) é suprimida nas amostras analisadas aos 8 meses de armazenamento, independentemente dos tratamentos aplicados.

6. DISCUSSÃO

A interpretação dos resultados quanto ao efeito do ambiente de conservação permitiu verificar que, de modo geral, a câmara seca mostrou maior eficácia de conservação da qualidade das sementes, seguida da câmara fria e esta da condição ambiente.

Os testes de germinação e emergência em campo não detectaram diferenças significativas no desempenho das sementes mantidas nas diferentes condições de armazenamento (Tabela 9 e 10).

Tal fato pode ser explicado pelo relato de GILL & DELOUCHE (1973), que afirmaram ser a perda da capacidade germinativa uma das manifestações finais da deterioração das sementes, e que a estabilidade da germinação, durante o armazenamento, não significa que mudanças deteriorativas não tenham ocorrido. Ainda pode-se lembrar que o teste de germinação é padronizado e fornece condições ideais para o desenvolvimento das espécies (AOSA, 1983).

Ao contrário do teste de germinação, o teste

de emergência em campo não permite a padronização das variáveis edafoclimáticas; e a falta de controle dessas variáveis influencia os resultados, levando em alguns casos à obtenção de dados não compatíveis com os evidenciados nos testes de vigor.

Os resultados do teste de primeira contagem de germinação aos 2 meses de armazenamento (Tabela 9), que revelaram a superioridade no desempenho das sementes mantidas em câmara fria não se repetiram nas outras épocas avaliadas. Cumpre ressaltar que o referido teste tem recebido críticas de diversos pesquisadores (McDONALD, 1975 e GRABE, 1976), visto que o parâmetro em que se baseia pode ser afetado por pequenas variações de temperatura e umidade, mas como já citado, apresenta vantagens importantes para uso em laboratório.

Na comparação efetuada entre os ambientes, dentro de cada época (Tabela 9), o teste de condutividade elétrica não apontou diferenças significativas, provavelmente devido a alta qualidade inicial das sementes, que não permitiu a detecção de alterações.

De acordo com TAO (1988), um dos fatores que influenciam essa medida é o conteúdo de umidade das sementes. Para evitar essa influência, as sementes tiveram suas umidades igualadas antes da realização desse teste. Desta feita, pode-se inferir que a variação de condutividade entre as sementes dos diferentes ambientes, verificadas aos 2 meses, e que não mais se repetiu, pode ser considerada

ocasional.

Em relação aos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, aqueles que se mostraram mais sensíveis na detecção de diferenças de vigor entre as sementes, oriundas dos diferentes ambientes de armazenamento, foram os testes de envelhecimento acelerado e os teste de frio com e sem solo, conforme visto na revisão.

Todavia a variação apresentada no teste de envelhecimento acelerado aos 2 meses de armazenamento (Tabela 10) não foi coerente com nenhum outro resultado de teste de vigor em época alguma. O responsável pela superioridade do desempenho das sementes provenientes da câmara fria, nessa avaliação, pode ter sido o grau de umidade das sementes. De acordo com MARCOS-FILHO *et al* (1987), o grau de umidade das sementes é um dos vários fatores que podem contribuir para a falta de consistência de resultados no teste de envelhecimento acelerado. Esse mesmo teste mostrou variações significativas na avaliação realizada aos 6 meses de armazenamento, apontando menor eficácia de conservação na condição ambiente. Comportamento semelhante também foi verificado aos 4 meses pelo teste de frio com solo e aos 2 e aos 4 meses no teste de frio sem solo, sendo esse último aquele que possibilitou a detecção precoce de variações entre os ambientes (Tabela 9).

Ainda, nos teste de frio com e sem solo aos 6 meses de armazenamento (Tabela 9) foi possível verificar uma

clara distinção entre os ambientes quanto à eficácia de conservação das sementes, evidenciando a menor capacidade de manutenção da qualidade das sementes proporcionada pela condição ambiente, e a superioridade da câmara seca sobre a câmara fria.

Da mesma forma as avaliações comparando os ambientes durante o armazenamento (Tabela 10) para os testes de envelhecimento acelerado, frio com solo e frio sem solo mostraram a superioridade da câmara seca sobre a câmara fria e desta sobre a condição ambiente.

Na avaliação aos 8 meses de armazenamento (Tabela 17) as diferenças quanto a capacidade de manutenção da qualidade das sementes relativa aos ambientes em estudo foram indicadas pelos diversos parâmetros avaliados, como os testes de frio com e sem solo, envelhecimento acelerado, germinação e primeira contagem da germinação.

Deste modo fica claro a menor eficácia de conservação da qualidade das sementes proporcionada pela condição ambiente e a superioridade da câmara seca sobre a câmara fria em função do prolongamento do período de armazenamento.

Com base nas pesquisas já realizadas é possível afirmar que as condições de temperatura e umidade relativa do ar, nas condições de ambiente, constituem-se em fatores preponderantes para a plena conservação das sementes durante o armazenamento. Assim, quando as mesmas não se encontrarem dentro do limite correspondente a $(T + U < 80)$,

conforme apontado por DELOUCHE et al. (1973), para o armazenamento durante 9 meses,; acarretarão nível significativo de deterioração natural. Os resultados obtidos pelo presente trabalho, confirmam e reforçam a recomendação de condições controladas para a preservação da qualidade das sementes.

Também, de acordo com PEREIRA (1992), o armazenamento de grãos requer cuidados especiais sob condições de umidade relativa do ar superior a 70%. Neste caso, uma porção considerável de água contida no grão se dispersa nos constituintes coloidais e, eventualmente, pode preencher os espaços capilares entre partículas constituintes dos grãos. Desta forma uma quantidade de água se torna disponível e pode ser utilizada para reações químicas e bioquímicas, tais como as reações enzimáticas e a desnaturação das proteínas.

Por outro lado, ROBERTS (1974) afirma que, dentro das condições usuais de armazenamento, não existe razão para supor que variações na temperatura e na umidade da sementes poderiam ser fatores deletérios exceto, possivelmente, por variações muito rápidas na umidade.

Do mesmo modo, um dos fatores que podem afetar a viabilidade das sementes durante o período de conservação é a qualidade inicial das sementes (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977). Sementes de alta viabilidade são mais resistentes à umidade e temperatura desfavoráveis do que as de baixa viabilidade inicial.

No presente trabalho, através da caracterização da qualidade inicial dos híbridos estudados (Tabela 4), constatou-se que os materiais apresentavam elevada viabilidade quando do início do armazenamento, ficando portanto excluída qualquer interferência desse fator nos resultados obtidos.

A interpretação dos resultados referentes ao comportamento dos híbridos no armazenamento possibilitou verificar que, de maneira geral, o híbrido precoce P3072 teve perda mais acentuada de vigor, principalmente quando mantido em condição ambiente.

Nos testes de germinação e emergência em campo (Tabela 5 e 6) os resultados apontaram uma tendência oposta de comportamento, mas tendo em vista os elevados valores de porcentagem de germinação e emergência apresentados por ambos os híbridos, não se pode considerá-los como uma medida concreta de distinção dos materiais.

Quanto aos resultados do teste de condutividade elétrica, faz-se necessário ressaltar que cada cultivar possui um valor específico de condutividade, o que impossibilita a comparação entre os mesmos quanto à esse teste, permitindo apenas uma averiguação na amplitude de variação dentro de cada cultivar. Nesse sentido, evidenciou-se valores bastante próximos para ambos os híbridos avaliados.

A inferioridade no desempenho das sementes do híbrido precoce P3072 foi mostrada pelos testes mais

sensíveis na detecção de alteração de vigor, conforme discutido anteriormente, quais sejam: teste de envelhecimento acelerado , testes de frio com e sem solo (Tabela 5 e 6).

O início da queda da qualidade das sementes do material precoce foi verificado nos testes de frio a partir da avaliação aos 4 meses de armazenamento e nos testes de frio com e sem solo e envelhecimento acelerado aos 6 meses de conservação (Tabela 5).

Os resultados do comportamento dos híbridos nos diferentes ambientes, aos 6 meses de armazenamento (Tabela 7 e 8), embora sendo obtidos submetendo as sementes a condições de estresse diferentes, apontaram a maior sensibilidade à perda de qualidade do material precoce armazenado sob condição ambiente.

Assim, considerando a elevada qualidade fisiológica dos materiais no início do armazenamento, a amplitude das diferenças mostrou que as mesmas não foram casuais, podendo ser atribuídas ao comportamento diferencial dos híbridos em função do tempo e condições de armazenamento.

É sabido que o período de armazenamento normal das sementes de milho entre a etapa de produção e a sua utilização para semeadura varia em torno de 6 meses. Nesse caso, uma vez que as perdas de qualidade se mostraram mais aceleradas para o material precoce, há indicações que atenção maior deve ser dirigida a conservação de sementes de híbrido de ciclo de maturação mais precoce, principalmente

quando não houver controle de temperatura e umidade relativa no ambiente de armazenamento.

Poucos estudos já realizados compararam diretamente o comportamento de híbridos de ciclos diferentes, resultando em conclusões contraditórias principalmente em função das condições variáveis empregadas.

Boa parte dos trabalhos nessa área, apenas compararam o desempenho de milho em função do tipo de grão (dente e "flint"), não se atendo para o ciclo vegetativo dos materiais estudados.

O presente trabalho, com relação ao tipo de grão, vem corroborar os resultados obtidos por GILL & DELOUCHE (1973), onde o tipo "flint" mostrou tendência superior quanto à amplitude de conservação, quando comparado ao genótipo apresentando endosperma menos consistentes.

A observação da influência do estresse no desempenho das sementes permite verificar que seu efeito começou a ser nítido aos 6 meses de armazenamento (Tabela 11), através dos testes mais sensíveis como o envelhecimento acelerado, e os testes de frio com e sem solo, que detectaram desempenho inferior dos materiais submetidos à estresse.

A interpretação dos resultados permitiu afirmar que, nos teste de germinação, emergência em campo e condutividade elétrica, o efeito do estresse não pode ser evidenciado (Tabelas 11 e 12).

O teste de primeira contagem de germinação não

indicou o efeito do estresse dentro de cada época (Tabela 11), mas a ação entre ambientes e estresses aos 2 meses (Tabela 13) mostrou que para as sementes não estressadas a câmara fria proporcionou condições superiores de conservação. A influência do conteúdo de umidade das sementes, alterado principalmente pela manutenção em ambiente de umidade relativa mais elevada, pode explicar esse comportamento, pois poderia levar a uma velocidade maior de germinação.

Outra explicação pode ser a associação dos resultados ao aumento de permeabilidade das membranas com o decorrer do processo de deterioração, possibilitando uma absorção mais rápida de água em qualquer dos ambientes (BEWLEY & BLACK, 1985), com conseqüente diminuição das diferenças entre eles. Entretanto o mesmo não se repetiu em outras épocas, impedindo estabelecer essa relação de forma mais concreta.

É importante observar que para o teste de frio com solo a ação conjunta entre ambientes e estresses, aos 6 meses de armazenamento (Tabela 15), evidenciou a maior sensibilidade ao estresse, das sementes armazenadas em condição ambiente, que acarretou em perdas consideráveis de vigor avaliados por esse parâmetro.

Essa tendência indica que cuidados especiais devem ser tomados com sementes destinadas a regiões com elevada instabilidade climática por ocasião da implantação da cultura (temperatura e umidade relativa do ar elevadas, ou

baixas temperaturas logo após a semeadura), mesmo quando submetidas a períodos curtos de armazenamento ocorridos na empresa.

Quanto ao efeito de épocas (Tabela 16) é preciso ressaltar que, a interpretação dos resultados, durante o transcorrer do armazenamento, foi feita tendo em vista a elevada qualidade inicial das sementes dos híbridos estudados, a qual se manteve até o final do período de armazenamento. Tal fato acarretou diferenças significativas entre as épocas, mas extremamente sutis em termos práticos. Portanto, de modo geral, foi possível verificar uma queda no desempenho das sementes com o decorrer do tempo, representada por reduzida alteração da qualidade das mesmas quando foi considerado como fator único de causa de variação (englobando todos os tratamentos sem distinção).

Quanto à análise eletroforética, os dados possibilitaram afirmar que nenhum resultado obtido indicou comportamento diferencial de um tratamento específico. Sendo possível afirmar, de modo geral para milho que, em relação a proteínas totais do endosperma, as alterações verificadas foram preferencialmente na expressão de proteínas de peso molecular similar a 43 kD (Foto 1 e Figura 2, 3 e 4). A proteína com peso molecular citado corresponde a ovoalbumina, que se constitui em uma substância de reserva.

As alterações citadas anteriormente fornecem indicações preliminares sobre eventuais proteínas afetadas pelo processo de deterioração, mostrando um possível caminho

para estudos mais amplos e detalhados, que deveriam ser concentrados na região referida. Tais evidências iniciais encontram-se de acordo com o trabalho de CHAUHAN (1985) com soja e cevada, o qual menciona que a ocorrência de alterações proteicas e enzimáticas em sementes podem monitorar as alterações de qualidade que elas sofrem. O autor propõe que as alterações metabólicas das sementes em germinação podem estar correlacionadas com as alterações metabólicas das sementes em processo de envelhecimento. Essa hipótese poderia ser verificada preliminarmente monitorando as alterações observadas na proteína da região da ovoalbumina.

A supressão da expressão do gene de esterase da posição R4 pode ser relacionada àquela relatada por MACHADO (1990), que demonstrou o bloqueio da expressão do mesmo gene pelo METHOMYL, um bloqueador de ATPase mitocondrial.

PASTEUR et al., 1985, relata o efeito inibidor de carbamatos e organofosforados sobre as esterases, sendo clássico o caso da inibição da colinesterase, ligada ao metabolismo respiratório.

Do mesmo modo que a colinesterase, uma esterase de vegetais ligada à respiração, sofre inibição por compostos orgânicos e carbamatos, com a deterioração tem-se um bloqueio da síntese de esterase da região R4, não se podendo afirmar em que ponto da síntese os compostos atuam.

De maneira geral, estas observações preliminares podem contribuir para a utilização da eletroforese de marcas moleculares na avaliação das sementes, associando alterações de bandas de proteínas e isoenzimas a atributos de vigor e desempenho.

CONCLUSÕES

A análise dos dados e a interpretação dos resultados do presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

. Híbridos de milho de ciclo de maturação mais precoce apresentam tendência a perdas de qualidade mais aceleradas durante o armazenamento, principalmente se conservados em condição ambiente, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar.

. Os resultados da análise eletroforética indicam a viabilidade da utilização de marcas moleculares na avaliação da qualidade das sementes.

. A região de expressão proteica similar a proteína de peso molecular similar a 43 kD (ovoalbumina) e a região R4 da expressão do gene de esterase são possíveis marcas moleculares relacionadas à alterações metabólicas das sementes em processo de deterioração.

. A condição ambiente proporciona menor eficácia na conservação da qualidade das sementes, independentemente do ciclo de maturação de híbridos de milho.

. O estresse influencia o desempenho das sementes, sendo responsável por perdas a partir dos 6 meses de armazenamento.

. Os testes mais sensíveis na detecção de alterações da qualidade fisiológica das sementes são os testes de frio com e sem solo e o teste de envelhecimento acelerado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A. A. & ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. ed. Seed biology. New York, Academic Press, 1972. cap.4, p.283-315.

ABDALLA, F.H.; ROBERTS, E.H. Effects of temperature, moisture, and oxygen on the induction of cromossome damage in seeds of barley, broad beans, and pea during storage. Annals of Botany, Oxford , 32 (125): 119-136, 1968.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Seed Vigor testing handbook. 1983. 88p. (Contribution n^o32).

BEWLEY, J.D. Membrane changes in seed as related to germination and pertubations resulting from deterioration in storage. In: McDONALD JR., J.M. & NELSON, C.J. Physiology of seed deterioration. Madison, C.S.S.A., 1983. cap.2, p.27-45. (CSSA Special Publication, 11).

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Seeds; physiology of development and germination. New York, Plenum Press, 1985. 367p.

BOJARCZUCK, J.; KROLIKOWSKI, Z.; BOJARCZUCK, M. Application of the cold test in breeding, seed production and growing corn. Biuletyn Instytutu Hodowlii Aklimatyzacji Róslin, (3/4): 171-8, 1972. Apud Field Crop Abstracts, Farnham Royal, 26 (12):659, Dec. 1973. (Resumo).

BOSSER, F. Conservação dos cereais e outros produtos granulados por meio de resfriamento. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE ARMAZENAGEM, 3. Curitiba, 1978. Anais. Curitiba, Companhia Paranaense de Silos Armazéns, 1982. p. 48-54.

BOULTER, D., THURMAN, D.A.; DERBYSHIRE, E. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds. New Phytologist, Cambridge, 66:27-36, 1976.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, San Diego, 72: 248-54, 1976.

BRASIL. Ministério de Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regras para análise de semente. Brasília, 1980. 188p.

- BURRIS, J.S. Seed/ seedling vigor and field performance. Journal of Seed Technology, Lansing, 1 (2): 58-76, 1976.
- BURRIS, J.S. & NAVRATIL, R.J. Relationship between laboratory cold-test methods and field emergency in maize inbreds. Agronomy Journal, Madison, 71:985-8, 1979.
- CARRARO, D.M. Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.) Piracicaba, 1990. 121p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CARVALHO, N.M. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S.M.; MARCOS-FILHO; J.; SILVA, W.R., Coord. Atualização em produção de sementes. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.207-23.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. Sementes, ciência, tecnologia e produção. 2.ed. Campinas, Fundação Cargill, 1983. 492p.
- CHAUHAN, K .P. S.; GOPINATHAN, M .C.; BABU, C .R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. Seed Science and Technology, Zurich, 13:629-41, 1985.

CHERRY, J.P. Protein degradation during seed deterioration
In: SYMPOSIUM ON DETERIORATION MECHANISMS IN SEEDS;
ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL
SOCIETY, 73., New Orleans, 1981. Phytopathology, St. Paul,
73(2): 317-21, 1983.

CHERRY, J.H. & SKADSEN, R.W. Nucleid acid and protein
metabolism during seed deterioration. In: McDONALD JR,
M.D. & NELSON, C.J. Physiology of seed deterioration.
Madison, CSSA, 1983. cap 4. p. 65-87. (CSSA Special
Publication, 11).

CHING, T.M. & SCHOOLCRAFT, I. Physiological and chemical
differences in aged seeds. Crop Science, Madison,
8:407-9, 1968.

CHRISTENSEN, C.M. Some changes in n^0_2 corn stored two years
at moisture contents of 14,5 and 15,2% and temperatures
of 12, 20 and 25°C. Cereal Chemistry, St. Paul, 44
(1):95-9, 1966.

CÔME, D. Post harvest physiology of seeds as related to
quality and germinability. In: LIEBERMANN, M. Post
harvest; physiology and crop preservation. New York,
Plenum Press, 1983. cap..2, p. 142-65.

- COPELAND, L.O. & McDONALD JR, M.B. Principles of seed science and technology. 2 ed. New York, Mcmillan; London, Collier Mcmillan, 1985. 321p.
- DELOUCHE, J.C. Standartization of vigor tests. Journal of Seed Technology, Lansing, 1 (2): 75-85, 1976.
- DELOUCHE, J.C.; MATTHES, K.K.; DOUGHERTY, G.M.; BOYD, A.H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. Seed Science and Technology, Zurich, 1 (3): 671-700, 1973.
- DELOUCHE, J.C. & BASKIN, C.C. Accelerated aging thecniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Science and Technology, Zurich, 1 (2): 427-52, 1973.
- EDJE, D.T. & BURRIS, J.S. Physiological and biochemical changes in deteriorating soybean seeds. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts, Virginia, 60: 158-66, 1970.
- EGLI, D.B.; WHITE, D.M.; TEKRONY, D.M. Relationship between seed vigor and the storability of soybean seed. Journal of Seed Technology, Lansing, 3 (2): 1-11, 1978.
- FRATIN, P. Comparação entre métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1987. 191p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- GILL, N.S. & DELOUCHE, J.C. Deterioration of seed corn during storage. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts, Virginia, 63: 33-50, 1973.
- GOEDERT, C.O. Conservação de germoplasma-semente. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. Anais. Jaboticabal, F.C.A.V. 1988. p. 78-95.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. Bioscience, Washington, 21(18): 939-44, 1971.
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. Annals Missouri Botanical Garden, Saint Louis, 64: 161-80, 1959.
- GRABE, D.F. Measurement of seed vigor. Journal of Seed Technology, Lansing, 1 (2): 18-31, 1976.
- HAMIL, D.E. & BREWBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants: IV. The peroxidase isoenzyme of maize (*Zea mays* L.) Physiologia Plantarum, Copenhagen, 22: 945-58, 1969.
- HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. Seed biology. New York, Academic Press, 1972. p. 145-245.

HARRINGTON, J.F. Problems of seed storage. In: HEYDECKER, W.H., ed. Seed ecology. Nottingham, The Pennsylvania State University Press, 1973. cap. 14, p. 251-65.

HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 17 (2): 281-6, 1982.

HUNTER, R.L. & MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, Washington, 125 (3261): 1294-5, 1957.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Handbook of vigour test methods. Zurich, 1981. 1172p.

JAMES, E. Preservation of seed stocks. Advances in Agronomy, London, 19: 87-106, 1967.

JUSTICE, O.L. & BASS, L.N. Principles and practices of seed storage. Washington, U.S.D.A. Agricultural Research Service, 1978. 289p. (USDA. Agricultural Research Service, 506).

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T₄ Nature, London, 227: 680-5, 1970.

LOEFFLER, N.L.; MEYER, J.L.; BURROWS, J.S. Comparison of two cold-test procedures for use in maize drying studies. Seed Science and Technology, Zurich, 13, 653-8, 1985.

LOZANO, J. L. & LEOPOLD, A.C. The physiology and genetics of seeds aging. In: GLOBAL MAIZE GERMPLASM WORKSHOP, México, 1988. Recent advances in conservation and utilization genetic resources; proceedings. México. CYMMIT, 1988. p. 81-93.

MACHADO, J.A. Methomyl action on anthocyanin and Est'loc expression in CMS T maize lines. Effects on Rf1/ bm2 backgrounds. Fourth International Workshop on Plant Mitochondria. Boyce Thompson Institute for Plant Research. Cornell University, NY, USA. 1990 (Poster)

MACHADO, J.A. and MONELLI, V.L. Alelos raros de esterase em milho (*Zea mays* L.); aplicação em seleção assistida por marcas moleculares e no controle de identidade genética em produção de sementes. I Congresso Latino-Americano de Biotecnologia, São Paulo, Brasil, 1991. (Poster)

MAEDA, J.A.; LAGO, A.G.; MIRANDA, L.T.; TELA, R. Armazenamento de sementes de cultivares de milho e sorgo com resistências ambientais diferentes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 22 (1): 1-7, 1987.

MARCOS FILHO, J. Fatores que afetam a conservação. A Semente, São Paulo, 6: 3-4, 1976.

MARCOS FILHO, J.; CARVALHO, R.V.; CÍCERO, S.M.; DEMÉTRIO, C G.B. Qualidade fisiológica e comportamento de sementes de soja (*Glicine max*, (L) Merrill). no no armazenamento e no campo. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 42: 195-249, 1985.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. Avaliação da qualidade das sementes. Piracicaba, FEALQ. 1987. 230p.

MARKET, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenic, and species especific patterns. Biochemistry, New York, 45: 753-63, 1959.

MARTINEZ, C. Conditioning seed corn for volume and quality. Seed World, Northwest Highway, 128 (913): 8-10, 1990.

MARTIN, C. & THIMANN, K.V. The role of protein synthesis in the senescence of barley leaves I. The formation of protease. Plant physiology, 49: 64-71, 1972.

MCDONALD JR, M.B. A rewiev and evaluation of seed vigor tests. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts, Virginia, 65: 109-39, 1975.

- 4 MCGEE, D.C. Introduction. In: SYMPOSIUM ON DETERIORATION MECHANISMS IN SEEDS; ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 73. New Orleans, 1981. Phytopathology, St. Paul, 73 (21): 314-5, 1983.
- MINOR, H.C. & PASCHAL, E.H. Variation in storability of soybeans under simulated tropical conditions. Seed Science and Technology, Zurich, 10 (1): 131-9, 1982.
- MORENO-MARTINEZ, E.; MORONES, R.R.; GUTIERREZ, L.R. Diferencias entre lineas, cruas simples y dobles de maiz en su suceptibilidade al dano por condiciones adversas de almacenamiento. Turrialba, San Jose, 28: 233-7, 1978.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. Manuel technique de genétique par electrophorèse des proteines. Paris, Lavoisier, 1987. 217p.
- PEIRCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. Applications of isoenzyme analysis in horticultural science. Hort Science, St. Joseph, 8 (1):17-22, 1973.
- PEREIRA, J.A.M. Água no grão. In: CURSO DE ARMAZENAMENTO DE SEMENTES, Viçosa, 1992. Viçosa, CENTREINAR, 1992. p irreg. (Treinamento na Área de Pós-Colheita - Cursos para Técnicos de Cooperativas).

PERRY, D.A. Report of the Vigour Committee, 1974-1978. Seed Science and technology, Zurich, 6 (4): 159-81, 1978.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília, Ministério da Agricultura / AGIPLAN, 1977. 289p.

ROBERTS, E.H. Viability of seeds. London, Chapman and Hall, 1974. 448p.

ROSS, E.E. Precepts of successful seed storage. In: McDONALD JR, M.D. & NELSON, C.J., ed. Physiology of seed deterioration. Madison, CSSA., 1983. cap 1., p. 1-27. (CSSA Publication, 11).

SAS INSTITUTE INC. Statistical Analysis System, Release 6.03 , Cary, 1988.

SCOTT, G.E. Improvement for accelerated aging response of seed maize populations. Crop Science, Madison, 21: 41-3, 1981.

STUBER, C.W.; WENDEL, J.L.; GOODMAN, N.M.; SMITH, J.S.C. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.). Raleigh, North Carolina State University/ ; Agricultural Research Service, 1988. 87p. (Technical Bulletin, 286).

- TAO, K.L.J. Vigor "referee" test for soybean and corn. The Newsletter of the Association of Official Seed Analysts, Mississippi, 54 (1): 40-58, 1980.
- TATUM, L.A. Seed permeability and cold-test reaction in *Zea mays* L. Agronomy Journal, Madison, 46: 8-10, 1954.
- THORUN, W. & MAURER, H.R. The molecular sieving effects in polyacrilamide gel. In: MAURER, H.R. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrilamide gel electrophoresis. New York, Walter de Gruyter, 1971. 222p.
- TOOLE, U.K. Ancient seeds: seed longevity. Journal of Seed Technology, Lansing, 10 (1): 1-23, 1986.
- TOLEDO. F.F. de & MARCOS FILHO, J. Manual das sementes; tecnologia de produção. São Paulo, Agronômica Ceres, 1977. 224p.
- VILLIERS, T.A. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W. , ed. Seed Ecology. Nottingham, ISA, Pennsylvania State University Press. 1973. p. 265-88.
- WILSON JR, D.O; McDONALD JR, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. Seed Science and Technology, Zurich, 14: 269-300, 1986.

WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical tests for seed vigor Seed Science and Technology, Zurich, 1: 127-57, 1973.

ZINK, E. Vigor de sementes de milho. In : SEMINÁRIO BRASILEIRO DE SEMENTES, 2., Pelotas, 1968. Anais. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura,, 1970. p.231-2.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JR, P. Sistema de análise estatística para microcomputadores - SANEST. Pelotas, UFPel, 1984. (Disquete).