

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Condições de armazenamento e conservação do potencial
fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho**

Tathiana Silva Timóteo

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2010**

Tathiana Silva Timóteo
Engenheira agrônoma

**Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de
sementes de diferentes genótipos de milho**

Orientador:
Prof. Dr. **JULIO MARCOS FILHO**

Dissertação ou Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Timóteo, Tathiana Silva

Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho/ Tathiana Silva Timóteo. - - Piracicaba, 2011.
89 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Fisiologia vegetal 2. Isoenzimas 3. Milho - Vigor 4. Sementes - deterioração I. Título

CDD 633.15
T585c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*A Deus, pela vida e sabedoria e a
Nossa Senhora, pela poderosa intercessão*

OFEREÇO

*Aos meus pais José Timóteo e Édira Jane,
pelo amor, incentivo e exemplo de vida
e aos meus irmãos, Guilherme e Tiago, pelo
carinho, apoio e amizade*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo cuidado e pela presença constante ao meu lado.

À minha família, em especial aos meus pais, que jamais mediram esforços durante minha vida e essa é mais uma vitória nossa!

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), pelo suporte e apoio na realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu grande amigo, professor Julio Marcos Filho, pela orientação eficiente e constante, pela confiança demonstrada, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos, que contribuíram em grande parte para minha formação profissional e, sobretudo pela amizade muito valiosa pra mim. Muito obrigada!

À grande amiga Helena M. C. P. Chamma, pelos ensinamentos, pela dedicação e amizade incondicional.

À professora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelas sugestões, boa vontade de sempre, colaboração e amizade.

Aos funcionários do laboratório de sementes da Esalq, Adilson, Ticão, João e Zezé e aos secretários Rafael e Luciane, pela colaboração, apoio e amizade.

Aos professores Silvio Moure Cícero e Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre, pelos ensinamentos e amizade.

À minha “miga”- irmã Ká, que foi minha família em Piracicaba, uma das pessoas mais guerreiras e determinadas que conheci, exemplo de fé, caráter e fortaleza. Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo e pela amizade!

Aos amigos do Laboratório de Sementes da Esalq pelo convívio, e em especial ao Chico e a Rê, pela colaboração, incentivo e pela amizade.

Aos amigos do GOU (Grupo de Oração Universitário), em especial Rê, Lore e Aninha, pessoas iluminadas por Deus, obrigada por todo suporte espiritual, pelas partilhas, pelo carinho, pela convivência e troca de experiências.

A duas pessoas que foram verdadeiras providências de Deus em minha vida, Helô e Wilder, pelo esforço, pela gentileza, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À equipe “deixa arder” (UFLA) pelo apoio e boa vontade!

Aos amigos do laboratório de genética bioquímica de plantas (Esalq), em especial à Salete Aparecida Gaziola, pelas sugestões, colaboração e amizade.

À empresa Syngenta pela cessão das sementes.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que essa fase da minha vida fosse tão maravilhosa. Muito obrigada!

"Deus me conceda falar com propriedade e pensar de forma correspondente aos dons que me foram dados, porque ele é o guia da sabedoria e o orientador dos sábios. Em seu poder estamos nós, as nossas palavras, a nossa inteligência e as nossas habilidades. Ele me concedeu o conhecimento exato de tudo o que existe, para eu compreender a estrutura do mundo e a propriedade dos elementos, o começo, o meio e o fim dos tempos, a alternância dos solstícios e as mudanças de estações, os ciclos do ano e a posição dos astros, a natureza dos animais e o instinto das feras, o poder dos espíritos e o raciocínio dos homens, a variedade das plantas e a propriedade das raízes. Aprendi tudo o que está oculto e tudo o que se pode ver, porque a sabedoria, artífice de todas as coisas, foi quem me ensinou."

Sab 7, 15-20

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão bibliográfica	17
2.2 Material e métodos	29
2.2.1 Obtenção de lotes com diferentes potenciais fisiológicos e caracterização dos ambientes de armazenamento	29
2.2.2 Avaliações do desempenho das sementes	32
2.2.2.1 Grau de umidade.....	32
2.2.2.2 Germinação.....	32
2.2.2.3 Primeira contagem de germinação.....	32
2.2.2.4 Envelhecimento acelerado	32
2.2.2.5 Teste de frio com terra	33
2.2.2.6 Emergência de plântulas em campo	33
2.2.3 Avaliações da atividade enzimática das sementes	33
2.2.4 Procedimento estatístico	34
2.3 Resultados e discussão	37
2.3.1 Avaliação do potencial fisiológico	41
2.3.2 Avaliação da atividade enzimática	61
3 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho

A conservação do potencial fisiológico de sementes durante armazenamento depende de vários fatores, dentre os quais o genótipo e as condições de ambiente. Empresas produtoras de sementes de milho têm demonstrado séria preocupação com variações na longevidade de sementes de diferentes híbridos, que podem não apresentar o desempenho desejado, tanto na época normal de semeadura como na semeadura de “safrinha”. Visando contribuir para o esclarecimento do problema, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos de ambientes de armazenamento sobre o potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho, procurando identificar causas de possíveis alterações fisiológicas e diferenças em seu desempenho. Foram avaliadas sementes de três híbridos experimentais de milho, cada um representado por três lotes produzidos pela empresa Syngenta Seeds, armazenados durante quinze meses, em três ambientes: câmara fria e seca (10 °C e 30 % de umidade relativa do ar), laboratório e ambiente controlado (20 °C e 70 % de umidade relativa do ar). O desempenho das sementes foi avaliado em épocas trimestrais, por meio de testes de germinação, envelhecimento acelerado, frio e emergência de plântulas em campo. Foi também determinada a atividade dos sistemas enzimáticos superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), glutamato desidrogenase (GTDH), α -amilase (α -AM) e sorbitol desidrogenase (SDH), por meio da técnica de eletroforese. Verificou-se que o potencial de armazenamento de sementes de diferentes genótipos de milho é avaliado, com segurança, associando-se resultados de testes de germinação e de vigor com avaliações da atividade de isoenzimas. Alterações em sistemas isoenzimáticos álcool desidrogenase, catalase, esterase, α -amilase e sorbitol desidrogenase permitem identificar o progresso do processo de deterioração de sementes de milho e o estabelecimento de causas de diferenças no desempenho de genótipos e lotes de sementes. O armazenamento sob condições sub-ótimas de temperatura e umidade relativa do ar é adequado para promover diferenças na intensidade e velocidade de deterioração de sementes de genótipos de milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Longevidade; Deterioração; Isoenzimas; Vigor

ABSTRACT

Storage conditions and seed performance of different corn genotypes

Seed storability is affected by several factors including genotype and environmental conditions. Corn seed producers are highly concerned with variations in seed longevity of different hybrids, resulting in lower performance than desired during the normal sowing season as much as during off season times. The objective of this research was to evaluate the effect of storage conditions on the seed physiological potential of different corn genotypes to identify possible causes of changes in seed performance. Three experimental corn hybrids each represented by three seed lots produced by Syngenta Seeds were evaluated. Seeds were stored for fifteen months under three environments: cold and dry chamber (10°C and 30% relative air humidity), laboratory, and controlled environment (20°C and 70% relative air humidity). Seed performance was evaluated every three months by germination, accelerated aging and cold tests as well as field seedling emergence. Activity of the enzymatic systems superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH), alcohol dehydrogenase (ADH), glutamate oxalacetate transaminase (GOT), glutamate dehydrogenase (GTDH), α -amilase (α -AM) and sorbitol dehydrogenase (SDH) was also determined using electrophoresis. The storability of corn seeds from different genotypes can be consistently evaluated by associating germination and vigor test results with isoenzymatic activity. Changes in alcohol dehydrogenase, catalase, esterase, α -amilase and sorbitol dehydrogenase isoenzymatic systems can identify the progress of seed deterioration in corn and establish causes of differences in performance among seed genotypes and lots. Storage under sub-optimal temperature and relative air humidity is an efficient procedure to provoke differences in intensity and speed of seed deterioration in corn seeds of different genotypes.

Keywords: *Zea mays* L; Longevity; Deterioration; Isoenzymes; Vigor

1 INTRODUÇÃO

A utilização de sementes de alto potencial fisiológico é fundamental para o estabelecimento adequado do estande na cultura do milho. Deve-se considerar que o potencial fisiológico das sementes é influenciado por vários fatores durante todo o processo de produção. Deste modo, as empresas produtoras de sementes procuram adotar procedimentos eficientes durante as etapas pré e pós-colheita para assegurar que apenas lotes de sementes com alto nível de desempenho sejam comercializados e utilizados pelos consumidores.

Programas de controle de qualidade sempre foram importantes, uma vez que o mercado de sementes é cada vez mais competitivo. Nesse contexto, um dos principais desafios da pesquisa é identificar, com segurança, a intensidade e as possíveis consequências de processos deteriorativos intimamente relacionados com a perda da capacidade germinativa ao longo do armazenamento, dentre eles o envolvimento de enzimas envolvidas no processo de deterioração; uma das metas é a detecção dos estádios iniciais desse processo. Assim, a associação de resultados de testes de germinação, vigor e análises envolvendo técnicas moleculares pode constituir alternativa importante para a avaliação do potencial fisiológico das sementes.

Dessa forma, a pesquisa tem procurado fornecer suporte às empresas produtoras de sementes, no contínuo aperfeiçoamento das técnicas de produção, processamento e armazenamento. O armazenamento em ambiente controlado é um exemplo e reflete a preocupação com as diferenças na longevidade das sementes e com a preservação do potencial de desempenho. No entanto, o armazenamento de sementes de milho é relativamente pouco estudado, embora algumas empresas adotem o armazenamento em ambiente controlado. Ao mesmo tempo, quando os lotes de sementes são transferidos aos revendedores, as condições de armazenamento frequentemente não são satisfatórias e interferem negativamente no comportamento das sementes.

Sendo assim, empresas que atuam significativamente no mercado de sementes de milho têm demonstrado preocupação com o assunto, principalmente porque frequentemente são constatadas diferenças na longevidade das sementes sob a

influência do genótipo. Dessa forma, o monitoramento do potencial fisiológico de sementes ao longo do tempo é fundamental para garantir a sua preservação.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação dos efeitos de ambientes de armazenamento sobre o potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho, procurando identificar causas de possíveis alterações fisiológicas e diferenças em seu desempenho.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

O potencial fisiológico das sementes pode ser afetado por diversos fatores durante o processo de produção, incluindo o genótipo, pois diferentes cultivares de uma mesma espécie podem apresentar diferenças quanto ao vigor e longevidade (ANDRADE; BORBA, 1993). Segundo esses autores, as adversidades ocorridas durante o desenvolvimento das sementes como a disponibilidade de água e de nutrientes, a temperatura, o ataque de doenças e de insetos podem afetar o desempenho das sementes; além disso, os procedimentos adotados durante a colheita, processamento e armazenamento também influenciam significativamente o potencial fisiológico das sementes.

O armazenamento adequado possibilita a conservação da viabilidade de sementes por períodos prolongados. Toledo e Marcos Filho (1977) relataram que, para a preservação do poder germinativo das sementes ortodoxas, é necessário mantê-las em ambiente relativamente seco e frio. Em condições normais de ambiente, a quantidade de vapor d'água presente no ar pode ser suficiente para promover o reinício das atividades metabólicas do embrião, se o oxigênio e a temperatura forem suficientes. A respiração, consumindo parte dos alimentos armazenados na semente e transformando-os em substâncias mais simples, aliada à ação de microorganismos, pode provocar o aquecimento das sementes armazenadas e reduzir drasticamente sua viabilidade.

Segundo Stein, Slabauch e Plumer (1974), muitos fatores afetam o desempenho das sementes durante o armazenamento, incluindo o genótipo, o tipo da semente, estágio de maturação, tratamentos anteriores ao armazenamento, viabilidade e teor de água inicial das sementes, temperatura e umidade relativa do ar, pressão de oxigênio durante o armazenamento e grau de infecção por fungos e bactérias. Existe uma série de inter-relações desses fatores que dificulta a avaliação do comportamento das diversas espécies durante o armazenamento.

Vários autores têm destacado, há muito tempo, que os principais fatores responsáveis pela conservação das sementes durante o armazenamento são a

temperatura ambiente e o grau de umidade das sementes. Por exemplo, Harrington (1972), afirmou que a manutenção da baixa temperatura reduz a atividade das enzimas envolvidas no processo respiratório e, conseqüentemente, a velocidade de queda da viabilidade das sementes ortodoxas durante o armazenamento.

Hartmann e Kester (1974) consideraram que as condições efetivas para o armazenamento compreendem combinação de umidade relativa do ar, de 10 a 50 %, e temperatura de 0 a 10 °C. No entanto, a temperatura apropriada para o armazenamento depende do período de armazenamento e da espécie considerada.

O grau de umidade das sementes é função da umidade relativa do ar que, por sua vez, é influenciada pela temperatura. O período necessário para que o teor de água das sementes atinja o equilíbrio higroscópico depende da espécie e, principalmente, da temperatura. O equilíbrio higroscópico é atingido com maior rapidez sob altas temperaturas (HARRINGTON, 1972).

Toledo e Marcos Filho (1977) citaram que os graus de umidade para conservação de sementes de diferentes espécies, pelo período de um ano, variam de aproximadamente 11 a 14 %, verificando-se redução da percentagem de germinação na medida em que aumenta o grau de umidade das sementes ortodoxas. Para o armazenamento por períodos mais longos as sementes devem apresentar graus de umidade inferiores a 11 %.

Delouche et al. (1973) propuseram alternativas envolvendo combinações favoráveis de temperatura e umidade relativa do ar para o armazenamento de sementes de grandes culturas: período de 8 a 10 meses, a soma da umidade relativa do ar (%) e temperatura (°C) não deve ultrapassar 80; período de 12 a 18 meses, a soma desses valores não deve ultrapassar 65 a 70; período de 3 a 5 anos, a soma deve ser, de no máximo, 55; período de 5 a 15 anos, a soma não deve ultrapassar 45.

Diversos trabalhos envolvendo variações na temperatura e umidade relativa do ar durante o armazenamento de sementes de milho demonstraram que uma das combinações favoráveis para a conservação durante seis meses após a colheita seria proporcionada pela manutenção do teor de água de 12 a 13 %, em ambiente a 20 °C e umidade relativa do ar inferior de 60 % (DELOUCHE; BASKIN, 1973), ou seja, $T^{\circ}\text{C} + \text{UR}\% \leq 80$.

Oliveira (1997) verificou que sementes de milho armazenadas em armazém convencional, em embalagem semipermeável ao vapor d'água, apresentaram redução no vigor após 18 meses de armazenamento; em câmara refrigerada, o potencial fisiológico das sementes permaneceu inalterado. Resultado semelhante foi obtido por Carvalho (1992), testando uma unidade móvel de refrigeração para a conservação de sementes de milho, condição que proporcionou melhores respostas em comparação à condição de ambiente natural.

As condições de temperatura e umidade relativa do ar, durante o armazenamento, são de grande importância na evolução da deterioração, a qual não pode ser evitada, mas pode ser minimizada no armazenamento sob condições adequadas, como controle de temperatura e umidade relativa do ar no interior do armazém (SANTOS; MENEZES; VILELA, 2004).

A deterioração de sementes é um processo degenerativo contínuo, que se inicia após a maturidade fisiológica e continua até a perda completa da viabilidade da semente. A extensão das mudanças que ocorrem neste processo depende principalmente do período e das condições de armazenamento, podendo resultar na redução da percentagem e velocidade de emergência de plântulas e desenvolvimento deficiente das plantas no campo (BINGHAM; HARRIS; McDONALD, 1994).

Para McGee (1983), as causas básicas da deterioração podem ser incluídas em duas categorias: a primeira agrupa os danos por invasão dos tecidos por microorganismos, insetos e roedores ou deterioração natural dos tecidos durante o envelhecimento. A segunda abrange causas fisiológicas e bioquímicas ligadas ao metabolismo, que podem levar à desnaturação de enzimas e inativação dos ácidos nucléicos.

Segundo Ellis e Roberts (1980), a deterioração das sementes durante o armazenamento ocorre em consequência de uma combinação de três fatores principais: período de armazenamento, temperatura do ambiente e grau de umidade das sementes.

De acordo com Popinigis (1985), o potencial fisiológico das sementes é avaliado através da viabilidade, determinada pelos testes de germinação e de tetrazólio, e do vigor. Os resultados do teste de germinação apresentam alto grau de confiabilidade

para analistas e produtores de sementes, sob os aspectos de reprodutibilidade dos resultados e como parâmetro para a normatização da produção e para a fiscalização do comércio. No entanto, o mesmo pode não ocorrer quando se trata da utilização de lotes para semeadura em campo ou durante o armazenamento (MARCOS FILHO, 2001). À medida que as condições ambientais se desviam das mais adequadas para o estabelecimento das plântulas ou para o armazenamento das sementes, é provável que a porcentagem de emergência de plântulas seja inferior à da germinação determinada em laboratório (MARCOS FILHO, 1999). Diante disso, surgiram os testes de vigor, como forma de complementação às informações obtidas no teste de germinação (AOSA, 1983), uma vez que são considerados importantes por revelarem variações estreitas no estágio de deterioração de lotes de sementes.

Segundo Pádua e Vieira (2001), lotes de sementes com porcentagens de germinação semelhante, mas com diferentes níveis de vigor, podem apresentar desempenho diferenciado em relação ao armazenamento, em função do nível de vigor e das condições de armazenamento.

Neste sentido, a detecção da deterioração das sementes por meio de testes de vigor pode ser entendida como componente importante na avaliação do potencial fisiológico, contribuindo na solução de problemas da indústria de sementes (WILSON; McDONALD, 1986; BERJAK; PAMMANTER, 2000). Entre os diversos testes de vigor existentes, o teste de envelhecimento acelerado merece destaque, pois existem evidências consistentes de que, dentro de um mesmo laboratório, apresenta alto grau de padronização e reprodutibilidade (KRZYANOWSKI; MIRANDA, 1990).

O teste de envelhecimento acelerado, utilizando temperatura e umidade relativa elevadas, procura avaliar o que ocorre no envelhecimento natural, de maneira mais rápida, baseado na simulação de fatores ambientais adversos, como temperatura e umidade relativa do ar elevadas, que são as principais causas de deterioração das sementes (DELOUCHE; BASKIN, 1973; MARCOS FILHO, 1994).

A eficiência desse teste é avaliada pela diferença de sensibilidade apresentada pelas sementes ao envelhecimento. Sementes mais vigorosas retêm sua capacidade de produzir plântulas normais e apresentam germinação mais elevada após serem submetidas ao envelhecimento acelerado, enquanto as de baixo vigor apresentam

maior redução de sua viabilidade (MARCOS FILHO, 1994; VIEIRA; CARVALHO, 1994). Tornou-se um dos testes mais utilizados para avaliação do potencial fisiológico de sementes, principalmente para soja (VIEIRA et al, 2001). Pela sua facilidade de aplicação e interpretação, vem sendo amplamente utilizado para estudar o processo de deterioração e o vigor de diversas espécies de sementes.

O teste de envelhecimento acelerado pode ser utilizado como ferramenta importante para auxiliar a tomada de decisões em diferentes etapas da produção e do uso das sementes, sendo considerado como um dos métodos mais empregados para a determinação do potencial fisiológico das sementes, em razão da possibilidade de padronização de métodos, reprodutibilidade de resultados (VIEIRA et al., 2005) e da eficiência para estimar o potencial de armazenamento de lotes de sementes, além de proporcionar relação com a emergência de plântulas em campo de várias espécies.

O teste tem sido utilizado para avaliar o vigor de sementes de diversas espécies e incluído em programas de controle de qualidade conduzidos por empresas produtoras de sementes, pois, em poucos dias, são obtidas informações relativamente seguras sobre o potencial de armazenamento dos lotes processados e, dependendo do histórico do lote, do potencial de emergência das plântulas em campo (FRIGERI, 2007).

Delouche e Baskin (1973), estudando o potencial de armazenamento de 31 lotes de sementes de milho, determinado através do teste de envelhecimento acelerado, mostraram relação positiva entre os resultados desse teste e a viabilidade das sementes durante o armazenamento.

Outro teste de resistência a estresse é o teste de frio que inicialmente foi desenvolvido para avaliar o efeito do tratamento de sementes com fungicidas (WOODSTOCK, 1976). Posteriormente, passou a ser considerado como teste de vigor, avaliando a resposta de amostras de sementes submetidas à combinação de baixa temperatura, alto grau de umidade do substrato e, se possível, agentes patogênicos. Dois tipos de estresse predominam nesse teste, pois a temperatura subótima dificulta a atuação de mecanismos de reparo, permitindo a perda de solutos celulares, devido à configuração dos sistemas de membranas, favorecendo a atividade de microorganismos prejudiciais ao desempenho das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

O teste de velocidade de emergência de plântulas em campo se baseia no princípio de que lotes com maior velocidade de emergência são mais vigorosos. Resultados satisfatórios com o uso desse teste foram obtidos para avaliação do vigor de sementes de milho (ANDREOLI et al., 2002) e de milho doce (GUISCHEM; NAKAGAWA; ZUCARELI, 2002; CAMARGO; CARVALHO, 2008).

O teste de primeira contagem de germinação se baseia no princípio de que as amostras que apresentam maiores porcentagens de plântulas normais na primeira contagem estabelecidas pelas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 1992), serão as mais vigorosas, o que se relaciona com a velocidade de germinação, porém pode proporcionar uma resposta melhor que o teste de velocidade como relatam Brown e Mayer (1986), reforçando a afirmação de que este teste é de grande interesse para avaliação do vigor de sementes de milho devido à praticidade e tempo de execução.

A detecção da continuidade do processo de deterioração de sementes, ao longo do armazenamento, pode ser entendida como componente importante na avaliação do potencial fisiológico, permitindo identificar problemas e propor soluções à indústria de sementes.

Ainda como suporte para os testes de germinação e vigor, o estudo do processo de envelhecimento de sementes através de determinações de alterações em grupos enzimáticos tem permitido identificar os pontos iniciais em que ocorrem os danos, bem como obter informações mais seguras sobre as causas de eventos deteriorativos e suas consequências. Segundo Copeland e McDonald (1995), dentre as proteínas, as enzimas desempenham importante papel na evolução da deterioração de sementes, de modo que alterações em sua atividade podem ser um excelente indicativo de perda do potencial fisiológico.

Várias isoenzimas também têm sido utilizadas em várias pesquisas como marcadores moleculares do potencial fisiológico de sementes. Por meio desses marcadores, tem sido possível elucidar causas da deterioração das sementes. Segundo Goodman e Stuber (1980), várias isoenzimas foram estudadas em milho, incluindo: fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH), amilase, catalase (CAT), glutamato desidrogenase (GTDH), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), isocitrato desidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), entre outras.

As primeiras mudanças deteriorativas que afetam o potencial fisiológico das sementes têm sido atribuídas a vários processos bioquímicos, como desnaturação de biomoléculas e acumulação de substâncias tóxicas, em adição à queda da integridade das membranas (BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991). Nesse sentido, numerosas tentativas têm sido feitas visando relacionar a queda na viabilidade de sementes com alterações na atividade de certas enzimas.

À medida que evolui a deterioração, a capacidade de reorganização das membranas celulares é reduzida, resultando em decréscimo da germinação e do vigor das sementes (LIN, 1990). A exsudação de constituintes celulares está inversamente associada ao vigor, com base em três fatores: perda da integridade das membranas, da compartimentalização da estrutura celular e liberação de substratos para o desenvolvimento de microrganismos, acelerando o processo de deterioração (WOODSTOCK, 1988).

Em milho, algumas isoenzimas tais como fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH), α e β -amilase, catalase (CAT), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (POX), apresentam variação na expressão de seus padrões com o desenvolvimento ou estágio metabólico (SCANDALIOS, 1974).

Copeland e McDonald (2001) destacaram que para detectar o início da deterioração das sementes, as avaliações mais sensíveis são aquelas relacionadas à atividade de enzimas associadas à biossíntese em novos tecidos, uma vez que, com o processo de deterioração das sementes, as enzimas tornam-se menos eficientes para exercer sua atividade catalítica.

Assim, variações nos perfis de proteínas e de enzimas específicas, principalmente aquelas relacionadas ao processo respiratório e à peroxidação de lipídios e remoção de radicais livres, podem constituir ferramentas eficientes para monitorar as alterações bioquímicas resultantes da deterioração (CHAUHAN; GOPINATHAN; BASU, 1985).

A degradação das membranas celulares pela ação de radicais livres é uma das teorias mais aceitas sobre as causas da deterioração de sementes, talvez por ser considerada como o início do processo de desorganização metabólica. A base para esta afirmação vem do conhecimento de que sementes deterioradas lixiviam maior quantidade de eletrólitos quando embebidas diretamente em água. Radicais livres são

átomos que apresentam elétrons com valências livres produzidas durante as reações oxidativas e a interação destes com lipídios da estrutura das membranas são a base do mecanismo de deterioração (KRZYANOWSKI; WEST; FRANÇA NETO, 2001).

O desenvolvimento e a existência de qualquer organismo na presença de oxigênio, mesmo em condições fisiológicas normais, está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis pelo dano oxidativo em biomoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), carboidratos, lipídeos e proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; SIES, 1991).

As EROs podem ser tanto radicais (moléculas contendo um ou mais elétrons não pareados), quanto não radicais. As mais relevantes são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (HO^{\cdot}), radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), peroxil (RO_2), alcoxil (RO^{\cdot}), o oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

As plantas têm sistemas de defesa contra EROs bem desenvolvidos, prevenindo tanto sua formação como a remoção. Em condições normais, a formação e a remoção ocorrem de forma balanceada. Entretanto, em condições de estresse, pode haver aumento na formação de EROs associado à supressão dos sistemas de defesa (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002).

As plantas respondem ao acréscimo das EROs com aceleração dos processos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (ALSCHER; HESS, 1993). Dentro da célula, as superóxidos dismutases (SODs) constituem a primeira linha de defesa contra EROs (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002). Como todos os compartimentos celulares são possíveis locais de formação $O_2^{\cdot-}$, é fundamental que as SODs estejam presentes para removê-lo.

Segundo McDonald (1999), as SODs são encontradas principalmente no citoplasma celular e na matriz mitocondrial e constituem o primeiro grupo de enzimas que catalisa a reação de dismutação de radicais peróxido livres ($O_2^{\cdot-}$) para oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Senaratna e Mckersie (1986), afirmaram que a SOD é o mais notável exemplo de neutralizador de radicais livres, pois é efetiva ao menor sinal de dano. Já Rosa et al. (2005) avaliando tolerância de sementes de milho a altas temperaturas de secagem, não observaram diferença na atividade da SOD.

Segundo Alscher, Erturk e Health (2002) e Taiz e Zaiger (2004), apesar de sua grande efetividade na neutralização do oxigênio reativo, a SOD produz H_2O_2 que, apesar de menos reativo, torna-se tóxico em altas concentrações. Assim, sua atividade isoladamente é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres conjuntamente, como a catalase (CAT) (McDonald, 1999).

O H_2O_2 formado pode ser decomposto pela catalase, cujas subunidades são formadas no citoplasma, sendo a síntese completada no peroxissomo (McDONALD, 1999). O H_2O_2 é parcialmente detoxificado pela CAT (ativa em altas concentrações de H_2O_2) nos peroxissomos, mas o H_2O_2 no citosol e cloroplasto é degradado pela peroxidase (POX) (KLAPHECK; ZIMMER; COSSE, 1990). Em outra rota, caso não seja detoxificada por essas enzimas, o H_2O_2 pode reagir formando radicais hidroxila (BOWLER; VAN MONTAGO; INZÉ, 1992) que causam peroxidação de lipídios.

A perda da atividade da enzima CAT pode ser responsável pelo acúmulo de H_2O_2 em sementes de milho durante o envelhecimento (CHANG; SUNG, 1998). Sung e Chiu (1995) mostraram aumento da peroxidação de lipídios, associado à redução na atividade das enzimas de remoção de radicais livres em sementes de soja envelhecidas naturalmente.

Durante o armazenamento de sementes de algodão (GOEL; SHEORAN, 2003) e soja (SUNG; CHIU, 1995) observou-se que as atividades das enzimas CAT e SOD, reduziram progressivamente. Sung e Jeng (1994) concluíram que, com o envelhecimento artificial de sementes de amendoim, houve redução da atividade da SOD, entretanto a atividade da CAT não variou. Em sementes armazenadas de soja (STEWART; BEWLEY, 1980) e amendoim (SUNG; JENG, 1994), a atividade da SOD não foi detectada, enquanto a CAT teve atividade detectada em eixo e cotilédones.

Para Copeland e McDonald (1995), a respiração é responsável por parte da atividade de um grande número de enzimas que atuam no metabolismo de reservas. À medida que se progride a deterioração, a taxa respiratória diminui, tendo como consequência final a perda de germinação. A enzima malato desidrogenase (MDH), responsável por catalisar a reação de malato à oxalacetato, tem importante função no ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana

mitocondrial e fixação do CO₂ nas plantas (CONN; STUMPF, 1980). A eficiência do uso deste sistema enzimático no estudo de processos deteriorativos em sementes tem se mostrado bastante variável. Enquanto em sementes de soja, Shatters et al. (1994) observaram que a atividade dessa isoenzima foi a menos afetada em 48 e 96 horas de envelhecimento, Camargo (1998) relatou que essa mesma enzima foi um interessante marcador para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de café, em especial como indicativo da ocorrência de respiração aeróbica.

A respiração aeróbica, no entanto, não é o único fator que pode afetar a deterioração de sementes. Zhang et al. (1994) verificaram que, em função do metabolismo anaeróbico a produção de compostos voláteis pelas sementes pode ser um fator que traduz a evolução do processo de deterioração. Segundo esses autores, o acetaldeído teve maior efeito danoso, independentemente da umidade relativa e da temperatura do ambiente de armazenamento, enquanto o etanol causou deterioração de sementes, somente em condição de umidade relativa alta.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) possui reconhecida atuação no metabolismo anaeróbico de plantas, promovendo a redução do acetaldeído a etanol. Os indícios de que a atividade desta isoenzima pode ser relacionada com o potencial fisiológico das sementes não são recentes, pois, Throneberry e Smith (1955) já haviam observado, em sementes de milho, relação positiva entre viabilidade das sementes e atividade da álcool desidrogenase. Mesmo em trabalhos de certificação da pureza genética de híbridos de milho, seu uso tem sido avaliado (SALGADO, 2001), embora, ao que parece, esta enzima venha a constituir mais uma ferramenta para a detecção de eventos deletérios em sementes.

A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, desempenhando papel chave no metabolismo de lipídeos, ponto importante no processo deteriorativo de sementes (VIEIRA, 1996). Shatters et al. (1994) trabalhando com sementes de soja, observaram perda de 77 % da atividade da esterase após 48 horas de envelhecimento. Santos, Menezes e Vilela (2004) constataram, em diferentes lotes de sementes de feijão envelhecido artificialmente, que a atividade da enzima esterase no período zero foi mais elevada, demonstrando que as sementes apresentavam maior peroxidação de lipídios, causando aumento na permeabilidade das

membranas. Ainda segundo esses autores, as alterações nos padrões da enzima esterase evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes à medida que os níveis de fatores adversos de temperatura e teor de água das sementes são aumentados no processo de envelhecimento.

A glutamato oxalacetato transaminase (GOT) participa da reação específica de transferência do aminogruppo de um aminoácido ao ácido α -cetoglutárico para formar o ácido glutâmico e produzir o cetoácido (CONN; STUMPF, 1990). Reage em diferentes velocidades com aproximadamente todos os outros aminoácidos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem, sobretudo, no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial interna é especificamente permeável, penetra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Essa é, portanto, uma enzima atuante no processo de degradação e síntese de proteínas (CONN; STUMPF, 1990), apresentando um importante papel na germinação das sementes.

Utilizando técnicas eletroforéticas, Chauhan, Gopinathan e Basu (1985) observaram, em soja e cevada, aumento do número de bandas da glutamato oxalacetato transaminase (GOT) com o envelhecimento das sementes. Segundo esses autores, essas mudanças no número de bandas são devidas a aumento na atividade metabólica que ocorre com a evolução do processo de deterioração.

A glutamato desidrogenase (GTDH) é uma enzima que cataliza a deaminação oxidativa do glutamato, formando amônia e α -cetoglutarato. A amônia pode ser recuperada e reutilizada a aminoácidos. Embora a amônia e o α -cetoglutarato sejam catalizados pela mesma enzima, o uso de duas coenzimas (NAD^+ e NADPH) diferentes, pela glutamato desidrogenase, possibilita a regulação independente da deaminação do glutamato e da aminação do α -cetoglutarato (LEHNINGER, 1992). Uma vez que esta enzima atua na oxidação de aminoácidos fornecendo energia para as células (ciclo do ácido cítrico) e/ou na redução do α -cetoglutarato para a síntese de aminoácidos, pode desempenhar importante papel na germinação de sementes.

A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido e sua produção pela camada de aleurona em sementes de cereais normalmente não ocorre em resposta ao

ácido giberélico, a não ser que a semente entre na fase de secagem pós maturação, ou seja, submetida à secagem artificial em estádios mais precoces do desenvolvimento (EVANS; BLACK; CHAPMAN, 1975).

Oishi e Bewley (1990) trabalhando com sementes de milho, concluíram que a secagem prematura ou logo após a maturidade fisiológica causa declínio de ABA e permite que a camada de aleurona torne-se sensível ao ácido GA_3 , produzindo a enzima α -amilase. O GA_3 é sintetizado no escutelo e transportado para a camada de aleurona, onde a síntese de α -amilase é induzida. Essa enzima é secretada no amido contido no endosperma, onde a degradação hidrolítica ocorre e a glicose formada é então transportada para as partes da plântula em crescimento (GUIMARÃES, 1999).

Embora existam na literatura estudos relacionados com as alterações no potencial fisiológico e na composição enzimática durante o armazenamento de sementes de milho, ainda há muito a ser esclarecido nesse processo. Considerando que o principal desafio das pesquisas sobre armazenamento de sementes está na identificação de parâmetros que permitam avaliar precocemente o processo de deterioração, o monitoramento dessas alterações pode se constituir em ferramenta eficiente para a avaliação da longevidade e potencial fisiológico das sementes de diferentes genótipos.

2.2 Material e métodos

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal e no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP/ ESALQ), Piracicaba - SP e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG.

Para tanto, foram utilizados três híbridos experimentais de milho (Tabela 1) produzidos pela empresa Syngenta Seeds, aqui identificados por A, B e C, cada um representado por três lotes de sementes tratadas com fungicida e inseticida, armazenados em três ambientes diferentes.

Segundo informações da própria empresa, esses híbridos possuem comportamento diferenciado em relação ao armazenamento.

Tabela 1 - Descrição das características dos híbridos utilizados

Híbrido	Tipo e ciclo	Peneira*	Grão e cor
A	Triplo/precoce	18 R1	Duro/amarelo-alaranjado
B	Simples/precoce	20 C	Duro/alaranjado
C	Duplo/precoce	22 C	Duro/alaranjado

*Peneira 18 R1 = sementes arredondadas retidas em peneira de crivos circulares com diâmetro de 18/64" e posteriormente nas peneiras de perfuração oblonga 13/64 x 3/4"

*Peneira 20 C = sementes achatadas retidas em peneira de perfuração circular com diâmetro de 20/64" e que, posteriormente, atravessaram peneira de perfuração oblonga com crivo de 13/64 x 3/4"

*Peneira 22 C = sementes achatadas retidas em peneira de perfuração circular com diâmetro de 22/64" e que, posteriormente, atravessaram peneira de perfuração oblonga com crivo de 13/64 x 3/4"

2.2.1 Obtenção de lotes com diferentes potenciais fisiológicos e caracterização dos ambientes de armazenamento

Como a empresa não tinha disponibilidade de lotes de cada híbrido com potenciais fisiológicos diferentes, fato confirmado após a realização de testes preliminares após a recepção das sementes, foi necessário efetuar o envelhecimento artificial de parte do lote de sementes recebido de cada híbrido. O uso de lotes de

sementes envelhecidas artificialmente é justificável, pois permite o controle mais preciso de variáveis, pois as diferenças no potencial fisiológico das sementes avaliadas são menos dependentes do histórico do lote.

Testes foram realizados para a determinação do período mais apropriado de exposição das sementes de cada híbrido ao envelhecimento artificial. Para os híbridos A e C foi recebido um lote de sementes com 10,5 kg e 16,5 kg, respectivamente. Esses lotes foram divididos em três partes cada, sendo uma mantida sem alterações constituindo os lotes 1 (híbrido A) e 7 (híbrido C) e, as outras duas, envelhecidas artificialmente a 41 °C durante 72 e 96 h, constituindo os lotes 2 e 3 (híbrido A) e 8 e 9 (híbrido C). Ao mesmo tempo, foi recebido um lote com 15,0 kg de sementes do híbrido B, o qual foi dividido em três partes, sendo uma mantida sem alterações constituindo o lote 4 e, as outras duas, envelhecidas artificialmente a 41 °C durante 96 e 120 h, constituindo os lotes 5 e 8, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Tempo de exposição das sementes ao envelhecimento artificial, de cada híbrido, para obtenção de lotes com diferentes potenciais fisiológicos

Híbrido	Lote	Período de exposição das sementes ao envelhecimento artificial
A	1	0 hora
	2	72 horas
	3	96 horas
B	4	0 hora
	5	96 horas
	6	120 horas
C	7	0 hora
	8	72 horas
	9	96 horas

Após a realização do envelhecimento artificial, foi realizada a homogeneização manual e, depois disso, as sementes foram colocadas para secar, à temperatura ambiente, até atingirem teores de água próximos aos iniciais (cerca de 9%).

Depois disso, as sementes de cada lote foram acondicionadas em sacos de tela de algodão e armazenadas em três ambientes: câmara fria e seca (A_1), a 10 °C e 30 % de umidade relativa do ar, ambiente natural não controlado (A_2) com registro diário de temperatura e umidade relativa e ambiente controlado (A_3), a 20 °C e 70 % de umidade

relativa do ar. Este último foi estabelecido mediante o uso de solução de NaCl em recipiente de plástico (35 x 20 x 11 cm) posicionado no interior de uma caixa de plástico (51 x 36 x 15 cm), onde também foram mantidas as sementes acondicionadas em sacos de algodão. Na definição do volume de solução de NaCl tomou-se como base a proporção de solução utilizada no teste de envelhecimento acelerado com o uso de solução saturada de NaCl (40 g de sal para 100 mL de água), conforme Jianhua e McDonald (1996); foram utilizadas soluções com diferentes concentrações do sal, dependendo da quantidade de semente de cada híbrido, visando manter o interior da caixa com umidade relativa do ar em torno de 70 %. Assim, para o híbrido A foram utilizados quatro litros de solução com concentração de 80 % (1.280 g de NaCl para 4.000 mL de água) para cada caixa contendo aproximadamente 1,75 kg de sementes e, para os híbridos B e C, foram utilizados quatro litros de solução saturada (1.600g de NaCl para 4.000 mL de água) para cada caixa com aproximadamente 2,5 kg e 2,75 kg de sementes, respectivamente. Durante todo o período de armazenamento, as caixas contendo as sementes foram mantidas em câmara seca a 20 °C e 50-60 % de umidade relativa do ar. O período de armazenamento foi de 15 meses, sendo as sementes submetidas a diferentes avaliações, com intervalos trimestrais.

Antes do início de cada uma dessas avaliações, foi realizada a uniformização do grau de umidade das sementes. Esse procedimento foi necessário porque as sementes permaneceram expostas a diferentes condições de armazenamento e, possivelmente, apresentavam variações nos graus de umidade. Assim, para cada época de armazenamento, as sementes que haviam sido armazenadas em câmara fria e seca (A₁) e em ambiente controlado (A₃) foram mantidas em ambiente natural não controlado (A₂) durante aproximadamente dez dias antes da instalação de cada época de testes. Este fato é importante para a execução dos testes, porque a uniformização do teor de água das sementes é imprescindível para a padronização e obtenção de resultados comparáveis (MARCOS FILHO, 1999).

Foi realizado o monitoramento da temperatura e umidade relativa do ar, nos três ambientes durante todo o período de armazenamento por meio dos registros em termohigrógrafo.

2.2.2 Avaliações do desempenho das sementes

Foram realizadas em amostras coletadas no início e aos 3, 6, 9, 12 e 15 meses de armazenamento.

2.2.2.1 Grau de umidade

Determinado antes da instalação dos diferentes testes, pelo método da estufa a 105 °C (± 3 °C), durante 24 horas (BRASIL, 2009), em duas amostras. Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida) por lote. Essa determinação também foi realizada após a exposição das sementes às condições do teste de envelhecimento acelerado.

2.2.2.2 Germinação

Teste conduzido com quatro repetições de 50 sementes, em rolos de papel-toalha umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, a 25 °C, por sete dias. A interpretação foi efetuada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em percentagem média de plântulas normais para cada lote.

2.2.2.3 Primeira contagem de germinação

Computada no teste de germinação (item 2.2.1.2), considerando a porcentagem de plântulas normais no quarto dia após a semeadura.

2.2.2.4 Envelhecimento acelerado

O método utilizado foi o de mini-câmaras em que as sementes foram distribuídas em camada única sobre uma tela suspensa no interior de caixa de plástico (11 x 11 x 3 cm) contendo 40 mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas, a 41 °C (AOSA, 1983). Após esse período, foi conduzido o teste de germinação e considerou-se a porcentagem de plântulas normais no quarto dia após semeadura.

2.2.2.5 Teste de frio com terra

Conduzido com quatro repetições de 50 sementes. Foram utilizadas bandejas de plástico de 34 x 23 x 7 cm, com 1 kg de mistura de terra e areia na proporção de 1:3. Em cada bandeja foram distribuídas duas repetições de 50 sementes, em seguida cobertas com 1 kg do mesmo substrato, conforme Caseiro e Marcos Filho (2000). A disponibilidade de água do substrato foi ajustada para 70 % da sua capacidade de retenção. A água utilizada foi previamente resfriada a 10 °C. Para reduzir a evaporação, cada bandeja foi colocada no interior de um saco de plástico transparente e, em seguida, mantida em câmara fria, a 10 °C, por sete dias. Após esse período as bandejas foram transferidas para germinador a 25 °C, sendo o registro das porcentagens de plântulas realizado no quinto dia.

2.2.2.6 Emergência de plântulas em campo

Conduzida com quatro repetições de 50 sementes, cada uma representada por uma linha de 4 m de comprimento, onde as sementes foram distribuídas de maneira eqüidistante, em sulcos com cerca de 7 cm de profundidade e cobertas com, aproximadamente, 3 cm de terra. O espaçamento entre linhas foi de 40 cm. A avaliação foi realizada no décimo quarto dia após a semeadura, registrando-se o número de plântulas emersas, sendo os resultados expressos em percentuais de plântulas emersas.

2.2.3 Avaliações da atividade enzimática das sementes

Para as avaliações da atividade enzimática, foram coletadas duas amostras de sementes dos três híbridos, armazenadas nos três ambientes, no início e aos 3, 6, 9, 12 e 15 meses de armazenamento e conservadas em congelador a -80 °C, até a realização das análises eletroforéticas.

Posteriormente, as amostras foram trituradas em moinho com o uso de nitrogênio líquido e maceradas manualmente, na presença do antioxidante PVP (polivinilpirrolidona) e conservadas em congelador a -80°C.

Foram coletadas subamostras de 100 mg do material macerado, às quais foram adicionadas o tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8,0) na quantidade de 2,5 vezes

a massa de cada amostra e 0,1 % de β -mercaptoetanol; em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos. O material foi colocado em geladeira *overnight* e depois foi centrifugado a 14.000 rpm, por 30 minutos, a 4 °C. Foram aplicados 40 μ L do sobrenadante no gel de corrida (gel separador, poliacrilamida 7,5% e gel concentrador, poliacrilamida 4,5%) e gel de amido para o sistema enzimático α -amilase (gel separador, poliacrilamida 7,5% e amido solúvel 0,5% e gel concentrador, poliacrilamida 4,5%). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi a Tris-glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 120 V, por 8 horas. Após a eletroforese, procedeu-se à revelação dos géis para as enzimas malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), esterase (EST), superóxido dismutase (SOD), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), glutamato desidrogenase (GTDH), α -amilase (α -A) e sorbitol desidrogenase (SDH) de acordo com protocolo proposto por Alfenas (2006). A avaliação dos perfis eletroforéticos foi realizada com base na presença ou ausência e intensidade de bandas.

2.2.4 Procedimento estatístico

Para os testes realizados em laboratório, com exceção da avaliação da atividade de enzimas, a análise estatística foi efetuada de acordo com o delineamento inteiramente casualizado (Tabela 3). Para o teste de emergência de plântulas em campo foi adotado o delineamento blocos ao acaso (Tabela 4). Foi utilizado o esquema fatorial, avaliando-se os efeitos de ambientes e de lotes de sementes de cada híbrido. As análises foram realizadas separadamente para cada híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para a execução da análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

Tabela 3 - Esquema da análise da variância para os testes realizados em laboratório

Causas de variação	GL
Lotes	2
Ambientes	2
Lotes x Ambientes	4
Resíduo	27
Total	35

Tabela 4 - Esquema da análise da variância para os testes realizados em campo

Causas de variação	GL
Lotes	2
Ambientes	2
Lotes x Ambientes	4
Blocos	3
Resíduo	24
Total	35

2.3 Resultados e discussão

As condições de temperatura e umidade relativa do ar foram distintas nos três ambientes, permitindo estimar variações no desempenho das sementes dos três híbridos.

Em câmara fria e seca (A_1) a temperatura e a umidade relativa do ar se mantiveram durante todo o período de armazenamento, com valores de 10 °C e 30 %, com variações máximas de 2 pontos percentuais na umidade relativa.

No ambiente controlado (A_3), a temperatura se manteve durante todo o período de armazenamento a 20 °C e a umidade relativa do ar próxima de 50 % com variações de 2 pontos percentuais; porém, no interior das caixas de plástico, onde as sementes foram colocadas, a umidade relativa do ar permaneceu em torno de 70 %. De acordo com Delouche et al. (1973), as condições de armazenamento são seguras quando permitem a manutenção do potencial fisiológico das sementes durante pelo menos três anos. Esses autores efetuaram indicações quanto a combinações de temperatura e umidade relativa do ar favoráveis para o armazenamento de sementes de grandes culturas como o milho: período de 8 a 10 meses de armazenamento, a soma da umidade relativa do ar (%) e temperatura (°C) não deve ultrapassar 80; para o período de 12 a 18 meses a soma desses valores não deve ultrapassar 65; para 3 a 5 anos, a soma deve ser de, no máximo, 55 e, para 5 a 15 anos, não ultrapassar 45. Sendo assim, a combinação mantida no ambiente A_1 foi de 40, o que possibilitaria, de acordo com os autores citados, a manutenção do potencial fisiológico das sementes durante vários anos. Já a combinação mantida no ambiente A_3 foi de 90, o que indica que a manutenção da viabilidade das sementes armazenadas nesse ambiente não deveria ser favorável para o armazenamento durante período superior a oito meses.

Para o ambiente de laboratório (A_2), as temperaturas máximas (T_x), mínimas (T_n), médias (T_m) e umidade relativa do ar (UR) durante o período de armazenamento das sementes estão registrados na Tabela 5. A temperatura variou de 14,0 a 31,0 °C e a umidade relativa do ar, de 72 a 83%.

Tabela 5 - Valores médios das temperaturas máximas (Tx), mínimas (Tn) e médias (Tm) e da umidade relativa do ar (UR) dos meses correspondentes ao período de armazenamento das sementes de milho em ambiente de laboratório

Meses	Tx (°C)	Tn (°C)	Tm (°C)	UR (%)
Novembro/2008	26,0	22,5	24,3	74
Dezembro/2008	31,0	22,0	24,8	71
Janeiro/2009	28,0	23,0	25,0	81
Fevereiro/2009	27,0	23,0	25,4	82
Março/2009	30,0	20,0	26,2	75
Abril/2009	27,0	19,0	23,9	72
Mai/2009	24,0	19,0	21,9	75
Junho/2009	21,0	14,0	16,4	80
Julho/2009	20,0	16,0	17,5	83
Agosto/2009	22,0	16,0	18,6	75
Setembro/2009	22,5	18,0	20,8	81
Outubro/2009	24,0	18,0	21,2	81
Novembro/2009	26,0	22,0	23,8	77
Dezembro/2009	27,0	22,5	24,8	79
Janeiro/2010	28,5	22,5	25,5	82
Fevereiro/2010	30,0	22,3	26,1	78

Dentre os fatores que afetam a conservação de sementes, a umidade relativa do ar e a temperatura são de grande importância na evolução da deterioração. As variações na umidade relativa do ar observadas durante os 15 meses de armazenamento, mesmo sendo sutis em números, quando interagindo com as alterações na temperatura, poderiam influenciar diretamente a manutenção do potencial fisiológico das sementes mantidas em laboratório (A₂).

Durante o processo de hidratação e secagem das sementes que ocorre em ambientes não controlados, como no caso do ambiente de laboratório (A₂), geralmente, ocorre redução do potencial fisiológico das sementes (COPELAND; MCDONALD, 2001). Quanto maior a frequência de oscilações do grau de umidade das sementes, maior deve ser a redução da germinação, sendo que esses efeitos deletérios aumentam com o período de hidratação.

Conforme mostra a Tabela 6, os lotes de sementes dos três híbridos apresentavam graus de umidade entre 8,0 % a 9,4 % antes do armazenamento. Durante o armazenamento, esses valores se situaram entre 6,2 % a 8,7 % quando armazenados em câmara fria e seca (A₁), 10,1 % a 12,0 % em ambiente de laboratório

(A₂) e 11,5 % a 13,5 % em ambiente controlado (A₃). Devido à diferença existente nos graus de umidade das sementes armazenadas nos três ambientes, foi realizada a uniformização do teor de água das sementes em ambiente de laboratório (A₂) antes do início de cada época de avaliação. Isso é importante pois, pode haver influência nos resultados de testes que envolvem a determinação da velocidade de germinação ou de emergência de plântulas. Sabe-se que sementes mais úmidas, dentro de limites, podem apresentar germinação mais rápida, o mesmo ocorrendo com o desenvolvimento inicial das plântulas. Da mesma forma, no envelhecimento acelerado, a desuniformidade do teor de água nas sementes gera variação acentuada na intensidade de deterioração das sementes (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987; MARCOS FILHO, 1999).

Após a uniformização do grau de umidade em ambiente de laboratório (A₂), os lotes de sementes, dos três híbridos, apresentaram diferenças de 1,0 a 1,7 pontos percentuais no teor de água. Esses valores são relativamente uniformes e adequados antes dos testes, em cada época de avaliação, pois observando os dados nota-se que esse parâmetro não afetou o comportamento das sementes durante os testes conduzidos ao longo do armazenamento, visto que as variações estavam dentro de limites toleráveis, ou seja, 2 a 3 pontos percentuais (MARCOS FILHO, 1999).

TABELA 6 - Valores médios do grau de umidade de três lotes de sementes de três híbridos de milho no início do armazenamento (AA), em função dos ambientes em que foram submetidos e antes e depois de entrarem em equilíbrio em condição ambiente, aos 3, 6, 9, 12 e 15 meses de armazenamento

HÍBRIDO	LOTE	AA	AMBIENTE	LOTE	3 meses		6 meses		9 meses		12 meses		15 meses	
					GU antes	GU depois	GU antes	GU depois	GU antes	GU depois	GU antes	GU depois	GU antes	GU depois
A	1	8,6	Câmara fria e seca	1	7,0	11,1	6,5	10,5	6,5	10,2	7,3	11,8	7,5	11,9
				2	7,3	11,1	6,9	11,1	6,9	10,7	6,9	11,9	8,2	12,6
				3	7,5	12,0	6,9	11,6	6,5	11,1	7,1	12,2	8,5	12,7
	2	9,4	Ambiente de Laboratório	1	11,0	12,3	11,1	11,2	11,0	11,5	11,0	12,1	11,1	12,0
				2	11,3	11,5	10,3	11,3	11,0	11,4	11,4	12,3	11,7	12,5
				3	10,9	12,2	10,5	12,0	11,2	10,5	11,9	12,0	11,8	11,7
	3	9,0	Ambiente controlado	1	13,0	11,5	12,2	11,1	11,5	11,6	12,2	11,9	13,5	12,6
				2	13,5	11,4	12,7	11,1	12,1	11,2	12,4	12,6	13,0	12,6
				3	13,5	11,4	12,0	12,0	12,1	10,9	12,2	12,8	12,9	12,9
B	4	8,3	Câmara fria e seca	4	7,3	10,6	6,5	11,1	6,5	10,8	7,3	11,4	8,5	12,7
				5	7,5	10,5	7,3	10,4	6,2	10,9	7,1	11,4	8,1	12,7
				6	7,2	11,1	6,7	11,3	6,3	11,0	6,7	11,2	8,7	12,2
	5	9,2	Ambiente de Laboratório	4	10,3	11,8	11,0	10,2	10,4	11,2	11,6	11,7	11,0	11,6
				5	10,9	10,9	10,5	10,7	10,9	10,8	11,4	11,6	11,2	11,5
				6	11,1	10,9	11,1	11,2	10,6	10,9	11,4	11,3	11,5	11,6
	6	8,9	Ambiente controlado	4	13,5	10,7	13,2	10,1	12,6	11,3	13,2	12,1	13,5	13,0
				5	13,5	11,2	13,6	10,7	12,7	11,6	13,0	12,2	13,6	13,0
				6	13,5	11,5	13,0	11,3	11,7	11,0	13,1	11,9	13,1	12,6
C	7	8,0	Câmara fria e seca	7	7,0	10,2	7,7	9,8	6,2	11,0	6,9	11,8	8,3	11,6
				8	7,5	10,6	7,1	10,1	6,4	10,9	7,3	11,5	8,1	11,4
				9	7,2	11,2	6,5	10,7	6,4	10,5	7,1	12,4	8,1	11,2
	8	8,8	Ambiente de Laboratório	7	12,0	11,1	10,1	10,1	10,8	11,9	11,3	11,9	11,6	11,4
				8	11,5	11,0	10,5	10,4	10,9	11,5	11,4	12,3	11,3	11,8
				9	11,3	11,7	10,9	10,8	10,8	11,3	11,3	11,8	11,5	11,2
	9	8,4	Ambiente controlado	7	13,5	10,8	12,4	10,1	12,2	10,5	13,0	12,3	12,7	12,8
				8	13,2	11,0	12,6	10,3	12,5	10,9	13,5	12,6	13,1	11,6
				9	13,1	11,4	13,4	10,9	12,9	11,0	13,3	12,4	12,6	13,0

2.3.1 Avaliação do potencial fisiológico

A interação ambientes de armazenamento e lotes de sementes de milho foi significativa para todos os testes realizados e em todas as épocas durante o armazenamento.

Avaliando os dados de germinação, verificou-se que o armazenamento em câmara fria e seca (A_1) foi o que proporcionou melhores condições para o desempenho dos lotes de sementes dos três híbridos, conforme observado na Tabela 7, onde a viabilidade das sementes de todos os lotes foi mantida durante todo o período de armazenamento com valores superiores a 92 %. Isso foi possível, pois a câmara fria e seca utilizada nesta pesquisa possui uma combinação de temperatura e umidade relativa do ar (10 °C e 30 % UR) extremamente favorável para o armazenamento de sementes de milho. Nessas condições, a conservação das sementes é favorecida, pois a baixa temperatura reduz a atividade das enzimas envolvidas no processo de respiração das sementes; esse processo é um dos principais responsáveis pela perda da viabilidade das sementes durante o armazenamento (HARRINGTON, 1972). Além disso, o baixo grau de umidade é um fator importante para a conservação das sementes, o que também contribuiu para que a viabilidade das sementes fosse mantida ao longo do armazenamento nesse ambiente, pois sabe-se que o grau de umidade é o fator mais importante entre os que afetam o potencial de armazenamento e o que mais influencia a taxa respiratória das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Para os demais ambientes (A_2 e A_3) houve diferença no comportamento dos lotes de sementes ao longo do armazenamento, sendo verificada maior redução na germinação das sementes no ambiente A_3 (ambiente controlado), onde as condições de alta umidade relativa do ar presente neste ambiente contribuiu para que as sementes armazenadas apresentassem germinação inferior. Kueneman (1983) afirma que a umidade relativa do ar é mais crítica do que a temperatura no ambiente de armazenamento.

As sementes dos lotes que não foram submetidas ao envelhecimento prévio e, portanto, considerados como lotes de melhor potencial fisiológico (lotes 1, 4 e 7), quando armazenadas em ambiente de laboratório (A_2) e em ambiente controlado com 20 °C e 70 % UR (A_3) apresentaram diferenças ao longo do armazenamento.

Tabela 7 - Porcentagens médias de plântulas normais, no teste de germinação, de três lotes de sementes de três híbridos de milho, em função do ambiente de armazenamento

		HÍBRIDO A														
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
1	97 A	94 Aa	95 Aa	96 Aa	97 Aa	95 Aa	94 Aa	94 Aa	95 Aa	92 Aa	88 Aa	90 Aa	93 Aa	89 Aa	87 Ab	84 Aa
2	96 A	97 Aa	95 Aa	96 Aa	97 Aa	95 Aa	89 Aab	94 Aa	93 Aa	89 Ab	80 Ab	81 Ab	90 Aa	83 Ab	77 Bc	79 Ab
3	96 A	92 Aa	98 Aa	94 Aa	94 Aa	93 Aa	70 Bb	60 Bb	49 Bb	42 Ab	28 Bb	57 Bc	60 Bb	44 Bb	37 Cb	26 Bb
CV (%)	3,0	7,3	5,3	6,6	4,9	7,3	7,3	5,3	6,6	4,9	7,3	7,3	5,3	6,6	4,9	7,3

		HÍBRIDO B														
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
4	100 A	100 Aa	100 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	100 Aa	99 Aa	98 Aa	97 Aa	95 Aa	97 Aa	98 Aa	95 Aa	87 Ab	84 Ab
5	99 A	100 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	98 Aa	80 Bb	79 Bb	76 Bb	64 Bb	47 Bb	65 Bc	62 Bc	47 Bc	33 Bc	26 Bc
6	98 A	96 Aa	99 Aa	98 Aa	96 Aa	97 Aa	71 Bb	69 Cb	60 Cb	45 Cb	35 Cb	44 Cc	46 Cc	34 Cc	29 Bc	21 Bc
CV (%)	1,6	7,8	5,3	7,7	7,3	7,3	7,8	5,3	7,7	7,3	7,3	7,8	5,3	7,7	7,3	7,3

		HÍBRIDO C														
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
7	98 A	97 Aa	98 Aa	98 Aa	98 Aa	98 Aa	99 Aa	97 Aa	91 Aab	81 Ab	61 Ab	97 Aa	99 Aa	82 Ab	75 Ab	57 Ab
8	98 A	98 Aa	98 Aa	97 Aa	97 Aa	98 Aa	86 Bb	86 Bb	72 Bb	59 Bb	42 Bb	84 Bb	84 Bb	68 Bb	59 Bb	51 Ab
9	99 A	96 Aa	97 Aa	96 Aa	95 Aa	97 Aa	68 Cb	61 Cb	46 Cb	39 Cb	25 Cb	61 Cb	38 Cc	29 Cc	22 Cc	16 Bb
CV (%)	1,6	5,9	4,8	8,1	8,6	9,0	5,9	4,8	8,1	8,6	9,0	5,9	4,8	8,1	8,6	9,0

Letras maiúsculas: comparações na coluna, dos lotes em uma mesma época; letras minúsculas: comparações na linha, dentro da mesma época, entre os diferentes ambientes de armazenamento. AA (antes do armazenamento); 3 (3 meses após o armazenamento); 6 (6 meses após o armazenamento); 9 (9 meses após o armazenamento); 12 (12 meses após o armazenamento); 15 (15 meses após o armazenamento).

As sementes do lote 1 (híbrido A), apresentaram germinação inicial de 97 %, sendo verificada queda na germinação aos 15 meses de armazenamento, com valor de 88% no ambiente de laboratório (A₂). A redução ocorrida na germinação das sementes armazenadas nesse ambiente pode estar relacionada às condições ambientais; as sementes por estarem em período avançado de armazenamento têm seu potencial fisiológico reduzido devido ao estágio mais avançado do processo de deterioração. A queda na germinação das sementes desse mesmo lote (lote 1) ocorreu mais rapidamente quando as sementes foram submetidas ao armazenamento em ambiente controlado (A₃), onde houve queda de 10 pontos percentuais no décimo segundo mês de armazenamento, com germinação de 89 % (Tabela 7).

Para as sementes do lote 7 (híbrido C) foi observado comportamento semelhante às sementes do lote 1 (híbrido A) com queda na germinação das sementes a partir dos 12 meses de armazenamento, com valor de 81 % no ambiente de laboratório (A₂), e aos nove meses, com valor de 82 %, no ambiente A₃ (Tabela 7).

Já as sementes do lote 4 (híbrido B) mantiveram germinação superior a 95 % durante todo o período de armazenamento no ambiente A₂ (Tabela 7) e, apesar de ter sido verificada queda na germinação das sementes aos 12 meses de armazenamento no ambiente A₃, o valor observado (87 %) ainda se encontra dentro dos padrões mínimos para comercialização.

Da mesma forma como nesta pesquisa, Marincek (2000) não verificou queda na germinação de sementes de milho, armazenadas por 12 meses em armazém convencional, sob condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar. Pádua, Vieira e Barbosa (2002) armazenaram sementes de algodão com diferentes níveis de vigor em condição ambiente e verificaram que o potencial fisiológico das sementes foi mantido até o oitavo mês de armazenamento, sendo que a redução do potencial fisiológico foi associado ao aumento na ocorrência de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. nas sementes.

Sendo assim, foi possível observar, por meio do teste de germinação, superioridade das sementes do híbrido B, onde praticamente não houve queda significativa na germinação das sementes durante todo o período de armazenamento nas três condições de armazenamento; ao final do armazenamento, enquanto as

sementes do lote 4 (híbrido B) apresentaram germinação de 95 % no ambiente de laboratório (A_2) e de 84 % no ambiente controlado (A_3), as sementes do lote 1 (híbrido A) apresentaram germinação de 88 % e 84 %, nesses mesmos ambientes e, as sementes do lote 7 (híbrido C), 61 % e 57 % (Tabela 7).

Ainda de acordo com a Tabela 7, foi observada queda na germinação, logo aos três primeiros meses de armazenamento, em lotes que foram submetidos ao envelhecimento prévio, ou seja, considerados como de potencial fisiológico intermediário (lotes 2, 5 e 8) e reduzido (lotes 3, 6 e 9), com germinação de 89 %, 80 % e 86 % (lotes 2, 5 e 8) e 70 %, 71 % e 68 % (lotes 3, 6 e 9) no ambiente de laboratório (A_2).

Para o ambiente controlado a 20 °C e 70 % UR (A_3), a queda na germinação das sementes desses mesmos lotes foram observadas, também, nos três primeiros meses de armazenamento, mas com queda mais significativa, onde foram verificados valores de germinação de 81 %, 65 % e 84 % para os lotes 2, 5 e 8, e de 57 %, 44 % e 61 % para os lotes 3, 6 e 9 (Tabela 7).

As quedas ocorridas de maneira mais rápida na germinação das sementes desses lotes eram de se esperar, pois elas foram submetidas ao envelhecimento prévio por período relativamente longo, o que faz com que elas estivessem em grau de deterioração mais avançado e, portanto, mais sensíveis ao armazenamento sob umidade relativa mais elevada, o que pode favorecer a atividade respiratória das sementes (ELLIS; SIMON; COVELL, 1987). Taxas elevadas de respiração esgotam rapidamente as substâncias de reserva acumuladas na semente, das quais ela depende para promover a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (CARNEIRO; AGUIAR, 1993).

Ao serem comparados lotes dos três híbridos que não foram envelhecidos (lotes 1, 4 e 7) e lotes envelhecidos por 96 horas (lotes 3, 5 e 9) foi observado que as sementes do híbrido C apresentaram potencial de armazenamento inferior aos dos outros híbridos, principalmente em ambiente de laboratório (A_2) e controlado (A_3) (Figura 1).

Vale ressaltar a superioridade das sementes do lote 5 (híbrido B) em relação as sementes dos lotes 3 e 9 (híbridos B e C) quando foram armazenadas em laboratório (A_2) (Figura 1).

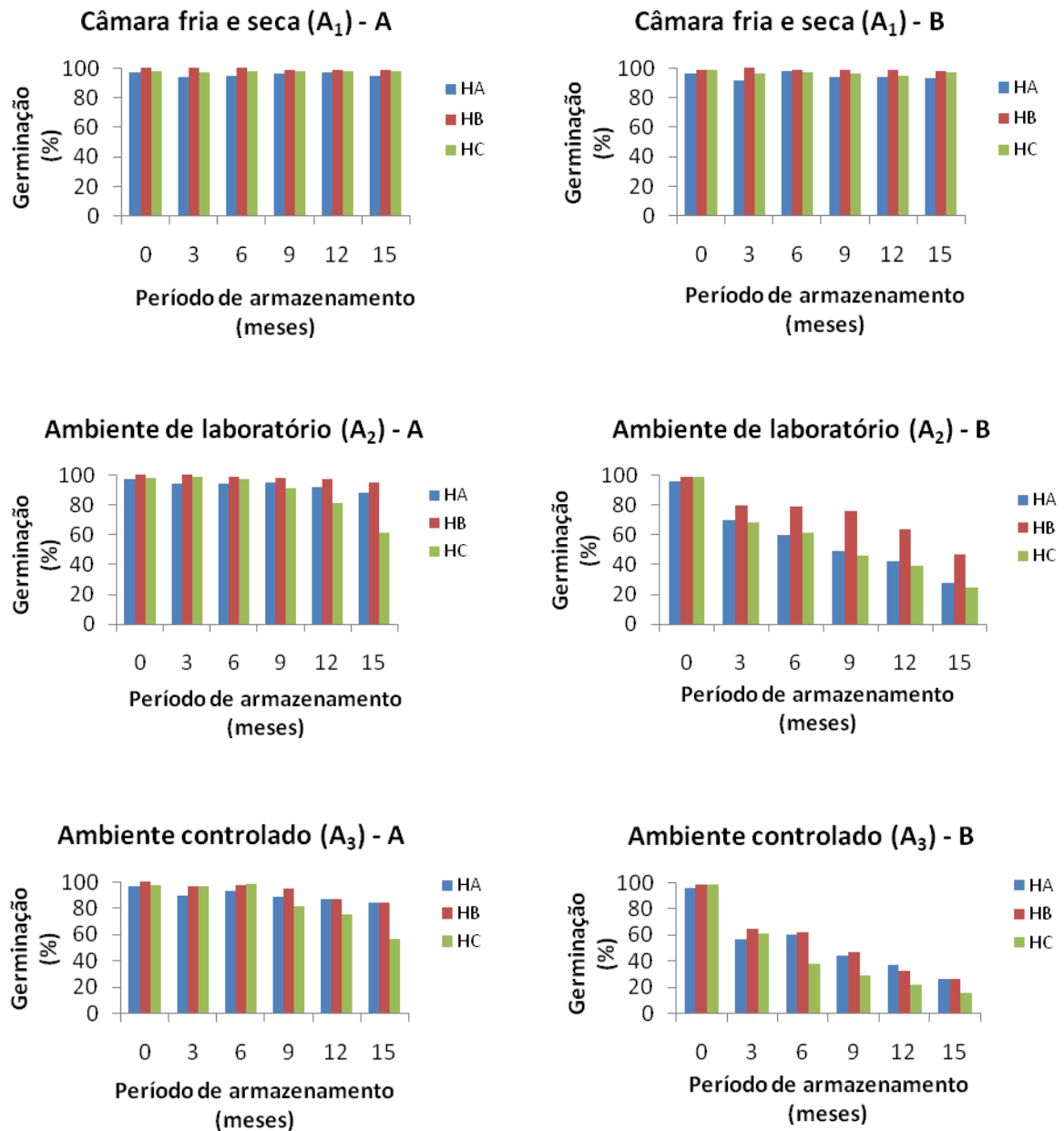


Figura 1 - Germinação de sementes dos lotes 1, 4 e 7 (A) e 3, 5 e 9 (B), de três híbridos de milho (HA, HB e HC) armazenados em câmara fria e seca (A₁), laboratório (A₂) e em ambiente controlado (A₃), por 15 meses

De maneira geral, em câmara fria e seca, as sementes de todos os híbridos conseguiram manter o potencial fisiológico durante todo o período de armazenamento (Figura 1). Em ambiente de laboratório (A₂) e controlado (A₃), as sementes dos híbridos A e B (lotes 1 e 4), tiveram comportamento semelhante, conservando o potencial

fisiológico por 15 meses em laboratório (A_2) e por 12 meses em ambiente controlado (A_3). Em relação aos lotes 3 e 5, dos mesmos híbridos, foi verificado que as sementes do híbrido B (lote 5) apresentaram germinação superior às do híbrido A (lote 3) em laboratório (A_2) (Figura 1), demonstrando a superioridade das sementes do híbrido B.

Já as sementes do híbrido C (lote 7) tiveram a germinação reduzida aos 12 meses de armazenamento em laboratório (A_2) e em ambiente controlado (A_3) e as sementes do lote 9 (híbrido C) apresentaram queda do potencial fisiológico logo nos três primeiros meses de armazenamento nos mesmos ambientes (Figura 1).

Os resultados da primeira contagem de germinação apresentados na Tabela 8 indicaram a mesma tendência dos resultados do teste padrão de germinação não sendo detectadas diferenças significativas entre o comportamento das sementes dos três híbridos armazenados em câmara fria e seca, sendo observados valores médios em torno de 96 %. Esses resultados podem ser atribuídos à baixa sensibilidade desse teste para detectar pequenas diferenças de vigor (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987), mas também pode ser devido ao fato das sementes terem alto potencial de desempenho sob condições favoráveis de ambiente.

Foi observada queda na porcentagem de germinação, na primeira contagem, nos ambientes A_2 (laboratório) e A_3 (controlado), para as sementes dos três híbridos. Isso foi semelhante ao ocorrido para o teste padrão de germinação; porém, na primeira contagem, o resultado foi verificado com antecedência de cerca de três meses, principalmente para os híbridos A e C (Tabela 8). Apesar do teste de primeira contagem ser um teste realizado sobre condições ótimas para a germinação das sementes, é considerado um teste de vigor e se baseia no princípio de que lotes que apresentam maiores porcentagens de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação são mais vigorosos, expressando a velocidade de germinação. Segundo Nakagawa (1999), a primeira contagem de germinação frequentemente é mais sensível para identificar diferenças de vigor entre lotes do que o teste de velocidade de germinação, reforçando então a afirmação de que o teste de primeira contagem de germinação é de grande interesse para a avaliação do vigor de sementes de milho visto também sua praticidade e tempo de execução.

Tabela 8 - Porcentagens médias de plântulas normais, na primeira contagem do teste de germinação, de três lotes de sementes de três híbridos de milho, em função do ambiente de armazenamento

HÍBRIDO A																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
1	96 A	95 Aa	98 Aa	96 Aa	96 Aa	94 Aa	96 Aa	93 Aa	94 Aa	88 Ab	79 Ab	96 Aa	89 Aa	85 Ab	79 Ab	74 Ab
2	93 A	97 Aa	95 Aa	96 Aa	96 Aa	93 Aa	93 Aab	91 Aa	90 Aa	82 Ab	73 Ab	98 Bb	86 Aa	77 Ab	63 Bc	54 Bc
3	91 A	95 Aa	92 Aa	94 Aa	89 Aa	92 Aa	79 Bb	55 Bb	42 Bb	31 Bb	20 Bb	74 Cb	52 Bb	37 Bb	22 Cb	17 Cb
CV (%)	4,0	4,8	4,7	5,8	6,9	8,7	4,8	4,7	5,8	6,9	8,7	4,8	4,7	5,8	6,9	8,7

HÍBRIDO B																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
4	99 A	100 Aa	100 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	100 Aa	99 Aa	98 Aa	93 Aa	86 Ab	99 Aa	96 Aa	91 Aa	75 Ab	68 Ac
5	98 A	100 Aa	99 Aa	97 Aa	97 Aa	97 Aa	91 ABa	69 Bb	65 Bb	38 Bb	30 Bb	73 Bb	49 Bc	35 Bc	20 Bc	15 Bc
6	93 A	99 Aa	97 Aa	94 Aa	87 Ba	93 Aa	82 Bb	51 Cb	49 Cb	28 Cb	20 Cb	55 Cc	35 Cc	27 Bc	17 Bc	13 Bb
CV (%)	3,3	6,2	7,3	7,3	7,0	7,6	6,2	7,3	7,3	7,0	7,6	6,2	7,3	7,3	7,0	7,6

HÍBRIDO C																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
7	96 A	97 Aa	97 Aa	99 Aa	98 Aa	98 Aa	100 Aa	94 Aa	85 Ab	58 Ab	39 Ac	99 Aa	85 Ab	77 Ab	56 Ab	48 Ab
8	97 A	98 Aa	95 Aa	94 Aa	94 Aa	96 Aa	91 Ba	78 Bb	61 Bb	43 Bb	26 Bc	91 Aa	77 Ab	53 Bc	46 Ab	42 Ab
9	98 A	99 Aa	97 Aa	94 Aa	90 Aa	96 Aa	79 Cb	47 Cb	37 Cb	28 Cb	15 Cb	69 Bc	37 Bb	20 Cc	12 Bc	10 Bb
CV (%)	0,9	5,0	5,4	6,4	11,3	8,5	5,0	5,4	6,4	11,3	8,5	5,0	5,4	6,4	11,3	8,5

Letras maiúsculas: comparações na coluna, dos lotes em uma mesma época; letras minúsculas: comparações na linha, dentro da mesma época, entre os diferentes ambientes de armazenamento. AA (antes do armazenamento); 3 (3 meses após o armazenamento); 6 (6 meses após o armazenamento); 9 (9 meses após o armazenamento); 12 (12 meses após o armazenamento); 15 (15 meses após o armazenamento).

No ambiente de laboratório (A_2) foi observada superioridade no desempenho das sementes do lote 4 (híbrido B), pois houve queda na germinação das sementes somente aos 15 meses de armazenamento, com valor médio de 86 %, enquanto que para as sementes do lote 1 (híbrido A) a queda se deu aos 12 meses, com germinação média de 88 % e para as sementes do lote 7 (híbrido C) aos nove meses, com valor de 85 % (Tabela 8).

Assim como no ambiente de laboratório (A_2), o decréscimo de germinação das sementes observado no ambiente A_3 (20 °C e 70% UR) indicou novamente superioridade das sementes do híbrido B, pois houve queda na germinação das sementes do lote 4 somente no décimo segundo mês de armazenamento. Já para as sementes dos lotes 1 (híbrido A) e 7 (híbrido C) foi observada queda a partir do sexto mês. Esse resultado indica que as sementes do híbrido B mantiveram germinação superior à estabelecida nos padrões para comercialização, nas condições do ambiente A_3 , por período superior às sementes dos outros híbridos (cerca de seis meses) (Tabela 8).

Esse comportamento é interessante, pois a grande preocupação da maioria das empresas produtoras de sementes de alto potencial fisiológico é a partir do momento que a semente é transferida da empresa para os revendedores. Isso porque a empresa pode garantir o potencial fisiológico de suas sementes dentro de sua infra-estrutura, onde, geralmente, possui condições adequadas para o armazenamento; diferente do que acontece nas revendas, onde as condições em que as sementes são armazenadas nem sempre são satisfatórias. Sendo assim, ocorrendo uma situação como esta, ou seja, se as sementes forem armazenadas em condições indesejáveis de temperatura e umidade relativa do ar, como as encontradas no ambiente A_3 desta pesquisa, as sementes do híbrido B poderiam conservar o potencial fisiológico por período superior às sementes dos outros híbridos, garantindo ao produtor uma semente com alta qualidade.

De maneira geral, os resultados do teste de primeira contagem foram semelhantes aos de germinação e isso pode ser visualizado pela Figura 2, onde foi observado comportamento semelhante dos três híbridos em câmara fria e seca (A_1), com conservação do potencial fisiológico por 15 meses.

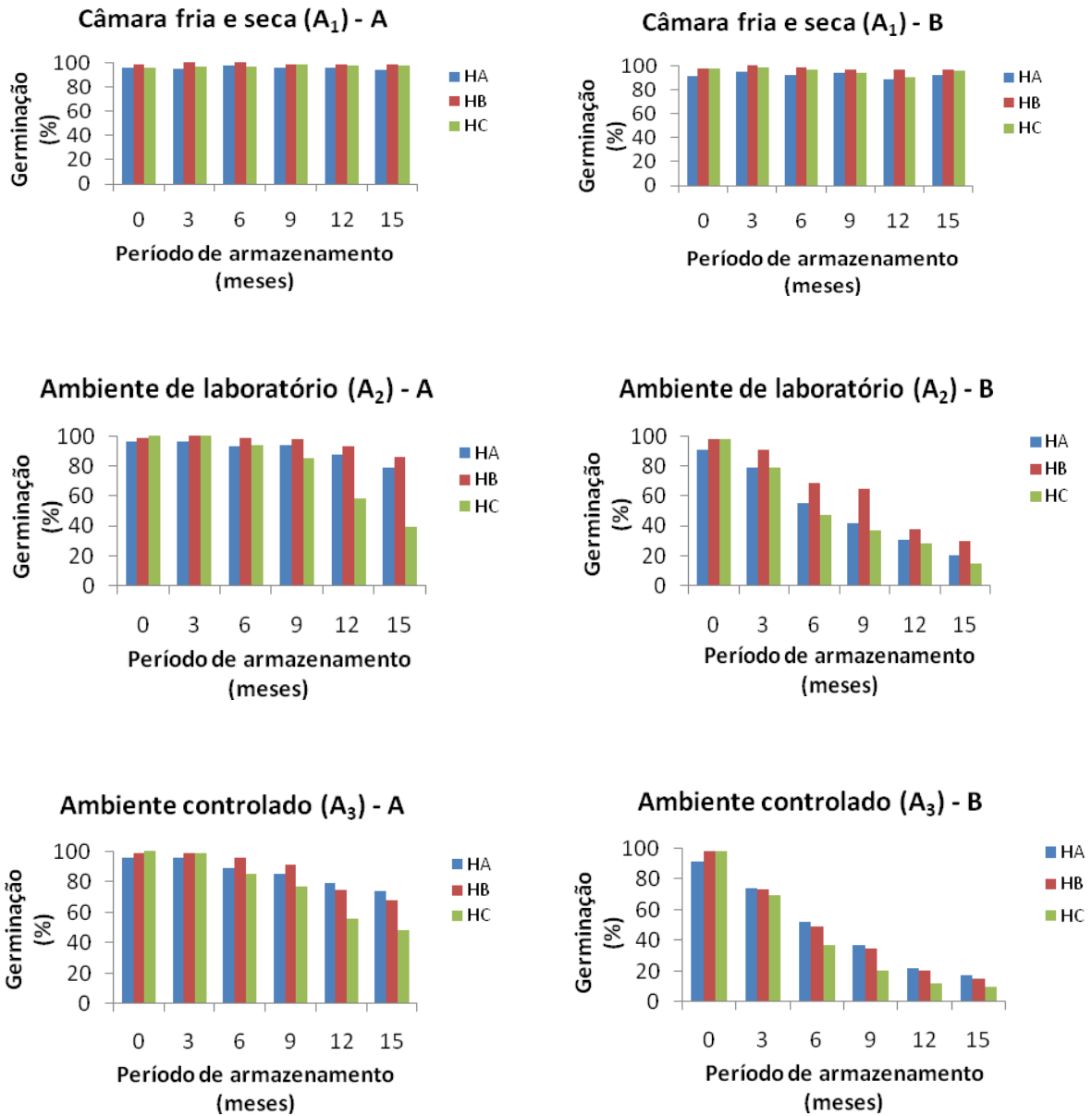


Figura 2 - Germinação, em função do teste de primeira contagem, de sementes dos lotes 1, 4 e 7 (A) e 3, 5 e 9 (B), de três híbridos de milho (HA, HB e HC) armazenados em câmara fria e seca (A₁), laboratório (A₂) e em ambiente controlado (A₃), por 15 meses

Em laboratório (A₂), quando se comparam as sementes dos lotes 3 e 5 (híbridos A e B) nota-se a superioridade do híbrido B, pois a queda no desempenho dessas sementes foram menos acentuadas (Figura 2).

As sementes do híbrido C tiveram pior desempenho dos que as dos híbridos A e B, principalmente em laboratório (A_2) e em ambiente controlado (A_3) (Figura 2).

No Brasil, um dos testes mais utilizados para determinação do vigor em sementes de milho é o teste de frio. Nesse teste, assim como nos de germinação e primeira contagem de germinação, não foram detectadas diferenças entre os lotes com potencial fisiológico superior dos três híbridos (lotes 1, 4 e 7) armazenados em câmara fria e seca, mantendo, de certa forma, o mesmo desempenho verificado antes do armazenamento (Tabela 9). De forma geral, se os resultados do teste de frio se aproximam dos obtidos no teste padrão de germinação, há grande possibilidade desses lotes apresentarem capacidade para germinar sob ampla variação das condições de umidade e temperatura do solo (CÍCERO; VIEIRA, 1994).

Ainda em câmara fria e seca (A_1), embora tenham sido verificadas quedas no desempenho das sementes dos lotes dos híbridos A e B (lotes 3 e 5) no final do armazenamento para o teste de frio, foram verificados valores de 89 % e 84 %. Já para as sementes do lote 9 (híbrido C), envelhecidas durante o mesmo período, foi verificado valor de 65 % no final do armazenamento, demonstrando novamente que o potencial de armazenamento desse híbrido é inferior ao dos demais (Tabela 9). Isso pode ser melhor visualizado na Figura 3, verificando-se que as sementes do híbrido C (lote 9) tiveram desempenho reduzido a partir do décimo segundo mês de armazenamento.

No ambiente de laboratório (A_2), as sementes dos híbridos A e B, que não foram submetidas ao envelhecimento (lotes 1 e 4) apresentaram porcentagens médias de plântulas normais após o teste de frio de 81 % e 79 %, enquanto que as sementes do híbrido C (lote 7) apresentaram redução de 28 pontos percentuais no desempenho aos seis meses de armazenamento, com valor médio de 68 %.

Tabela 9 - Porcentagens médias de plântulas normais, no teste de frio, de três lotes de sementes de três híbridos de milho, em função do ambiente de armazenamento

		HÍBRIDO A														
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
1	89 A	94 Aa	95 Aa	96 Aa	96 Aa	95 Aa	93 Aa	93 Aa	92 Aa	81 Ab	63 Ab	78 Ab	83 Ab	75 Ab	54 Ac	53 Ac
2	89 A	93 Aa	95 Aa	93 Aa	92 Aa	92 Aa	85 Aa	93 Aa	83 Ab	72 Ab	53 Bb	74 Ab	74 Bb	58 Bc	38 Bc	25 Bc
3	95 A	91 Aa	90 Aa	93 Aa	88 Aa	89 Aa	55 Bb	47 Bb	34 Bb	26 Bb	13 Cb	32 Bc	30 Cc	18 Cc	12 Cc	12 Cb
CV(%)	4,5	6,9	5,3	7,6	9,7	10,4	6,9	5,3	7,6	9,7	10,4	6,9	5,3	7,6	9,7	10,4
		HÍBRIDO B														
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
4	97 A	99 Aa	99 Aa	99 Aa	98 Aa	96 Aa	95 Aab	94 Aa	98 Aa	79 Ab	56 Ab	88 Ab	72 Ab	95 Aa	22 Ac	7 Ac
5	93 A	88 Ba	95 ABa	99 Aa	93 Aa	84 Ba	67 Bb	61 Bb	76 Bb	29 Bb	16 Bb	32 Bc	17 Bc	47 Bc	3 Bc	4 Ac
6	84 B	83 Ba	88 Ba	98 Aa	79 Ba	66 Ca	61 Cb	39 Cb	60 Cb	18 Cb	13 Bb	26 Bc	18 Bc	34 Cc	2 Bc	4 Ac
CV(%)	4,8	6,2	9,5	7,7	9,7	9,3	6,2	9,5	7,7	9,7	9,3	6,2	9,5	7,7	9,7	9,3
		HÍBRIDO C														
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
7	96 A	96 Aa	95 Aa	98 Aa	92 Aa	91 Aa	90 Aa	68 Ab	91 Aab	64 Ab	3 Ab	90 Aa	69 Ab	82 Ab	45 Ac	4 Ab
8	89 B	80 Ba	91 Aa	97 Aa	84 Aa	85 Aa	73 Bab	49 Bb	72 Bb	33 Bb	3 Ab	65 Bb	56 Bb	68 Bb	27 Bb	6 Ab
9	88 B	89 ABa	88 Aa	96 Aa	72 Ba	65 Ba	41 Cb	42 Bb	46 Cb	17 Cb	3 Ab	38 Cb	16 Cc	29 Cc	4 Cc	2 Ab
CV(%)	2,9	9,5	9,1	8,1	12,9	14,4	9,5	9,1	8,1	12,9	14,4	9,5	9,1	8,1	12,9	14,4

Letras maiúsculas: comparações na coluna, dos lotes em uma mesma época; letras minúsculas: comparações na linha, dentro da mesma época, entre os diferentes ambientes de armazenamento. AA (antes do armazenamento); 3 (3 meses após o armazenamento); 6 (6 meses após o armazenamento); 9 (9 meses após o armazenamento); 12 (12 meses após o armazenamento); 15 (15 meses após o armazenamento).

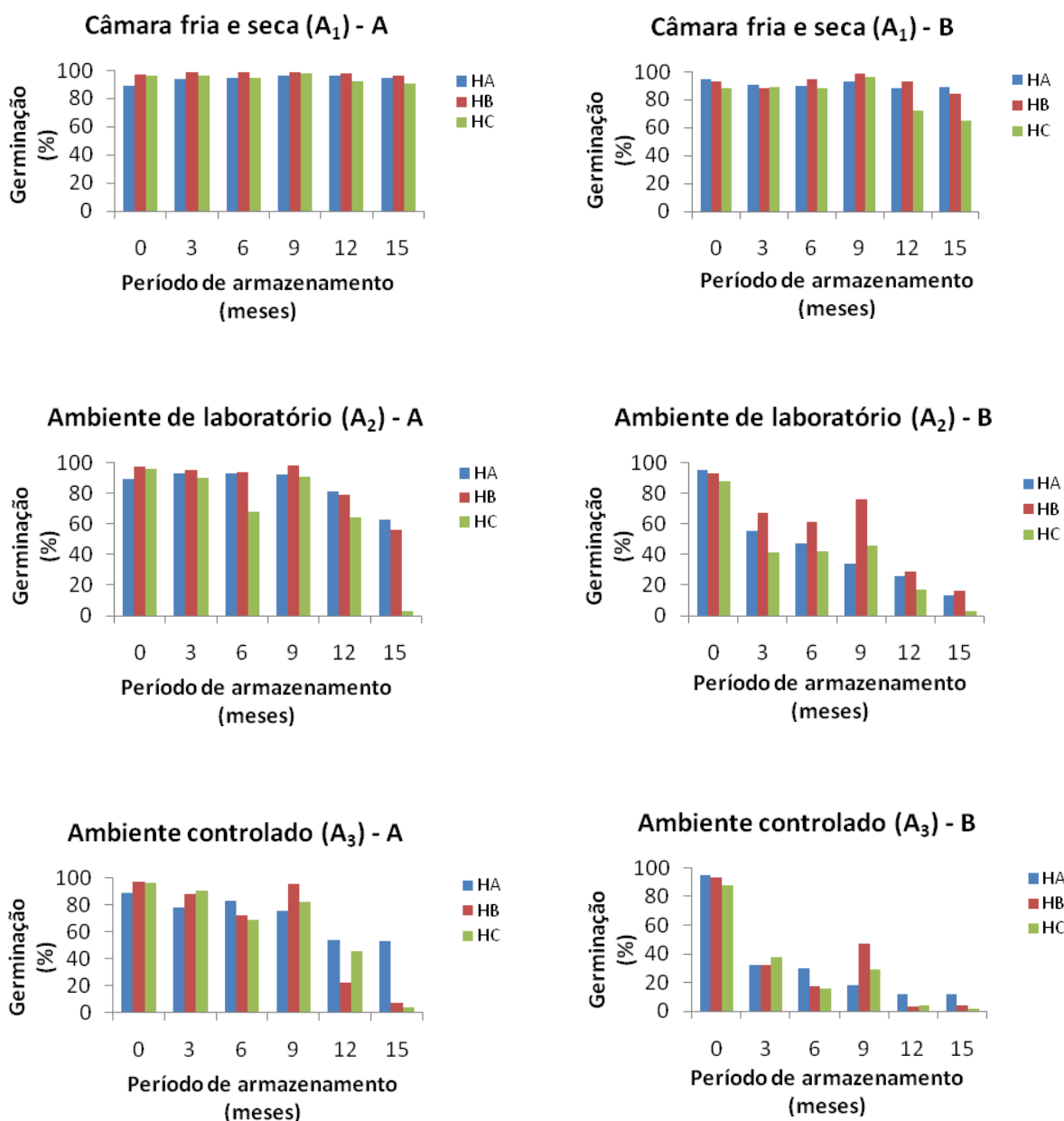


Figura 3 - Germinação, em função do teste de frio, de sementes dos lotes 1, 4 e 7 (A) e 3, 5 e 9 (B), de três híbridos de milho (HA, HB e HC) armazenados em câmara fria e seca (A₁), laboratório (A₂) e em ambiente controlado (A₃), por 15 meses

Lotes envelhecidos por 96 horas, ou seja, com potencial fisiológico reduzido, dos três híbridos (lotes 3, 5 e 9), apresentaram comportamento semelhante nos ambientes

de laboratório (A_2) e controlado ($20\text{ }^\circ\text{C}$ e 70% UR - A_3). Foi verificada redução no desempenho das sementes desses lotes a partir do terceiro mês de armazenamento, com queda de 40 pontos percentuais para as sementes do lote 3 (híbrido A), 26 para as sementes do lote 5 (híbrido B) e 47 para as sementes do lote 9 (híbrido C) (Tabela 9). Apesar da queda no desempenho das sementes desses lotes terem sido praticamente no mesmo período, de acordo com a Figura 3 observou-se que a queda no desempenho das sementes do híbrido B (lote 5) foi menor do que as dos outros híbridos em laboratório (A_2). O teste de frio tem sido utilizado no Brasil por empresas produtoras de sementes, principalmente nos estados do sul e sudeste, onde lavouras de milho podem ser semeadas entre início do mês de setembro e meados de outubro. Nessa época é comum a ocorrência de frentes frias, as quais, dependendo do nível de vigor dos lotes de sementes, poderão provocar sérios problemas para a germinação e emergência de plântulas (KRZYZANOWSKI; FRANÇA NETO; HENNING, 1991).

Se as condições de estresse durante a germinação, desenvolvimento de plântulas ou durante o armazenamento forem drásticas, mesmo o lote mais vigoroso pode fracassar. Foi o que aconteceu no ambiente A_3 ($20\text{ }^\circ\text{C}$ e 70% UR), onde as sementes dos lotes de todos os híbridos apresentaram redução no desempenho no terceiro mês de armazenamento, sendo que no final do armazenamento (12 e 15 meses), as sementes apresentaram redução drástica nas porcentagens médias de plântulas normais (Tabela 9). Isso comprova, mais uma vez, que as condições de armazenamento predominantes nesse ambiente são totalmente insatisfatórias para as sementes. O estresse causado pela baixa temperatura também pode explicar os resultados observados, pois nessa situação, as sementes encontram maior dificuldade para reorganização das membranas durante a embebição (MARCOS FILHO, 2005) e, estando as sementes em nível de deterioração mais avançado, a dificuldade torna-se ainda maior. Esse resultado mostra, também, que se ocorrerem no campo condições de estresse semelhante às do teste de frio, as sementes armazenadas no ambiente controlado (A_3) e até mesmo no ambiente de laboratório (A_2), teriam menor probabilidade de ter bom desempenho. Assim, mesmo sabendo que um lote apresenta alto vigor, não há garantia total de um desempenho superior ou favorável. Há, apenas,

maior probabilidade de um melhor desempenho em comparação a lotes menos vigorosos (MARCOS FILHO, 1999).

Outro teste em que as sementes são expostas a estresse é o envelhecimento acelerado, que se baseia no princípio de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente através de sua exposição a níveis elevados de temperatura e umidade relativa do ar (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987).

Na Tabela 10, encontram-se as médias de germinação após o envelhecimento acelerado. Para todos os híbridos, ocorreram reduções no vigor ao longo do armazenamento, com exceção dos lotes de potencial fisiológico superior (lotes 1, 4 e 7) e intermediários dos híbridos A e B (lotes 2 e 5), armazenados em câmara fria e seca.

Para os híbridos A e B (lotes 1 e 4), houve redução nas últimas etapas de armazenamento (12 e 15 meses), nas sementes armazenadas nos ambientes A_2 (laboratório) e A_3 (20 °C e 70 % UR). Vale ressaltar que as sementes do híbrido B (lote 4), com 15 meses de armazenamento no ambiente A_2 e nove meses no ambiente A_3 apresentaram porcentagem de germinação de 85 % após o envelhecimento acelerado. Isso mostra, mais uma vez, a superioridade do híbrido B, pois as sementes dos outros híbridos tiveram o vigor reduzido mais rapidamente; as sementes do híbrido A (lote 1) apresentaram redução no vigor aos 12 meses e as do híbrido C (lote 7) aos seis meses de armazenamento (Tabela 10). Nas condições desse teste, sementes com menor potencial fisiológico deterioram-se mais rapidamente, com reflexos na germinação após o período de envelhecimento acelerado (DUTRA; VIEIRA, 2004).

Da mesma forma que no teste de frio, foram observadas reduções drásticas na porcentagem de germinação após o envelhecimento acelerado, no final do período de armazenamento nos ambientes A_2 e A_3 , principalmente para os lotes com potencial fisiológico intermediário e reduzido (lotes 2, 3, 5, 6, 8 e 9) (Tabela 10). O fato das sementes desses lotes já estarem em grau de deterioração avançado pode prejudicar ainda mais a manutenção do potencial fisiológico dessas sementes durante o armazenamento, pois o alto conteúdo de umidade e a elevada temperatura favorecem a atividade respiratória das sementes (ELLIS; SIMON; COVELL, 1987), bem como a atividade e multiplicação de microrganismos (WARDYNSKI; RUST; YOKOYAMA, 1993), condições essas encontradas no teste de envelhecimento acelerado.

Tabela 10 - Porcentagens médias de plântulas normais, no teste de envelhecimento acelerado, de três lotes de sementes de três híbridos de milho, em função do ambiente de armazenamento

HÍBRIDO A																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
1	98 A	96 Aa	97 Aa	97 Aa	98 Aa	96 Aa	95 Aa	90 Aa	93 Aa	82 Ab	75 Ab	89 Aa	89 Aa	81 Aa	80 Ab	53 Ac
2	93 A	93 Aa	94 ABa	95 Aa	96 Aa	94 Aa	92 Aa	94 Aa	92 Aa	70 Bb	47 Bb	88 Aa	78 Bb	78 Aa	66 Bb	38 Bc
3	89 A	83 Ba	87 Ba	90 Aa	81 Ba	79 Ba	65 Bb	47 Bb	33 Bb	27 Cb	11 Cb	39 Bc	32 Cc	20 Bc	27 Cb	5 Cb
CV(%)	4,9	5,8	6,3	7,5	7,8	8,7	5,8	6,3	7,5	7,8	8,7	5,8	6,3	7,5	7,8	8,7

HÍBRIDO B																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
4	99 A	99 Aa	99 Aa	100 Aa	99 Aa	98 Aa	98 Aa	97 Aa	97 Aa	90 Ab	85 Ab	94 Aa	94 Aa	85 Aa	54 Ac	40 Ac
5	92 B	93 Aa	97 ABa	93 Aa	71 Ba	84 Ba	77 Bb	66 Bb	64 Bb	42 Bb	19 Bb	30 Bc	37 Bc	23 Bc	19 Bc	9 Bc
6	79 B	80 Ba	88 Ba	79 Ba	74 Ba	77 Ba	62 Cb	41 Cb	33 Cb	29 Cb	8 Cb	36 Bc	21 Cc	18 Bc	14 Bc	8 Bb
CV(%)	4,4	5,4	8,2	8,4	8,9	10,1	5,4	8,2	8,4	8,9	10,1	5,4	8,2	8,4	8,9	10,1

HÍBRIDO C																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A ₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A ₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A ₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
7	99 A	98 Aa	98 Aa	97 Aa	97 Aa	96 Aa	95 Aa	85 Aa	86 Ab	77 Ab	48 Ab	93 Aa	79 Aa	71 Ac	58 Ac	42 Ab
8	93 B	94 Aa	93 ABa	95 Aa	95 Aa	93 ABa	85 Bab	69 Bb	76 Bb	39 Bb	13 Bb	81 Bb	68 Bb	52 Bc	43 Bb	32 Bc
9	91 B	83 Ba	83 Ba	92 Aa	86 Aa	86 Ba	47 Cb	39 Cb	28 Cb	19 Cb	7 Bb	42 Cb	16 Cc	9 Cc	8 Cb	5 Cb
CV(%)	2,5	6,9	10,0	7,5	2,2	9,7	6,9	10,0	7,5	2,2	9,7	6,9	10,0	7,5	2,2	9,7

Letras maiúsculas: comparações na coluna, dos lotes em uma mesma época; letras minúsculas: comparações na linha, dentro da mesma época, entre os diferentes ambientes de armazenamento. AA (antes do armazenamento); 3 (3 meses após o armazenamento); 6 (6 meses após o armazenamento); 9 (9 meses após o armazenamento); 12 (12 meses após o armazenamento); 15 (15 meses após o armazenamento).

Por meio dos gráficos apresentados na Figura 4, verificou-se que houve redução no desempenho das sementes em câmara fria e seca (A_1) somente para os lotes com potencial fisiológico reduzido (lotes 3, 5 e 9). Isso é interessante, pois no teste de germinação essa diferença não foi detectada (Figura 1), talvez pelo fato do teste ser realizado em condições ideais.

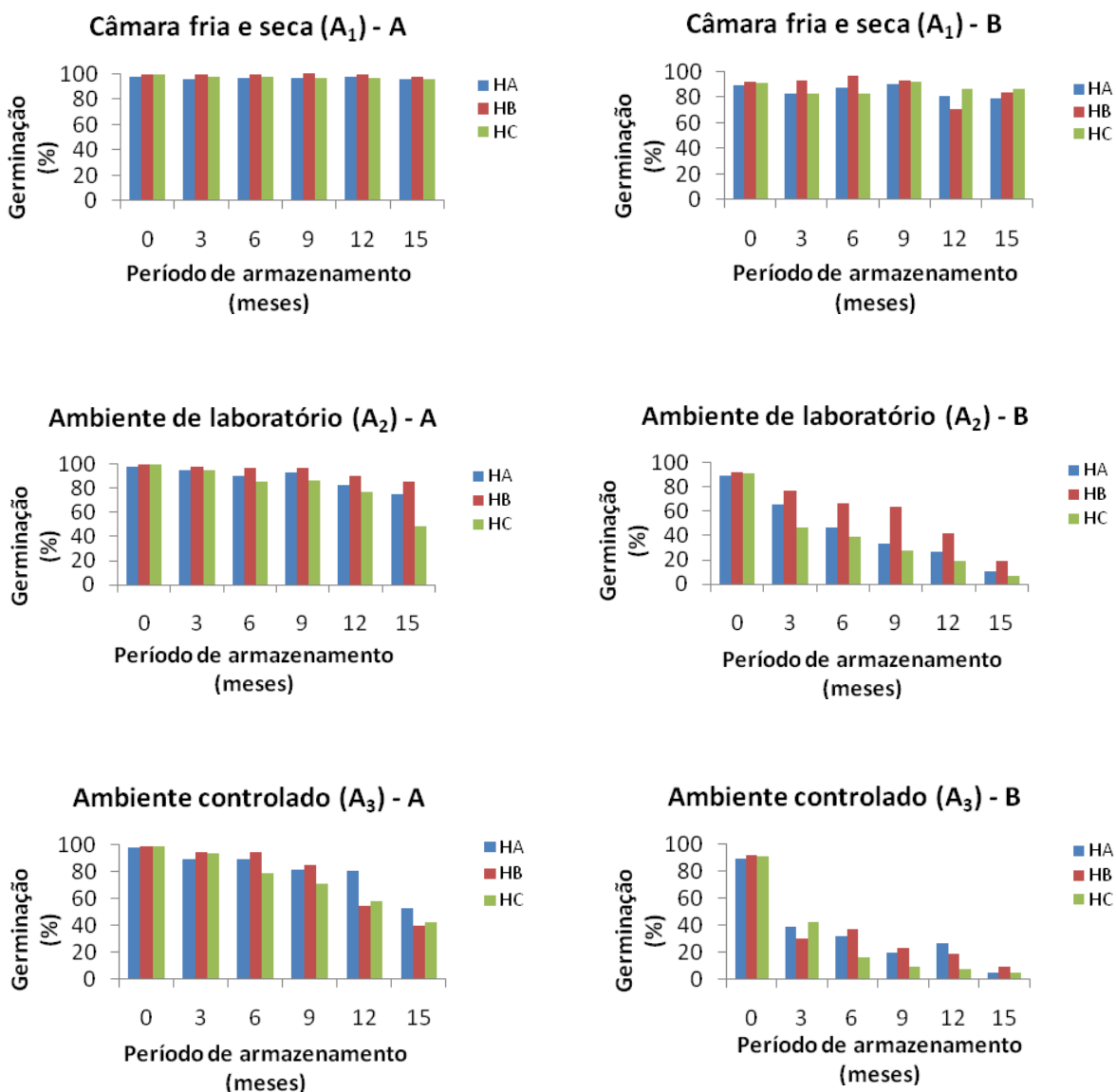


Figura 4 - Germinação, em função do teste de envelhecimento acelerado, de sementes dos lotes 1, 4 e 7 (A) e 3, 5 e 9 (B), de três híbridos de milho (HA, HB e HC) armazenados em câmara fria e seca (A_1), laboratório (A_2) e em ambiente controlado (A_3), por 15 meses

Os resultados do teste de emergência de plântulas em campo são apresentados na Tabela 11. Foram verificadas associações estreitas entre os resultados do teste padrão de germinação e a emergência de plântulas em campo em câmara fria e seca; os lotes com potencial fisiológico superior (lotes 1, 4 e 7) mantiveram o mesmo desempenho durante todo o período de armazenamento.

As condições encontradas em campo podem não ser favoráveis, havendo variações na temperatura, e isso pode ser prejudicial. De acordo com Marcos Filho (1986) e Carvalho e Nakagawa (2000), as sementes mais vigorosas germinam sob ampla variação de temperatura, ao passo que as mais deterioradas são menos tolerantes a possíveis desvios em relação ao nível ótimo. Isso pode ser observado por meio da Figura 5 quando se compararam lotes com alto potencial fisiológico (lotes 1, 4 e 7) e lotes com potencial fisiológico reduzido (lotes 3, 5 e 9), onde foi possível verificar que os primeiros lotes se mostraram mais tolerantes aos estresses que possivelmente ocorreram em campo e mantiveram o desempenho por um período de tempo maior, independentemente da condição de armazenamento que as sementes foram expostas.

A perda da germinação é o último efeito ou consequência da deterioração. Assim, a natureza progressiva da deterioração e seus efeitos iniciais não são levados em conta ao analisar-se apenas a germinação das sementes (DELOUCHE, 1963). A partir dessa premissa, pode-se considerar a existência de efeitos da deterioração antes mesmo que a porcentagem de germinação seja afetada. Isso fica claro ao observar os resultados das porcentagens obtidas no teste de emergência de plântulas em campo nos ambientes de laboratório (A_2) e controlado (A_3) (Tabela 11), onde houve redução logo nos primeiros meses de armazenamento, o que não foi detectado no teste padrão de germinação, mas identificado em testes de vigor.

Tabela 11 - Porcentagens médias de plântulas, no teste de emergência em campo, de três lotes de sementes de três híbridos de milho, em função do ambiente de armazenamento

HÍBRIDO A																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
1	96 A	95 Aa	94 Aa	92 Aa	94 Aa	92 Aa	97 Aa	88 Aa	88 Aab	87 Aab	73 Ab	91 Aa	89 Aa	79 Ab	79 Ab	69 Ab
2	96 A	95 Aa	89 Aa	91 Aa	94 Aa	87 Aa	94 Aab	82 Aab	81 Ab	79 Ab	63 Ab	84 Ab	75 Bb	71 Ac	71 Ab	48 Bc
3	92A	92 Aa	85 Aa	90 Aa	87 Aa	87 Aa	76 Bb	49 Bb	43 Bb	33 Bb	20 Bb	51 Bc	39 Cb	34 Bb	21 Bc	19 Cb
CV(%)	3,5	6,5	9,3	7,5	7,3	10,4	6,5	9,3	7,5	7,3	10,4	6,5	9,3	7,5	7,3	10,4
HÍBRIDO B																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
4	100 A	100 Aa	93 Aa	98 Aa	99 Aa	96 Aa	100 Aa	93 Aa	90 Aa	91 Aa	88 Aa	99 Aa	84 Ab	89 Aa	76 Ab	74 Ab
5	100 A	99 Aa	89 Aa	87 ABa	88 Ba	95 Aa	91 Aa	62 Bb	63 Bb	50 Bb	40 Bb	43 Bb	34 Bc	28 Bc	21 Bc	23 Bc
6	97 A	96 Aa	83 Aa	82 Ba	88 Ba	91 Aa	86 Aa	56 Bb	48 Cb	36 Cb	35 Bb	42 Bb	26 Bc	24 Bc	21 Bc	23 Bc
CV(%)	1,9	10,6	10,1	10,3	7,8	9,6	10,6	10,1	10,3	7,8	9,6	10,6	10,1	10,3	7,8	9,6
HÍBRIDO C																
LOTE	AA	CÂMARA FRIA E SECA (A₁)					AMBIENTE DE LABORATÓRIO (A₂)					AMBIENTE CONTROLADO (A₃)				
		3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
7	98 A	99 Aa	90 Aa	95 Aa	94 Aa	94 Aa	97 Aa	82 Aa	90 Aab	82 Ab	58 Ab	93 Aa	82 Aa	79 Ab	70 Ac	60 Ab
8	96 A	98 Aa	90 Aa	92 Aa	91 Aa	93 Aa	86 Ab	67 Ab	70 Bb	55 Bb	36 Bb	84 Ab	62 Bb	65 Bb	53 Bb	38 Bb
9	95 A	97 Aa	89 Aa	91 Aa	90 Aa	92 Aa	67 Bb	40 Bb	48 Cb	28 Cb	16 Cb	68 Bb	22 Cc	18 Cc	17 Cc	9 Cb
CV(%)	2,4	7,6	13,8	8,9	8,2	8,8	7,6	13,8	8,9	8,2	8,8	7,6	13,8	8,9	8,2	8,8

Letras maiúsculas: comparações na coluna, dos lotes em uma mesma época; letras minúsculas: comparações na linha, dentro da mesma época, entre os diferentes ambientes de armazenamento. AA (antes do armazenamento); 3 (3 meses após o armazenamento); 6 (6 meses após o armazenamento); 9 (9 meses após o armazenamento); 12 (12 meses após o armazenamento); 15 (15 meses após o armazenamento).

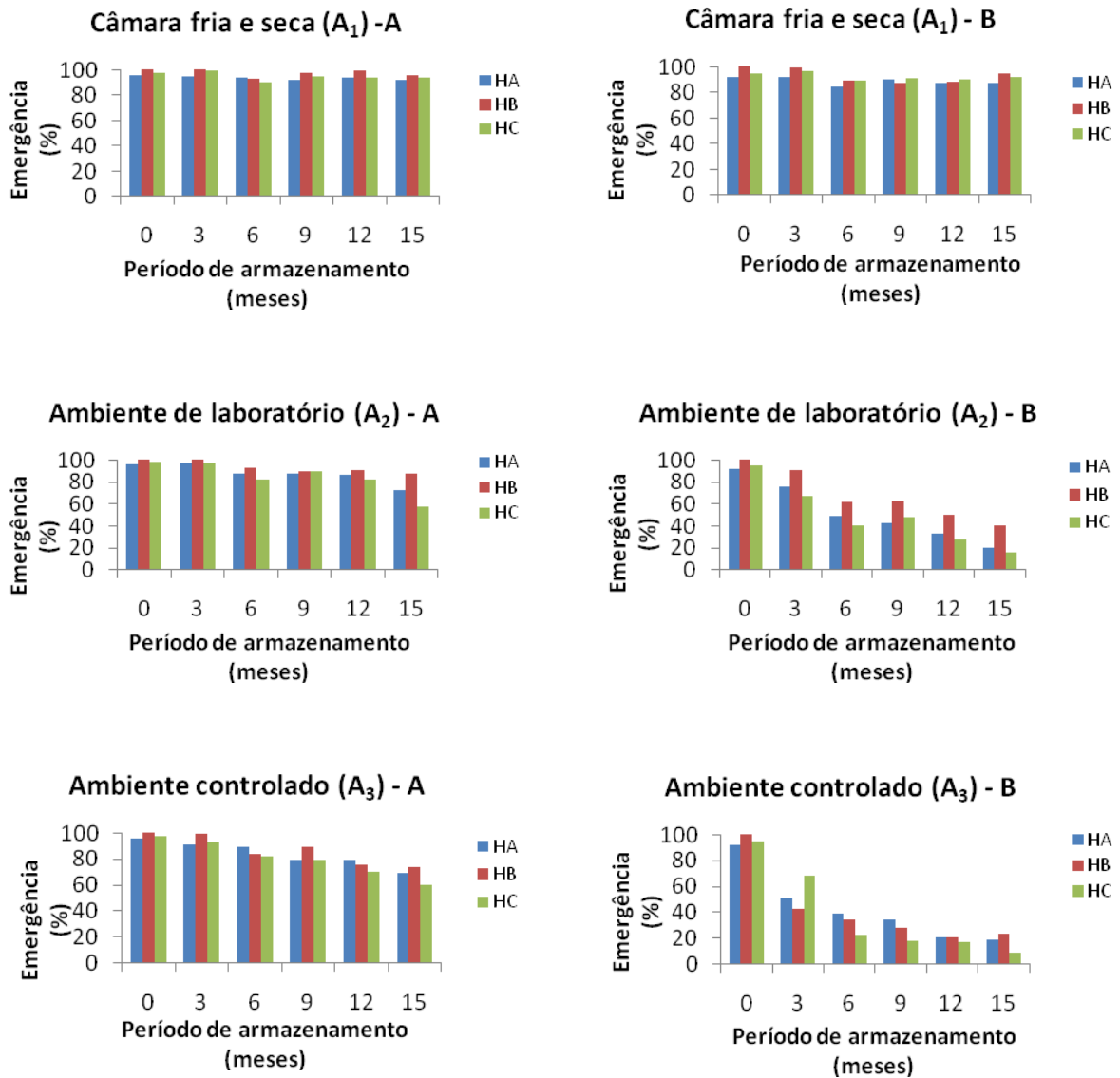


Figura 5 - Emergência de plântulas dos lotes 1, 4 e 7 (A) e 3, 5 e 9 (B), de três híbridos de milho (HA, HB e HC) armazenados em câmara fria e seca (A₁), laboratório (A₂) e em ambiente controlado (A₃), por 15 meses

No ambiente de laboratório (A₂), houve coerência com a identificação do híbrido B como superior na manutenção do potencial fisiológico pelos outros testes de vigor realizados, como primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e teste de frio. Isso, também, pode ser verificado na Figura 5, em todos os ambientes de armazenamento, onde as sementes do híbrido B apresentaram melhor desempenho em praticamente todos os períodos de armazenamento.

Houve redução na porcentagem de plântulas normais após seis meses para os híbridos A e C e para o híbrido B aos nove meses, ou seja, as sementes do híbrido B mantiveram o potencial fisiológico por mais três meses em relação aos outros dois híbridos (Figura 5). Burris (1976) comentou que o alto vigor de sementes pode ter influência positiva na emergência de plântulas em campo; porém, a magnitude dessa influência pode ser modificada pelo ambiente. Isso pode ser verificado para o ambiente controlado (A_3), onde os três híbridos apresentaram comportamento semelhante, com redução de vigor logo nos primeiros meses de armazenamento, ou seja, as condições de armazenamento desse ambiente provocaram redução na porcentagem de plântulas normais até mesmo das sementes dos lotes de alto potencial fisiológico.

As observações realizadas nos testes de germinação e vigor permitiram afirmar, de maneira geral, que para todos os híbridos estudados a câmara fria e seca (A_1) foi o ambiente que proporcionou melhores condições para o armazenamento das sementes, seguido do ambiente de laboratório (A_2). A explicação para a redução do potencial fisiológico verificado nas sementes armazenadas no ambiente de laboratório (A_2) pode estar associada ao fato de que durante todo o período do experimento as oscilações de temperatura e umidade relativa do ar nesse ambiente certamente podem ter contribuído para que as sementes tivessem o potencial de armazenamento reduzido.

O armazenamento em ambiente controlado (A_3) provocou maior redução do potencial fisiológico pela alta umidade relativa do ar presente nesse ambiente. De maneira geral, a longevidade das sementes ortodoxas diminuiu com o aumento da umidade relativa do ar (KRAAK, 1993; ROBERTS, 1973).

Em relação aos híbridos, foi possível detectar diferenças na longevidade, principalmente nos ambientes de laboratório (A_2) e controlado (A_3), onde, de maneira geral, as sementes do híbrido B mantiveram o potencial fisiológico por período superior, seguido dos híbridos A e C. As sementes do híbrido B conservaram o potencial fisiológico por volta de 15 meses em laboratório (A_2) e nove meses em ambiente controlado (A_3); as do híbrido A por 12 meses no A_2 e seis meses no A_3 e as do híbrido C por seis meses no A_2 e A_3 . Esse resultado foi interessante, pois a condição criada no ambiente A_3 (20 °C e 70 % UR) desta pesquisa permitiu antecipar a obtenção de informações sobre o potencial fisiológico; isto torna possível o planejamento da

estratégia a ser adotada por empresas produtoras de sementes de milho para o armazenamento e comercialização de sementes.

2.3.2 Avaliação da atividade enzimática

Os perfis isoenzimáticos das sementes de lotes de três híbridos de milho, submetidas ao armazenamento por 0, 9 e 15 meses, nos três diferentes ambientes estão apresentados nas Figuras 6 a 14.

Para a superóxido dismutase (SOD), foi observada maior atividade para as sementes do híbrido B (lote 4), armazenadas em câmara fria e seca (A₁). A maior atividade desta enzima em sementes desse híbrido no início do armazenamento (período zero) pode ser observada pela intensidade da primeira banda em relação à observada nas sementes dos outros híbridos nesse mesmo período (Figura 6A).

Dentre as alterações que ocorrem durante a deterioração, segundo McDonald (1999), está a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) que promovem modificações na estrutura das enzimas, além da degradação do sistema de síntese de novas enzimas. Os danos oxidativos, relacionam a perda da capacidade germinativa de sementes com a diminuição da eficiência dos sistemas antioxidantes (HENDRY, 1993; CHAITANYA; NAITHANI; NAITHANI, 2000).

A superóxido dismutase (SOD) é encontrada no citoplasma celular e matriz mitocondrial, sendo responsável pela catalização da reação de dismutação de radicais superóxido livres (O_2^-) convertendo-os a oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002), constituindo a primeira linha de defesa contra EROs. Assim, as SODs estão entre os mais importantes sistemas de defesa, quando acopladas a rotas de eventos necessários à desintoxicação das EROs (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002).

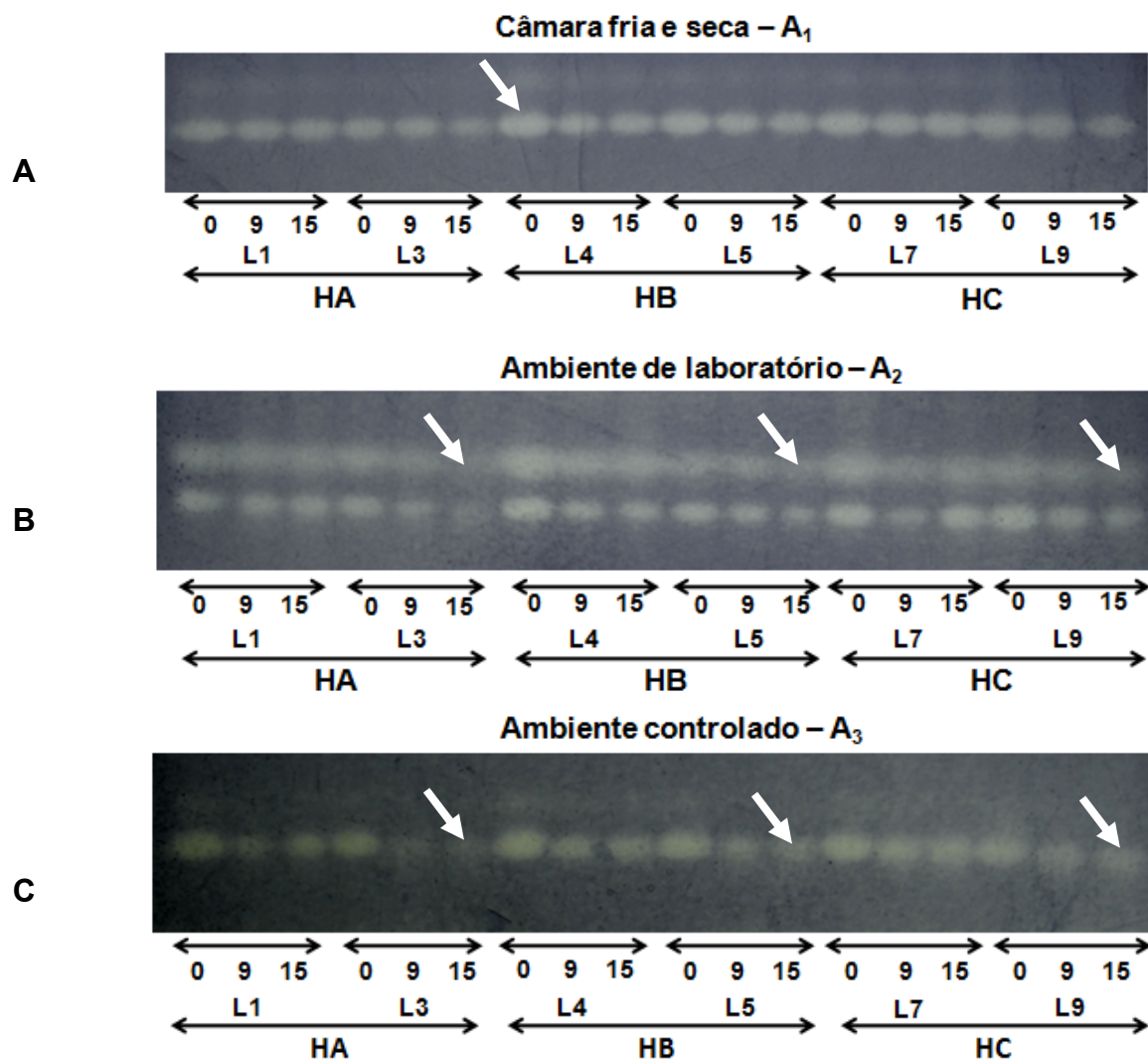


Figura 6 - Padrão enzimático da superóxido dismutase (SOD), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A_1 , ambiente de laboratório – A_2 e ambiente controlado – A_3)

Em condições normais a formação e a remoção das EROS ocorre de forma balanceada. Entretanto, em condições de estresse pode haver aumento na formação das EROs e supressão dos sistemas de defesa, como a SOD (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002). Nesta pesquisa, isso pode ser verificado em sementes armazenadas nos ambientes de laboratório (A_2) e controlado (A_3), com redução da atividade desta enzima em sementes armazenadas por 15 meses (Figura 6B e 6C).

Segundo Alscher, Erturk e Health (2002) e Taiz e Zeiger (2004), apesar da efetividade de neutralização do oxigênio reativo pela SOD, na reação é produzido o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico, pois pode reagir formando radicais hidroxila (BOWLER; VAN MONTEGO; INZÉ, 1992) que causam peroxidação de lipídios. Assim, a atividade da SOD isoladamente é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de sistemas removedores de radicais livres como a catalase e peroxidase (McDONALD, 1999).

A catalase (CAT) é uma enzima presente nos peroxissomas das células e tem a função de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem a produção de radicais livres, sendo, dessa maneira, de fundamental importância na desintoxicação celular (HALLINWELL; GUTERIDGE, 1989).

A catalase, por ser uma enzima envolvida no processo de remoção do peróxido de hidrogênio, desempenha controle desses peróxidos endógenos por meio do ciclo óxido-redução (FRIDOVICH, 1986). Sendo assim, a redução na atividade desta enzima, poderá resultar na diminuição da prevenção de danos oxidativos.

Pela Figura 7A, pode ser verificada maior atividade da CAT em sementes dos lotes 3, 5 e 9, armazenadas em câmara fria e seca (A_1).

A deterioração durante o armazenamento, principalmente nas condições de laboratório (A_2) e em ambiente controlado (A_3), pode ter induzido a aceleração de processos oxidativos e produção de radicais livres. Isso pode ser evidenciado pela maior atividade da enzima catalase (CAT) no início do armazenamento (0 mês), nesses ambientes (Figura 7B e 7C), onde a atividade dessa enzima foi reduzida em sementes armazenadas nos períodos subsequentes, podendo estar associada ao nível de deterioração, com menor expressão desta enzima removedora de peróxidos.

No ambiente controlado (A_3), houve maior atividade da CAT do que naquelas armazenadas nos outros dois ambientes. Isso pode ter acontecido devido às condições neste ambiente, 20 °C e 70 % UR, que podem ter contribuído para acelerar o processo de deterioração das sementes. Por meio dos testes de germinação e de vigor, também foi observada maior deterioração das sementes nestas condições (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11).

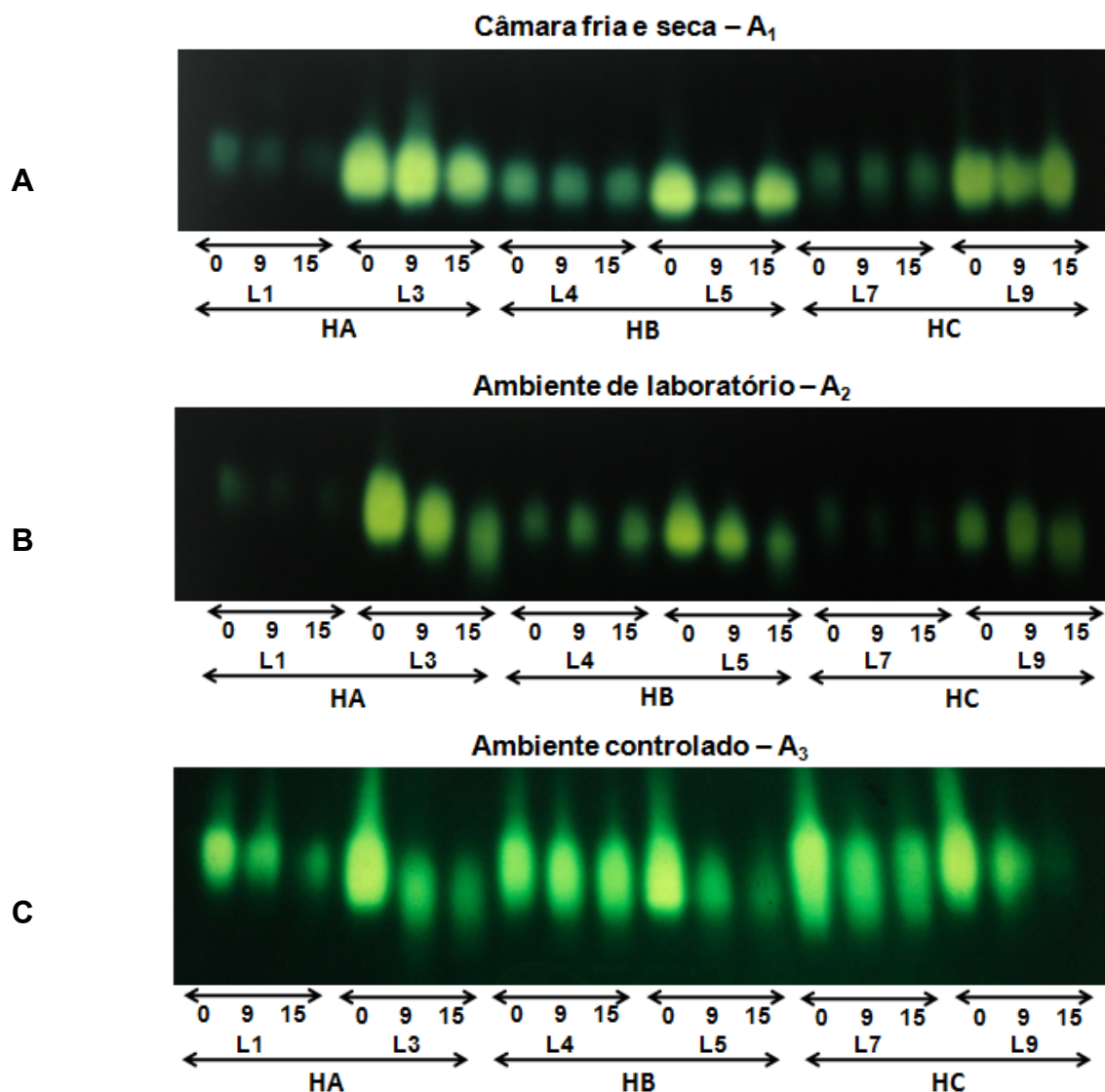


Figura 7 - Padrão enzimático da catalase (CAT), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

Em sementes mais deterioradas houve redução acentuada ou mesmo ausência de atividade dessa enzima, como observado nas sementes do híbrido C armazenadas por 15 meses em ambiente controlado (Figura 7C). Por ser a catalase uma das enzimas “scavenger”, ou seja, removedora de peróxido, a perda da atividade dessa enzima pode, parcialmente, esclarecer o fato de as sementes envelhecidas acumularem mais peróxidos.

Os resultados observados nesta pesquisa reforçam os de Corte et al. (2010) e Nakada et al. (2010), os quais verificaram aumento da peroxidação de lipídios com o aumento da deterioração das sementes. Assim, a redução da atividade da catalase (CAT) pode tornar as sementes mais sensíveis aos efeitos dos radicais livres e aumentar a formação de peróxido nas células, tornando as sementes mais sujeitas à perda de viabilidade. Isso pode ser confirmado pela redução da germinação nos períodos finais de armazenamento (Tabela 6), principalmente em sementes do híbrido C, no ambiente de laboratório (A_2) e no ambiente controlado (A_3).

Em outros estudos, tem sido demonstrada a relação entre a perda da viabilidade das sementes e a redução da atividade da catalase (CAT). Sung e Chiu (1995) observaram redução na atividade de enzimas “scavenger”, entre elas a catalase, com o aumento do período de armazenamento em sementes de soja. Resultados semelhantes foram obtidos por Goel e Sheoran (2003), em sementes de algodão.

Pelas análises eletroforéticas da enzima esterase (EST) pode-se observar maior atividade dessa enzima em sementes não submetidas ao armazenamento (período zero), em todos os lotes, nos três ambientes (Figura 8A, 8B e 8C). A atividade dessa enzima foi reduzida em sementes armazenadas por períodos superiores de armazenamento. Resultados estes semelhantes aos relatados por Padilha et al., (2001), onde foi observada a redução na atividade da esterase com o aumento do processo de deterioração em sementes de milho. Segundo Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), os radicais livres produzidos, como um resultado da peroxidação de lipídios no envelhecimento, reagem com os lipídeos das membranas celulares destruindo a estrutura dessas e também as reservas das sementes, resultando na redução do potencial fisiológico das sementes. Dessa forma, alterações nos padrões da EST evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução da germinação das sementes.

Esta enzima é acumulada antes do processo para prevenir a ação de radicais livres no início da deterioração, podendo reduzir sua expressão durante este processo devido à sua ação hidrolítica na liberação de ácidos graxos que são usados na beta oxidação, como fonte de energia para a germinação. Ressalta-se ainda que muitos

desses lipídeos são constituintes de membranas, cuja degradação aumenta com a deterioração (Marcos Filho, 2005).

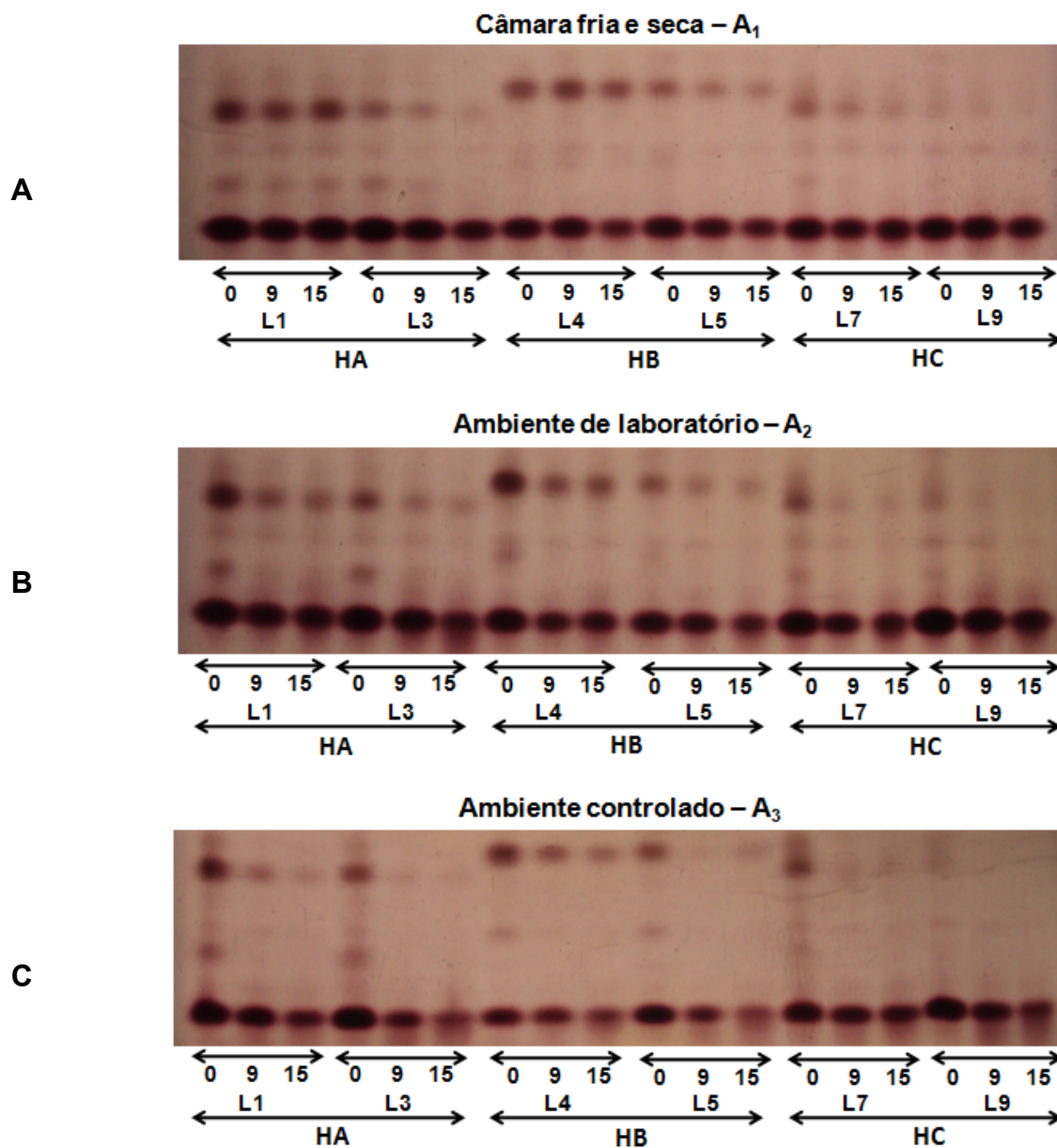


Figura 8 - Padrão enzimático da esterase (EST), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

Foi observado, também, maior atividade da esterase (EST) para os híbridos A e B foram maiores que as do híbrido C, nos três ambientes (Figura 8A, 8B e 8C), demonstrando que as sementes do híbrido C apresentavam maior peroxidação de lipídios de membrana celular, causando aumento na permeabilidade e, conseqüentemente, no processo deteriorativo. A desestruturação de membranas é considerada como o primeiro evento degenerativo de sementes (DELOUCHE: BASKIN, 1973) e, em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir o vigor. Isso foi confirmado nos testes de vigor (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11), nos quais as sementes do híbrido C apresentaram desempenho inferior ao das sementes dos híbridos A e B, principalmente nos ambientes de laboratório (A_2) e controlado (A_3).

Em relação aos padrões enzimáticos da malato desidrogenase (MDH) houve aumento na intensidade de bandas dessa enzima em sementes dos híbridos A e C, principalmente em câmara fria e seca (A_1) e ambiente controlado (A_3) (Figura 9A e 9C). A enzima malato desidrogenase (MDH) catalisa a conversão de malato a oxalacetato, tendo importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e de fixação de CO_2 nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Por se tratar de uma enzima importante na respiração celular, o aumento da expressão em diferentes compartimentos celulares pode estar relacionado ao aumento da respiração, que ocorre em sementes que se encontram em processo de deterioração avançado, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de potencial fisiológico reduzido (SHATTERS et al., 1994). Isso foi observado por Brandão Junior, Carvalho e Vieira (1999) em sementes de milho envelhecidas por 144 horas, e por Vieira (1996), em sementes de algodão submetidas a maiores períodos de envelhecimento artificial.

Vieira (1996) afirmou que enzimas envolvidas na respiração, como a MDH, podem apresentar alta atividade em sementes com potencial fisiológico reduzido e ser um possível marcador molecular para a deterioração.

No ambiente de laboratório (A_2) não foi possível detectar variações nos padrões de bandas da enzima MDH (Figura 9B). Spinola, Cícero e Melo (2000), trabalhando com sementes de milho, não constataram alterações nos perfis eletroforéticos dessa

enzima com o aumento do período de envelhecimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Shatters et al. (1994) que observaram que a atividade da MDH foi a menos afetada pelos períodos de envelhecimento em sementes de soja. Brandão Junior, Carvalho e Vieira (1999) observaram relações entre o potencial fisiológico de sementes de milho e a atividade da malato desidrogenase (MDH).

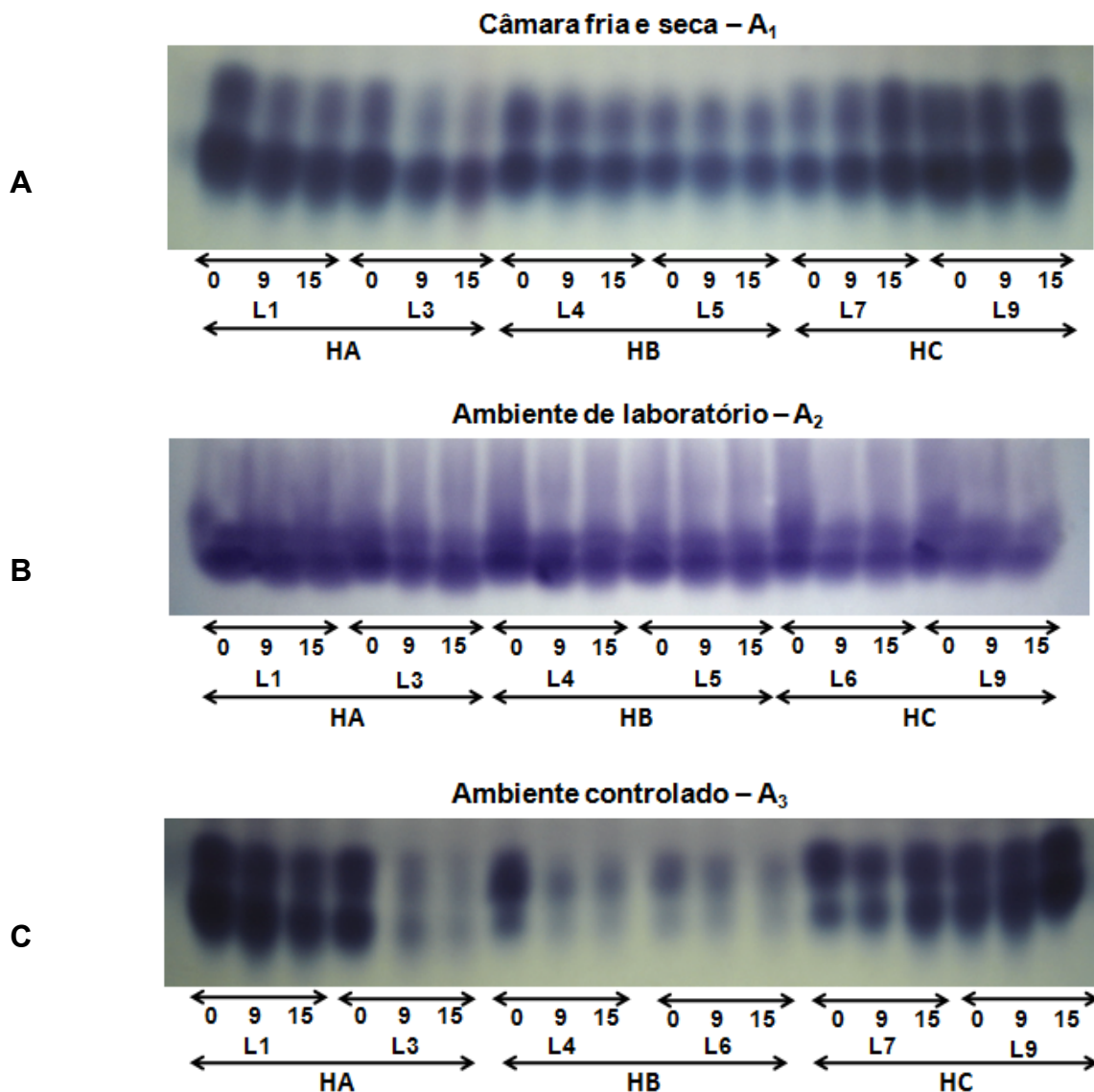


Figura 9 - Padrão enzimático da malato desidrogenase (MDH), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

De acordo com Salinas et al. (1998), os mitocôndrios dos eixos embrionários são responsáveis pelo fornecimento de energia usada no alongamento da radícula e, se a taxa respiratória diminui, a emergência e crescimento das plântulas também diminuem. Assim, pelo fato dos mitocôndrios serem o centro da respiração, fica evidente a importância dos efeitos da deterioração sobre o desempenho germinativo de sementes quando são consideradas as modificações ocorridas nessa organela.

Quando a via aeróbica é comprometida, a via anaeróbica da respiração é ativada e produtos tóxicos às células como acetaldeído e etanol são acumulados. No metabolismo anaeróbico, o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido para acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído é, então, reduzido para etanol pela álcool desidrogenase (ADH).

Não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes armazenadas em câmara fria e seca (A_1) na Figura 10A.

Comumente utilizada em estudos sobre deterioração de sementes, a álcool desidrogenase (ADH) possui reconhecida atuação no metabolismo anaeróbico de plantas, promovendo a redução do acetaldeído a etanol (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em estudo realizado por Zhang et al. (1994), foi observada, em função do metabolismo anaeróbico, a ocorrência da produção de compostos voláteis pelas sementes, cuja presença pode acelerar o seu processo de deterioração. De acordo com esses autores, entre os compostos voláteis, o acetaldeído foi o que proporcionou mais efeitos danosos independentemente do ambiente de armazenamento, acelerando o processo de deterioração.

Brandão Junior, Carvalho e Vieira (1999) observaram relação positiva entre a viabilidade de sementes de milho e atividade da enzima álcool desidrogenase. Resultados semelhantes foram obtidos por Throneberry e Smith (1955) também com sementes de milho. Já Vieira (1996) não observou alterações nos padrões isoenzimáticos dessa enzima com o avanço do processo deteriorativo de sementes de algodão.

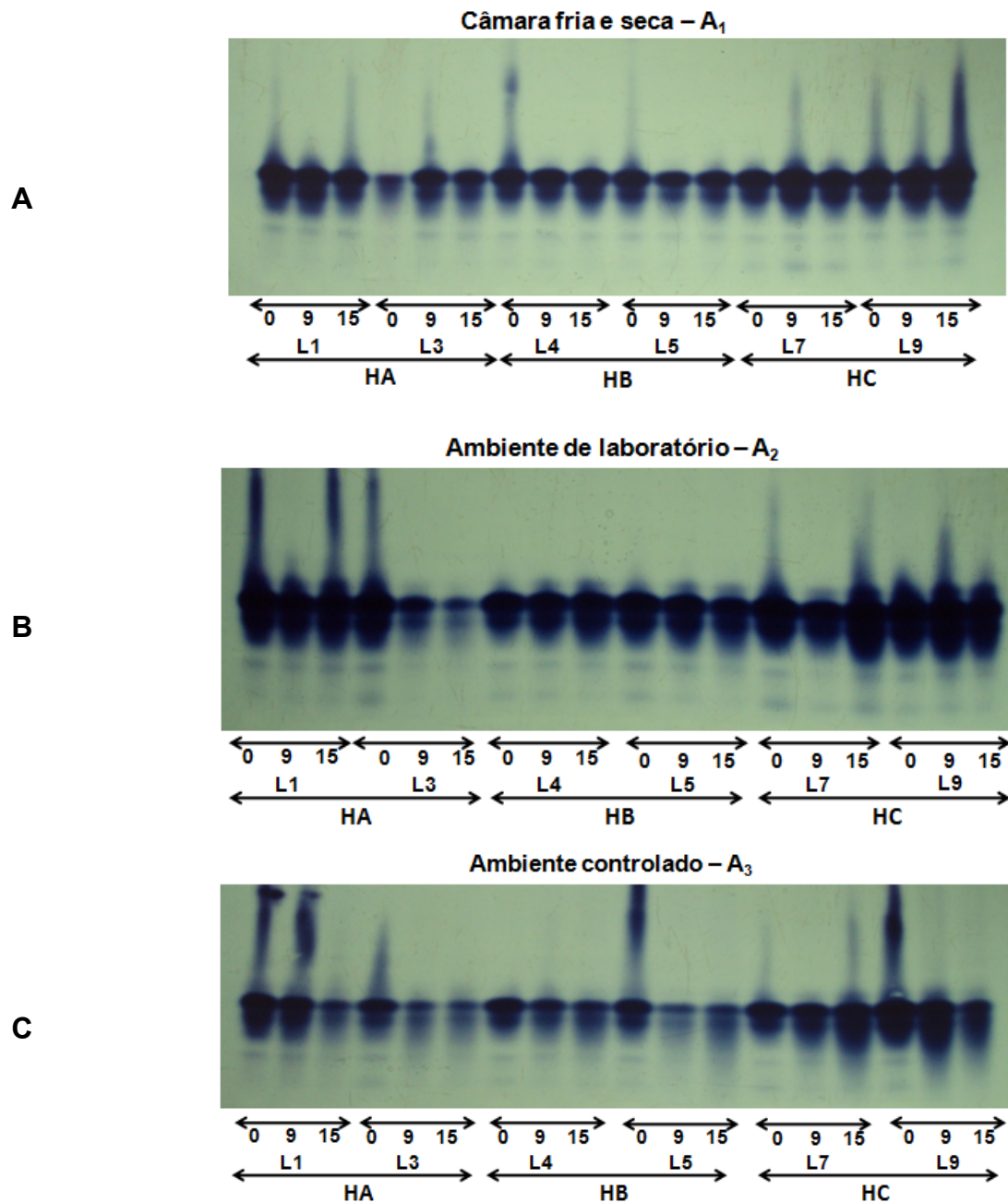


Figura 10 - Padrão enzimático da álcool desidrogenase (ADH), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

Nesta pesquisa foi observada maior atividade da enzima ADH em sementes do híbrido C, principalmente em ambiente controlado (A₃) (Figura 10C). O aumento da

atividade dessa enzima em sementes desse híbrido mantidas a condições de temperatura e umidade relativa desfavoráveis, como as que ocorreram nesse ambiente pode ter propiciado o aumento da respiração que ocorre em sementes que se encontram em processo de deterioração mais avançado. Com a subsequente produção de etanol que é tóxico às sementes é possível relacionar esses resultados com os observados nos testes de germinação e vigor, uma vez que, dos três híbridos estudados, o C foi o que se mostrou mais sensível nesse ambiente. Vieira (1996) afirmou que enzimas envolvidas na respiração podem apresentar alta atividade em sementes com potencial fisiológico reduzido e ser um possível marcador molecular para deterioração.

Foi observada redução na atividade da enzima glutamato oxalacetato transaminase (GOT) com o decorrer do armazenamento em ambiente controlado (A₃) e de laboratório (A₂) (Figura 11B e 11C). Esses resultados estão de acordo com os observados por Brandão Junior; Carvalho e Vieira (1999) que trabalharam com sementes de milho e verificaram diminuição na atividade e coloração das bandas com o aumento do tempo de envelhecimento das sementes, classificando essa enzima como um importante marcador para a determinação de alterações em estádios iniciais de deterioração de sementes de milho. Já Vieira (1996) não detectou variação na atividade dessa enzima para sementes envelhecidas de algodão, enquanto Chauhan, Gopinathan e Basu (1985) verificaram um incremento no número de bandas em sementes envelhecidas de soja e cevada. Segundo esses autores essas mudanças podem ser devido ao aumento na atividade metabólica com o processo de deterioração.

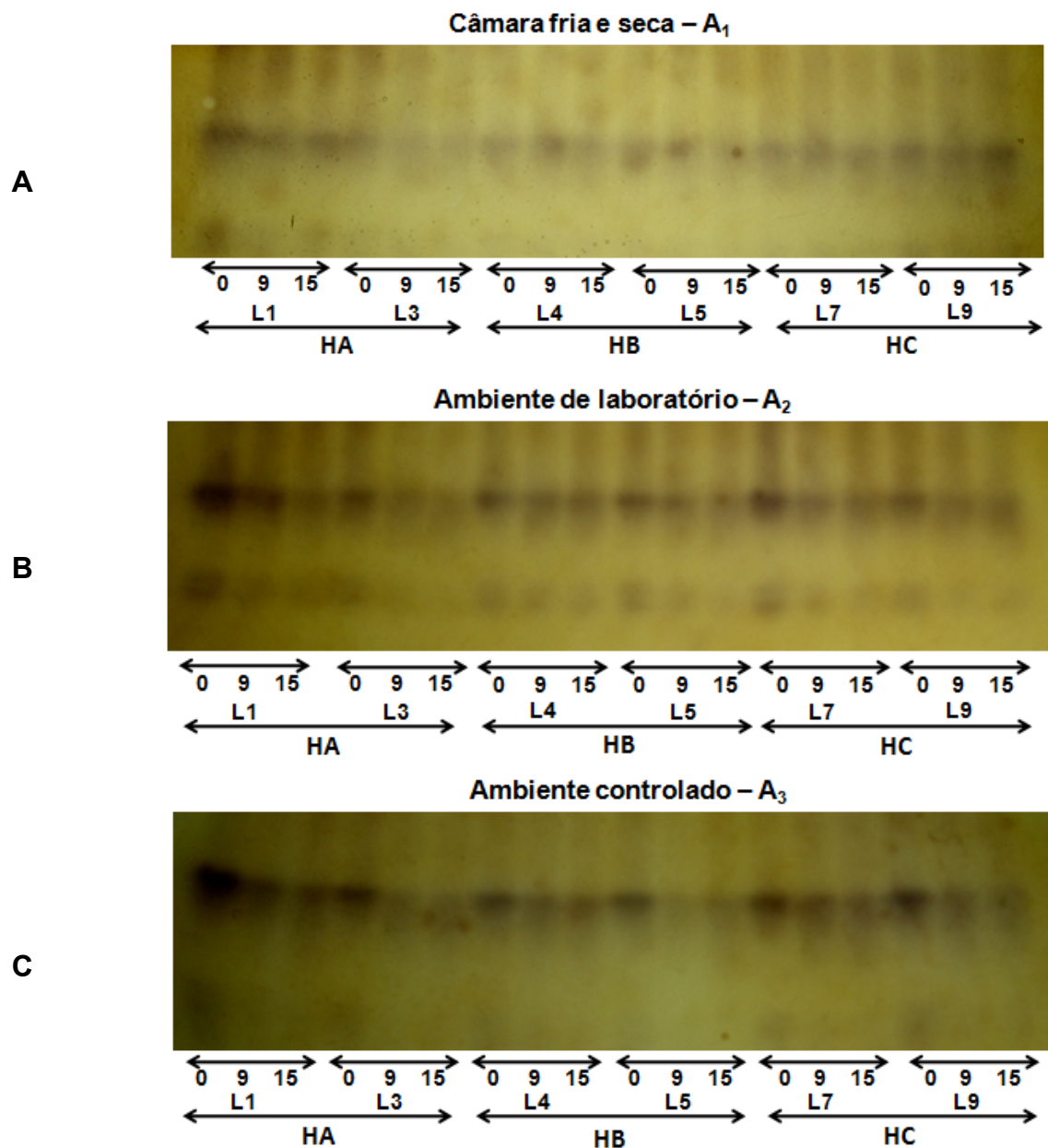


Figura 11 - Padrão enzimático da glutamato oxalacetato transaminase (GOT), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

Descrita como uma enzima de importante papel no metabolismo de aminoácidos, a GOT (glutamato oxalacetato transaminase) catalisa a reação específica de transferência de um aminogruppo de um aminoácido ao ácido α -cetoglutarato, para

formar o ácido glutâmico e produzir cetoácido, e reage em diferentes velocidades com aproximadamente todos os aminoácidos proteicos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem, sobretudo no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, penetra na matriz, na qual pode ser novamente transaminado ou desaminado pela glutamato desidrogenase (GTDH). Portanto, é uma enzima importante no processo de degradação e síntese de proteínas (CONN; STUMP, 1980), apresentando importante papel na germinação de sementes.

Pelo zimograma da glutamato desidrogenase (GTDH) não foi observada diferença na atividade dessa enzima em sementes dos três híbridos, durante os 15 meses de armazenamento, em câmara fria e seca (A_1) e no ambiente de laboratório (A_2) (Figura 12A e 12B). Isso pode ter ocorrido, pelo fato das alterações nos padrões dessa enzima geralmente ocorrerem em estádios mais avançados de deterioração. No ambiente de câmara fria e seca (A_1) houve uma combinação de temperatura e umidade relativa do ar (10°C e 30%) adequada para a conservação das sementes durante o armazenamento.

Essa enzima é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs, produção de NADPH para a síntese de aminoácidos. Assim, a mesma pode ter importante papel na germinação de sementes fornecendo energia para o processo, ou aminoácidos para o desenvolvimento do embrião.

Já no ambiente controlado (A_3), foi verificada maior atividade da GTDH, no início do armazenamento (0 mês) em sementes dos híbridos A e C (Figura 12C), demonstrando que a atividade respiratória das sementes desses híbridos estava mais elevada, caracterizando processo deteriorativo mais avançado, quando comparado às sementes do híbrido B. Neste último não houve variações dos padrões da GTDH nas sementes armazenadas em diferentes períodos de armazenamento.

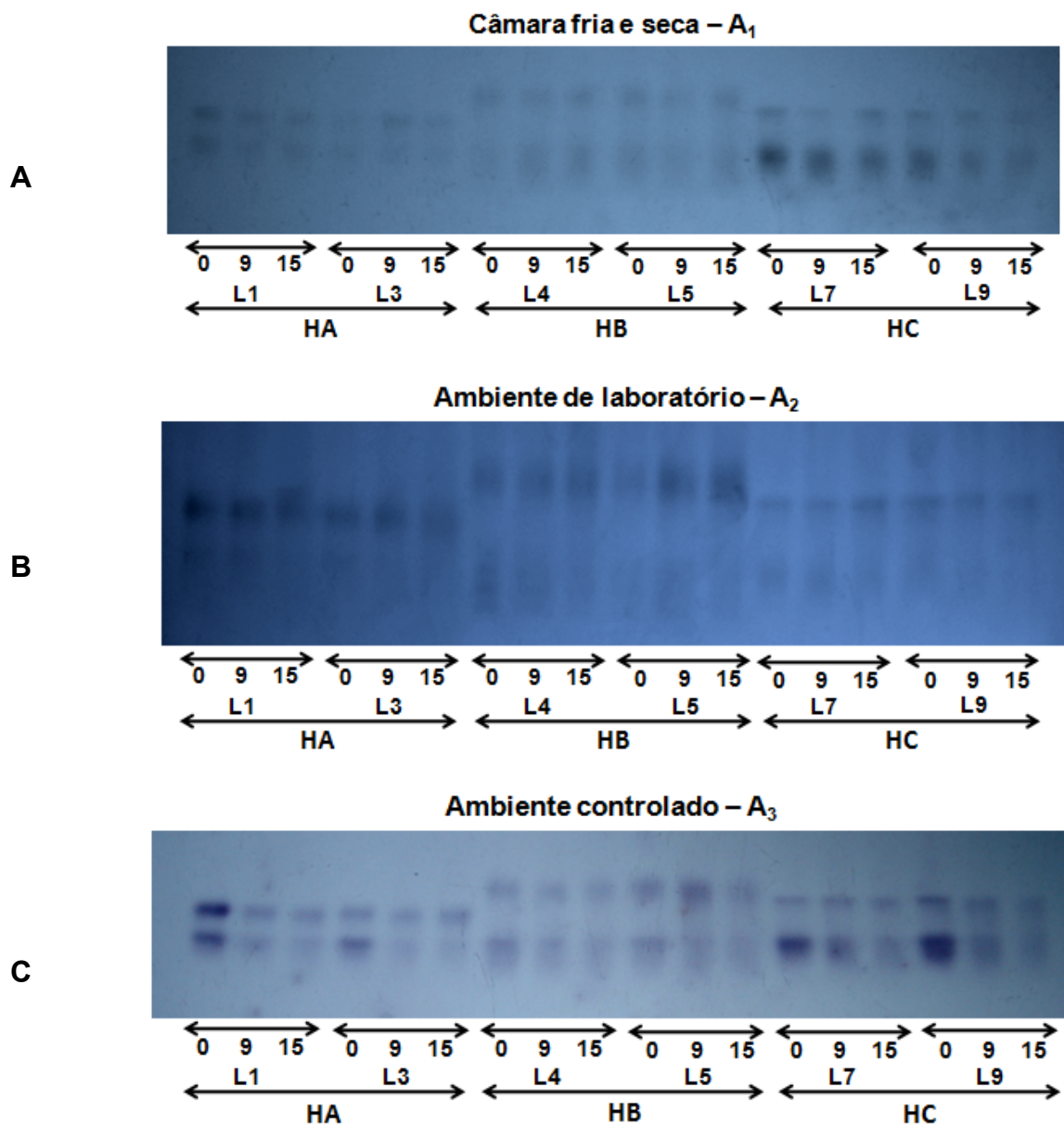


Figura 12 - Padrão enzimático da glutamato desidrogenase (GTDH), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

Resultados semelhantes foram obtidos por Brandão Júnior, Carvalho e Vieira (1999) em sementes de milho e Shatters et al. (1994) em sementes de soja, os quais

verificaram redução na atividade dessa enzima após 48 horas de envelhecimento e quase perda total da atividade após 96 horas.

A redução da atividade dessa enzima observada nos períodos finais de armazenamento, em sementes dos híbridos A e C, no ambiente controlado (A_3), comprometeu o fornecimento de energia para o desenvolvimento do eixo embrionário durante a germinação das sementes. Isso foi constatado pelos resultados obtidos nos testes utilizados para avaliação do potencial fisiológico das sementes (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11), com desempenho inferior dessas sementes em relação ao das do híbrido B, nesse mesmo ambiente.

Foi observada redução na atividade da α -amilase (α -AM) ao longo do armazenamento, para todos os híbridos estudados, em todos os ambientes (Figura 13A, 13B e 13C). Em diversos estudos têm sido observadas de relações entre perda de viabilidade e redução na atividade dessa enzima. Decréscimo em atividades de amilase tem sido reportado em sementes de cereais após o envelhecimento. Em sementes de trigo envelhecidas artificialmente, Petruzelli e Taranto (1990), Livesley e Bray (1991) e Ganguli e Semandi (1993) mostraram que a enzima α -AM foi sintetizada em taxas reduzidas pela camada de aleurona. Segundo os autores, mudanças deteriorativas podem ocorrer na camada de aleurona durante o envelhecimento. Essas alterações podem determinar a redução na produção de amilase, que por sua vez, influencia a germinação. Isso foi verificado por meio dos testes de vigor, onde o desempenho das sementes foi reduzido ao longo do armazenamento.

A α -amilase (α -AM) é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho. Usualmente não está presente nas sementes secas, sendo sintetizada e secretada pela camada de aleurona (KIGEL; GALILI, 1995). Durante o desenvolvimento da semente, a camada de aleurona serve para o estoque de reservas, enquanto que na germinação, constitui-se em fonte de enzimas para a mobilização das reservas (FINCHER, 1989).

Em sementes de sorgo, Perl, Luna e Gelmound (1978) verificaram que altas atividades da enzima α -AM estavam relacionadas ao maior desempenho das sementes.

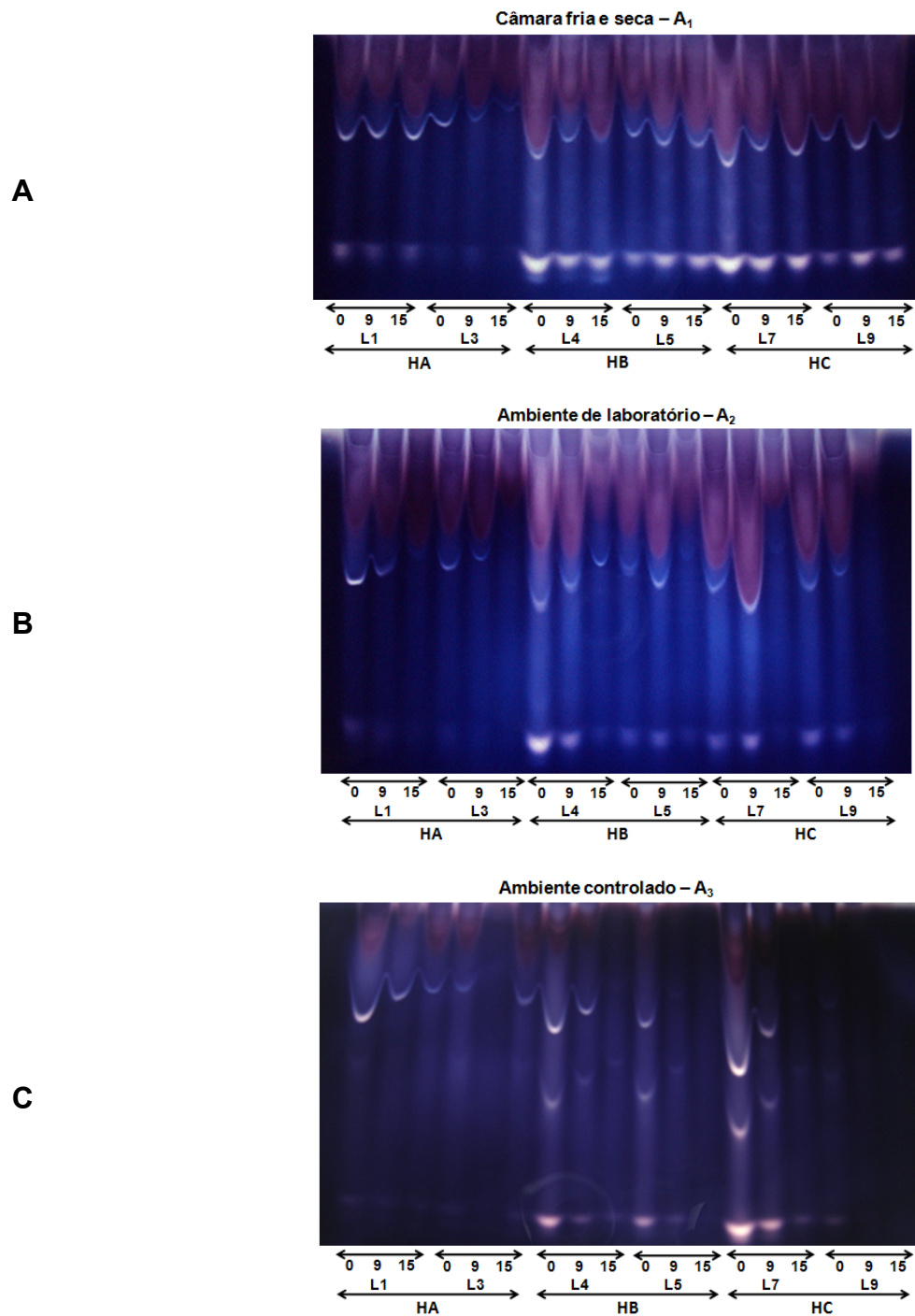


Figura 13 - Padrão enzimático da α -amilase (α -AM), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

Para a enzima sorbitol desidrogenase (SDH) foi verificada maior atividade no início do armazenamento para os lotes 1, 4 e 7, e menor atividade com o armazenamento nos três ambientes (Figura 14A, 14B e 14C).

A sorbitol desidrogenase (SDH) é uma enzima oxiredutora que catalisa a reação de remoção de termos de hidrogênio do monossacarídeo sorbitol possibilitando a degradação deste monossacarídeo e obtenção de energia para a célula. Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) e Brandão Junior, Carvalho e Vieira (1999) verificaram decréscimo gradual na atividade dessa enzima em sementes de milho com o aumento do tempo de envelhecimento.

A perda da atividade dessa enzima em sementes envelhecidas pode estar associada aos níveis baixos de produção de ATP, necessários para a atuação da enzima. Da mesma forma, o aumento da taxa respiratória durante a deterioração das sementes pode afetar a atividade dessa enzima, a qual segundo Murray (1984) é uma enzima que pela via glicolítica está intimamente relacionada à atividade respiratória.

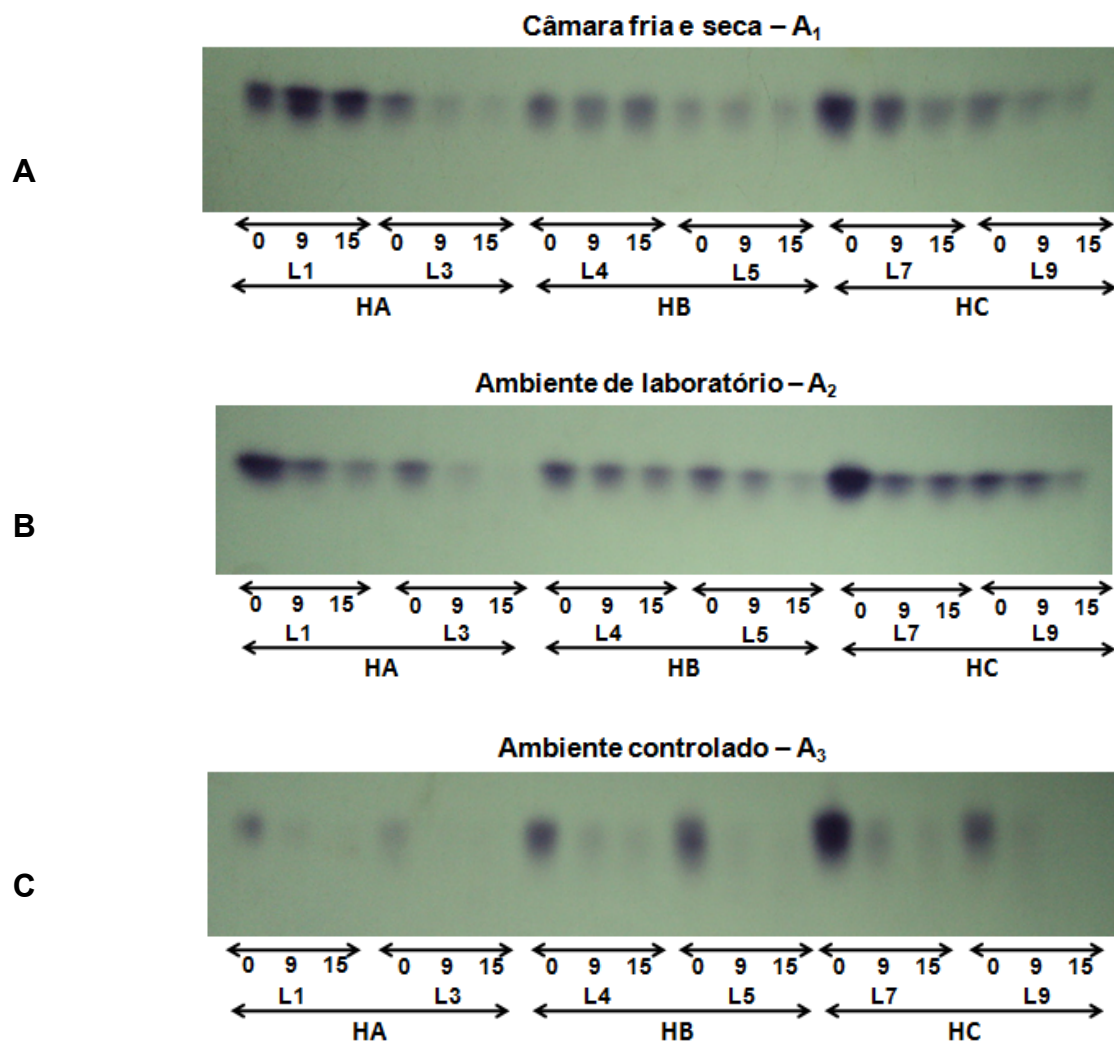


Figura 14 - Padrão enzimático da sorbitol desidrogenase (SDH), em sementes dos híbridos A (lotes 1 e 3), B (lotes 4 e 5) e C (lotes 7 e 9), submetidas a 0, 9 e 15 meses de armazenamento, em três condições (câmara fria e seca – A₁, ambiente de laboratório – A₂ e ambiente controlado – A₃)

3 CONCLUSÕES

As análises dos dados e a interpretação dos resultados da presente pesquisa permitiram concluir que:

- O potencial de armazenamento de sementes de diferentes genótipos de milho é avaliado, com segurança, associando-se resultados de testes de germinação de vigor com avaliações da atividade de isoenzimas.
- Alterações em sistemas isoenzimáticos álcool desidrogenase, catalase, esterase, α -amilase e sorbitol desidrogenase permitem identificar o progresso do processo de deterioração de sementes de milho e o estabelecimento de causas de diferenças no desempenho de genótipos e lotes de sementes.
- O armazenamento sob condições sub-ótimas de temperatura e umidade relativa do ar é adequado para promover diferenças na intensidade e velocidade de deterioração de sementes de genótipos de milho.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627p.

ALSCHER, R.G; ERTURK, N; HEALTH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ALSCHER, R.G.; HESS, J.L. **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 1 v.

ANDRADE, R.V.; BORBA, C.S. Fatores que afetam a qualidade das sementes. In: EMBRAPA, Centro Nacional de Milho e Sorgo. **Tecnologia para produção de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1993. p. 7-10.

ANDREOLI, C.; ANDRADE, R.V.; ZAMORA, S.A.; GORDON, M. Influência da germinação da semente e da densidade de semeadura no estabelecimento do estande e na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 1-5, 2002.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing, 1983. 93p. (Contribution, 32).

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated aging of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição Especial.

BINGHAM, L.J.; HARRIS, A.; McDONALD, L. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings from age and unaged seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 1, p. 127-139, 1994.

BOWLER, C.; VAN MONTAGO, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRANDÃO JUNIOR, D.E.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 2009. 399p.

BROWN, R.F.; MAYER, D.G. A critical analysis of Maguire's germination rate index. **Journal of Seed Technology**, Beltsville, v. 10, p. 101-110, 1986.

BURRIS, J.S. Seed: seedling vigor and field performance. **Journal of Seed Technology**, Beltsville, v. 1, p. 58-74, 1976.

CAMARGO, R. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea Arabica* L.)**. 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1998.

CAMARGO, R.; CARVALHO, M.L.M. Armazenamento a vácuo de sementes de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 131-139, 2008.

CARVALHO, M.L.M. **Refrigeração e qualidade de sementes de milho armazenadas em pilhas com diferentes embalagens**. 1992. 98p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1992.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARNEIRO, J.G.A.; AGUIAR, I.B. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Ed.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 333-350.

CASEIRO, R.F.; MARCOS FILHO, J. Procedimentos para a condução do teste de frio visando a avaliação do vigor de sementes de milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 459-466, 2000.

CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, T.; NAITHANI, S.C. Ascorbic acid metabolism in ageing recalcitrant sal (*Shorea robusta* Gaertn. F.) seeds. **Indian Journal Experimental of Botany**, New Delhi, v. 38, p. 1031-1035, 2000.

CHANG, S.M.; SUNG, J.M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 26, p. 613-626, 1998.

CHAUHAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BASU, C.R. Eletrophoretic variation of protein and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Techonology**, Zurich, v. 13, n. 3, p. 629-641, 1985.

CICERO, S.M.; VIEIRA, R.D. Teste de frio. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.151-164.

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

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 383-385, 1990.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. **Seed Science and Technology**. New York: Chapman & Hall, 1995. 410p.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. **Seed Science and techonology**. 4th ed. New York: Chapman & Hall, 2001. 409p.

CORTE, V.G.; BORGES, E.E.L.; LEITE, H.G.; PEREIRA, B.L.C.; GONÇALVES, J.F.C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

DELOUCHE, J.C. Seed deterioration. **Seed World**, Chicago, v. 92, n. 4, p. 14-15, 1963.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

DELOUCHE, J.C.; MATTHES, R.K.; DOUGHERTY, G.M.; BOYD, A.H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed Science and Techonology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 671-700, 1973.

DUTRA, A.S.; VIEIRA, R.D. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 715-721, 2004.

ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, London, v. 45, n. 1, p. 13-30, 1980.

ELLIS, R.H.; SIMON, G.; COVELL, S. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 38, p. 1033-1043, 1987.

EVANS, M.; BLACK, M.; CHAPMAN, J. Induction of hormone sensivity by dehydration is one positive role for drying in cereal seed. **Nature**, London, v. 258, n. 5531, p. 144-145, 1975.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.

FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 305-346, 1989.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical, **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 247, p. 1-11, 1986.

FRIGERI, T. **Interferência de patógenos nos resultados dos testes de vigor em sementes de feijoeiro**. 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

GANGULI, S.; SEN-MANDI, S. Effects of ageing on amylase activity and scutellar cell structure during imbibition in wheat seed. **Annals of Botany**, London, v. 71, n. 5, p. 411-416, 1993.

GOEL, A.; SHEORAN, I.S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, New York, v. 46, n. 3, p.429-434, 2003.

GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 35, 1980. New York. **Proceedings...** [S.1.]: American Seed Trade Association, 1980. p. 10-31.

GUIMARÃES, R.M. **Produção e tecnologia de sementes: fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 129p.

GUISCEM, J.M.; NAKAGAWA, J.; ZUCARELLI, C. Qualidade fisiológica de sementes de milho doce BR 400 (BT) em função do teor de água na colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 220-228, 2002.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 3, p. 145-245,

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagacion de plantas**. México: Continental, 1974. 810p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 1 v.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. **Methods of Enzimology**, v. 186, n. 1, p 1-85, 1990.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, p. 141-153, 1993.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853p.

KLAPHECK, S.; ZIMMER, I.; COSSE, H. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 31, p. 1005-1032, 1990.

KRAAK, H.L. Physiological aspects of storage of recalcitrant seed. In: SOMÉ, L. M.; KAM, M. de. (Ed.). **Tree seeds problems, with special reference to Africa**. Leiden: [s.n.], 1993. p. 239-253.

KRZYZANOWSKI, F.C.; MIRANDA, Z.F.S. Relatório do Comitê de Vigor da ABRATES. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 1, p. 7-25, 1990.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 15-50, 1991.

KRZYZANOWSKI, F.C.; WEST, S.H.; FRANÇA NETO, J.B. Influência do conteúdo de isoflavonas sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 47, 2001.

KUENEMAN, E.A. Genetic control of seed longevity in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 1, p. 5-8, 1983.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1992. 725p.

LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 1-6, 1990.

LIVESLEY, M.A.; BRAY, C.M. The effects of ageing upon α -amilase production and protein synthesis by aleurone layers. **Annals of Botany**, London, v. 68, n. 1, p. 69-73, 1991.

MARCOS-FILHO, J. Germinação de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO DE SEMENTES, 1, 1986. Piracicaba. **Trabalhos apresentados...** Campinas: Fundação Cargill, 1986, p. 11-39.

MARCOS FILHO, J. Envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**, Jaboticabal, FUNEP, 1994, p. 133-150.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, p. 3.1-3.24.

MARCOS FILHO, J. Pesquisa sobre vigor de sementes de hortaliças. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 63-75, 2001.

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

MARCOS-FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade fisiológica das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARINCEK, A. **Qualidade de sementes de milho produzidas sob diferentes sistemas de manejo no campo e em pós colheita**. 105p.. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

McDONALD JR.; M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

McGEE, D.C. Introduction. In: Symposium on deterioration mechanisms in seeds. Introduction. **Phytopatology**, St. Paul, v. 73, n. 2, p. 314-317, 1983.

MURRAY, D.R. Axis – cotyledon relationships during reserve mobilization. In: MURRAY, D.R. **Seed physiology**. New York: Academic Press, 1984. v. 2, 295p.

NAKADA, P.G.; OLIVEIRA, J.A.; MELO, L.C.; SILVA, A.A.; SILVA, P.A.; PERINA, F.J. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem, **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 42-51, 2010.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p. 1–24.

OISHI, M.Y.; BEWLEY, J.D. Distinction between the responses of developing maize kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability, α -amylase activity, and abscisic acid content. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, n. 2, p. 592-598, 1990.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do método de colheita e do tipo de armazenamento na qualidade de sementes de milho**. 1997. 134p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1997.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 255-262, 2001.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D.; BARBOSA, J.C. Desempenho de sementes de algodão tratadas quimicamente e armazenadas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 212-219, 2002.

PERL, M. L.; LUNA, I.; GELMOUND, H. Biochemical changes in sorghum seeds affected by accelerated ageing. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 29, n. 109, p. 497- 509, 1978.

PETRUZZELLI, L.; TARANTO, G. Amylase activity and loss of viability in wheat. **Annals of Botany**, London, v. 66, n. 4, p. 375-380, 1990.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, London, v. 1, n. 1, p. 499-514, 1973.

ROSA, S.D.V.F.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SALGADO, K.C. de C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 3, n. 2 p. 106-118, 1998.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Isoenzymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 25, p. 255-258, 1974.

- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A.C. **Membranes, metabolism and dry organisms**. London, 1986. p. 85-101.
- SHATTERS, R.G.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to osmotic priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 33-41, 1994.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal Medicine**, Tucson, v. 91, p. 31-39, 1991.
- SPINOLA, M.C.M.; CICERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.
- STEIN, W.L.; SLABAUCH, P.E.; PLUMER, A.P. Harvesting, processing, and storage of fruits seeds. In: **Seeds of woody plants in the United States**. Washington, 1974. p. 98-125.
- STEWART, R.R.C.; BEWLEY, J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, n. 2, p. 245-248, 1980.
- SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 1, p. 51-55, 1994.
- SUNG, J.M.; CHIU, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**, Clare, v. 110, n. 1, p. 45-52, 1995.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Califórnia: Cummings, 2004. 565p.
- THRONEBERRY, G.O.; SMITH, F.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, New York, v. 30, n. 4, p. 337, 1955.
- TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224p.
- VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Lavras. 1996. 114p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 1996.
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

VIEIRA, R.D.; SCAPPA NETO, A.; BITTENCOURT, S. R. M.; PANOBIANCO, M.; VOLPE, C. A. Envelhecimento acelerado em sementes de milho: teor de água da semente e variações na temperatura e umidade relativa do ar em função do tipo de câmara. **Científica**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 7-11, 2005.

WARDYNSKI, F.A.; RUST, S.R.; YOKOYAMA, M.T. Effect of microbial inoculation of high-moisture corn on fermentation characteristics, aerobic stability, and cattle performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 8, p. 2246-2252, 1993.

WILSON, D.O.; MCDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 14, p. 269-300, 1986.

WOODSTOCK, L.W. Seed imbibition: a critical period for successful germination. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1988.

WOODSTOCK, L.W. Progress reports on the seed vigor testing handbook. **Newsletter of the Association of Official Seed Analysts**, Ithaca, v. 50, n. 2, p. 1-78, 1976.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORA,URA, Y-I.; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 49-56, 1994.