

ELAINE HEBERLE

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE
MILHO ARMAZENADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

H445q
2012

Heberle, Elaine, 1978-

Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de milho armazenadas / Elaine Heberle. – Viçosa, MG, 2012. viii, 56f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Eduardo Fontes Araujo

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 48-53

1. *Zea mays*. 2. Sementes - Armazenamento. 3. Enzimas. 4. Sementes - Qualidade. 5. Sementes - Fisiologia pós-colheita. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.15

ELAINE HEBERLE

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE
MILHO ARMAZENADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de junho de 2012.

Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges

Prof. João Carlos Cardoso Galvão

Pesq. Roberto Fontes Araújo

Prof. Paulo Roberto Cecon
(Coorientador)

Prof. Eduardo Fontes Araújo
(Orientador)

*“É preciso a certeza de que tudo vai mudar.
É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós:
Onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração;
Pois a vida está nos olhos de quem sabe ver.
Se não houve frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houve flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houve folhas, valeu a intenção da semente.”*

(Maurício Francisco Ceolin)

*À meus amados pais, Roque e Maria Celita;
exemplos de amor, dedicação, força, trabalho, humildade e fé.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem Ele nada seria possível.

A meus pais Roque e Maria Celita, pelo amor incondicional, pela cultura e educação, por ensinar que o importante não é de onde se vem, mas para onde se vai e que cada um é do tamanho dos seus sonhos. Por apoiar minhas decisões, mesmo quando estas não eram compreensíveis. Pela força nas horas difíceis e diante dos obstáculos, que não me deixaram desistir. Pela humildade, por compreender as longas ausências e pelos braços sempre abertos no retorno. A minha mãe pela simplicidade, apoio e confiança. A meu pai, especialmente pelos sábios conselhos, pelo caráter, honestidade, honra e respeito.

A minhas irmãs Solange e Elisete, meu irmão Rodnei e meu sobrinho Dhjonathã, pelo carinho, incentivo, amizade e força.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Fitotecnia, por permitir a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao professor Eduardo Fontes Araújo, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e por toda a força durante o curso.

Ao professor Adílio Flauzino de Lacerda Filho, pela coorientação, pelos conhecimentos e amizade, e por me permitir novas experiências.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela coorientação e auxílio na análise estatística.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, pela disponibilidade e pelos conselhos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Sementes: Maristela, Camilla, Maria Carmen, Deborah, Beatriz, Márcio, João Batista, Elizabeth, Jackson, Haynna e Valquíria, pela convivência e troca de experiências.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, especialmente a Daniela, Juliane e Cristina, pela ajuda nas análises enzimáticas.

A Tatiane e professor Cláudio Horst Bruckner, pela presteza e amizade.

Aos amigos Maristela, Camilla, Patrícia, Márcio, Gustavo, Marcos Antônio, Leidiane, Gleici e Juliana, pela amizade e companheirismo.

A João Paulo Santos, pelos agradáveis momentos nestes cinco anos. Pela amizade, carinho, compreensão e por me acompanhar nesta jornada. E a sua família, pela carinhosa recepção e convivência.

Ao amigo professor André Luiz de Oliveira, pela amizade sincera, pelo apoio, carinho, torcida, conselhos e pelas longas e agradáveis conversas ao telefone, fazendo-se sempre presente.

As companheiras da república “Malwee”: Ana Paula, Rafaela, Marina, Laila, Natália, Milena e Flávia; e aos demais que compartilharam sua vida comigo: Silmara, Rodrigo, Maristela, Elaine, Luiza, Milene, Fabrício, Fernanda, Michelly, Sebastião e Mariana, pela amizade, compreensão, carinho e pela agradável convivência.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e concretização deste sonho;

OBRIGADA!

BIOGRAFIA

ELAINE HEBERLE, filha de Roque e Maria Celita Heberle, nasceu em 02 de dezembro de 1978, na zona rural do município de Itapiranga – SC.

Em março de 2001 iniciou o curso de graduação em Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina, concluindo-o em 10 de dezembro de 2005.

Em março de 2007 ingressou no curso de Mestrado em Fitotecnia (Produção Vegetal), da Universidade Federal de Viçosa, trabalhando na linha de pesquisa Produção e Tecnologia de Sementes.

Em agosto de 2008, foi aprovada a mudança de nível para doutorado direto, sem defesa de dissertação de mestrado, concluindo-o em junho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de milho.....	4
2.2 Atividade enzimática	8
2.2.1 Peroxidase (EC 1.11.1)	10
2.2.2 Catalase (EC 1.11.1.6)	11
2.2.3 α-amilase (EC 3.2.1.1)	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção dos lotes	15
3.2 Tratamentos	15
3.3 Avaliações	17
3.4 Delineamento e análise estatística	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	54

RESUMO

HEBERLE, Elaine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2012. **Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de milho armazenadas.** Orientador: Eduardo Fontes Araújo. Coorientadores: Adílio Flauzino de Lacerda Filho e Paulo Roberto Cecon.

O principal desafio do armazenamento de sementes é a manutenção da qualidade fisiológica, obtida após a colheita, até a semeadura. Os principais fatores ambientais que afetam a qualidade das sementes, durante este período, são a temperatura e a umidade relativa do ar. Objetivou-se avaliar o efeito de três ambientes na qualidade fisiológica e nas atividades enzimáticas de sementes de milho durante o armazenamento. Dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, foram armazenados em embalagem de papel nos ambientes: A1) câmara fria ($12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$), A2) ambiente não controlado (média de $21,6^{\circ}\text{C}/71\%\text{UR}$) e A3) câmara controlada ($30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$). As avaliações foram realizadas no início e aos 90, 180, 270, 360 e 450 dias de armazenamento pelos testes de germinação, primeira contagem da germinação, envelhecimento acelerado, emergência em leito de areia, condutividade elétrica, teor de água e atividade enzimática da peroxidase, catalase e α -amilase. O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas, tendo um esquema fatorial 3×2 (ambientes \times lotes) nas parcelas, e dias de armazenamento nas subparcelas, seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. A qualidade fisiológica das sementes foi reduzida durante o período de armazenamento e afetada pelas condições do ambiente, com maiores decréscimos naquelas armazenadas em ambiente com temperaturas mais elevadas. O lote 1 apresentou germinação inicial de 99% e, após 450 dias, esta foi reduzida a 92, 87 e 75%; e o lote 2 apresentou 97% de germinação no início e 90, 86 e 69% após 450 dias de armazenamento nos ambientes A1, A2 e A3, respectivamente. Considerando-se o padrão mínimo de germinação para comercialização de sementes certificadas de milho de 85%, estas podem ser armazenadas por 450 dias em câmara fria, ou por até 360 dias em ambiente não controlado, nas condições estudadas. Em ambientes com temperatura mais elevada, as sementes só podem ser armazenadas por até 180 dias, evitando a comercialização de lotes abaixo do padrão comercial. As atividades enzimáticas da peroxidase, catalase e α -amilase permitem a identificação do processo de deterioração das sementes de milho.

ABSTRACT

HEBERLE, Elaine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Physiological quality and enzymatic activity of stored mayze seeds.** Adviser: Eduardo Fontes Araújo. Co-advisers: Adílio Flauzino de Lacerda Filho and Paulo Roberto Cecon.

The most important challenge of storing seeds is the maintenance of physiological quality obtained after the harvest until the sowing. The main environmental factors that affect seed quality during this period are the temperature and relative humidity. The objective was to evaluate the effect of three storage environments in the physiological quality and in the enzymatic activities of corn seeds during storage. Two lots of corn seeds, cultivar BR 106, were stored in paper packing in the environments: A1) cold chamber ($12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{RH}$), A2) uncontrolled environment (average $21,6^{\circ}\text{C}/\pm 71\%\text{RH}$) and A3) controlled chamber ($30\pm 2^{\circ}\text{C}/70 \pm 5\%\text{RH}$). Evaluations were performed at first and at 90, 180, 270, 360 and 450 days of storage through germination test, first count of germination, accelerated aging, emergence in sand, electrical conductivity, water content and enzymatic activity of peroxidase, catalase and α -amylase. The experiment was a completely randomized design in a split plot, with a 3x2 factorial arrangement (environments x lots) in the plots, and days of storage in the subplots, with four replications. The seed physiological quality was reduced during storage and affected by environmental conditions, with greater decreases in those seed stored in an environment with higher temperatures. The lot 1 had an initial germination of 99%, and after 450 days, it was reduced to 92, 87 and 75%; and the lot 2 had 97% initial germination, at 90, 86 and 69% after 450 days storage, in the environments A1, A2 and A3, respectively. Considering the standard of minimum germination for marketing of certified corn seeds of 85%, they can be stored for 450 days in cold chamber, or up to 360 days in uncontrolled environment, under the conditions studied. In environments with high temperature, the corn seeds can only be stored for up to 180 days, avoiding the marketed of lots below the commercial standard. The enzymatic activities of peroxidase, catalase and α -amylase allow identification of the deterioration process of the corn seeds.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho tem grande importância no cenário agrícola, por ser fonte de matéria-prima de muitos produtos utilizados para a alimentação humana e animal. Está entre as mais cultivadas no Brasil, ocupando uma área estimada de 15.451,6 mil hectares, com produção de 65.902,7 mil toneladas e produtividade média de 4.265 Kg.ha⁻¹ na safra 2011/2012 (CONAB, 2012). O aumento da produção de grãos deve-se ao aumento da área plantada e ao aumento da produtividade. A obtenção de altas produtividades está relacionada com diversos fatores, entre eles a qualidade das sementes utilizadas para a implantação das novas lavouras.

A semente constitui um dos insumos de maior importância na agricultura, representando também o principal veículo de transferência do potencial genético superior, resultante de trabalhos de pesquisa, para o agricultor. O custo de sementes de alta qualidade representa em torno de 10 a 12% dos custos totais da lavoura. Portanto, a utilização de sementes com boa qualidade fisiológica e sanitária é a base para o sucesso de todas as outras operações utilizadas na lavoura para alcançar uma boa produtividade e obter sucesso na atividade agrícola.

A qualidade das sementes é influenciada por diversos fatores durante as etapas de sua produção, colheita, beneficiamento e armazenamento (KRYZANOWSKI et al., 2006). Sua qualidade final depende do cuidado em manter, durante as operações de beneficiamento e armazenamento, a qualidade obtida no campo.

Considerando que a qualidade das sementes de milho é máxima na maturidade fisiológica e que após este ponto inicia-se um processo inevitável e contínuo de deterioração, o ideal seria que estas fossem semeadas logo após a sua colheita. Entretanto, há um período entre a colheita e a semeadura e, assim, faz-se necessário o armazenamento destas.

O armazenamento é uma etapa fundamental no processo produtivo e o maior desafio está na manutenção da qualidade fisiológica das sementes durante este período, até o momento da semeadura, visto que a qualidade não pode ser melhorada (VILLELA e PERES, 2004). Os fatores que mais influenciam a qualidade das sementes armazenadas são o teor de água das sementes e a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento. Deste modo, o conhecimento dos fatores que afetam a qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento possibilita a aplicação de tecnologias e a manipulação das condições ambientais que podem contribuir para a redução da deterioração das mesmas.

Os programas de controle de qualidade tem fundamental importância no setor de produção e comercialização de sementes. Devido a competitividade do mercado, destacam-se as empresas preocupadas em assegurar aos agricultores cultivares modernas, geneticamente puras, de alta qualidade fisiológica e sanitária, e que assegurem potencial de altas produtividades. Contudo, um dos maiores desafios da tecnologia de sementes está em identificar claramente os processos degenerativos relacionados com a perda do vigor e a capacidade germinativa, que comprometem o estabelecimento de estande adequado, podendo interferir negativamente na produtividade da lavoura.

A deterioração das sementes é determinada por uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas que iniciam a partir da maturidade fisiológica e seguem em ritmo progressivo, determinando a queda da qualidade e podendo culminar na sua morte (MARCOS FILHO, 2005). Algumas das evidências são a redução do potencial germinativo e do crescimento ou vigor das plântulas, maior suscetibilidade a ataques de microrganismos patogênicos, emergência desuniforme e redução da produtividade.

Diversos testes visam avaliar a qualidade fisiológica das sementes, sendo que os principais utilizados em sementes de milho são os testes de germinação, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado, emergência em areia, primeira contagem da germinação e teste de frio.

As alterações bioquímicas que ocorrem durante a deterioração das sementes também podem ser investigadas através das mudanças nas atividades de diversas enzimas. Uma vez que estas participam em praticamente todas as reações do metabolismo e não são modificadas durante o processo (TAIZ e ZEIGER, 2009), podem servir como indicadores do processo deteriorativo das sementes. Diversas enzimas têm sido associadas ao processo de deterioração das sementes, entre elas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), glutamato desidrogenase (GDH) e fosfatase ácida (ACP).

Segundo Copeland e McDonald (2001), para a detecção do início da deterioração das sementes, as avaliações mais sensíveis são aquelas relacionadas com a atividade de enzimas associadas à biossíntese de novos tecidos, uma vez que, com o processo de deterioração das sementes, estas enzimas tornam-se menos eficientes para exercer sua atividade catalítica. Neste contexto, a enzima α -amilase desempenha papel importante para a germinação das sementes de milho, uma vez que está envolvida na degradação do amido e na mobilização de reservas durante a germinação.

Embora existam na literatura trabalhos relacionando a qualidade fisiológica das sementes com as condições de armazenamento, há ainda muito a ser esclarecido quanto ao efeito destas sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas que levam à deterioração das sementes de milho. Considerando que o principal desafio das pesquisas com armazenamento de sementes está na identificação de características que permitam avaliar precocemente o avanço da deterioração, o monitoramento destas alterações pode constituir uma ferramenta eficiente para a avaliação da longevidade e potencial fisiológico das sementes.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três ambientes na qualidade fisiológica e nas atividades das enzimas peroxidase, catalase e α -amilase de sementes de milho durante o armazenamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A obtenção de altas produtividades agrícolas está relacionada, entre outros fatores, com a qualidade das sementes utilizadas para a implantação das novas lavouras. A utilização de sementes de alta qualidade fisiológica e sanitária é considerada fundamental, pois aumenta a probabilidade de sucesso na atividade agrícola por permitir o rápido estabelecimento da cultura, reduzindo os possíveis riscos na implantação de uma lavoura com estande uniforme.

A obtenção de uma germinação rápida e estande uniforme tem grande importância para a cultura do milho por esta apresentar padrão unicolmo, com a produção de uma espiga por planta, não tendo a capacidade de compensação da população. Assim, a não obtenção de uma população próxima da ótima reflete na redução da produção de grãos. Deve-se considerar também que o milho apresenta ciclo determinado pela soma térmica. Dessa maneira, uma emergência desuniforme pode ocasionar heterogeneidade na maturação das plantas e, assim, influenciar a qualidade das sementes colhidas (LUDWIG et al., 2009).

As condições durante a produção, colheita e pós-colheita influenciam a qualidade final das sementes. A qualidade das sementes no momento da semeadura depende do cuidado em manter, durante o armazenamento, a qualidade obtida no início deste processo.

2.1 Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de milho

A qualidade das sementes de milho é máxima na maturidade fisiológica, após este ponto inicia-se um processo contínuo de deterioração evidenciada pela redução do vigor e do poder germinativo, podendo culminar na sua morte. A deterioração das sementes é um processo inevitável e irreversível, manifestada por uma série de alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas (CHING e SCHOOLCRAFT, 1968; BAUDET, 2003; MARCOS FILHO, 2005). Porém, a velocidade em que esta ocorre depende e pode ser controlada, em parte, pelo emprego de técnicas adequadas de colheita, secagem, beneficiamento e pelo adequado manejo das condições do ambiente durante o período de armazenamento (BAUDET, 2003).

O armazenamento é uma etapa de importância fundamental no processo produtivo e na manutenção da qualidade fisiológica das sementes, visto que esta não pode ser melhorada durante este período (VILLELA e PERES, 2004). Assim, torna-se necessário o conhecimento dos fatores que afetam a qualidade das sementes para o desenvolvimento e aplicação de tecnologias que evitem ou minimizem as perdas durante este período.

A massa de sementes armazenada constitui um sistema ecológico em que a preservação de sua qualidade, ou a sua deterioração, é resultado da interação entre as variáveis físicas (temperatura, umidade, propriedades físicas e termo-físicas das sementes e variáveis meteorológicas); variáveis químicas (disponibilidade de oxigênio intergranular); e variáveis biológicas internas (longevidade, maturidade, metabolismo e germinação) e externas (leveduras, fungos, insetos e roedores) das sementes (FARONI, 1998).

No ambiente de armazenamento, a conservação da qualidade das sementes está relacionada principalmente com o seu teor de água, a temperatura e umidade relativa do ar e a disponibilidade de oxigênio no ambiente intergranular. Geralmente, é favorecida pela diminuição da atividade metabólica decorrente de reduções no teor de água das sementes, da temperatura e umidade relativa do ar e da concentração de oxigênio (ROBERTS, 1973). Baixa umidade das sementes e baixa temperatura ambiente, associadas com menor umidade relativa do ar no ambiente de armazenamento, são importantes para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes por períodos prolongados.

Os principais fatores ambientais, que afetam a qualidade das sementes durante o armazenamento e que podem ser manipuladas pelo homem, são a temperatura e a umidade relativa do ar (CHANG et al., 1994; DELOUCHE, 2002; BAUDET, 2003). A maioria das espécies vegetais apresenta melhor conservação das sementes em temperaturas baixas. Delouche et al. (1973), Mora e Echandi (1976) e Maeda et al. (1987) recomendam que as condições ideais para a conservação de sementes de milho são aquelas que combinam temperaturas abaixo de 20°C e teor de água das sementes em torno de 12%.

Burges e Burrel (1964) estabeleceram um diagrama geral da conservação de cereais indicando a natureza dos riscos de deterioração em função do teor de água das sementes e da temperatura de armazenamento. Os autores destacam que quando a temperatura da massa ultrapassa 18°C sempre há riscos de má conservação do produto e que temperaturas mais baixas podem compensar, até certo ponto, maiores teores de água das sementes sobre a preservação da sua qualidade.

A temperatura de armazenamento influencia a umidade de equilíbrio das sementes, uma vez que estas são higroscópicas e, assim, podem absorver ou ceder água ao ambiente até atingir o equilíbrio higroscópico. O equilíbrio higroscópico ocorre quando há uma igualdade de tensões entre a umidade da semente e a umidade relativa do ar, em uma dada temperatura. A umidade de equilíbrio de sementes de milho armazenadas a uma mesma umidade relativa do ar é maior quando a temperatura é mais baixa; por exemplo, se a umidade relativa do ar é

de 60% a umidade de equilíbrio das sementes será em torno de 13,83% em ambiente com temperatura a 10°C, e de 11,66% a temperatura de 35°C (CHUNG e PFOST, 1967).

De acordo com Lacerda Filho et al. (2007), milho armazenado em condições de umidade e temperatura do ar intergranular que possibilitem a manutenção da umidade de equilíbrio podem manter sua qualidade durante longos períodos sem perder ou ganhar umidade. Os mesmos autores afirmam que se a temperatura for mantida baixa, de 14 a 20°C, não haverá redução de peso por perdas de água, além de ser um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de insetos e levar a uma significativa queda na infestação por fungos.

De maneira similar ao que ocorre com a umidade, as sementes tendem a entrar em equilíbrio térmico com a temperatura do ar que as circunda; assim, em condição de baixa temperatura as mesmas irão reduzir a sua temperatura e, conseqüentemente, todo o metabolismo que necessita de energia térmica para ocorrer será reduzido, levando à diminuição das atividades fisiológicas e das perdas em virtude da respiração e oxidação dos carboidratos das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Harrington (1972) estabeleceu um critério simples relacionando a viabilidade das sementes com o teor de água e a temperatura de armazenamento: para sementes de cereais e oleaginosas, com teor de água de 5 a 14% e em temperaturas de 0 a 40°C; o período de viabilidade das sementes é dobrado a cada decréscimo de 1% de umidade, e/ou a cada decréscimo de 5°C na temperatura de armazenagem.

Heinrich (1989) estudou a influência da temperatura de armazenamento e do teor de água da semente sobre a perda de matéria seca em milho e concluiu que as perdas são elevadas com a elevação da temperatura de armazenamento. O autor enfatiza que estas perdas podem ser reduzidas em torno de 80 a 90% em um mês de armazenamento sob 10°C, comparado às perdas ocorridas em temperaturas de 25 e 35°C.

A semente, como todo organismo vivo, respira. No processo respiratório ocorre o consumo de reservas e a produção de calor, dióxido de carbono e água. Conseqüentemente, ocorre perda de matéria seca (peso) e aumento da umidade e temperatura. A temperatura está entre os fatores que mais influenciam o processo de respiração das sementes. O aumento da intensidade da respiração é proporcional ao aumento da temperatura da massa de sementes e depende do grau de umidade das mesmas. Generalizando, as elevações da temperatura e da umidade relativa do ar correspondem a elevações de perdas qualitativas do produto armazenado, relacionadas com as alterações metabólicas promovidas pelo ambiente e aos estímulos proporcionados à atividade de fungos, bactérias e insetos presentes.

James (1967) afirma que as baixas temperaturas e umidades relativas do ar do ambiente de armazenamento são responsáveis pela redução da intensidade do processo respiratório das sementes e, conseqüentemente, pela conservação de sua qualidade. Segundo Pomeranz (1974), o aumento da temperatura acelera a respiração dos grãos e este fato torna difícil a distinção entre a respiração da microflora e dos próprios grãos.

Bilia et al. (1994) avaliaram o comportamento de sementes de milho híbrido durante o armazenamento sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar e concluíram que a baixa temperatura (10°C) favoreceu a preservação da qualidade fisiológica das sementes. Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho e Silva (1994), trabalhando com milho e soja em armazém refrigerado (temperaturas inferiores a 20°C). Estes autores também comentam que a intensidade do efeito depende do tipo de embalagem e de sua posição na pilha quando a temperatura não é uniforme, porque o equilíbrio térmico é mais lentamente atingido na base e centro da pilha que na superfície.

Christensen e Kaufmann (1972) verificaram que sementes de soja armazenadas em temperatura de 15°C permaneceram viáveis por 24 semanas, enquanto que as armazenadas sob 25°C apresentaram queda significativa da germinação após 12 semanas. Demito e Afonso (2009), em trabalho com resfriamento artificial de sementes de soja a 12°C antes do ensaio, verificaram que as sementes resfriadas mantiveram o índice de germinação acima do padrão comercial, após 140 dias de armazenamento, com uma pequena redução de 82% para 81%, enquanto que aquelas não resfriadas apresentaram uma queda acentuada na germinação, de 82% para 69%; conseqüentemente, ficaram abaixo do padrão comercial e foram descartadas.

Como já citado, a temperatura exerce influência sobre o metabolismo das sementes, pois condiciona a taxa de ocorrência das reações químicas e enzimáticas, afetando a sua longevidade. Quanto menor a temperatura, menores serão as reações que ocorrem durante o período de armazenamento e, assim, menor será a deterioração das sementes (BAUDET, 2003), evidenciada pela redução da germinação, desorganização das membranas celulares, perda da capacidade de seletividade de íons (FRANÇA NETO et al., 1999; VIEIRA e KRYZANOWSKI, 1999), decréscimo da tolerância às condições adversas durante a germinação, redução do vigor e morte das sementes (BASAVARAJAPPA et al., 1991).

Outro benefício da baixa temperatura de armazenamento está relacionado com os fatores bióticos externos das sementes: microrganismos, fungos e insetos. Na literatura há um grande número de trabalhos sobre a influência da baixa temperatura sobre a presença e a atividade de fungos e insetos, relacionando-os com a deterioração das sementes durante este

período (DHINGRA, 1985; LAZZARI, 1997; SUN e BYRNE, 1998; DOSLAND et al., 2006). A baixa temperatura de armazenamento pode inibir a germinação dos esporos dos fungos e a eclosão dos ovos dos insetos, reduzir a atividade, o crescimento e a taxa de reprodução, prolongar o ciclo biológico e aumentar a mortalidade, principalmente de insetos nos estádios imaturos.

Esporos de fungos e ovos de insetos, quando presentes nas sementes no início do armazenamento, geralmente encontram-se em estado de latência em função das condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Porém, as interações do ambiente com a massa de sementes armazenadas como, por exemplo, a elevação da temperatura, podem gerar alterações que se tornem favoráveis ao seu desenvolvimento, levando à germinação dos esporos e eclosão dos ovos (DHINGRA, 1985; LAZZARI, 1997).

A atividade de fungos e insetos em sementes com teores de água inferiores a 8% e temperaturas abaixo de 20°C é bastante reduzida (BEWLEY e BLACK, 1994), bem como o seu desenvolvimento (LAZZARI, 1997). A redução da temperatura da massa de grãos a 15°C mostra-se eficiente para a redução da atividade de água, reduzindo também a atividade de insetos e fungos (SUN e BYRNE, 1998).

2.2 Atividade enzimática

Os seres vivos são organismos complexos e organizados, onde cada uma das partes apresenta uma função específica. As células vivas são consideradas “máquinas químicas” que funcionam a base de energia química que, por sua vez, pode ser produzida pelos organismos por uma série de reações químicas. Entretanto, muitas das reações ocorrem lentamente para a manutenção dos processos vitais. A aceleração destas reações químicas ocorre por meio de catálise, executada por diversas enzimas.

As enzimas são proteínas com função específica de acelerar reações químicas. Elas aceleram a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos, quando comparadas com as reações correspondentes não-catalisadas. Para que a proteína seja classificada como enzima, ela deve apresentar alta eficiência catalítica, demonstrar alto grau de especificidade em relação aos seus substratos e aos seus produtos, acelerar a velocidade da reação em 10^6 a 10^{12} vezes mais que a reação correspondente não-catalisada, não ser consumida ou alterada ao participar da catálise, não alterar o equilíbrio das reações e ter sua atividade regulada geneticamente ou pelas condições metabólicas (LEHNINGER, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Segundo Taiz e Zeiger (2009), as enzimas catalisam praticamente todas as reações bioquímicas do metabolismo celular, acelerando a velocidade das reações, sem, no entanto, participar delas como reagente ou produto. Atuam também como reguladoras do complexo de reações, sendo consideradas como unidades funcionais do metabolismo celular.

Dentre os diversos processos envolvidos no mecanismo de deterioração das sementes estão as alterações fisiológicas e bioquímicas e, entre estas, as alterações nas atividades de diversas enzimas e isoenzimas. De acordo com Market e Moller (1959), o termo isoenzima refere-se às múltiplas formas moleculares de uma enzima, com afinidade para substratos idênticos ou similares, que ocorrem em um organismo. A análise de isoenzimas, através de técnicas de eletroforese, são utilizadas em estudos relacionados com a regulação gênica, bioquímica e ontogênica e também em relação às mudanças na qualidade fisiológica de sementes (ISTA, 1992).

As alterações enzimáticas vem sendo estudadas, dentro da área de tecnologia de sementes, com o objetivo de encontrar indicadores confiáveis relacionados com o potencial fisiológico das sementes e esclarecer os processos que levam à deterioração das mesmas. As enzimas podem servir como indicadores da deterioração, possibilitando a avaliação dos eventos bioquímicos decorridos durante o processo de deterioração e germinação das sementes (ALBUQUERQUE et al., 2009).

As avaliações enzimáticas tem sido utilizadas por pesquisadores para caracterização de lotes com diferentes níveis de deterioração, tolerância à dessecação, na avaliação da qualidade fisiológica de sementes armazenadas ou submetidas a diferentes testes e aos processos de germinação de diversas espécies vegetais.

Entre as enzimas frequentemente associadas ao processo de deterioração das sementes, destacam-se as antioxidantes ou removedoras de radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), peróxidos e produtos tóxicos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX). Também as enzimas envolvidas no processo respiratório como a malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH); e outras como a glutamato desidrogenase (GDH) e fosfatase ácida (ACP), envolvidas no metabolismo celular.

As superóxido dismutases constituem o primeiro grupo de enzimas que catalisam a reação de dismutação dos radicais livres para oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McDONALD, 1999). Contudo, apesar de sua efetividade na neutralização de oxigênio reativo, sua atuação isolada é pouco funcional para a proteção da semente devido a formação de H_2O_2 na reação. Embora este último seja menos reativo, em alta concentração

torna-se tóxico e, assim, torna-se necessário a formação de um sistema antioxidante no qual tem importante participação a peroxidase e catalase.

Segundo Copeland e McDonald (2001), as avaliações que melhor detectam o início da deterioração das sementes são as relacionadas com enzimas envolvidas na biossíntese de novos tecidos, pois estas tornam-se menos eficientes devido à deterioração. Neste contexto, a enzima α -amilase desempenha papel importante para a germinação das sementes, principalmente dos cereais como o milho, uma vez que está envolvida na mobilização de reservas durante a germinação.

Neste trabalho foram estudadas as enzimas peroxidase (POX), catalase (CAT) e α -amilase (AM).

2.2.1 Peroxidase (EC 1.11.1)

A enzima peroxidase está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e atua e tem importante papel na desintoxicação celular, eliminando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEHNINGER, 2006).

O peróxido de hidrogênio é uma substância reativa capaz de se difundir a partir do seu local de produção e inativar enzimas, principalmente por oxidação de grupos tióis essenciais (BOWLER et al., 1994). Ele pode ser convertido em outros radicais livres mais prejudiciais, como o radical hidroxil, na presença de metais de transição como Fe^{3+} e Cu^{2+} , presentes nas células, pela Reação de Fenton (ACWORTH et al., 1997).

Os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio envolvem a peroxidação de lipídios, mudanças na composição dos ácidos graxos, perdas de fosfolipídios e mudanças estruturais, que afetam diretamente a estrutura das membranas, citada como uma das principais causas da deterioração das sementes. Contudo, os eventos deteriorativos não ocorrem isoladamente; assim, os danos às membranas mitocondriais tem efeito direto na respiração, os danos nas membranas do retículo endoplasmático e complexo de Golgi tem maior impacto sobre a síntese de proteínas e os danos ao DNA terão consequências sobre a atividade de transcrição (BRACINNI et al., 2001).

Essa enzima é removedora de peróxido e a perda de sua atividade pode tornar a semente mais sensível aos efeitos do O_2 e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de

membrana, o que provoca a degeneração de suas membranas e o comprometimento de seu vigor.

Spinola et al. (2000) observaram redução gradativa da atividade da peroxidase em sementes de milho submetidas ao envelhecimento acelerado até períodos de 72 horas, e o desaparecimento das bandas dos padrões eletroforéticos desta enzima em períodos mais longos. Os autores verificaram correlação da atividade desta enzima com os resultados detectados pelos testes de qualidade fisiológica.

2.2.2 Catalase (EC 1.11.1.6)

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada nos glioxissomos das células vegetais. Do mesmo modo que a peroxidase, ela atua na desintoxicação celular, transformando espécies reativas de oxigênio em substâncias não reativas e na decomposição do peróxido de hidrogênio por reação de dismutação (LEHNINGER, 2006).

Por serem enzimas “scavenger” (removedoras de peróxidos), a perda da atividade da catalase e peroxidase pode ser relacionada com o aumento do acúmulo de peróxidos em sementes envelhecidas e deterioradas. Basavarajappa et al. (1991) e Jeng e Sun (1994), verificaram aumento da peroxidação de lipídios com a evolução da deterioração das sementes, e Abdul-Baki e Anderson (1972) estabeleceram uma relação entre a atividade das peroxidases com a viabilidade das sementes.

Vieira et al. (2011) verificaram aumento da atividade das enzimas esterase e catalase com o envelhecimento de sementes de arroz armazenadas em ambiente a 9°C/48%UR. Entretanto, os autores concluem que os resultados não foram consistentes para avaliar a eficiência destas como indicadores da qualidade fisiológica das sementes de arroz.

Ferreira et al. (2007) observaram maior atividade da catalase e superóxido dismutase em sementes de milho tratadas com bioestimulante e armazenadas por seis meses, em relação àquelas tratadas na pré-semeadura. Os autores sugerem que pode ter ocorrido um efeito fitotóxico dos produtos, estimulando o aumento da atividade destas enzimas.

2.2.3 α -amilase (EC 3.2.1.1)

A enzima α -amilase apresenta importância fundamental durante a germinação das sementes, especialmente de cereais como o milho. As sementes de cereais apresentam como principais substâncias de reserva os carboidratos (cerca de 70%) e as proteínas (8-15%). As sementes de milho possuem, em média, 83% da matéria seca constituída por carboidratos,

principalmente amido (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000) que é o principal carboidrato de reserva dos cereais, constituindo cerca de 72% da semente de milho e 88% de seu endosperma (MEDCALF, 1973). O amido é um polímero de glicose organizado em estruturas granulares insolúveis, os grãos de amido, constituídos por dois tipos de moléculas; a amilose e a amilopectina.

Nas gramíneas, o endosperma é um bloco de tecido morto cercado por uma camada de células vivas, a camada de aleurona, que sintetiza as enzimas necessárias para a degradação das reservas que possibilitam a germinação das sementes. Devido à sua característica granular e insolúvel, o amido da semente é resistente ao ataque enzimático (FANNON et al., 1992); assim, o início de sua degradação requer enzimas especializadas que, geralmente, não existem ou apresentam atividade muito baixa na semente madura e quiescente (ZEIGLER, 1995). Sendo assim, a produção de um mecanismo de degradação do amido altamente eficiente é um dos fatores chave para a germinação e vigor das sementes.

A mobilização das reservas das sementes ocorre após o alongamento e emissão da raiz primária, sendo um evento pós-germinativo, porém a degradação dessas reservas inicia nas primeiras horas de embebição de sementes não dormentes. A degradação do amido durante a germinação ocorre por meio de duas vias, a via fosforolítica e a via hidrolítica (amilolítica).

A via hidrolítica de degradação do amido envolve a ação de quatro enzimas: α -amilase, β -amilase, enzima desramificadora e α -glicosidase.

A enzima α -amilase cliva, ao acaso, as ligações α -1-4 das cadeias de amilose e da amilopectina. Cerca de 90% do açúcar liberado pela hidrólise do amido, catalisada pela α -amilase, consiste de maltose (dissacarídeo formado por duas moléculas de glucose unidas por ligação α -1-4). O restante é encontrado na forma de pequenas “dextrinas limite” (pontos de ramificação consistindo de 4 a 10 resíduos de glucose).

A β -amilase degrada a molécula de amilose atacando especificamente a segunda ligação, começando do final não redutor da cadeia, produzindo exclusivamente maltose. A β -amilase poderá degradar a amilopectina, porém diferente da α -amilase, porque ela não atua dentro da molécula. Assim, podem restar grandes cadeias ramificadas entre os pontos de ramificação (grandes dextrinas limite).

A enzima desramificadora, também chamada de dextrinase limite, atua clivando as ligações α -1-6 nos pontos de ramificação, permitindo que as amilases (α -amilase e β -amilase) continuem degradando o amido até maltose.

A α -glicosidase realiza a etapa final da hidrólise do amido, convertendo a maltose em duas moléculas de glicose.

Em cereais, os produtos de digestão do amido (principalmente glicose e maltose) são absorvidos pelo escutelo e, então, convertidos para sacarose. A sacarose é transportada para o eixo embrionário, onde é utilizada para o crescimento da raiz e da parte aérea (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1978). As enzimas “pré-existent” são detectadas com baixa atividade em sementes secas e, durante a embebição, são ativadas e secretadas para as células onde ocorre a degradação das reservas. Durante a embebição também ocorre a síntese “de novo” das enzimas não detectadas, a partir de aminoácidos.

Entre as enzimas amilolíticas ativadas e sintetizadas durante a germinação, acredita-se que a α -amilase exerça papel fundamental na degradação de amido em sementes de cereais devido ao seu poder de iniciar a hidrólise de grãos de amido insolúveis e por representar 90% da atividade amilolítica do início da germinação de sementes de milho (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1978). Usualmente não está presente nas sementes secas, sendo sintetizada e secretada pela camada de aleurona durante o processo de germinação.

Estudos sobre o desenvolvimento e regulação hormonal da expressão de genes revelam que a indução da α -amilase resulta na sua síntese "de novo", sendo acompanhada por um aumento pronunciado no mRNA para a proteína. Nos cereais, esta indução responde positivamente às giberelinas (GA) e negativamente ao ácido abscísico. A giberelina é secretada pelo embrião para as camadas de aleurona e escutelo, induzindo a síntese de mRNA da α -amilase que aumenta em paralelo com a atividade de síntese da enzima no cotilédone (BECK e ZIEGLER, 1989).

Embora diferentes tipos de enzimas sejam capazes de liberar “*in vitro*” glicanos solúveis a partir de grânulos de amido purificados, acredita-se que a única enzima capaz de fazê-lo “*in vivo*” seja a α -amilase. Ela parece apresentar papel central no processo de hidrólise do amido e, por possuir atividade endo-amilolítica, a α -amilase promove alterações marcantes no grão de amido, fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos nos cereais, capaz ainda de degradá-los inteiramente (BECK e ZIEGLER, 1989).

A atividade da α -amilase está relacionada com a germinação das sementes. Aragão et al. (2003) observaram maior germinação e vigor, menor teor de proteínas totais e maior atividade amilolítica em sementes de milho superdoce armazenadas por oito meses em câmara seca (25°C/40%UR) e submetidas a pré-embebição em solução de 50 mg.L⁻¹ GA₃. Os autores

relacionam a maior germinação e vigor das sementes tratadas com a maior atividade da α -amilase. Resultados semelhantes foram observados em sementes de arroz por Shaw e Ou-Lee, citados por Das e Sen-Mandi (1992), onde verificaram que a atividade da α -amilase é necessária para a germinação das sementes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Departamentos de Fitotecnia e Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - Minas Gerais, durante o período de dezembro de 2010 a março de 2012.

Foram utilizados sementes de milho da variedade BR 106, peneira 22 L, categoria S1, adquiridas da empresa Sementes Boa Esperança LTDA, cadastrada no Registro Nacional de Sementes e Mudanças (RENASSEM) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

3.1 Obtenção dos lotes

Devido a indisponibilidade da empresa em fornecer diferentes lotes, optou-se pela separação das sementes em duas partes e por submeter uma delas a um estresse (envelhecimento acelerado) para a diferenciação dos lotes. O uso do lote de sementes envelhecidas artificialmente permite o controle mais preciso das variáveis avaliadas, pois as diferenças no potencial fisiológico são menos dependentes do histórico das sementes.

Após o recebimento das sementes, estas foram expurgadas com fosfato de alumínio (Fosfina), de acordo com as indicações do fabricante (2 g i.a.m⁻³). Em seguida foram homogeneizadas e divididas em duas partes para constituir os lotes.

- **Lote 1 (L1):** foi constituído por uma das partes resultantes da divisão do lote recebido.

- **Lote 2 (L2):** foi constituído por sementes submetidas a um estresse. Para tanto, as sementes foram colocadas em fina camada sobre telas de aço galvanizado acopladas sobre bandejas plásticas nas quais foi adicionada água destilada, e mantidas em câmara incubadora do tipo BOD, à temperatura de 41°C por 48 horas. Após este período, as sementes foram retiradas e mantidas em temperatura ambiente até seu teor de água atingir valor semelhante ao do Lote 1 ($\pm 14\%$).

3.2 Tratamentos

Obtidos os lotes, estes foram divididos em três partes cada um. Cada uma das partes foi subdividida em quatro para obtenção das repetições. As sementes foram acondicionadas

em embalagem de papel e armazenadas em três ambientes: A1) câmara fria ($12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{UR}$), A2) ambiente não controlado (laboratório) e A3) câmara controlada ($30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\% \text{UR}$), durante 0, 90, 180, 270, 360 e 450 dias.

Para determinar as condições do ambiente não controlado (laboratório) foi realizado o monitoramento da temperatura e umidade relativa do ar durante o período experimental. Os valores médios mensais das condições ambientais são apresentados na Figura 1. A temperatura média do período foi de $21,6^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 71%.

As temperaturas médias mensais variaram de 18°C (jul/2011) a $24,3^{\circ}\text{C}$ (fev/2012). A média das máximas mensais foi de $26,5^{\circ}\text{C}$, variando de 22,3 a $29,2^{\circ}\text{C}$; e das mínimas de 18°C , variando de 16 a $19,6^{\circ}\text{C}$.

A média mensal da umidade relativa do ar variou de 66 a 78%, observada em setembro/2011 e em dezembro/2011, respectivamente.

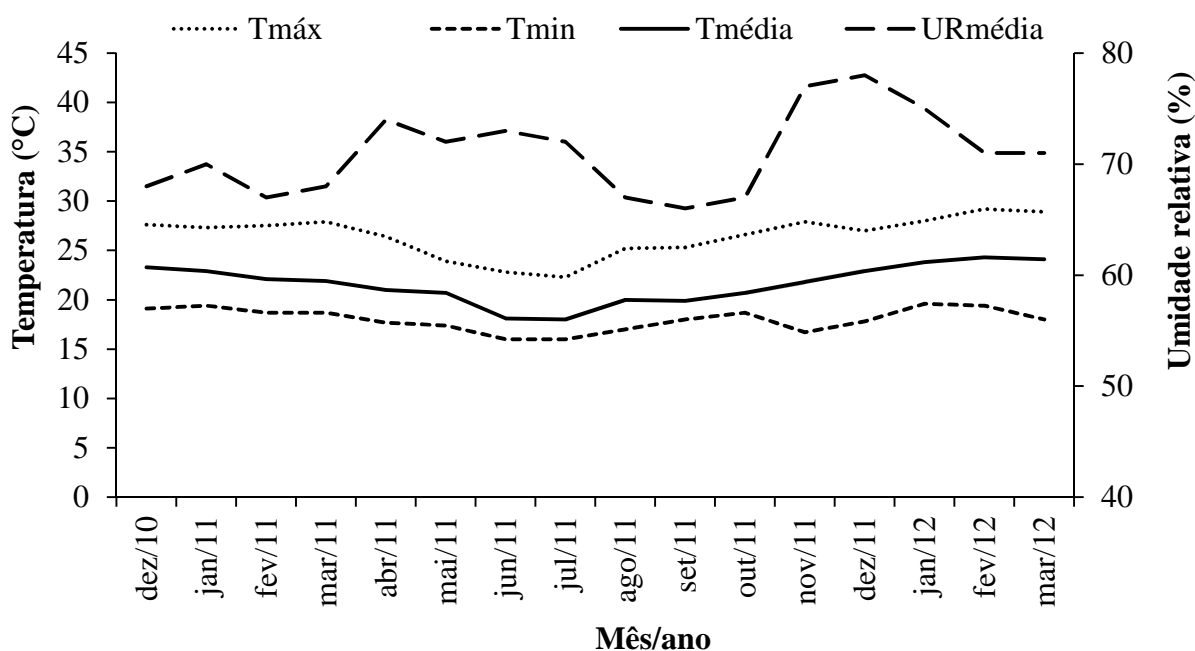


Figura 1. Valores médios mensais da temperatura máxima (Tmáx), mínima (Tmin) e média (Tmédia) e da umidade relativa média do ar (URmédia) do ambiente não controlado (laboratório), durante o armazenamento de sementes de milho de dezembro/2010 a março/2012, em Viçosa-MG.

3.3 Avaliações

As seguintes características das sementes foram avaliadas no início (0) e aos 90, 180, 270, 360 e 450 dias de armazenamento:

- **Teor de água das sementes:** realizado pelo método da estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}/24$ horas, utilizando-se duas réplicas de cada repetição, seguindo as recomendações das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de teor de água.

- **Teste de germinação:** quatro réplicas de 50 sementes por repetição foram distribuídas sobre substrato de papel Germitest, previamente umedecido com água no volume de 2,5 vezes o peso do papel seco, e confeccionados rolos que foram mantidos em germinador de câmara a temperatura de 25°C por sete dias. Foram contabilizadas as plântulas normais, anormais e mortas aos quatro e sete dias (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

- **Primeira contagem da germinação:** realizado em conjunto com o teste de germinação, pela contagem de plântulas normais aos quatro dias após a montagem do teste (NAKAGAWA, 1999). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

- **Condutividade elétrica:** foi conduzida utilizando-se quatro réplicas de 50 sementes por repetição colocadas em copos plásticos e pesadas em balança analítica (precisão 0,001 g), foram adicionados 75 mL de água destilada em cada copo e estes foram mantidos em BOD a temperatura de 25°C , por 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura da condutividade elétrica da solução de imersão utilizando-se um condutímetro Digimed CD-21. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999).

- **Teste de envelhecimento acelerado:** uma camada única e uniforme de sementes foi disposta sobre tela suspensa no interior de caixas plásticas tipo Gerbox, contendo 40 mL de água destilada, e mantidas em câmara incubadora BOD a temperatura de 41°C por 72 horas (SPINOLA et al., 2000). Após este período as sementes foram submetidas ao teste de germinação como descrito anteriormente, com quatro réplicas por repetição, e a contagem

realizada no quarto dia após a montagem do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

- **Teste de emergência em areia:** realizado seguindo recomendação das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Quatro réplicas de 50 sementes por repetição foram semeadas em bandejas contendo substrato de areia, dentro de casa de vegetação. A semeadura foi feita em linhas com espaçamento de 10 cm entre si e a profundidade de 3 cm. A umidade do substrato foi mantida com irrigações diárias durante a condução do teste. O número de plântulas emergidas foi contabilizado diariamente até que este permanecesse constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas emergidas.

- **Extração das enzimas:** as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme citado anteriormente, por períodos de 48 horas para extração das enzimas peroxidase e catalase, e por 70 horas para extração da enzima α -amilase. Após estes períodos, foram selecionadas as sementes que visivelmente iniciaram o processo de germinação, foram retirados a radícula e parte aérea e as sementes foram então acondicionadas em pacotes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer à temperatura de -20°C até a extração das enzimas (CONCEIÇÃO, 2011). Para extração das enzimas adicionou-se 10 mL de solução tampão a aproximadamente 2 g de material vegetal, que foram posteriormente triturados em dispersor ultra turrax até obtenção de uma massa homogênea, que foi centrifugada a $17.000\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ a 4°C , durante 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976).

- **Atividade enzimática da peroxidase (EC 1.11.1):** para extração desta enzima foi utilizada solução tampão contendo tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5, bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15M. Para determinação da atividade enzimática adicionou-se uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0) e 0,5 mL de H_2O_2 (1,8%). A quantidade de extrato enzimático utilizado variou com a amostra, completando-se 3 mL do meio de reação com água deionizada. A atividade enzimática foi determinada por espectrofotômetro, pela observação da variação da absorbância no comprimento de onda de 470 nm, a 25°C , e os resultados expressos em $\text{UA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína (NEVES, 2003).

- **Atividade enzimática da catalase (EC 1.11.1.6):** a solução tampão de extração foi constituída por tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 e polivinilpirrolidona (PVP) 1%. Para determinação da atividade enzimática da catalase foram misturados 0,85 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), 0,5 mL de H₂O₂ 30 mM e 0,15 mL de extrato enzimático. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro observando-se a variação da absorbância em comprimento de onda de 240 nm, a 25°C, e expressa em UA. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína (HODGES, 1997).

- **Atividade enzimática da α -amilase (EC 3.2.1.1):** a solução de extração foi constituída por tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,9 e cloreto de sódio 0,006 M. A partir de uma solução de maltose 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram realizadas cinco diluições da solução maltose (0, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e em cada tubo foram adicionados 500 μL de solução de ácido dinítrosalicílico - 3,5. Os tubos foram colocados em água fervente por cinco minutos e após resfriados. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 5 mL de água deionizada e estes foram agitados. Estas soluções foram utilizadas para estabelecer a curva padrão de maltose no espectrofotômetro, observando-se a absorbância em comprimento de onda de 540 nm. A solução de ácido dinítrosalicílico - 3,5 foi preparada da seguinte forma: 0,5 g de ácido dinítrosalicílico - 3,5 em 25 mL de água deionizada, 15 g de tartarato de potássio e sódio tetrahidratado e 10 mL de hidróxido de sódio 2 N. O volume foi completado com água deionizada para 50 mL. Essa solução foi preparada com aquecimento para facilitar a diluição. Para determinação da atividade enzimática, em tubos de vidro foram misturados 250 μL de extrato enzimático e 250 μL de amido 1%; estes foram deixados para reagir durante cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 μL da solução de ácido dinítrosalicílico - 3,5 e os vidros foram fervidos durante cinco minutos. Após resfriados, em cada um foram adicionados 5 mL de água deionizada. A determinação da atividade foi realizada em espectrofotômetro, observando-se a absorbância em comprimento de onda de 540 nm a 25°C, e expressa em UA. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína (WORTHINGTON, 1947).

3.4 Delineamento e análise estatística

O experimento foi instalado em esquema de parcela subdividida, tendo nas parcelas um esquema fatorial 3x2 (3 ambientes de armazenamento x 2 lotes) e nas subparcelas os dias de armazenamento, em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os dados

foram submetidos à análise de variância e, independentemente da significância, optou-se pelo desdobramento da interação do ambiente x lote x dias de armazenamento. Para os fatores qualitativos as médias foram comparadas utilizando-se o teste Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. E para o fator quantitativo os modelos de regressão foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão utilizando-se o teste t com nível de 5% de probabilidade, no coeficiente de determinação (R^2) e no fenômeno biológico descrito. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (SAEG, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios do teor de água das sementes dos lotes nos diferentes ambientes, em cada período de armazenamento avaliado. As sementes foram armazenadas com teor de água inicial de 14,13 e 14,07%, para os lotes 1 e 2, respectivamente.

Em cada período de armazenamento, não foram verificadas diferenças significativas do grau de umidade das sementes devido a combinação de lotes e ambientes.

Tabela 1. Teor de água (%) de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em três ambientes.

Ambiente	Dias de armazenamento					
	0		90		180	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12±2°C/60±5%UR	14,13aA	14,07aA	13,67aA	13,48aA	13,45aA	13,28aA
Não controlado	14,13aA	14,07aA	13,20aA	13,16aA	13,06aA	13,00aA
30±2°C/70±5%UR	14,13aA	14,07aA	13,23aA	13,10aA	13,01aA	12,90aA
Ambiente	270		360		450	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	12±2°C/60±5%UR	13,23aA	13,20aA	13,08aA	13,23aA	13,20aA
Não controlado	13,07aA	13,01aA	12,89aA	13,07aA	13,01aA	12,89aA
30±2°C/70±5%UR	12,39aA	12,09aA	12,28aA	12,39aA	12,09aA	12,28aA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, dentro de um mesmo lote e período de armazenamento, e por uma mesma letra maiúscula na linha, dentro de um mesmo ambiente e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que as sementes apresentaram grau de umidade relativamente uniforme e adequado para a realização dos testes, com variações dentro dos limites toleráveis, de 2 a 3 pontos percentuais (MARCOS FILHO, 2005). Este fato tem importância porque maiores

variações entre os teores de água das sementes podem interferir nos resultados dos testes aplicados, pois sementes mais úmidas, dentro de certos limites, podem apresentar maior velocidade de germinação e estabelecimento inicial de plântulas.

Ao longo armazenamento, ocorreu redução do grau de umidade em todas as sementes, independentemente da combinação do lote e ambiente de armazenamento (Figura 2). De modo geral, as sementes armazenadas em temperaturas mais elevadas apresentaram reduções maiores e mais rápidas do teor de água, com variações em torno de 1% nas sementes armazenadas em câmara fria, de 1,4% naquelas mantidas em ambiente não controlado e de 2% nas armazenadas em temperatura de 30°C.

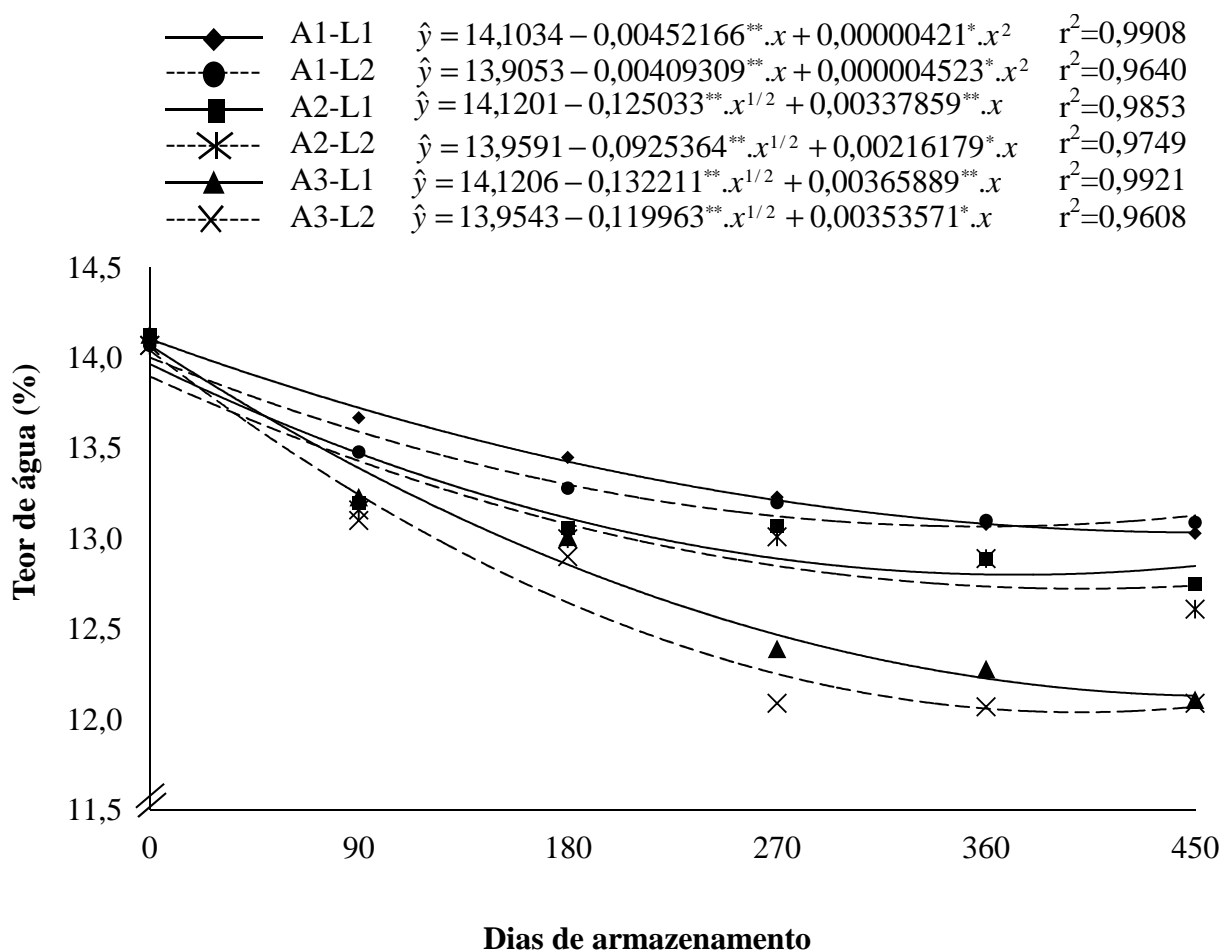


Figura 2. Teor de água de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: 12±2°C/60±5%UR; A2: Não controlado; A3: 30±2°C/70±5%UR; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1%, (*) significativo a 5% pelo teste “t”.

As sementes apresentaram tendência em manter seu grau de umidade após certo período de armazenamento; isso ocorre porque as sementes são higroscópicas e, assim, podem absorver ou ceder água ao ambiente até atingir o ponto de equilíbrio higroscópico (PEH), onde há igualdade de tensões entre a umidade da semente e a umidade relativa do ar.

De acordo com Baudet (2003), a temperatura de armazenamento influencia no tempo que a semente leva para atingir o equilíbrio higroscópico e, em sementes de milho mantidas a uma mesma umidade relativa do ar, este ponto é atingido duas vezes mais rápido à temperatura de 30°C que a 10°C.

Neste trabalho, as sementes atingiram a umidade de equilíbrio em torno 12% aos 270 dias, quando armazenadas a 30±2°C/70±5%UR, e em torno de 13% aos 360 dias quando armazenadas a 12±2°C/60±5%UR ou em ambiente não controlado, porém, nestas últimas, observa-se ainda uma pequena variação do grau de umidade até o final do período avaliado, que pode ser atribuída à flutuação da umidade relativa do ar, uma vez que esta não foi constante.

A redução do teor de umidade das sementes na câmara fria pode ser explicada pela menor umidade relativa deste ambiente, uma vez que estas foram armazenadas em embalagem permeável, houve troca de umidade com o meio.

Os valores da umidade de equilíbrio das sementes, observados neste trabalho, estão abaixo dos valores observados por Chung e Pfof (1967), que estabeleceram uma tabela da umidade de equilíbrio de sementes de milho em relação à temperatura e umidade relativa do ar do ambiente de armazenamento. Segundo os autores, a uma umidade relativa do ar de 60% a umidade de equilíbrio seria de 13,83% e em umidade relativa do ar de 70% o equilíbrio higroscópico das sementes seria atingido com valores de 14,43% a 20°C e de 13,63% a 30°C.

Lacerda Filho et al. (2007) observaram que milho armazenado em ambiente que possibilita a manutenção da umidade de equilíbrio das sementes, manteve sua qualidade por períodos mais prolongados, sem significativas perdas ou ganhos de umidade. Os autores também ressaltaram que, a utilização de baixas temperaturas de armazenamento reduz a deterioração das sementes, por proporcionarem condições desfavoráveis ao desenvolvimento de insetos e significativa queda na infestação por fungos.

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios das características iniciais dos dois lotes de sementes: germinação e vigor, determinado pela primeira contagem da germinação, envelhecimento acelerado, emergência em leito de areia e pela condutividade elétrica.

Tabela 2. Caracterização inicial de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, quanto a germinação (GER), primeira contagem da germinação (PCG), envelhecimento acelerado (EA), emergência em areia (EMG) e condutividade elétrica (CE).

Ambiente	Vigor									
	GER		PCG		EA		EMG		CE	
	(%)		(%)		(%)		(%)		($\mu\text{S. cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12 \pm 2°C/60 \pm 5%UR	99,00aA	97,00aA	97,50aA	94,00aA	96,00aA	93,00aA	95,00aA	95,50aA	10,28aA	11,87aA
Não controlado	99,00aA	97,00aA	97,50aA	94,00aA	96,00aA	93,00aA	95,00aA	95,50aA	10,28aA	11,87aA
30 \pm 2°C/70 \pm 5%UR	99,00aA	97,00aA	97,50aA	94,00aA	96,00aA	93,00aA	95,00aA	95,50aA	10,28aA	11,87aA

Médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, para uma mesma característica, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Verificou-se que os dois lotes de sementes apresentavam elevado potencial fisiológico inicial, com germinação de 99 e 97% para os lotes 1 e 2, respectivamente.

Não foi observado efeito imediato na qualidade fisiológica das sementes entre os lotes devido ao estresse provocado no lote 2, quando este foi mantido por 48 horas em ambiente úmido a 41°C, anterior ao seu armazenamento.

Os danos provocados nas sementes devido a algum tipo de injúria ou estresse podem causar efeito imediato ou latente. Os efeitos imediatos podem ser detectados logo após o dano causado, porém os efeitos latentes são manifestados somente após certo tempo. No armazenamento de sementes, os efeitos latentes demonstram a velocidade da taxa de deterioração das mesmas, determinando sua viabilidade e seu potencial de armazenamento. Estes são influenciados, principalmente, pela qualidade inicial das sementes e pelas condições de armazenamento (BAUDET, 2003).

De acordo com os resultados deste trabalho, valores de condutividade elétrica de 10,28 e 11,87 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ podem ser associados a alto vigor das sementes de milho, variedade BR 106, comprovados pelo teste de germinação e demais testes de vigor realizados no período que antecedeu o armazenamento das sementes. A condutividade elétrica baseia-se no princípio de que, com o processo de deterioração, ocorre a lixiviação de constituintes celulares das sementes embebidas em água, devido a perda da integridade dos sistemas de membranas celulares que ocorre em função da desidratação das sementes, e é mais elevada no início da embebição, declinando a medida que ocorre a reorganização dos sistemas de membranas durante o processo de reidratação. Assim, baixos valores de condutividade indicam alto vigor das sementes (VIEIRA e KRYZANOWSKI, 1999).

Os resultados médios do teste de germinação de cada lote nos diferentes ambientes, em cada período de armazenamento, são apresentados na Tabela 3.

Observou-se efeito significativo de lotes apenas aos 360 e 450 dias para as sementes mantidas a $30\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$, e aos 450 dias para aquelas em ambiente não controlado. A redução mais acentuada da germinação do lote 2, a partir destes períodos, pode ser atribuída ao efeito latente provocado pelo estresse ao qual foi submetido antes do armazenamento e agravado pela maior temperatura do ambiente.

A germinação foi afetada pelo ambiente de armazenamento a partir dos 90 dias para ambos os lotes, com maiores decréscimos para as sementes armazenadas por maior período e em maior temperatura. Em todos os períodos avaliados, o ambiente de câmara fria mostrou-se

superior na manutenção da germinação, diferenciando-se dos demais. A partir dos 270 dias, o ambiente não controlado mostrou-se superior ao ambiente 3 e inferior ao ambiente 1.

Tabela 3. Germinação (%) de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em três ambientes.

Ambiente	Dias de armazenamento					
	0		90		180	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12±2°C/60±5%UR	99,00aA	97,00aA	98,00aA	96,00aA	96,50aA	94,50aA
Não controlado	99,00aA	97,00aA	96,50abA	93,50abA	94,00aA	91,50aA
30±2°C/70±5%UR	99,00aA	97,00aA	93,00bA	90,50bA	86,00bA	85,50bA
Ambiente	270		360		450	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	12±2°C/60±5%UR	96,50aA	93,00aA	92,00aA	89,50aA	91,00aA
Não controlado	90,00bA	89,00aA	87,00bA	86,00aA	86,00bA	80,00bB
30±2°C/70±5%UR	79,00cA	77,30bA	74,50cA	69,00bB	68,50cA	51,00cB

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, dentro de um mesmo lote e período de armazenamento, e médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na linha, dentro um de mesmo ambiente e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O ambiente a baixa temperatura foi eficiente na manutenção da germinação acima do padrão mínimo exigido para comercialização de sementes certificadas de milho ($GER \geq 85\%$) (IMA, 2012), armazenadas por 450 dias, apresentando após este período, potencial germinativo de 91,0 e 88,5% para os lotes 1 e 2, respectivamente. Nessas condições a conservação das sementes é favorecida, pois a baixa temperatura reduz a atividade de enzimas envolvidas no processo de respiração que é considerada como um dos principais processos responsáveis pela perda da viabilidade das sementes (HARRINGTON, 1972).

O potencial germinativo, após 450 dias, no ambiente não controlado foi de 86,0 e 80,0%, e no ambiente 3 de 68,5 e 51,0%, para lotes 1 e 2, respectivamente.

Outro fator a ser considerado é a validade do teste de germinação. Para sementes de milho o teste de germinação é válido por 12 meses, e a reanálise por 8 meses (IMA, 2012). Assim, mesmo que as sementes apresentem alto potencial germinativo no início do armazenamento, se estas forem armazenadas em condições desfavoráveis à manutenção da qualidade fisiológica, podem ser comercializadas abaixo do padrão. Em consequência disso, podem ocorrer falhas no estabelecimento do estande, reduzindo a produtividade.

A germinação decresceu linearmente ao longo do armazenamento, com decréscimo bastante acentuado nas sementes mantidas no ambiente a $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$ (Figura 3).

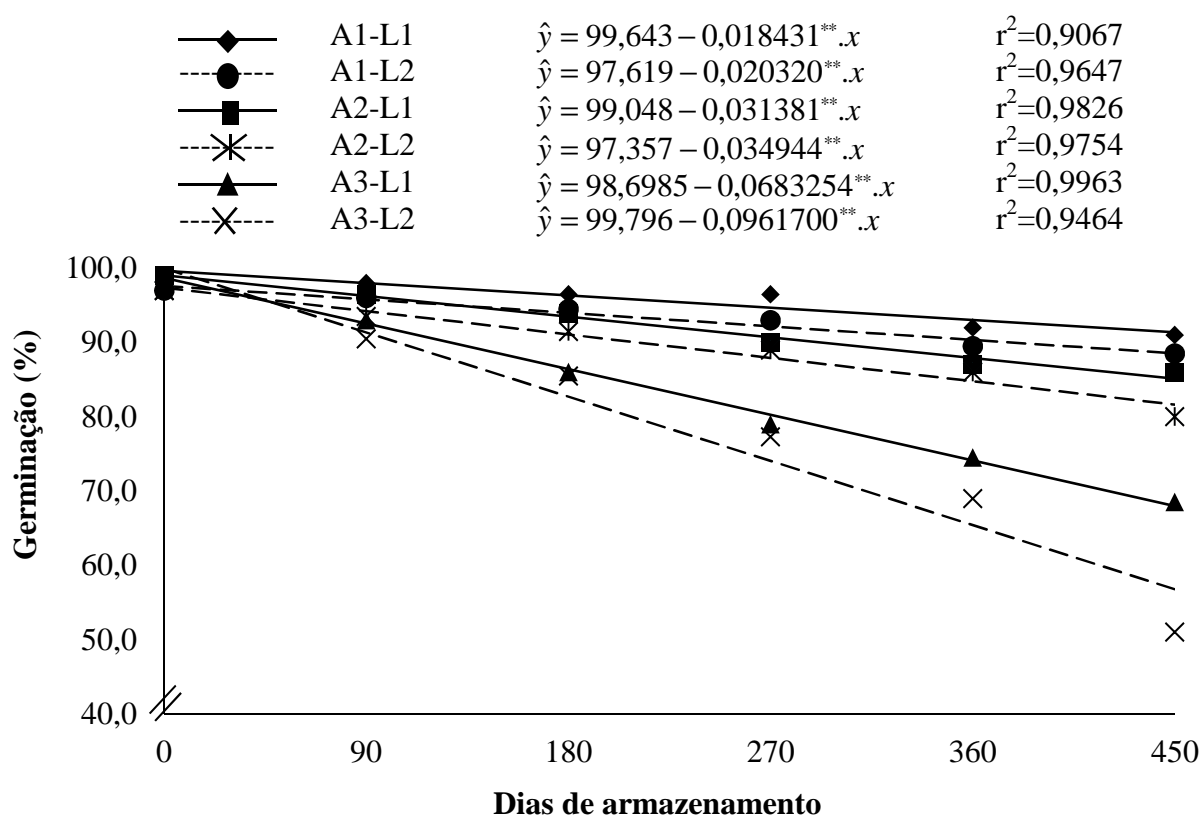


Figura 3. Germinação de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1% pelo teste “t”.

Considerando-se o padrão comercial de germinação mínima das sementes, os resultados deste trabalho demonstram que as sementes do lote 1 poderiam ser armazenadas por 450 dias em câmara fria ou em ambiente não controlado, ou por 180 dias em ambiente a

$30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$. O lote 2 poderia ser armazenado por até 450 dias a $12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$, por 360 dias em ambiente não controlado, ou por até 180 dias a $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$. Após estes períodos ocorre a perda do padrão germinativo das sementes.

Portanto, a longevidade das sementes de milho é influenciada pelas condições de armazenamento e pela qualidade inicial das sementes. Embora os testes realizados no início do armazenamento não tenham demonstrado nenhuma diferença significativa na qualidade fisiológica das sementes dos dois lotes, o estresse causado no lote 2 parece ter causado um efeito latente, levando a maiores decréscimos no potencial germinativo destas sementes, evidenciando maior velocidade na taxa de deterioração das mesmas.

Este trabalho evidencia a influencia da temperatura sobre o potencial de armazenamento das sementes de milho. Portanto, devem ser considerados no momento do armazenamento, o histórico da semente, sua qualidade fisiológica inicial, o período que as sementes ficarão armazenadas e as condições do ambiente, especialmente da temperatura do ar, evitando-se assim o descarte dos lotes e/ou a comercialização de sementes abaixo do padrão comercial exigido.

O aumento da temperatura de armazenamento levou ao aumento do número de plântulas anormais com o aumento do período de envelhecimento das sementes (dados não apresentados), demonstrando que estas deixaram de apresentar condições para o desenvolvimento adequado. Do mesmo modo, foi observado um grande número de sementes mortas entre aquelas armazenadas em temperatura elevada, a partir dos 360 dias.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os encontrados por Carvalho et al. (2010), quando armazenaram sementes de milho em câmara fria e verificaram germinação de 96% após cinco meses de armazenamento. No entanto, diferem dos resultados do mesmo autor, quando as sementes foram armazenadas em condição ambiente em Gurupi – TO (temperatura média $25,5^{\circ}\text{C}$) e apresentaram germinação de 2% após o período citado.

Timoteo (2010) também observou manutenção de alto potencial germinativo em sementes de milho armazenadas por 15 meses em câmara fria e seca (10°C e 30%UR), e redução progressiva da germinação das sementes mantidas em ambiente não controlado (14 a 31°C e 72 a 83%UR) e em ambiente controlado (20°C e 70%UR).

O teste de germinação é o procedimento oficial para avaliação da capacidade das sementes produzirem plântulas normais em condições ideais, porém nem sempre revela diferenças no desempenho entre lotes de sementes durante o armazenamento ou a campo (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Assim, a complementação das informações para

análise da qualidade fisiológica das sementes é realizada pelos testes de vigor, que possibilitam a seleção dos melhores lotes para a comercialização (MARCOS FILHO, 2005).

O vigor das sementes compreende um conjunto de características que determinam o potencial para a emergência e o rápido desenvolvimento de plântulas normais, sob ampla diversidade de condições ambientais (ISTA, 1992).

O vigor, avaliado pela primeira contagem da germinação (Tabela 4), apontou efeito de lote apenas aos 180 dias para as sementes do ambiente 3, aos 270 dias para as do ambiente não controlado, e aos 360 dias para as do ambiente 1, com menor vigor observado sempre no lote 2. Porém, estes efeitos não foram verificados nos períodos seguintes e, assim, são pouco conclusivos.

Tabela 4. Vigor (%), pela primeira contagem da germinação, de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em três ambientes.

Ambiente	Dias de armazenamento					
	0		90		180	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12±2°C/60±5%UR	97,50aA	94,00aA	95,50aA	91,50aA	92,00aA	91,00aA
Não controlado	97,50aA	94,00aA	90,50abA	91,00aA	87,50abA	86,50aA
30±2°C/70±5%UR	97,50aA	94,00aA	86,00bA	81,50bA	83,75bA	72,50bB
Ambiente	270		360		450	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	12±2°C/60±5%UR	92,00aA	89,50aA	90,50aA	84,00aB	86,00aA
Não controlado	84,50bA	79,50bB	81,50bA	78,00bA	77,00bA	75,00bA
30±2°C/70±5%UR	73,50cA	70,00cA	61,00cA	60,00cA	39,50cA	44,00cA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, dentro de um mesmo lote e período de armazenamento, e médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na linha, dentro de um mesmo ambiente e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliando o efeito do ambiente de armazenamento, o ambiente de câmara fria foi o melhor na manutenção do vigor das sementes em todos os períodos avaliados, apresentando aos 450 dias de armazenamento, 86,0 e 84,5% de vigor para os lotes 1 e 2, respectivamente.

De modo geral, as sementes armazenadas em ambiente não controlado apresentaram vigor intermediário, menor que as armazenadas no ambiente 1 e maior que as do ambiente 3, observado aos 270, 360 e 450 dias de armazenamento. E ao final do experimento, ainda foram obtidos valores satisfatórios por este teste (77,0 e 75,0%, para lotes 1 e 2, respectivamente), considerando que é realizado pela contagem de plântulas normais no quarto dia do teste de germinação.

Verificou-se o efeito do ambiente 3 sobre a redução do vigor das sementes avaliadas aos 90 dias e nos períodos subsequentes, para ambos os lotes. O vigor das sementes deste ambiente foi drasticamente reduzido em todos os períodos avaliados, chegando, aos 450 dias, com somente 39,5 e 44,0% de vigor, enquanto as sementes armazenadas nos outros dois ambientes apresentavam ainda vigor de 75,0 a 86,0% (Tabela 4).

Como pode ser observado na Figura 4, o vigor das sementes, avaliado pelo teste de primeira contagem da germinação, foi reduzido linear e progressivamente ao longo do armazenamento em todos os tratamentos, com decréscimos mais acentuados no ambiente com maior temperatura, seguindo a mesma tendência do teste de germinação.

Ressalta-se que os resultados deste teste foram obtidos em condições controladas e otimizadas de temperatura e umidade, e a drástica queda no vigor, principalmente das sementes armazenadas a $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$, reflete a dificuldade em se obter rápida germinação e o estabelecimento de estande uniforme, uma vez que as condições reais às quais as sementes serão submetidas na semeadura a campo, geralmente, não são as ideais.

Em trabalho realizado por Peres (2010), avaliando diversos testes de vigor em sementes de milho, o autor considerou o teste de primeira contagem da germinação como altamente sensível para a diferenciação de classes de vigor das sementes. Por ser um teste que trata da contagem de plântulas normais obtidas em teste de germinação, ele é visto como parte de um procedimento padronizado com alto potencial para determinação do vigor das sementes (NAKAGAWA, 1999).

Os resultados do envelhecimento acelerado indicam efeito significativo de lote apenas nos períodos de 90, 360 e 450 dias de armazenamento nas sementes armazenadas nos ambientes 2 e 3 (Tabela 5).

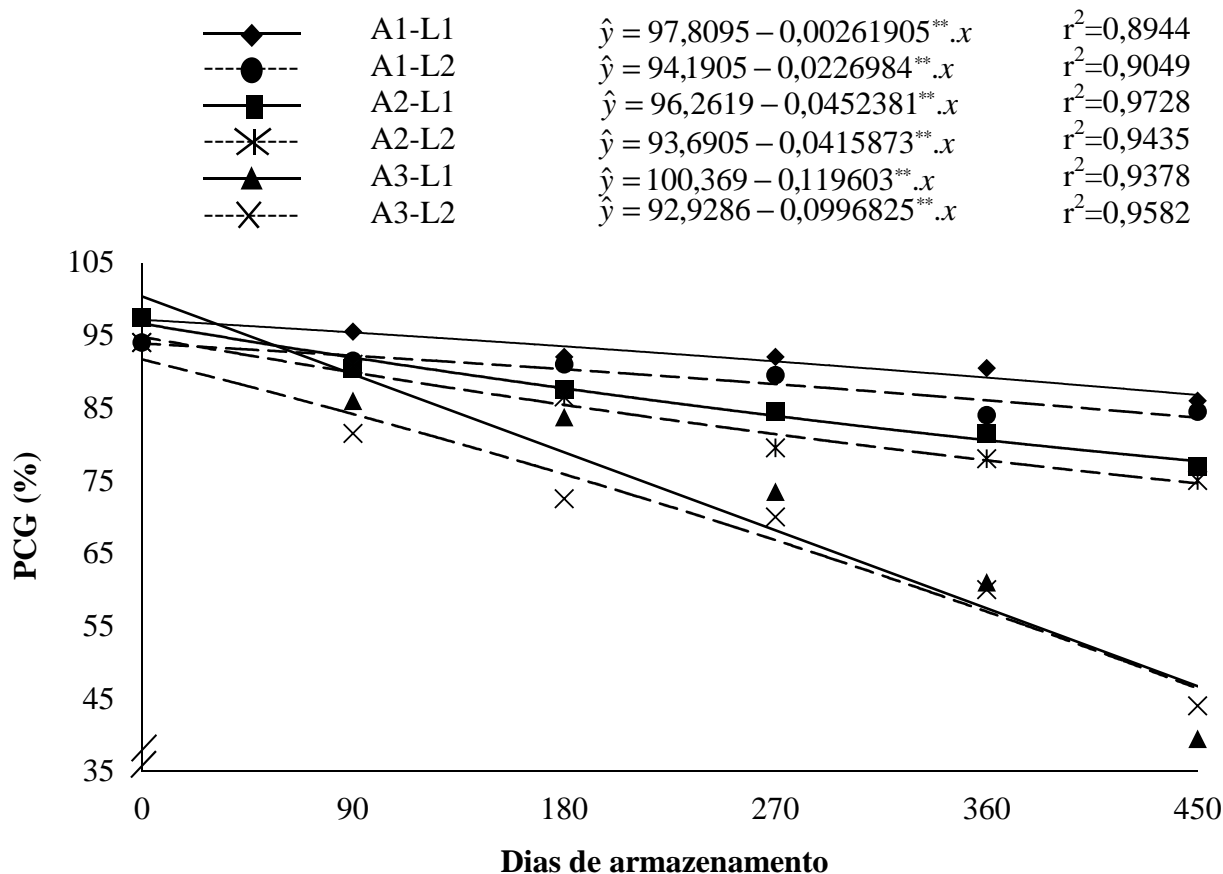


Figura 4. Primeira contagem da germinação (PCG) de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1% pelo teste “t”.

No período de 90 dias, não foi verificado efeito do ambiente sobre o vigor das sementes. Aos 180 dias, as sementes do lote 2 a $30\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$ apresentaram redução significativa do vigor, diferindo do ambiente 1, mas não diferente do ambiente não controlado. Aos 270 dias, as sementes do ambiente 3 apresentaram valores baixos de vigor, próximos de 50%, enquanto que as mantidas em ambiente não controlado e em câmara fria apresentaram ainda alto vigor, com valores próximos a 86 e 92%, para ambos ambientes, respectivamente.

O teste de envelhecimento acelerado avalia o vigor das sementes pela porcentagem de plântulas normais observadas no teste de germinação, após as mesmas terem sido submetidas a estresse em condições de temperatura e umidade relativa do ar elevadas, por determinado período. Está baseado no fato de que sementes de menor vigor deterioram-se mais

rapidamente do que as vigorosas, refletindo em redução da germinação após o envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 2005).

Tabela 5. Vigor (%), pelo teste de envelhecimento acelerado, de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em três ambientes.

Ambiente	Dias de armazenamento					
	0		90		180	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12±2°C/60±5%UR	96,00aA	93,00aA	91,00aA	91,00aA	91,50aA	93,50aA
Não controlado	96,00aA	93,00aA	91,00aA	86,00aB	87,50aA	88,50abA
30±2°C/70±5%UR	96,00aA	93,00aA	88,50aA	88,50aA	86,50aA	84,50bA
Ambiente	270		360		450	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	12±2°C/60±5%UR	92,50aA	92,00aA	88,50aA	89,00aA	83,00aA
Não controlado	86,00bA	87,00aA	86,50aA	82,00bB	72,50bB	80,50aA
30±2°C/70±5%UR	51,50cA	50,00bA	39,00cB	45,50cA	27,50cA	23,00cB

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, dentro de um mesmo lote e período de armazenamento, e médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na linha, dentro de um mesmo ambiente e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Efeitos similares foram observados também nos períodos de 360 e 450 dias, indicando o ambiente 3 como prejudicial à manutenção do vigor das sementes por períodos prolongados de armazenamento. Semelhante ao verificado pelo teste de primeira contagem da germinação, o ambiente de câmara fria mostrou-se mais eficiente na manutenção do vigor das sementes de milho, e o ambiente não controlado ficou em posição intermediária, no entanto estes dois ambientes proporcionaram, ao fim do maior período observado, valores acima de 72% de vigor.

Na Figura 5 observa-se o comportamento do vigor, pelo envelhecimento acelerado, das sementes armazenadas nos diferentes ambientes ao longo do armazenamento. Verifica-se

pequena redução no vigor das sementes armazenadas tanto em câmara fria como em ambiente de condições não controladas. Porém, as sementes armazenadas em condições de $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$, apresentaram uma redução muito acentuada do vigor, especialmente a partir dos 180 dias de armazenamento, com valores muito baixos aos 450 dias, indicando o estado avançado da deterioração das sementes neste ambiente.

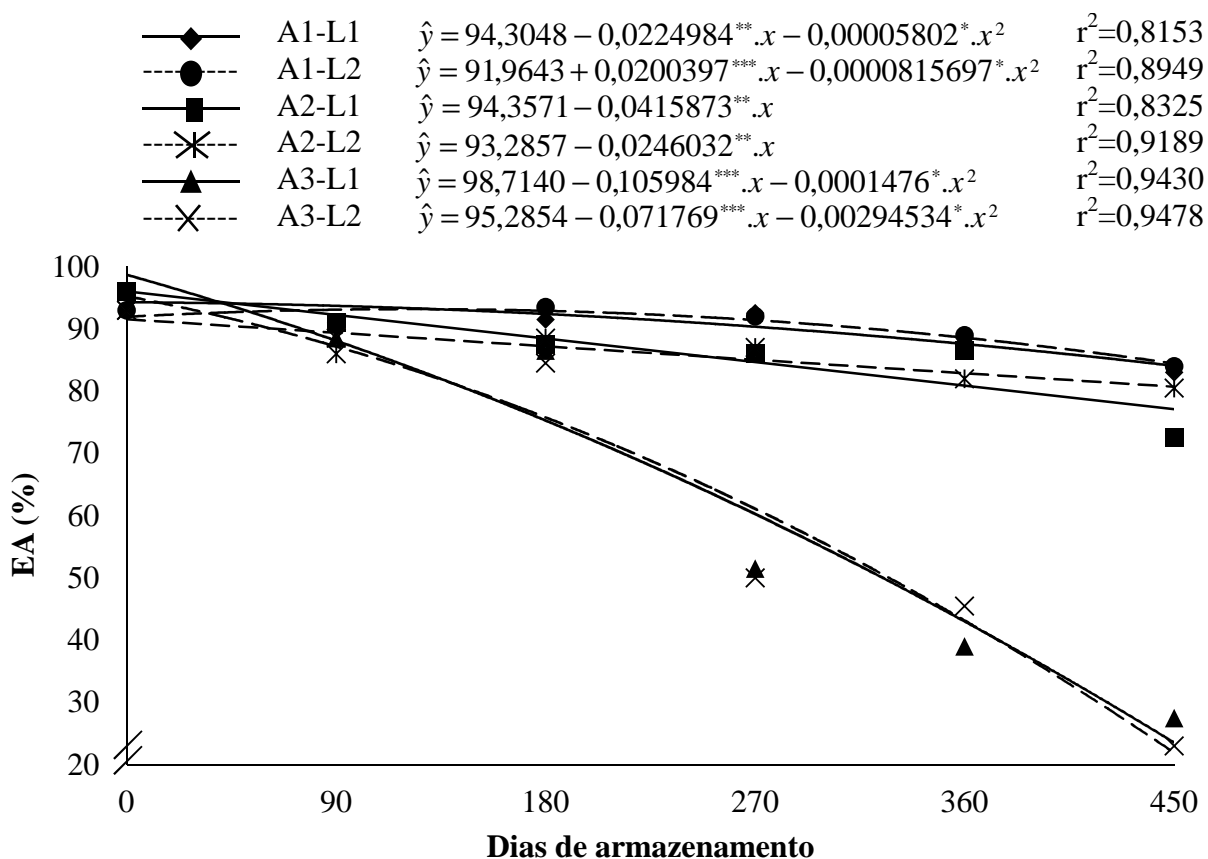


Figura 5. Envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1%, (*) significativo a 5%, (***) significativo a 10% pelo teste “t”.

Estes resultados estão de acordo com os relatados por Timoteo (2010) que observou pequenas reduções no vigor de sementes de milho com alto potencial fisiológico inicial armazenadas, por 15 meses, em câmara fria (10°C e $30\%\text{UR}$) e em ambiente não controlado

(14 a 31°C e 72 a 83%UR). A autora também observou drástica redução do vigor nas sementes armazenadas a 20°C e 70%UR, após 3 meses.

Na Tabela 6 são apresentados os valores médios da emergência em leito de areia, em cada período de armazenamento. Verificou-se efeito semelhante ao observado pela primeira contagem da germinação.

Tabela 6. Emergência em areia (%), de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em três ambientes.

Ambiente	Dias de armazenamento					
	0		90		180	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12±2°C/60±5%UR	95,00aA	95,50aA	94,50aA	90,50aA	91,00aA	90,00aA
Não controlado	95,00aA	95,50aA	89,50abA	89,00aA	87,00abA	86,00aA
30±2°C/70±5%UR	95,00aA	95,50aA	83,50bA	81,00bA	80,00bA	69,00bB
Ambiente	270		360		450	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	12±2°C/60±5%UR	90,00aA	89,00aA	89,00aA	86,00aA	83,00aA
Não controlado	85,00aA	79,00bB	80,00bA	79,50aA	78,00aA	75,00aA
30±2°C/70±5%UR	70,50bA	60,50cB	67,00cA	49,50bB	58,50bA	41,50bB

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, dentro de um mesmo lote e período de armazenamento, e médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na linha, dentro um de mesmo ambiente e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Não houve efeito de lote para as sementes armazenadas em câmara fria, em nenhum dos períodos de armazenamento avaliados. Este efeito foi verificado somente no lote 2 quando armazenado em condição não controlada aos 270 dias, e aos 180 dias e períodos subsequentes para as sementes armazenadas no ambiente 3.

Quanto ao efeito do ambiente, este foi observado aos 90 dias e nos períodos maiores de armazenamento das sementes, com maior redução da emergência das sementes do ambiente 3, evidenciando a maior deterioração causada pelas condições impostas no mesmo.

Verifica-se que, aos 360 dias de armazenamento, as sementes mantidas em câmara fria apresentaram emergência ainda superior a 85,0%, com queda para 83,0 e 79,5% aos 450 dias, para os lotes 1 e 2, respectivamente. As sementes armazenadas em condição não controlada mantiveram este valor até os 270 (lote 1) e 180 (lote 2) dias. No entanto, as do ambiente 3 já apresentaram valores menores, 83,5 e 81,0% (lotes 1 e 2, respectivamente), aos 90 dias de armazenamento. Estes dados são um indicativo da rápida velocidade de deterioração das sementes quando armazenadas em temperaturas mais elevadas, e que não foram detectados pelo teste de germinação nestes períodos.

Estas diferenças podem ser atribuídas às condições de campo, no qual as variáveis não são controladas como ocorre no teste de germinação, e podem ser prejudiciais ao desempenho do potencial germinativo das sementes. Uma vez que a perda da germinação é a última consequência da deterioração, o processo progressivo da deterioração e seus efeitos iniciais não são levados em conta ao analisar-se apenas o número de plântulas normais pelo teste de germinação (DELOUCHE, 1973). Assim, é fundamental a utilização de testes de vigor para a complementação das informações para auxiliar na tomada de decisão.

Do mesmo modo, a resposta da emergência ao longo do armazenamento foi semelhante a observada nos outros testes de vigor. Observa-se que houve uma redução mais acentuada da emergência das sementes do ambiente 3, com menores valores de plântulas emergidas no lote 2 (Figura 6).

Observa-se, na Tabela 3, que as sementes armazenadas a 30°C após 270 dias já não apresentavam potencial germinativo mínimo para comercialização (79,0 e 77,3 %, para lotes 1 e 2, respectivamente) e apresentaram baixos valores de vigor, com os menores valores encontrados pelo teste de envelhecimento acelerado, seguido da emergência e da primeira contagem da germinação. Estes resultados são coerentes, pois a primeira contagem da germinação é avaliada em conjunto com o teste de germinação que é conduzido sob condições ideais e controladas de temperatura e umidade. No teste de emergência as sementes são submetidas às condições ambientais não controladas, e no teste de envelhecimento acelerado são submetidas a um estresse por alta temperatura e umidade, que podem provocar maior deterioração das sementes.

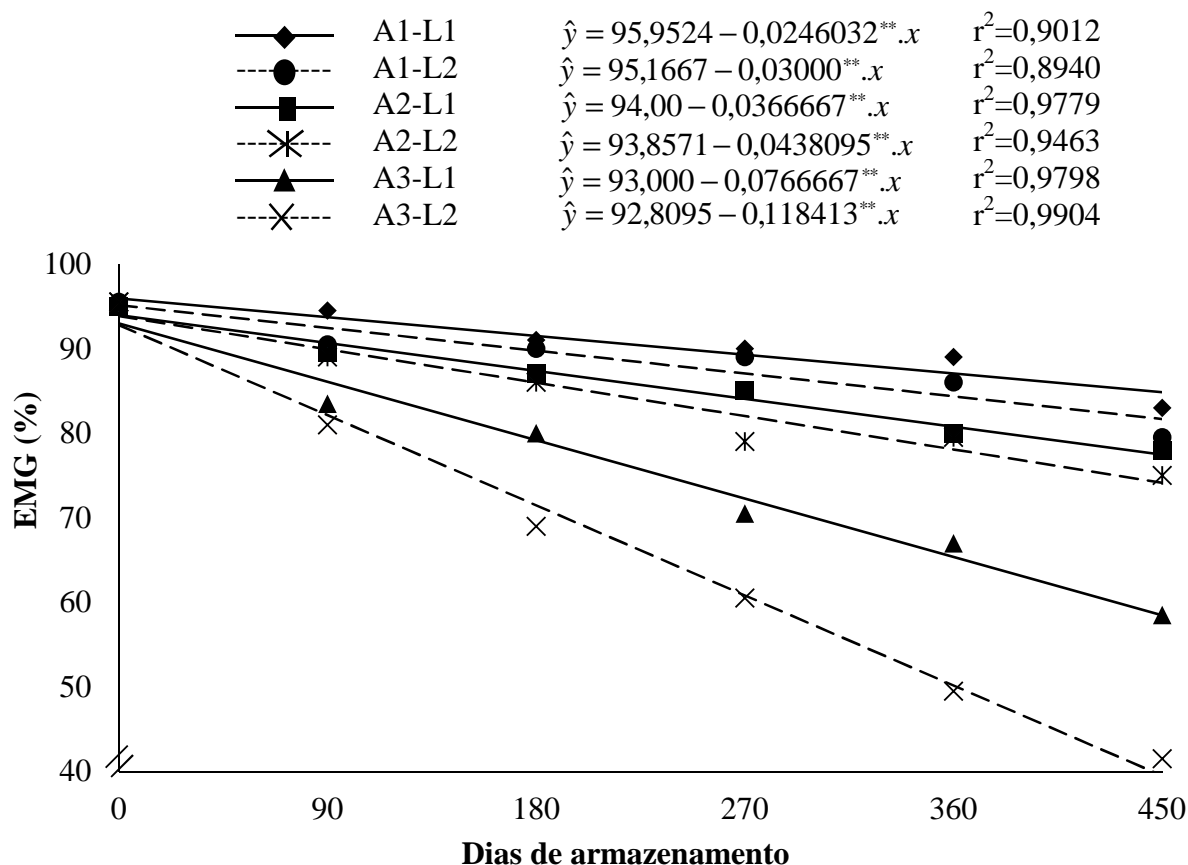


Figura 6. Emergência em leito de areia (EMG) de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1% pelo teste “t”.

Os resultados deste trabalho demonstraram pequeno aumento nos valores da condutividade elétrica das sementes submetidas ao armazenamento à baixa temperatura após 450 dias. Nas sementes armazenadas em ambiente não controlado os valores duplicaram após este período e, sob temperatura elevada, os valores foram quase triplicados quando comparados aos do início do armazenamento (Tabela 7). O lote 2 foi diferenciado do lote 1 a partir dos 180 dias, indicando que o estresse ao qual foi submetido antes do armazenamento ocasionou maior taxa de velocidade na redução do vigor determinado por este teste, evidenciado pela maior lixiviação de eletrólitos.

O aumento da condutividade elétrica verificada entre os ambientes a partir dos 90 dias no lote 1, e 180 dias no lote 2, agravada com o decorrer dos períodos de armazenamento, indicam que o aumento da temperatura do ambiente levou a uma redução da capacidade de

reorganização das membranas destas sementes quando submetidas a embebição, evidenciando maior redução do vigor e maiores taxas de deterioração das mesmas.

Tabela 7. Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em três ambientes.

Ambiente	Dias de armazenamento					
	0		90		180	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
12 \pm 2°C/60 \pm 5%UR	10,28aA	11,87aA	10,56aA	12,11aA	11,38bA	11,89bA
Não controlado	10,28aA	11,87aA	10,62aA	11,57aA	10,53bB	12,86bA
30 \pm 2°C/70 \pm 5%UR	10,28aA	11,87aA	11,02aB	13,21aA	14,29aB	17,49aA
Ambiente	270		360		450	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	12 \pm 2°C/60 \pm 5%UR	11,11bA	11,96cA	11,14cB	13,56cA	11,21cB
Não controlado	11,92bB	15,45bA	15,25bB	19,76bA	20,46bA	22,06bA
30 \pm 2°C/70 \pm 5%UR	17,79aB	20,62aA	22,98aB	26,18aA	25,45aB	29,66aA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, dentro de um mesmo lote e período de armazenamento, e médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na linha, dentro de um mesmo ambiente e período de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados estão de acordo com Faroni et al. (2005), que avaliaram a condutividade elétrica de sementes de milho armazenadas por até 180 dias em temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C e verificaram relação positiva entre o aumento da condutividade elétrica e da temperatura a partir dos 60 dias de armazenamento.

Fessel et al. (2006) e Vieira et al. (2001) sugerem que o teste de condutividade elétrica é pouco eficiente para detectar alterações de vigor e para a classificação de lotes de sementes de milho e soja após armazenamento a baixa temperatura (10°C). Os autores sugerem que, quando submetidas a baixas temperaturas de armazenamento, ocorre estabilização das

membranas das sementes, explicando os aumentos não-significativos na condutividade elétrica das mesmas, não sendo este teste um bom indicador da deterioração nestas condições.

Rosa (2009) recomenda que as sementes advindas de armazenamento em temperaturas baixas devem ser submetidas a períodos de repouso de 12 a 24 horas em temperaturas de 20 a 25°C antes de serem submetidas ao teste de condutividade elétrica. Estas recomendações foram atendidas neste trabalho e, mesmo assim, não foram detectadas grandes variações nas leituras da condutividade elétrica das sementes armazenadas a 12°C, considerados os valores obtidos no início e após 450 dias de armazenamento (10, 28 a 11, 21 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para o lote 1 e 11, 87 a 15, 65 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para o lote 2).

As sementes do ambiente 3 apresentaram resposta linear entre a condutividade elétrica e o período de armazenamento, e as demais apresentaram resposta quadrática, com lixiviações menores nos períodos iniciais e acentuadas com o envelhecimento das sementes (Figura 7).

De modo geral, o vigor das sementes foi reduzido ao longo do armazenamento em todos os ambientes estudados, com decréscimos mais acentuados para o ambiente a temperatura mais elevada, seguido do ambiente não controlado; no ambiente a baixa temperatura houve redução menos acentuada do vigor por períodos prolongados.

Comparando-se os resultados do vigor e da germinação, pode-se verificar que o vigor apresentou decréscimos mais rápidos, mostrando-se mais sensível a deterioração e reforçando a teoria de que a perda do vigor antecede a perda da germinação (DELOUCHE, 2002).

Outros autores também verificaram o benefício da baixa temperatura de armazenamento sobre a manutenção da qualidade fisiológica de sementes de milho. Bilia et al. (1994) observaram maior preservação da qualidade das sementes quando armazenadas durante seis meses em ambiente a 10°C/90%UR, comparada àquelas mantidas em condição ambiente em Piracicaba-SP (17-24°C/64-83%UR). Carvalho et al. (2010) armazenaram sementes de milho em condição ambiente em Gurupi – TO (temperatura média 25,5°C) e em câmara fria (20°C/20%UR) e após cinco meses, verificaram germinação de 2,0 e 96,0% para estes ambientes, respectivamente.

Estes resultados evidenciam o fato de que, nas condições de armazenamento, a temperatura do ar é fator fundamental na manutenção da qualidade das sementes até o momento da sementeira. Isso deve-se ao fato de que temperaturas mais elevadas aumentam as taxas metabólicas das sementes ocasionando perdas no poder germinativo e no vigor, o qual é um dos principais problemas enfrentados por produtores, principalmente nas regiões tropicais, onde a temperatura e umidade relativa do ar são bastante elevadas (BILIA et al., 1994).

—◆—	A1-L1	$\hat{y} = 10,25 + 0,00612^* .x - 0,000009^{***} .x^2$	$r^2=0,8181$
-●-	A1-L2	$\hat{y} = 12,15 - 0,00900^{***} .x - 0,000036437^* .x^2$	$r^2=0,9526$
—■—	A2-L1	$\hat{y} = 10,7124 - 0,01667^* .x + 0,00008377^{**} .x^2$	$r^2=0,9867$
-×-	A2-L2	$\hat{y} = 11,5094 - 0,00000005^* .x + 0,000049^{**} .x^2$	$r^2=0,9786$
—▲—	A3-L1	$\hat{y} = 8,73914 + 0,0365855^{**} .x$	$r^2=0,9677$
-×-	A3-L2	$\hat{y} = 10,4828 + 0,0415750^{**} .x$	$r^2=0,9795$

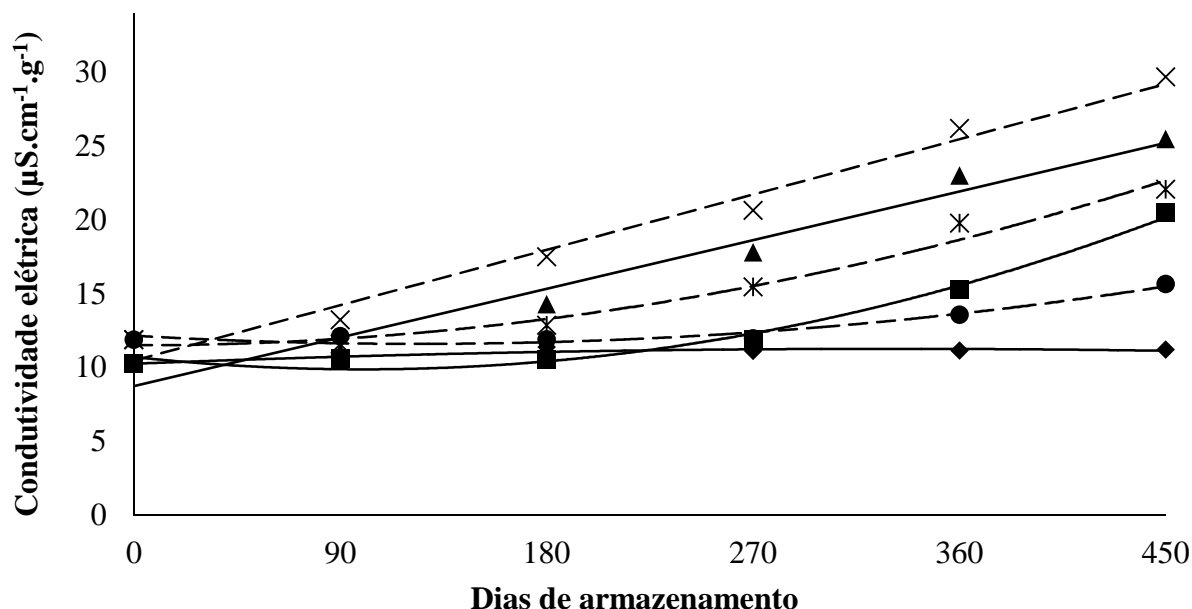


Figura 7. Condutividade elétrica de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30 \pm 2^\circ\text{C}/70 \pm 5\% \text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1%, (*) significativo a 5%, (***) significativo a 10% pelo teste “t”.

Segundo McDonald (1999), algumas das alterações ocorridas e relacionadas com a deterioração são a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) que promovem modificações na estrutura das enzimas e degradação do sistema de síntese de novas enzimas. Os danos oxidativos causados por radicais livres, que geralmente se acumulam em sementes secas, também envolvem a peroxidação de lipídios, mudanças na composição dos ácidos graxos, perdas de fosfolipídios e mudanças estruturais, afetando diretamente a estrutura das membranas, citada como uma das principais causas da deterioração das sementes (BRACINNI et al., 2001).

Ainda de acordo com Hendry (1993), estes danos podem relacionar a perda da capacidade germinativa das sementes com a diminuição da atividade e eficiência dos sistemas antioxidantes. Em condições normais, a formação e a remoção dos radicais livres ocorre de

forma balanceada. Contudo, em caso de estresse pode ocorrer aumento da formação das EROs e supressão dos sistemas de defesa (ALSCHER e HESS, 1993) que, inevitavelmente, levarão a deterioração.

As enzimas estudadas, catalase, peroxidase e α -amilase, apresentaram redução da atividade ao longo dos períodos de armazenamento (Figuras 8, 9 e 10), seguindo as tendências observadas nos testes de vigor.

De modo geral, reduções mais acentuadas da atividade ocorreram nas sementes armazenadas no ambiente 3 ($30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$), seguido do ambiente 2 (não controlado) e do ambiente 1 ($12\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$), no qual as sementes mantiveram maior atividade enzimática por maior tempo de armazenamento.

A catalase e a peroxidase atuam na desintoxicação celular, transformando espécies reativas de oxigênio em substâncias não reativas e na decomposição do peróxido de hidrogênio por reação de dismutação (LEHNINGER, 2006).

Na Figura 8 observa-se o comportamento da atividade da catalase ao longo do armazenamento das sementes nos diferentes ambientes. A enzima apresentou decréscimo progressivo de sua atividade ao longo do período, em todos os ambientes estudados, seguindo a mesma tendência apresentada pelos testes de vigor.

A redução da atividade desta enzima, ao longo do armazenamento, demonstra que houve redução da capacidade de prevenção de danos oxidativos. A deterioração das sementes, principalmente naquelas armazenadas a $30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$ e seguidas pelas mantidas em ambiente não controlado, pode ter induzido a aceleração dos processos oxidativos e supressão da atividade enzimática antioxidante. Este fato explica a maior atividade da catalase no início do armazenamento, e a sua redução nos períodos subsequentes está relacionada ao nível de deterioração, evidenciado pelos testes de germinação e de vigor das sementes. Ressalta-se que o ambiente 3, que corresponde aos maiores decréscimos da atividade da catalase, é o que possuía a maior temperatura (30°C). E a temperatura é um dos principais fatores que afeta a respiração, e esta, por sua vez, é um dos principais processos ligados à formação de radicais livres nas sementes.

Timoteo (2010) também observou redução progressiva da atividade da catalase, através de padrões eletroforéticos, durante o armazenamento de sementes de milho em três ambientes, por 15 meses. Porém, a autora verificou maior intensidade de bandas nas sementes armazenadas em câmara controlada a $20^{\circ}\text{C}/70\%\text{UR}$, comparada aquelas mantidas em ambiente não controlado (14 a 31°C e 72 a $83\%\text{UR}$) e em câmara fria e seca ($10^{\circ}\text{C}/30\%\text{UR}$).

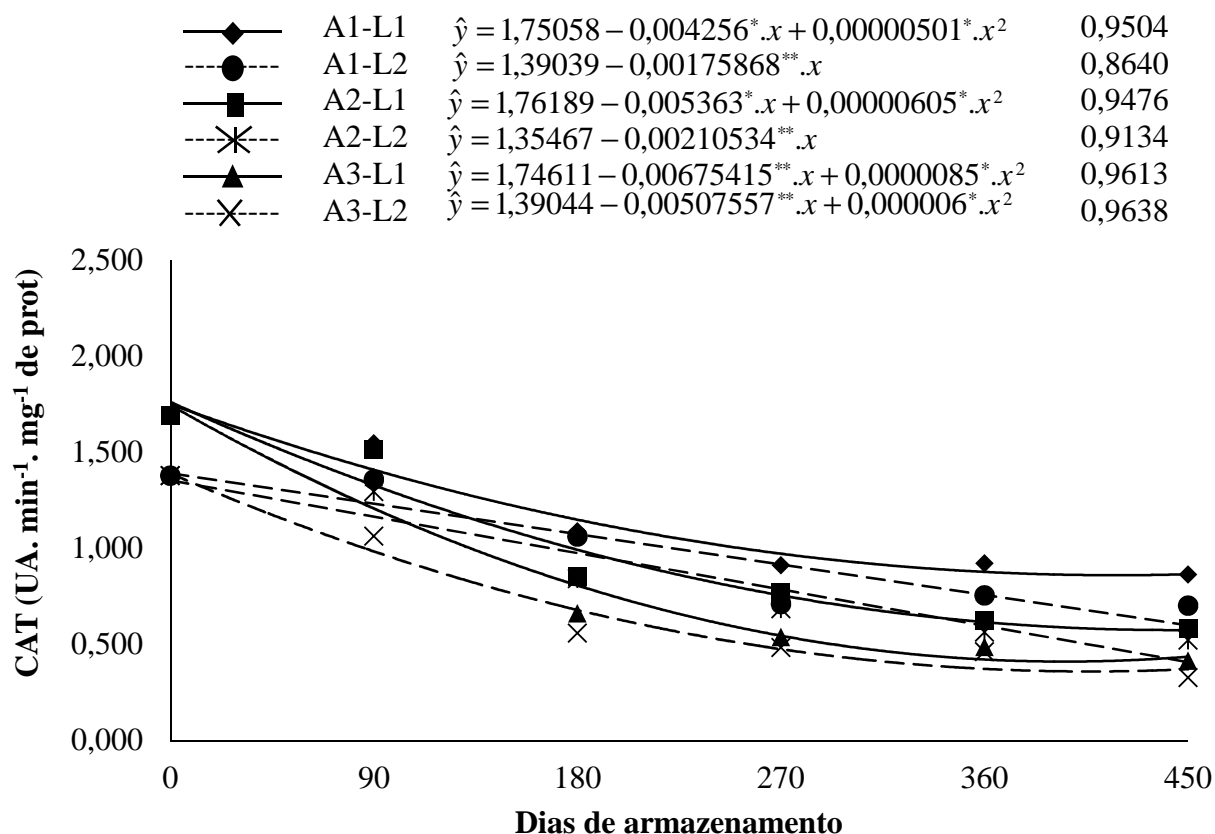


Figura 8. Atividade da enzima catalase de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30 \pm 2^\circ\text{C}/70 \pm 5\% \text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1%, (*) significativo a 5% pelo teste “t”.

A atividade da peroxidase, ao longo do armazenamento (Figura 9), apresentou comportamento semelhante ao observado na catalase.

As sementes armazenadas em câmara fria mantiveram maior atividade da enzima durante todo período avaliado, com pequena redução. Observou-se decréscimos progressivos, com resposta linear, nas sementes do ambiente não controlado, com atividade semelhante a das sementes do ambiente 3 no final do experimento (450 dias). No ambiente 3, a atividade reduziu rapidamente até os 180 dias de armazenamento e após, apresentou uma tendência de estabilização e um pequeno aumento aos 450 dias.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Spinola et al. (2000) que observaram redução gradativa da atividade da peroxidase em sementes de milho submetidas ao envelhecimento acelerado até períodos de 72 horas, e o desaparecimento das bandas dos

padrões eletroforéticos desta enzima em períodos mais longos. No entanto, no envelhecimento natural das sementes, não foi verificado a inativação desta enzima.

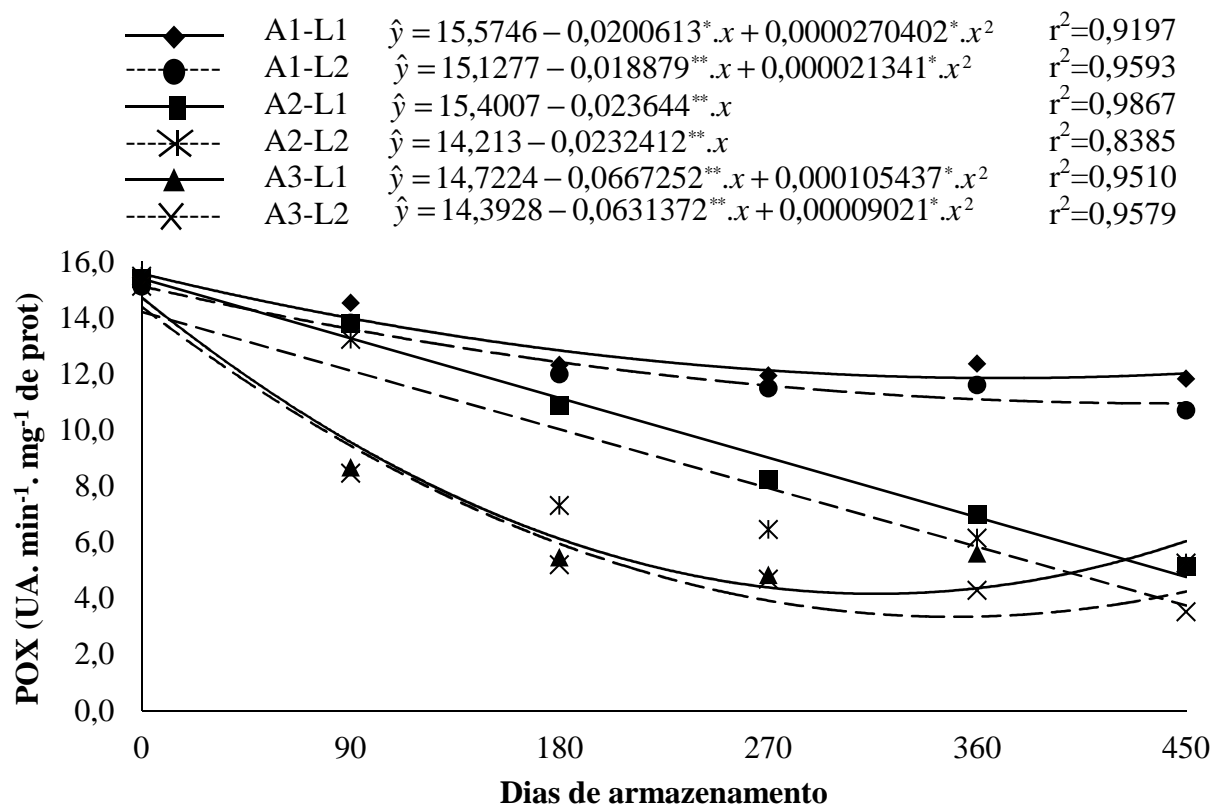


Figura 9. Atividade da peroxidase de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30 \pm 2^\circ\text{C}/70 \pm 5\% \text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1%, (*) significativo a 5% pelo teste “t”.

Conceição (2011) também verificou redução das atividades da catalase e peroxidase em sementes de milho com atraso da colheita, relacionando-as com a redução da qualidade fisiológica das sementes.

Por ser um das enzimas “scavenger” (removedora de peróxidos), a perda de sua atividade pode ser relacionada com o aumento do acúmulo de peróxidos em sementes envelhecidas e deterioradas. Basavarajappa et al. (1991) e Jeng e Sun (1994), verificaram aumento da peroxidação de lipídios com a evolução da deterioração das sementes, e Abdul-Baki e Anderson (1972) estabeleceram relação entre a atividade das peroxidases com a viabilidade das sementes.

Os resultados observados reforçam os encontrados nos demais testes, evidenciando o ambiente de câmara fria como superior na manutenção da qualidade fisiológica das sementes de milho e que temperaturas elevadas são prejudiciais à longevidade das sementes por períodos prolongados.

A manutenção da qualidade fisiológica é influenciada também pelas alterações bioquímicas que afetam o funcionamento e integridade das enzimas envolvidas em vários processos, dentre elas as antioxidantes. Portanto, a preservação da qualidade das sementes depende de um fino ajuste entre a produção e a remoção ou degradação de radicais livres que são inevitavelmente produzidos por todos os organismos aeróbicos em função dos processos metabólicos normais das células, principalmente da respiração.

A α -amilase teve sua atividade reduzida continuamente e progressivamente ao longo do armazenamento em todos os tratamentos estudados, com reduções maiores e mais acentuadas nas sementes em temperatura mais elevada e nas sementes do lote 2 (Figura 10). A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho no início da germinação (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1978). A redução de sua atividade está relacionada com a redução da germinação das sementes, como observado. Uma vez que usualmente não está presente nas sementes secas, precisa ser sintetizada durante o processo de germinação e com o avanço do processo deteriorativo, esta síntese é reduzida.

Resultados de redução da atividade da enzima em sementes de milho também foi relatada por Timoteo (2010), durante o armazenamento em três diferentes ambientes, por 15 meses. Diversos autores também observaram relação entre a redução da atividade da α -amilase e a perda da viabilidade de sementes de cereais durante o envelhecimento. Estudos revelam que a deterioração pode causar modificações na camada de aleurona reduzindo a síntese de α -amilase, que por sua vez, afeta a germinação (PETRUZELLI e TARANTO, 1990; GANGULI e SEMANDI, 1993). Isto foi verificado neste trabalho, baseado na redução do vigor e germinação das sementes ao longo do armazenamento.

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios das atividades enzimáticas, referente a combinação de lotes e ambientes, dentro de cada período de armazenamento.

Para a atividade da catalase, houve efeito de lote apenas na avaliação inicial (0 dias) e aos 90 e 450 dias de armazenamento, para as sementes do ambiente 3. Este efeito foi observado também no ambiente 2 aos 180 e 270 dias, e no ambiente 3 aos 360 dias de

armazenamento pela atividade da peroxidase. A α -amilase somente apresentou o efeito aos 360 dias, nas sementes do ambiente 3.

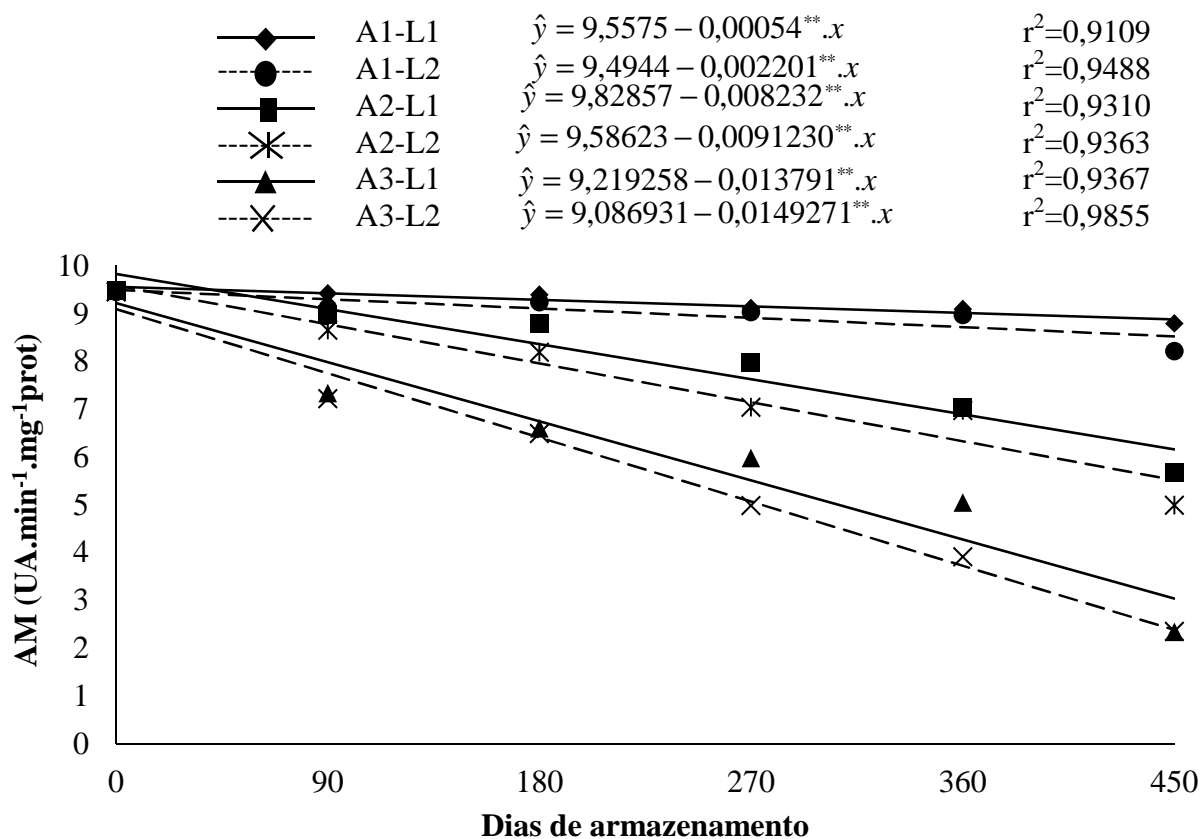


Figura 10. Atividade da α -amilase de sementes de milho, variedade BR 106, em função dos dias de armazenamento para as respectivas combinações de lotes e ambientes. A1: $12\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$; A2: Não controlado; A3: $30\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$; L1: lote 1 e L2: lote 2. (**) significativo a 1%, (*) significativo a 5% pelo teste “t”.

Dentro de cada período de armazenamento, a peroxidase e a α -amilase foram as enzimas que se mostraram mais sensíveis na detecção do efeito do ambiente, observado aos 90 dias de armazenamento nas sementes armazenadas no ambiente 3, e a partir dos 180 dias nas armazenadas em ambiente não controlado (Tabela 8).

Estes resultados indicam mais uma vez o ambiente a baixa temperatura como superior na manutenção da qualidade das sementes de milho, seguido do ambiente não controlado. Também reforçam a evidência do efeito da elevação da temperatura de armazenamento na

aceleração da taxa de deterioração das sementes, refletida na redução da atividade destas enzimas.

Os resultados encontrados pelo estudo das atividades enzimáticas da catalase, peroxidase e α -amilase podem ser relacionadas com a qualidade fisiológica das sementes de milho, durante o armazenamento, estando de acordo com os testes fisiológicos anteriormente descritos. Assim, estas enzimas podem ser utilizadas como indicadoras do processo de deterioração de sementes de milho.

Tabela 8. Atividade enzimática da catalase, peroxidase e α -amilase de dois lotes de sementes de milho, variedade BR 106, armazenados em diferentes ambientes: A1 ($12\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%\text{UR}$), A2 (Não controlado) e A3 ($30\pm 2^\circ\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$).

Ambiente	Catalase		Peroxidase		Alpha-amilase	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0 dias						
1	1,6919aA	1,3784aB	15,4193aA	15,1236aA	9,4913aA	9,4521aA
2	1,6919aA	1,3784aB	15,4193aA	15,4820aA	9,4913aA	9,4521aA
3	1,6919aA	1,3784aB	15,4193aA	15,1236aA	9,4913aA	9,4521aA
90 dias						
1	1,5470aA	1,3586aA	14,5382aA	13,8306aA	9,4187aA	9,1231aA
2	1,5132aA	1,2943aA	13,7964aA	13,2325aA	8,9766aA	8,6540aA
3	1,3714aA	1,0632aB	8,6688bA	8,4710bA	7,3342bA	7,2190bA
180 dias						
1	1,0888aA	1,0624aA	12,3177aA	12,0036aA	9,3956aA	9,2387aA
2	0,8511abA	0,8424abA	10,8905aA	7,3171bB	8,7869aA	8,1901abA
3	0,6623bA	0,5591bA	5,4601bA	5,1976cA	6,5990aA	6,4912bA
270 dias						
1	0,9113aA	0,7105aA	11,9469aA	11,5040aA	9,1123aA	9,0344aA
2	0,7705abA	0,6855aA	8,2559bA	6,4624bB	7,9872bA	7,0384bA
3	0,5377bA	0,4832aA	4,8407cA	4,6953cA	5,9712cA	4,9805cA
360 dias						
1	0,9220aA	0,7557aA	12,3633aA	11,6173aA	9,0919aA	8,9711aA
2	0,6213abA	0,5633aA	6,9860bA	6,1445bA	7,0431bA	6,9733bA
3	0,4860bA	0,4625aA	5,5982bA	4,2951cB	5,0439cA	3,9130cB
450 dias						
1	0,8635aA	0,7025aA	11,8258aA	10,7080aA	8,7891aA	8,2167aA
2	0,5820abA	0,5220abA	5,2400bA	5,2638bA	5,6712bA	4,9872bA
3	0,4145bA	0,3273bB	5,1368bA	3,5277cA	2,3418cA	2,3511cA

Médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, para uma mesma característica, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5. CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica das sementes foi afetada pelas condições de armazenamento, demonstrando que a temperatura é um importante fator a ser considerado para o armazenamento de sementes de milho por períodos prolongados.

Considerando-se o padrão mínimo de germinação para comercialização de sementes certificadas de milho de 85%, estas podem ser armazenadas por 450 dias em câmara fria, e 360 dias em ambiente não controlado, nas condições estudadas. Em condições de temperatura mais elevada ($30\pm 2^{\circ}\text{C}/70\pm 5\%\text{UR}$), as sementes podem ser armazenadas apenas por período de 180 dias, sem que ocorra perda do padrão mínimo exigido.

As atividades enzimáticas da peroxidase, catalase e α -amilase decrescem com o aumento do período e com o aumento da temperatura de armazenamento das sementes, evidenciando maior deterioração.

As enzimas peroxidase, catalase e α -amilase permitem identificar o progresso da deterioração de sementes de milho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWISK, T.T. (Eds). **Seed Biology: germination control, metabolism and pathology**. New York: Academic Press, v.2, 1972, p.283-315.
- ACWORTH, I.N.; McCABE, D.R.; MAHER, T. The Analysis of free radicals, their reaction products and antioxidants. In: BASKIN, S.I.; SALEM, H. (Eds). **Oxidants, antioxidants and free radicals**. Washington, DC: Taylor Francis, 1997, p.23-77.
- ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; ALMEIDA, I.F.; CLEMENTE, A.C.S. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* K.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.31, n.1, p.249-258, 2009.
- ALSCHER, R.G.; HESS, J.L.. **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, v.1, 1993. 189p.
- ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; ALVES, E.; CATANEIO, A.C.; CAVARIANI, A.; NAKAGAWA, J. Atividade aminolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho superdoce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.25, n.1, p.43-48, 2003.
- BASAVARAJAPPA, B.S; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.19, n.2, p.279-286, 1991.
- BAUDET, L.M. Armazenamento de sementes. In: PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.D.; ROTA, G.M. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Gráfica Universitária - UFPel, 1ed., 2003, p.369-418.
- BILIA, D.A.C.; FANCELLI, A.L.; MARCOS FILHO, J.; MACHADO, J.A. Comportamento de sementes de milho híbrido durante o armazenamento sob condições variáveis de temperatura e umidade relativa do ar. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.51, n.1, p.153-157, 1994.
- BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.95-117, 1989.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 2ed., 1994. 445p.
- BRACCINI, A.L.; BRACCINI, M.C.L.; SCAPIM, C.A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.11, n.1, p.10-15, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton: CRC Press, v.13, n.3, p.199–218, 1994.
- BURGES, H.D.; BURREL, N.J. Cooling Bulk Grain in the British climate to control storage insects and to improve keeping quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York: McGraw-Hill, v.15, p.32-50, 1964.
- CARVALHO, E.V., SIEBENEICHLER, S.C.; MATOS, W.L.; SANTOS, R.P.L. Qualidade fisiológica de sementes de milho sob diferentes condições de armazenamento. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v.9, n.3, p.58-65, 2010.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 4ed., 2000. 588p.
- CARVALHO, M.L.M.; SILVA, W.R. Refrigeração e qualidade de sementes de milho armazenadas em pilhas com diferentes embalagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.9, p.1319-1332, 1994.
- CHANG, C.S.; CONVERSE, H.H.; STEELE, J.L. Modeling of moisture content of grain during storage with aeration. **Transaction of the ASAE**, St Joseph, v.37, n.6, p.1891–1898, 1994.
- CHING, T.M.; SCHOOLCRAFT, I. Physiological and chemical differences in aged seeds. **Crop Science**, Madison, v.8, p.407-409, 1968.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Biological processes in stored soybeans. In: SMITH, A.K. **Soybeans Chemistry and Technology**. West Port: AVI Publishing, v.1, 1972, p.278-293.
- CHUNG, D.S.; PFOST, H.B. Adsorption and desorption of water vapor by cereal grains and their products. Part II. Development of the general isotherm equation. **Transactions of the American Society Agricultural Engineers**, St Joseph, v.10, p.551-554, 1967.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**. Oitavo levantamento, maio 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab, 2012. 36p.
- CONCEIÇÃO, P.M. **Sistema radical de plântulas como indicativo de vigor e efeito de bioestimulante em sementes de feijão e milho**. Viçosa: UFV, 2011. 68p. (Tese de doutorado).
- COPELAND, J.C.; McDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 4ed, 2001. 488p.

- DAS, G.; SEN-MANDI, S. Scutellar amilase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, London, v.69, n.6, p.497-501, 1992.
- DELOUCHE, J.C. Germinação, deterioração e vigor de sementes. **Seed News**, Pelotas, v.6, n.6, p.24-31, 2002.
- DELOUCHE, J.C.; MATTHES, K.K.; DOUGHERTY, G.M.; BOYD, A.H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.671-700, 1973.
- DEMITO, A.; AFONSO, A.D.L. Qualidade de sementes de soja resfriadas artificialmente. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.17, n.1, p.7-14, 2009.
- DHINGRA, O.D. Prejuízos causados por microrganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.7, n.1, p.139-146, 1985.
- DOSLAND, O.; SUBRAMANYAM, B.; SHEPPARD, K.; MAHROOF, R. Temperature modification for insect control. In: _____. **Insect management for food storage and processing**. [S.l.]: AACC International, 2006, p.89-103.
- FANNON J.E.; HAUBER, R.J.; BEMILLER, J.N. Surface pores of starch granules. **Cereal Chemistry**, v.69, p.284-288, 1992.
- FARONI, L.R. Fatores que influenciam a qualidade dos grãos armazenados. **Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha**, v.5, p.34-41, 1998.
- FARONI, L.R.; BARBOSA, G.N.O.; SARTORI, M.A., CARDOSO, F.S.; ALENCAR, E.R. Avaliação qualitativa e quantitativa de milho em diferentes condições de armazenamento. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.13, n.3, p.193-201, 2005.
- FERREIRA, L.A.; OLIVEIRA, J.A., VON PINHO, E.V.R.; QUEIROZ, D.L. Bioestimulante e fertilizantes associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.29, n.2, p.80-89, 2007.
- FESSEL, S. A.; VIEIRA, R. D.; CRUZ, M. C. P. Teste de condutividade elétrica em sementes de milho armazenadas sob diferentes temperaturas e períodos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p.1551-1559, 2006.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRYZANOWKI, F.C; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRYZANOWSKI, F.C; VIEIRA, R.D; FRANÇA NETO, J.B. (Eds). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.8, p.1-28.
- GAUNGULI, S.; SEMANDI, 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.
- HARRINGTON, J.F. Thumb rules of drying seeds. **Crops and Soils**, v.13, p.16-17, 1972.
- HEINRICH, B. Grain preservation by means of refrigeration in tropical countries. **Sulzer Technical Review**, Winterhur, v.71, n.4, p.19-23, 1989.

- HENDRY, G.A.F.. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Cambridge, v.3, p.141-153, 1993.
- HODGES, D.M.; ANDREWS, C.J.; JOHNSON, D.A.; HAMILTON, R.I. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.310, p.1105-1113, 1997.
- IMA- Instituto Mineiro de Agropecuária. **Instrução Normativa nº 25, de 16 de dezembro de 2005**. www.ima.mg.gov.br/sanidade-vegetal/semences-e-mudas/legislacao. Acesso em: 03 de junho 2012.
- ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Eletrophoresis handbook: variety identification. In: ISTA. **Handbook of variety testing**, Zurich, 1992. 50p.
- JAMES, E. Preservation of seeds stocks. **Advances in Agronomy**, New York, v.19, p.87-106, 1967.
- JENG, T.L.; SUNG J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxidase scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n.3, p.531-539, 1994.
- KRZYŻANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; FRANÇA-NETO, J.B.; COSTA, N.P. Tecnologias que valorizam a semente de soja. **Seed News**, Pelotas, v.10, n.6, p.1-2, 2006.
- LACERDA FILHO, A.F. de; DEMITO, A.; MIRANDA, L.; COSTA, C.A da; HEBERLE, E; VOLK, M.B. da S. Resultados comparativos do resfriamento artificial e aeração com ar ambiente durante a armazenagem de 16.000 t de milho a granel. **Relatório técnico**. Viçosa, 2007. 8p.
- LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: Edição do autor, 1997. 134p.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 4ed., 2006. 1202p.
- LUDWIG, M.P.; SCHUCH, L.O.B.; LUCCA FILHO, O.A.; AVELAR, S.A.G.; MIELEZRSKI, F.; OLIVEIRA, S.; CRIZEL, R.L. Desempenho de sementes e plantas de milho híbrido originadas de lotes de sementes com alta e baixa qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.8, n.1, p.83-92, 2009.
- MAEDA, J.A; LAGO, A.A.; MIRANDA, L.T. de; TELLA, R. Armazenamento de sementes de cultivares de milho e sorgo com resistências ambientais diferentes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.1-7, 1987.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

- MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of isoenzymes: tissue, antogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, Washington, v.45, p.453-463, 1959.
- MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of plants**. Pergamon Press, 4ed, 1978. 270p.
- McDONALD, M.B.. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.27, n.1, p.177-237, 1999.
- MEDCALF, D.G. Structure and composition of cereal component as related to their potential industrial utilization. In: POMERANS, Y. (Ed). **Industrial uses of cereal**. St Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1973, p.121-160.
- MORA, M.A, ECHANDI, R.Z. Evaluacion del efecto de condiciones de almacenamiento sobre la calidadde semillas de arroz (*Orriza sativa* L.) y de mays (*Zea mays* L.). **Turrialba**, San Jose, v.26, n.4, p.413-416, 1976.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.2, p.1-24.
- NEVES, L.L.M. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo (*Abelmoshus esculentus* (L.) Moench)**. Viçosa: UFV, 2003. 72p. (Tese de doutorado).
- PERES, W.L.R. **Testes de vigor em sementes de milho**. Jaboticabal: UNESP, 2010. 50p. (Dissertação de mestrado).
- PETRUZELLI, L.; TARANTO, G.. Amylase activity and loss of viability in wheat. **Annals of Botanny**, London, v.66, n.4, p.375-380, 1990.
- POMERANZ, Y. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. **Storage of cereal grains and their products**. St Paul: AACC, 1974, p.56-114.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Techonology**, Zurich, v.1, n.1, p.499-514, 1973.
- ROSA, M.S. **Teste de condutividade elétrica para sementes de milho e soja armazenadas sob baixa temperatura**. Piracicaba: USP, 2009. 69p. (Dissertação mestrado).
- SAEG – **Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes – UFV, Viçosa, 2007.
- SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.2, p.263-270, 2000.
- SUN, D.W.; BYRNE, C. Selection of EMC/ERH isotherm equations for rapeseed. **Journal Agricultural Engineering Research**, Silsoe, n.69, p.307-315, 1998.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.
- TIMOTEO, T.S.. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho**. Piracicaba: USP, 2010. 91p. (Tese de doutorado).
- VIEIRA, A.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; CARVALHO, M.L.M; PEREIRA, E.M., CARVALHO, B.O. Qualidade de sementes de arroz irrigado produzidas com diferentes doses de silício. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.33, n.3, p.490-500, 2011.
- VIEIRA, R. D.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; RUCKER, M. Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments. **Seed Science and Technology**, Lincoln, v.29, n.3, p.599-608, 2001.
- VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Eds). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.4, p.1–26.
- VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 266-281.
- ZEIGLER, P. Carbohydrate degradation during germination. In: KEGEL, J. & GALILI, G. (Eds). **Seed development and germination**. New York: Marcel Decker, 1995, p.139-162.
- WORTHINGTON, V. **Worthington enzyme manual**. Worthington Biochemical Corp, New Jersey, 1947. 401p.

ANEXOS

ANEXO 1. Quadro da análise de variância do teor de água (TA), germinação (GER), primeira contagem da germinação (PCG), envelhecimento acelerado (EA) e emergência em areia (EMG) de dois lotes de sementes de milho armazenadas em três ambientes, por 450 dias.

FV	GL	Quadrados Médios				
		TA (%)	GER (%)	PCG (%)	EA (%)	EMG (%)
Lote (L)	1	0,052223 ^{ns}	235,1111 ^{**}	227,5069 ^{**}	2,2500 ^{ns}	711,1111 ^{**}
Ambiente (A)	2	0,439959 ^{**}	2199,528 ^{**}	4368,271 ^{**}	9849,083 ^{**}	4440,083 ^{**}
L x A	2	0,017059 ^{ns}	63,02778 ^{**}	5,298611 ^{ns}	68,2500 ^{**}	237,8611 ^{**}
Resíduo (a)	18	0,090681	9,685185	9,479167	8,7500	11,92593
Dias de armazenamento (DA)	5	4,044257 ^{**}	1470,711 ^{**}	2428,096 [*]	3604,317 ^{**}	2077,467 ^{**}
DA x L	5	0,054349 ^{ns}	9,177778 [*]	35,84028 ^{**}	59,78333 ^{**}	58,11111 [*]
DA x A	10	0,091047 ^{ns}	231,5278 ^{**}	496,7542 ^{**}	1540,750 ^{**}	329,1500 ^{**}
DA x L x A	10	0,012994 ^{ns}	48,89444 ^{**}	23,18194 [*]	18,98333 ^{***}	34,06111 ^{***}
Resíduo (b)	90	0,142343	6,285185	11,81250	9,927778	19,54815
CV Parcela (%)		2,27	3,52	3,73	3,69	4,22
CV Subparcela (%)		2,84	2,83	4,17	3,93	5,41

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; *** significativo a 10% de probabilidade; ^{ns} não significativo, pelo teste F.

ANEXO 2. Quadro da análise de variância da condutividade elétrica (CE) e atividades enzimáticas da peroxidase (POX), catalase (CAT) e α -amilase (AM) de dois lotes de sementes de milho armazenadas em três ambientes, por 450 dias.

FV	GL	Quadrados Médios			
		CE	POX	CAT	AM
		($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	(UA. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ prot.)	(UA. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ prot.)	(UA. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ prot.)
Lote (L)	1	206,2328 ^{**}	22,16405 ^{**}	0,804487 ^{**}	12,54016 ^{**}
Ambiente (A)	2	518,1196 ^{**}	373,6396 ^{**}	1,054451 ^{**}	241,6371 ^{**}
L x A	2	2,842165 ^{***}	0,8858462 ^{ns}	0,008135 ^{ns}	0,25124 ^{ns}
Resíduo (a)	18	0,9878563	0,8780741	0,026633	0,508154
Dias de armazenamento (DA)	5	355,9413 ^{**}	250,1210 ^{**}	4,007180 ^{**}	178,3402 ^{**}
DA x L	5	4,181924 [*]	1,033515 ^{ns}	0,064183 ^{ns}	0,12008 ^{ns}
DA x A	10	71,88338 ^{**}	23,25702 ^{**}	0,062459 ^{ns}	19,42022 ^{**}
DA x L x A	10	2,541196 ^{***}	2,003217 ^{**}	0,006628 ^{ns}	1,089231 ^{**}
Resíduo (b)	90	1,475996	0,7918219	0,040578	0,612819
CV Parcela (%)		6,67	9,53	17,41	7,70
CV Subparcela (%)		8,16	9,05	21,49	6,93

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; *** significativo a 10% de probabilidade; ^{ns} não significativo, pelo teste F.