

RAQUEL ALVES DE FREITAS

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE SEMENTES DE ALGODÃO DURANTE A DETERIORAÇÃO
E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE ARMAZENAMENTO**

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
2003**

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

T

F866q
2003

Freitas, Raquel Alves de, 1970-

Qualidade fisiológica e caracterização bioquímica de
sementes de algodão durante a deterioração e avaliação do
seu potencial de armazenamento / Raquel Alves de Frei-
tas.- Viçosa: UFV, 2003.
102p.: il.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Viçosa.

1. Algodão – Sementes – Armazenamento. 2. Algodão -
Sementes – Armazenamento – Qualidade fisiológica. 3.
Algodão – Sementes – Deterioração. 4. Algodão - Semen-
tes – Armazenamento – Alterações bioquímicas. I. Uni-
versidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 633.5121

CDD 20.ed. 633.5121

RAQUEL ALVES DE FREITAS

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE SEMENTES DE ALGODÃO DURANTE A DETERIORAÇÃO
E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE ARMAZENAMENTO**

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: 7 de julho de 2003.

Prof^ª Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Conselheira)

Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias
(Conselheiro)

Prof. Eduardo Fontes Araújo

Prof. Roberto Ferreira da Silva

Prof^ª Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

AGRADECIMENTO

A Deus, que sempre esteve e estará a me conduzir.

À Universidade Federal de Viçosa e, em especial, ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

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

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela orientação, pela amizade, pela compreensão, pela objetividade e pelos ensinamentos.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela co-orientação e pela constante participação.

Ao doutor Luiz Antônio dos Santos Dias, pela orientação nas análises estatísticas, pelos esclarecimentos e atenção em todos os momentos.

Aos professores Eduardo Fontes Araújo e Roberto Ferreira da Silva, pelas sugestões.

Aos professores da UFV e da UFU, os quais muito contribuíram para a minha formação profissional.

À minha mãe e meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado, tornando possível as minhas conquistas.

Ao meu esposo Cláudio, pelo companherismo, pelo incentivo e apoio constante.

Aos amigos Cristina, Tânia, Terezinha, Telma, Vera Lúcia, Carlos Machado e Adílio, com os quais aprendi o verdadeiro significado da palavra amizade.

Aos amigos dos laboratórios de sementes, enzimologia e bioquímica, Carminha, Christiano, Inês, Bárbara, Luciana e Gal pela agradável convivência e pela valiosa colaboração na execução do experimento.

Aos meus colegas e amigos de curso, Telma, Marlei, Josete, Daniella, Andréa, Cândida, Paulo, Ricardo, Wanderlei, Frederico e Diolino, pelo agradável convívio e valioso apoio no decorrer do curso.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para o êxito deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Deterioração de sementes	3
2.2. Armazenamento de sementes.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Avaliação da qualidade das sementes.....	19
3.1.1. Determinação do grau de umidade.....	19
3.1.2. Germinação.....	20
3.1.3. Envelhecimento acelerado.....	20
3.1.4. Germinação a baixa temperatura	20
3.1.5. Condutividade elétrica.....	21
3.1.6. Emergência das plântulas em leito de areia.....	21
3.2. Avaliação bioquímica das sementes	22
3.2.1. Determinação da atividade de lipoxigenase	22
3.2.2. Determinação da atividade de fosfatase ácida.....	23
3.2.3. Determinação de inibidores de protease	23
3.2.4. Determinação de lipídios	24
3.2.5. Determinação de ácidos graxos	25
3.3. Análise estatística.....	25
3.3.1. Experimento 1- Armazenamento (envelhecimento natural)	25
3.3.2. Experimento 2- Envelhecimento artificial.....	26

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Grau de umidade das sementes	28
4.2. Qualidade fisiológica das sementes	30
4.2.1. Germinação	30
4.2.2. Envelhecimento acelerado	34
4.2.3. Germinação a baixa temperatura	38
4.2.4. Condutividade elétrica	42
4.2.5. Emergência das plântulas em leito de areia	44
4.3. Avaliação bioquímica nas sementes	46
4.3.1. Atividade de lipoxigenase	46
4.3.2. Atividade de fosfatase ácida	51
4.3.3. Inibidor de tripsina	56
4.3.4. Lipídios	59
4.3.5. Ácidos graxos	64
4.4. Correlação entre testes para avaliação da qualidade fisiológica e determinações bioquímicas nas sementes	68
4.5. Relação entre as alterações provocadas pelo envelhecimento natural e artificial das sementes	72
4.6. Avaliação do potencial de armazenamento das sementes	81
5. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE	95

RESUMO

FREITAS, Raquel Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Qualidade fisiológica e caracterização bioquímica de sementes de algodão durante a deterioração e avaliação do seu potencial de armazenamento.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Luiz Antônio dos Santos Dias.

Este trabalho teve como objetivos avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes do algodoeiro durante o envelhecimento natural e artificial, verificar se as avaliações bioquímicas podem se constituir em alternativa eficiente para avaliação do vigor e avaliar o potencial de armazenamento destas sementes. Para tanto, sementes de duas variedades (IAC-20 RR e Fabrika) foram armazenadas no Setor de Armazenamento da Unidade de Beneficiamento de Sementes do DFT/UFV durante 12 meses, a partir de maio/2001, em condições de ambiente e em câmara fria. Para provocar o envelhecimento artificial, as sementes foram submetidas a 42°C e 100% UR por períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A qualidade fisiológica (teste de germinação, envelhecimento acelerado, germinação a baixa temperatura) e as avaliações bioquímicas (atividade das enzimas lipoxigenase e fosfatase ácida, inibidor de tripsina, teor de lipídios e ácidos graxos) foram feitas aos 0, 2, 4, 6, 8, 10, e 12 meses de armazenamento e após cada período de envelhecimento artificial. As sementes armazenadas em ambiente e em

câmara fria foram ainda avaliadas pelos testes de condutividade elétrica e emergência das plântulas em leito de areia. Observou-se que os envelhecimentos natural e artificial acarretaram decréscimos na viabilidade, no vigor, nas atividades de lipoxigenase, fosfatase ácida e inibidor de tripsina e nos teores de lipídios das sementes. No entanto, não foi possível determinar associação entre as alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas nas sementes em ambos os processos de envelhecimento. Para as sementes armazenadas em ambiente, maior similaridade entre os resultados de envelhecimento acelerado e natural ocorreu quando se avaliou a germinação a baixa temperatura e a atividade de fosfatase ácida. Os testes de envelhecimento acelerado e de germinação a baixa temperatura, realizados antes do armazenamento, estimaram a viabilidade das sementes, respectivamente, após oito e dez meses de armazenamento em ambiente. As determinações bioquímicas realizadas antes do armazenamento não permitiram prever o potencial de conservação das sementes do algodoeiro; no entanto, estas determinações foram eficientes para monitorar o processo de deterioração durante o armazenamento.

ABSTRACT

FREITAS, Raquel Alves de, Universidade Federal de Viçosa, July 2003.
Physiological quality and biochemical characterization of cotton seed during deterioration and evaluation of its storage potential. Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Committee members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Luiz Antônio dos Santos Dias.

This study was done to evaluate the physiological and biochemical changes during natural and artificial aging of cotton seed and to determine if the biochemical evaluations can act as efficient alternative vigor and the storage potential evaluation. The cotton seeds of two cultivars (IAC-20 RR and Fabrika) were stored from May 2001, for 12 months, under ambient conditions and in a cold room at the storage facility of the seed processing Unit of DFT/UFV. The artificial aging was induced by storing the seeds for 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours at 42°C and 100% relative humidity. The changes in the physiological quality (germination, accelerated aging and cool germination tests) and the biochemical parameters (lipoxygenase and acid phosphatase activity, trypsin inhibitor, lipid and fatty acid content) were determined after each artificial aging period and at two month interval in stored seeds. Electrical conductivity and seedling emergence in sand was also determined for stored seeds. The viability, vigor, lipoxygenase and acid phosphatase activity, trypsin inhibitor, and lipid content of the cotton seed decreased by natural or artificial aging.

However, there was no association between these alterations and the accelerated or natural aging processes. For seeds stored under ambient conditions, maximum similarity with accelerated aging occurred for cool germination and activity acid phosphatase. The accelerated aging and cool germination tests before storage estimated seed viability of eight and ten months, respectively, storage under ambient conditions. The pre-storage biochemical parameters storage did not predict storage potential of cotton seed, but these evaluations can efficiently monitor the deterioration process during storage.

1. INTRODUÇÃO

Dado o fato de que a utilização de sementes de alta qualidade é a base para elevação da produtividade agrícola, qualidade de sementes tem sido objeto de inúmeras pesquisas em decorrência das sementes estarem sujeitas a uma série de mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e física após a sua maturação. Essas mudanças caracterizam o processo de deterioração, o qual está associado com a redução do vigor e perda da capacidade germinativa das sementes.

A detecção do estágio de deterioração de um lote de sementes tem sido feita, freqüentemente, por meio de testes de vigor, que se constituem em ferramenta imprescindível em um programa de controle de qualidade de sementes. O objetivo básico destes testes é identificar diferenças importantes no potencial fisiológico de lotes de sementes, especialmente daqueles que apresentam poder germinativo elevado e semelhante, já que, muitas vezes, estes podem exibir comportamentos distintos quanto ao desempenho em campo e/ou armazenamento.

Estas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que as primeiras alterações nos processos bioquímicos associados à deterioração ocorrem, geralmente, antes que sejam verificados declínios na capacidade de germinação (DELOUCHE & BASKIN, 1973).

O envelhecimento acelerado, no qual as sementes são submetidas a alta temperatura e umidade relativa elevada, tem se destacado como um dos

testes de vigor mais importante para avaliar a qualidade fisiológica de lotes de sementes, bem como estimar o seu potencial de armazenamento. Entretanto, a literatura relata resultados contraditórios quando se comparam as alterações decorrentes da deterioração provocada por esse teste em relação à deterioração natural das sementes durante o armazenamento. Vale ressaltar, contudo, que são escassos os trabalhos que buscam determinar as alterações bioquímicas decorrentes do envelhecimento acelerado e natural, especialmente em sementes de algodão.

Os mecanismos que levam à deterioração da semente ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que a redução na qualidade fisiológica das sementes está relacionada a alterações bioquímicas que conduzem ao comprometimento de suas atividades metabólicas. Dentre estas alterações, destacam-se: mudanças na atividade respiratória e enzimática, nos processos de síntese, nos compostos de reserva, nas membranas celulares e nos cromossomos (ABDUL-BAKI & ANDERSON, 1972).

Considerando que o principal desafio das pesquisas sobre vigor de sementes está na identificação de características que permitam avaliar precocemente o processo de deterioração, o monitoramento destas alterações pode se constituir em ferramenta eficiente para a avaliação da qualidade das sementes. Segundo COPELAND & McDONALD JR. (1985), para detectar o início da deterioração, as avaliações mais sensíveis são aquelas relacionadas à atividade de enzimas associadas à biossíntese em tecidos novos. Neste sentido, pesquisas têm sido conduzidas buscando determinar alterações na atividade de determinadas enzimas associando-as à perda de qualidade da semente.

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes do algodoeiro após o envelhecimento natural, decorrente do armazenamento, e artificial, obtido com o teste de envelhecimento acelerado. Além disso, procurou-se verificar se alterações bioquímicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento podem se constituir em um indicador eficiente do vigor das sementes do algodoeiro. Objetivou-se também avaliar a eficiência de testes fisiológicos e bioquímicos para estimar o potencial de armazenamento das sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Deterioração de sementes

As sementes atingem a máxima qualidade por ocasião da maturidade fisiológica, sendo que, a partir desse ponto, inicia-se o processo de deterioração, caracterizado pela queda progressiva e irreversível da qualidade (DELOUCHE & BASKIN, 1973). Uma seqüência de eventos ocorre nas sementes após a maturidade fisiológica, antes da perda completa da sua viabilidade. Segundo os referidos autores, essa seqüência hipotética se inicia com a desorganização de membranas e perda do controle de sua permeabilidade, que são seguidas pela redução do potencial de armazenamento, da velocidade da germinação, da porcentagem de emergência de plântulas e aumento na ocorrência de anormalidades nas mesmas, culminando com a redução do poder germinativo e morte da semente.

No entanto, a causa exata da perda da viabilidade das sementes ainda não está bem definida. Enquanto nenhuma causa específica tem sido apontada, há um consenso geral entre as pesquisas realizadas, de que o DNA é de alguma forma degradado, prejudicando o processo de transcrição, tendo como conseqüência uma incompleta ou mesmo falha na síntese de enzimas essenciais ao processo germinativo. Com o sistema enzimático comprometido, as reservas armazenadas não são hidrolisadas e, conseqüentemente, a

síntese de ATP fica também prejudicada (McDONALD JR., 1999), provocando um retardamento no desenvolvimento do embrião.

Além dessas perturbações bioquímicas, vários autores têm apontado danos na membrana como o fator chave no processo de deterioração das sementes (DELOUCHE & BASKIN, 1973; KOOSTRA & HARRINGTON, 1973, WILSON JR. & McDONALD JR., 1986; McDONALD JR., 1999).

As membranas celulares são constituídas de uma dupla camada de moléculas de lipídios às quais se associam, interna e externamente, moléculas de proteínas. A dupla camada age como uma barreira à difusão de materiais para o interior e o exterior das células e organelas, além de proporcionar um meio adequado para que proteínas mensageiras transmembranas funcionem. Essa camada é composta por ácidos graxos saturados e insaturados (BEWLEY, 1986).

A peroxidação de lipídios é freqüentemente citada como a principal causa da perda da integridade da membrana e, conseqüentemente, da deterioração de sementes (McDONALD JR., 1999). De acordo com WILSON JR. & McDONALD JR. (1986), o processo de deterioração teria como alteração bioquímica inicial a desestruturação do sistema de membranas em nível celular, por meio da ação de radicais livres. O processo pelo qual os radicais livres se formam é conseqüência da reação de lipídios estruturais, principalmente os poliinsaturados, razão pela qual esse processo é designado peroxidação de lipídios. Segundo os autores, a peroxidação é um processo degradativo que ocorre quando o oxigênio atmosférico entra em contato com as moléculas de triacilglicerídeos.

Segundo BEWLEY & BLACK (1994), a peroxidação de um ácido graxo insaturado ocorre, inicialmente, com a remoção de um átomo de hidrogênio ligado a um carbono adjacente à dupla ligação, para produzir um radical livre, o qual reage com o oxigênio molecular, resultando num rearranjo na cadeia do ácido graxo e na formação de um radical peróxido. Por sua vez, este reage com um ácido graxo insaturado vizinho, para formar um hidroperóxido, o qual é instável e degrada-se, gerando novos radicais livres, perpetuando o processo e produzindo como resultado da decomposição alcanos, olefinas, álcoois e compostos carbonílicos, tóxicos à célula.

Dessa forma, a intensidade e velocidade do processo deteriorativo nas sementes pode estar relacionado à composição química das mesmas. Segundo MEDEIROS FILHO et al. (1996), sementes de algodoeiro apresentam alto teor de óleo (25% - 40%) mostrando-se, portanto, forte predisposição ao processo deteriorativo.

A reação de peroxidação de lipídios é acelerada por uma classe de enzimas denominada lipoxigenases, as quais estão presentes em sementes de muitas espécies. Lipoxigenase (Linoleato oxigênio oxidorreductase, EC 1.13.11.12), também conhecida como caroteno oxidase ou lipoxidase, refere-se a um grupo de dioxigenase que catalisa a adição de oxigênio molecular a moléculas poliinsaturadas contendo o sistema cis, cis-1,4-pentadieno (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987). Ao lado dos ácidos graxos poliinsaturados, principais substratos dessas enzimas, uma variedade de moléculas contendo essa estrutura podem servir de substrato para as lipoxigenases (MACK et al., 1987). O sistema ocorre comumente nos ácidos graxos di e trinsaturados, como os ácidos linoléico e linolênico, os quais são os principais substratos para lipoxigenases em plantas superiores. O linoléico é o mais abundante ácido graxo na maioria dos tecidos de plantas (HILDEDRAND et al., 1988). Segundo BELTRÃO & SOUZA (1999), em sementes de algodoeiro, esse ácido representa 47,8% dos ácidos graxos totais.

Os radicais livres podem agir sobre outros compostos além dos ácidos graxos. Segundo McDONALD JR. (1999), alterações na estrutura de proteínas de sementes têm sido atribuídas à ação desses radicais. BEWLEY & BLACK (1994) afirmam que os produtos resultantes da peroxidação inativam proteínas ligadas à membrana, alterando-lhe a estrutura tridimensional e a permeabilidade.

A deterioração das sementes interfere nos processos fisiológicos e no funcionamento normal das células; no entanto a identificação de uma causa comum do processo deteriorativo tem sido um desafio para os tecnologistas de sementes. De acordo com ROBERTS (1973), a falta de esclarecimentos sobre suas causas deve-se ao grande número de alterações fisiológicas e metabólicas que ocorrem no processo, o que torna difícil a identificação de causa e efeito a uma resposta deteriorativa específica.

Para DIAS & MARCOS FILHO (1995), a desestruturação e a perda da integridade do sistema de membranas celulares causadas principalmente, pela oxidação de lipídios, promovem alterações no metabolismo e nas trocas de água e solutos entre as células e o meio exterior, levando a reflexos diretos sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Segundo CHING (1973), os primeiros sítios de envelhecimento em nível celular são a mitocôndria, as membranas e os ribossomos.

As células, no entanto, apresentam um complexo sistema de defesa antioxidante para se proteger dos danos causados pelas espécies de oxigênio ativo (McDONALD JR., 1999). Esse mecanismo de proteção envolve várias enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos, como superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase (HARRINGTON, 1973; HALMER & BEWLEY, 1984; McDONALD JR., 1999).

Assim, variações na atividade de proteínas e enzimas específicas podem se constituir em ferramenta eficiente e interessante na determinação de mudanças bioquímicas resultantes do processo deteriorativo (CHAUHAN et al., 1985; CARRARO, 1990; VIEIRA, 1996). Além disso, também têm sido correlacionadas com a deterioração mudanças na composição e concentração de macromoléculas como proteínas, carboidratos (ANDERSON, 1973; BASAVARAJAPPA et al., 1991) e lipídios (ANDERSON, 1973).

SUNG & JENG (1994) observaram que o envelhecimento acelerado estimulou a peroxidação de lipídios e reduziu a atividade de enzimas removedoras de peróxido, como a peroxidase e a superóxido dismutase, motivo pelo qual, sementes envelhecidas acumulam mais peróxidos do que as não envelhecidas. Os autores constataram ainda, redução na atividade de lipoxigenase.

BASAVARAJAPPA et al. (1991), avaliando o processo de deterioração de membrana e outras mudanças bioquímicas em sementes de milho submetidas ao envelhecimento acelerado, verificaram decréscimo na atividade de peroxidase, fosfatase ácida, fosfomonoesterase e desidrogenases. Segundo os autores, um substancial aumento na concentração de aminoácidos livres e na atividade de amilase e protease confirmaram a degradação de biomoléculas armazenadas em sementes, durante o período de envelhecimento. Também

PERL et al. (1978) observaram aumento na atividade de protease durante o envelhecimento acelerado de sementes de sorgo.

Variações eletroforéticas nos perfis de proteínas e enzimas específicas podem ser uma eficiente ferramenta na determinação de mudanças bioquímicas decorrentes do processo de deterioração (CHAUHAN et al., 1985). Neste contexto, BRANDÃO JR. et al. (1999) verificaram que variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de milho e que, dentre as enzimas estudadas, a sorbitol desidrogenase e a glutamato-oxaloacetato transaminase podem ser consideradas promissores marcadores bioquímicos para avaliação da qualidade de sementes em início de deterioração. Os autores verificaram ainda que houve diminuição do número e/ou da intensidade das bandas das enzimas álcool desidrogenase, glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, sorbitol desidrogenase e peroxidase com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado. Já os perfis eletroforéticos do grupo das hidrolases apresentaram um aumento no número de bandas e redução da intensidade para a esterase, enquanto a fosfatase ácida só apresentou atividade a partir de 96 horas de envelhecimento.

Avaliando as possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho submetidas ao envelhecimento acelerado, SPINOLA et al. (2000) verificaram que as alterações das isoenzimas fosfatase ácida e peroxidase foram mais efetivas do que os testes de vigor para avaliar a qualidade das sementes; já a malato desidrogenase manteve seus padrões inalterados com o avanço do processo deteriorativo.

As fosfatases ácidas (ortofosfato-monoéster: fosfo-hidrolase, EC 3.1.3.2) são um grupo de enzimas que catalizam a hidrólise de fosfato monoésteres. Segundo Plaxton, 1996 citado por AOYANA et al. (2001) estas fosfatases geralmente estão presentes em múltiplas formas, exercendo diferentes propriedades bioquímicas e exibem uma maior atividade a pH ótimo abaixo de 6,0. Várias funções têm sido atribuídas a fosfatase ácida em plantas, incluindo participação na tradução de sinais. De acordo com DUFF et al. (1994) elas participam da regulação do metabolismo por meio da desfosforilação de proteínas. O fósforo não somente exerce um papel vital na transferência de energia e regulação metabólica, mas é também um importante constituinte de

fosfolipídios e ácidos nucleicos. Segundo SPINOLA et al. (2000), esta enzima atua sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação desses lipídios.

Plantas, animais e microrganismos contêm proteínas e outras moléculas que apresentam a propriedade de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade dessas proteases por competição pelo seu sítio catalítico. Estas proteínas são denominadas de inibidores de proteases, cuja massa molecular varia de 10 a 90 KDa, na maioria dos casos, podendo exibir alta especificidade ou não em relação à enzima inibida. A maioria dos inibidores de proteases conhecida e caracterizada pertence ao grupo das serino-proteases, como a tripsina (RICHARDSON, 1991). A avaliação de inibidores de proteases em sementes tem sido geralmente realizada pelo fato destes inibidores estarem relacionados a fatores anti-nutricionais (LAM et al., 1999). No entanto, é possível que inibidores de proteases estejam também relacionados com as funções fisiológicas das sementes. Segundo RYAN (1973), os altos níveis de inibidores de proteases encontrados em sementes de muitas espécies vegetais levam a algumas suposições sobre seu papel fisiológico. Provavelmente, agem como proteínas de reserva ou armazenamento, como reguladores de enzimas endógenas ou como agentes de defesa contra insetos predadores ou microrganismos patogênicos. Para TREMACOLDI (2001), inibidores de proteases podem controlar proteases endógenas, prevenindo a hidrólise prematura de materiais de reserva. De acordo com LAM et al. (1999), os inibidores de tripsina se acumulam na fase final do desenvolvimento das sementes à semelhança do que ocorre com as proteínas abundantes do final da embriogênese (LEA), coincidindo com a aquisição da tolerância à dessecação em sementes.

Enquanto vários estudos utilizam o teste de envelhecimento acelerado com o objetivo de elucidar as diversas alterações ocorridas nas sementes durante o processo de deterioração, os pesquisadores ainda não chegaram a um consenso se os eventos produzidos pelo envelhecimento acelerado são semelhantes aos ocorridos nas sementes submetidas ao envelhecimento natural. Assim, algumas pesquisas vêm sendo conduzidas buscando comparar as alterações decorrentes do envelhecimento natural e artificial em sementes de várias espécies.

De acordo com PRIESTLEY & LEOPOLD (1983), o envelhecimento acelerado, apesar de proporcionar redução no vigor, provoca alterações nas sementes de forma diferente do que é observado no envelhecimento natural. POWELL & HARMAN (1985) questionaram se os eventos fisiológicos ocorridos durante o envelhecimento acelerado refletiam aqueles ocorridos durante o envelhecimento natural. RAJAGOPAL & SEN-MANDI (1992) observaram maior atividade da fosfatase ácida em sementes de arroz envelhecidas artificialmente em relação às envelhecidas naturalmente e àquelas não envelhecidas. Em contraste, LIKHATCHEV et al. (1984) verificaram em sementes de várias espécies, redução no conteúdo de açúcares solúveis, aumento na hidrólise de fitina e mudança na mobilidade eletroforética de proteínas específicas tanto durante o envelhecimento natural como acelerado. Os referidos autores concluíram que as mudanças bioquímicas ocorridas durante o envelhecimento acelerado foram semelhantes às ocorridas durante o envelhecimento natural, variando apenas a taxa de ocorrência.

Em sementes de feijão, os padrões eletroforéticos de proteínas totais alteraram após 72 horas de envelhecimento acelerado, enquanto que sementes naturalmente envelhecidas só apresentaram alterações após dois anos de armazenamento a 15°C (MACHADO NETO et al., 2001). Os autores verificaram ainda que características fisiológicas, como germinação e vigor, foram mais eficientes para monitorar a deterioração em sementes naturalmente envelhecidas, enquanto que para as sementes envelhecidas artificialmente (41°C/100%UR), as mudanças no padrão de bandas de proteínas (avaliações eletroforéticas) foram mais adequadas.

McDONALD JR. & KAMALAY (1990) verificaram que sementes armazenadas sob condições ideais tiveram pequena ou nenhuma alteração no padrão de proteína. Contudo, BASAVARAJAPPA et al. (1991) detectaram decréscimo no conteúdo total de proteína após o envelhecimento das sementes, e estes resultados foram associados com um aumento na concentração de aminoácidos livres, sugerindo degradação das proteínas por proteases.

Com a intensificação do processo deteriorativo ocorre redução na quantidade de lipídios nas sementes, em decorrência da oxidação destes (KOOSTRA & HARRINGTON, 1973; BASAVARAJAPPA et al., 1991; KALPANA

& MADHAVA RAO, 1996). Por outro lado, POWELL & HARMAN (1985) não detectaram redução deste componente em sementes em deterioração.

PRIESTLEY & LEOPOLD (1983) verificaram que o armazenamento das sementes de soja por 44 meses, em condição ambiente, promoveu declínio bastante acentuado no vigor e na viabilidade dessas sementes, o que estava associado com decréscimo na proporção de ácidos graxos poliinsaturados. Segundo BUBECK et al. (1989), à medida em que ocorre redução nos valores de ácidos graxos poliinsaturados, em decorrência do processo de oxidação dos lipídios, há um aumento na proporção relativa dos ácidos graxos saturados.

HARMAN & MATTICK (1976), trabalhando com sementes de ervilha e STEWART & BEWLEY (1980), com sementes de soja, encontraram mudanças na concentração de ácidos graxos após o teste de envelhecimento acelerado. Por outro lado, outros autores não confirmaram estas alterações em sementes deterioradas (PRIESTLEY & LEOPOLD, 1979; PEARCE & ABDEL SAMAD, 1980; SENERATNA et al., 1988).

Por sua vez, PÉREZ & ARGÜELLO (1995) não observaram mudanças na proporção relativa dos ácidos oléico/linoléico em eixos embrionários de sementes de amendoim após exposição a diferentes períodos de envelhecimento acelerado. As alterações bioquímicas decorrentes tanto do envelhecimento acelerado como do envelhecimento natural foram melhores detectadas quando se avaliaram a lixiviação de eletrólitos e o conteúdo de malonaldeído (produto da peroxidação de lipídios).

Para BAILLY et al. (1996), o envelhecimento acelerado pode desnaturar enzimas em diferentes graus ou afetar a sua síntese. Os autores observaram clara relação entre a perda da atividade de enzimas detoxificantes, peroxidação de lipídios e deterioração das sementes durante o envelhecimento acelerado. No entanto, ressaltam a dificuldade de distinção se os danos oxidativos e redução na atividade das enzimas são causas ou conseqüências da perda da viabilidade das sementes.

Pelas observações descritas na literatura, verificou-se que tanto o envelhecimento natural como o artificial resultam em danos às estruturas celulares e subcelulares, tais como membranas, organelas e moléculas de reserva (McDONALD JR., 1975), sendo que muitas dessas alterações metabólicas ainda necessitam ser melhor elucidadas. Tais alterações resultam

em mudanças fisiológicas nas sementes que afetam o seu vigor e, conseqüentemente, o seu desempenho em campo. Dessa forma, transformações degenerativas sutis, que exercem grande influência no potencial de desempenho das sementes com reflexos na capacidade de armazenamento, na emergência no campo, no crescimento e na produtividade das plantas (AOSA, 1983), têm sido detectadas e avaliadas pelos testes de vigor. De acordo com MARCOS FILHO (1999b), estes testes representam uma importante ferramenta para a caracterização da qualidade fisiológica das sementes.

Ao longo dos anos, diversos testes de vigor têm sido desenvolvidos e propostos. Segundo VENTER (2000), esses testes podem ser classificados nas seguintes categorias: testes de estresse, testes bioquímicos e testes de crescimento e avaliação de plântulas.

O envelhecimento acelerado tem sido um dos testes de vigor mais utilizado devido a sua aplicabilidade para sementes de diversas culturas (McDONALD JR., 1995). Nesse teste, as sementes são submetidas a alta temperatura e umidade relativa por um período relativamente curto, sendo, em seguida, colocadas para germinar (AOSA, 1983). Este teste foi originalmente desenvolvido para determinar o potencial de armazenamento das sementes. No entanto, estudos têm mostrado que seus resultados estão correlacionados com a emergência de plântulas de algodão, ervilha, feijão e soja (VENTER, 2000).

LAGO (1985), avaliando a eficiência de testes de vigor na predição do potencial de armazenamento de sementes de algodoeiro, observou que, em sementes tratadas com fungicidas, o teste de envelhecimento acelerado (42°C/72 h) foi o mais eficaz, destacando-se dos demais. Também, LAPOSTA et al. (1995) detectaram que o teste de envelhecimento acelerado foi um dos mais eficiente para a avaliação do vigor destas sementes, permitindo a separação de lotes em diferentes níveis de vigor e potencial de emergência de plântulas em campo.

O teste de germinação à baixa temperatura, conduzido a 18°C, foi desenvolvido inicialmente para avaliar o vigor de sementes de algodão (AOSA, 1983) e vem sendo um dos testes mais empregado para esta espécie (TOLLIVER et al., 1997). De acordo com HOPE & MAAMARI (1994), a baixa

temperatura, principalmente durante o período inicial de embebição, interfere na qualidade fisiológica das sementes. Segundo DIAS & ALVARENGA (1999), o estresse ocasionado pela baixa temperatura pode alterar o padrão de germinação, reduzindo a velocidade de emergência das plântulas. Assim, a utilização do teste de germinação à baixa temperatura em lotes de sementes com capacidade de germinação semelhante, porém diferindo quanto ao vigor, pode permitir identificar diferenças marcantes na porcentagem de emergência das plântulas, permitindo inferir sobre o seu desempenho no campo, especialmente quando a semeadura for realizada em locais sujeitos à baixa temperatura. Dessa forma, FREITAS et al. (2000b), correlacionando os resultados dos testes conduzidos em laboratório aos de emergência das plântulas de algodoeiro em campo, verificaram que em condições adversas, a emergência em campo apresentou maior correlação com o vigor, avaliado por meio da germinação à baixa temperatura. FREITAS et al. (2000a) observaram que este teste mostrou-se também o mais eficiente para avaliar o vigor das sementes durante o armazenamento.

Segundo KERBY et al. (1989), lotes de sementes de algodoeiro que apresentam germinação, a 18°C, superior a 60% podem ser considerados adequados para semeadura em campo. A principal vantagem do teste de germinação a baixa temperatura consiste em ser realizado segundo os procedimentos rotineiros utilizados no teste de germinação, sendo os critérios para avaliação de plântulas padronizados.

Como a deterioração de sementes está associada com a perda da integridade das membranas celulares, testes de vigor baseados neste princípio também têm sido utilizados em diferentes espécies. De acordo com BEWLEY & BLACK (1994), no início do processo de absorção de água, mesmo em sementes viáveis, há um rápido efluxo de compostos orgânicos e inorgânicos para o meio de embebição, pois a integridade da membrana plasmática se encontra incompleta. A situação é revertida no decorrer da embebição, quando a membrana adquire uma configuração mais estável devido a mecanismos de reparo. Segundo esses autores, em sementes de baixa viabilidade ou não viáveis tais mecanismos podem estar ausentes ou ineficientes, ou, ainda, as membranas podem estar tão danificadas que o reparo torna-se impossível. Baseado na integridade das membranas, o teste de condutividade elétrica tem

se mostrado uma alternativa interessante para avaliar a qualidade das sementes.

No entanto, SMITH & VARVIL (1985), avaliando 17 lotes comerciais de sementes de algodoeiro, verificaram que os resultados de condutividade individual, obtidos pelo método ASA-610, não apresentaram exatidão na estimativa do potencial de germinação de sementes deslintadas com ácido. HOPPER & HINTON (1987), em dois ensaios com sementes de algodoeiro, também obtiveram resultados pouco consistentes, ao utilizarem o método ASA-610, indicando, assim, dificuldades na avaliação da qualidade dessas sementes por meio da condutividade individual. Este procedimento, portanto, não se mostrou adequado para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes de algodão.

Por sua vez, TORRES (1997), verificou que os testes de condutividade elétrica, pelo método de massa, frio sem solo e comprimento de plântulas sob estresse hídrico a -0,3 MPa foram os mais eficientes para diferenciar os níveis de vigor das sementes de algodoeiro, mostrando maior correlação com a emergência de plântulas em campo. O autor constatou, também, que a germinação superestimou o desempenho das sementes em campo. Entretanto, a primeira contagem do teste de germinação, os testes de frio sem solo e de envelhecimento acelerado o subestimou.

Mais recentemente, PÁDUA & VIEIRA (2001b) verificaram que o teste de condutividade elétrica não se mostrou adequado para avaliar o vigor de sementes de algodão e mencionaram a necessidade de se adequar a metodologia do teste para as sementes desta espécie.

Pelo exame da literatura, verifica-se, portanto, que o teste de condutividade elétrica ainda não pode ser considerado como uma opção eficiente para avaliar o vigor das sementes de algodão. Cabe ressaltar que, o principal desafio das pesquisas sobre testes de vigor está na identificação de características adequadas, comuns à deterioração das sementes, de forma que, quanto mais distante da perda da capacidade de germinação estiver a característica empregada, mais promissor será o teste (AOA, 1983).

Os conhecimentos atuais sobre a deterioração das sementes sugerem que as macromoléculas essenciais para a germinação podem ser degradadas durante o processo de envelhecimento das sementes. Desse modo têm se

intensificado o desenvolvimento de testes bioquímicos mais sensíveis para avaliação do vigor e do potencial de armazenamento das sementes. Tais testes geralmente se baseiam nas alterações enzimáticas ou das substâncias de reserva das sementes. Neste sentido, MACHADO NETO et al. (2001) verificaram que características fisiológicas, como germinação e vigor, foram mais eficientes para monitorar a deterioração em sementes de feijão naturalmente envelhecidas, enquanto que para as sementes envelhecidas artificialmente (41°C/100%UR), as mudanças no padrão de bandas de proteínas (avaliações eletroforéticas) foram mais adequadas.

2.2. Armazenamento de sementes

Na maturidade fisiológica as sementes atingem o máximo vigor. Entretanto, as condições adversas ocorridas entre esse estágio e a colheita podem contribuir para aumentar a velocidade do processo deteriorativo das sementes. No algodoeiro, a deiscência das maçãs ocorre da base para o ápice da planta, podendo haver uma diferença de até 60 dias entre a abertura da primeira e da última maçã. Diante disso, o poder germinativo das sementes bem como o seu potencial de armazenamento podem ser afetados por condições ambientais, devido à exposição prolongada do fruto no campo (POPINIGIS, 1985).

A manutenção da qualidade da semente durante o período de armazenamento é um aspecto a ser considerado dentro do processo produtivo de qualquer cultura, visto que o sucesso de uma lavoura depende, principalmente, da utilização de sementes com altos padrões de qualidade (MEDEIROS FILHO, 1996).

Segundo CARVALHO & NAKAGAWA (2000), no armazenamento, a velocidade do processo deteriorativo pode ser controlada em função da longevidade, da qualidade inicial das sementes e das condições do ambiente. Como a longevidade é uma característica genética inerente à espécie, somente a qualidade inicial das sementes e as condições do ambiente de armazenamento podem ser manipuladas.

Durante o período de armazenamento, a temperatura e a umidade relativa do ar são os principais fatores físicos que afetam a manutenção da qualidade das sementes. Desses dois fatores, a umidade relativa é considerada mais importante, dada a sua relação direta com o grau de umidade das sementes, uma vez que aumento no teor de água da semente eleva a sua atividade metabólica. Entretanto, a temperatura contribui significativamente, afetando a velocidade dos processos bioquímicos (DELOUCHE et al., 1973). Conseqüentemente, o período de viabilidade da semente pode ser aumentado não somente pela redução da umidade, mas também pela redução da temperatura de armazenamento.

Durante o armazenamento de sementes de algodoeiro, em dois ambientes (câmara fria e condições não controladas), MEDEIROS FILHO et al. (1996) observaram que, quando as sementes foram armazenadas em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa, ocorreu redução significativa da germinação e do vigor, durante um período de quatro meses.

HALDER & GUPTA (1980) verificaram que sementes de girassol armazenadas a temperatura de 28°C foram completamente deterioradas aos 90 dias quando mantidas em condições de 95% de umidade relativa do ar. Por outro lado, as sementes armazenadas em ambiente de 85% de umidade relativa, permaneceram viáveis por 120 dias; nessas condições, a germinação declinou rapidamente após os 150 dias. Contudo, as sementes armazenadas em ambiente com 50% de umidade relativa não foram afetadas. Portanto, a umidade relativa do ar e o período de permanência nas diferentes condições foram os principais fatores envolvidos no processo de deterioração dessas sementes.

O vigor das sementes no início do armazenamento é outro fator de grande importância, pois afeta diretamente o potencial de conservação. Assim, lotes de sementes vigorosas geralmente mantêm sua qualidade fisiológica durante período de tempo prolongado.

Estudos conduzidos por PAOLINELLI & BRAGA (1997), avaliando alterações na qualidade de sementes de algodoeiro durante o armazenamento, mostraram interações altamente significativas entre níveis de vigor e períodos de armazenamento. Para o lote de vigor alto, não houve diferenças entre condições de armazenamento até cinco meses. Após esse período, aos

10 meses, a qualidade das sementes armazenadas em condições ambientais decresceu drasticamente. Por outro lado, os lotes armazenados em câmara fria foram estatisticamente superiores e mantiveram a germinação, quando comparados àqueles mantidos em condições ambientais. Trabalhando com sementes de algodão, PÁDUA & VIEIRA (2001a) e PÁDUA et al. (2002) também observaram que lotes de baixo vigor apresentaram menor tolerância ao armazenamento.

PÁDUA et al. (2002) armazenaram sementes de algodão com diferentes níveis de vigor em condição ambiente e verificaram que a qualidade das sementes foi mantida até o oitavo mês de armazenamento, sendo que a redução da qualidade foi associada ao aumento na ocorrência de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. nas sementes. FREITAS et al. (2000a) também constataram aumento da incidência de fungos de armazenamento no decorrer do armazenamento; os autores observaram ainda, decréscimo da viabilidade e do vigor das sementes de algodão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Enzimologia do BIOAGRO na UFV. Foram utilizadas sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), deslintadas quimicamente, das variedades IAC-20 RR e Fabrika, fornecidas pela empresa Syngenta.

Experimento 1- Armazenamento das sementes (envelhecimento natural):

Para cada variedade, amostras de 10 kg de sementes foram homogeneizadas e acondicionadas em embalagens permeáveis (sacos de papel). Metade da amostra (5 kg) foi armazenada em câmara fria (CF), à temperatura de $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar e a outra metade (5 kg) em condições ambiente (Amb) no Setor de Armazenamento da Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFV. Tanto em câmara fria como em ambiente, as sementes permaneceram armazenadas por um período de 12 meses, a partir de maio de 2001.

As sementes armazenadas em câmara fria e em ambiente foram submetidas a testes para avaliação da qualidade (determinação do grau de umidade, germinação, envelhecimento acelerado, germinação a baixa temperatura, condutividade elétrica e emergência das plântulas em leito de areia) e testes bioquímicos (determinação da atividade das enzimas lipoxigenases, fosfatase ácida, inibidor de tripsina, teor de lipídios e ácidos

graxos), conforme metodologias descritas nos itens 3.1 e 3.2, respectivamente, conduzidos aos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses de armazenamento.

Para as determinações bioquímicas, foram coletadas 100 sementes de cada tratamento em cada época de avaliação que foram armazenadas a -20°C até a realização das análises.

O monitoramento da temperatura e da umidade relativa do ar, no armazenamento em ambiente foi realizado durante todo o período, por meio de registro em um termohigrógrafo. Os dados das temperaturas máxima e mínima e da umidade relativa do ar média estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

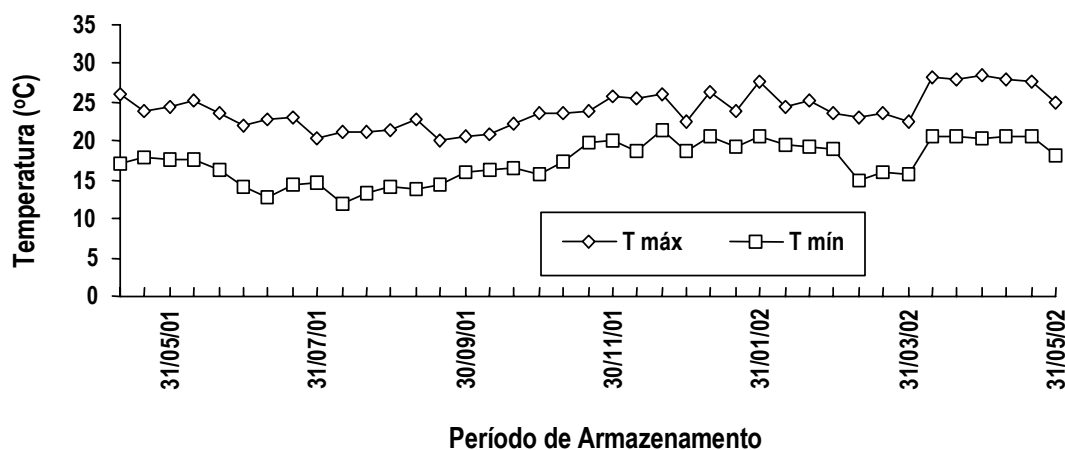
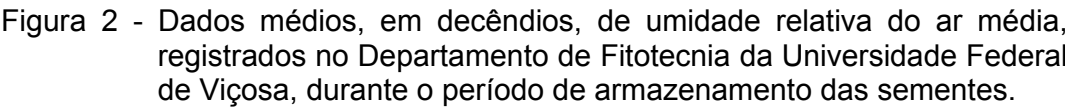


Figura 1 - Dados médios, em decêndios, de temperatura máxima e mínima, registrados no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, durante o período de armazenamento das sementes.

Experimento 2- Envelhecimento artificial:

As sementes das duas variedades foram envelhecidas artificialmente em incubadora tipo BOD nas condições recomendadas para o teste de envelhecimento acelerado. Para tanto, as sementes foram distribuídas em camada única sobre bandeja de tela acoplada ao gerbox, o qual continha ao fundo 40 mL de água. Os gerbox foram tampados, para se obter 100% de



Para as determinações bioquímicas, foram também coletadas 100 sementes de cada tratamento em cada período de envelhecimento que foram armazenadas a -20°C até a realização das análises.

3.1.1. Determinação do grau de umidade

19

3.1.2. Germinação

Foi conduzido com oito subamostras de 25 sementes, em rolo de papel germitest, umedecido com água, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador a 25°C. Foram realizadas contagens aos quatro e sete dias após a instalação do teste. As avaliações foram feitas conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais.

3.1.3. Envelhecimento acelerado

Utilizou-se a metodologia proposta pela AOSA (1983) e descrita por MARCOS FILHO (1999a). Foram utilizadas 250 sementes por tratamento, as quais foram distribuídas sobre uma tela de alumínio, fixada em caixa plástica tipo "gerbox", contendo, ao fundo, uma lâmina de água destilada de 40 mL. Para provocar o envelhecimento, os "gerbox", contendo as sementes, foram fechados e acondicionados em uma incubadora tipo BOD, sob temperatura de 42°C, durante 72 h, conforme LAGO (1985). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, seguindo-se o mesmo procedimento descrito no item 3.1.2. Uma única avaliação foi realizada aos quatro dias após a instalação do teste, seguindo-se os mesmos critérios estabelecidos para o teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais.

As 50 sementes restantes foram utilizadas para determinação do grau de umidade após o envelhecimento, seguindo-se o mesmo procedimento descrito no item 3.1.1.

3.1.4. Germinação a baixa temperatura

Adotou-se a metodologia recomendada pela AOSA (1983) e descrita por DIAS & ALVARENGA (1999). Conduziu-se a avaliação com quatro subamostras de 50 sementes por tratamento, conforme método descrito no

item 3.1.3., para o teste de germinação, sendo que os rolos foram acondicionados dentro de sacos plásticos e mantidos em BOD a 18°C, sob escuro. A avaliação foi feita oito dias após a instalação do teste, sendo computadas as plântulas normais que apresentavam o eixo hipocótilo-radícula com comprimento maior ou igual a 4 cm. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.1.5. Condutividade elétrica

Para essa avaliação, foi adotada a metodologia proposta pela AOSA (1983) e relatada por VIEIRA & KRZYZANOWSKI (1999). Foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes por tratamento, pesadas com precisão de 0,001 g e, posteriormente, colocadas em copos plásticos, contendo 75 mL de água destilada, permanecendo em uma incubadora tipo BOD, a 25°C, durante 24 h. Decorrido esse período, o conteúdo dos copos foi agitado com bastão de vidro para permitir uniformização dos lixiviados na solução procedendo-se, então, às leituras da condutividade elétrica na solução de embebição em condutivímetro DIGIMED modelo CD-21. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ de semente.

3.1.6. Emergência das plântulas em leito de areia

Foi realizada em caixas plásticas contendo areia peneirada e esterilizada com brometo de metila, utilizando-se quatro subamostras de 50 sementes para cada tratamento. Em cada caixa foram semeadas 50 sementes por sulco a profundidade de 2 cm, num total de quatro sulcos por caixa. Irrigações foram efetuadas sempre que necessário. A avaliação da porcentagem de emergência de plântulas foi efetuada aos 10 dias após a semeadura.

3.2. Avaliação bioquímica das sementes

3.2.1. Determinação da atividade de lipoxigenase

Para obtenção do extrato, uma semente foi macerada em almofariz em banho de gelo, utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção 1:10 (p/v). Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 17.200 $\times g$ por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de lipoxigenase e de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico desenvolvido por SMITH et al. (1985).

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por AXELROD et al. (1981). Neste método, é medido o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

O substrato foi preparado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel-alumínio contendo 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 μL de ácido linoléico e 90 μL de Tween 20 (SIGMA). Para o clareamento da solução, foram adicionadas gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL aferindo-se o volume. Esta solução-estoque foi armazenada em tubos de plástico de 2 mL com tampa, envolvido em papel-alumínio e armazenado a -20°C.

Para as análises das atividades de lipoxigenase, misturam-se 1,0 μL do extrato e 4,0 μL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 5,0 a 25°C, de acordo com os resultados de experimentos preliminares. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 15 em 15 segundos, a 234 nm, por um período de 2,5 minutos. O mesmo procedimento foi usado para o branco, o qual não continha o extrato da semente. As velocidades iniciais, obtidas pela medida de absorção a 234 nm, em função do tempo, foram determinadas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 25.000 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o produto formado. Todas as incubações foram feitas em triplicatas.

3.2.2. Determinação da atividade de fosfatase ácida

Para obtenção do extrato, uma semente foi macerada em almofariz em banho de gelo, utilizando tampão acetato de potássio 0,1 M, pH 5,0, na proporção 1:10 (p/v). Posteriormente, centrifugado a 24.700 xg por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de fosfatase ácida.

A atividade da enzima fosfatase ácida foi determinada seguindo a metodologia descrita por MAIA et al. (2000). Para tanto, 50 µL do extrato foi adicionado a uma mistura contendo 100 µL do substrato p-nitrofenil fosfato 0,018 M e 800 µL do tampão acetato de potássio 0,1 M, pH 5,0. Os tubos foram incubados a 30 °C por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se um mL de hidróxido de sódio 0,5 M e procedeu-se a leitura em espectotômetro a 400 nm, após o branco (1 mL da solução tampão e 2 mL de água destilada). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância a 400 nm. min⁻¹. mg⁻¹ de semente. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.2.3. Determinação de inibidores de protease

Para obtenção do extrato, uma semente foi macerada em almofariz em banho de gelo, utilizando tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂, na proporção 1:10 (p/v). O homogenato foi centrifugado a 17.200 xg por 30 minutos, a 4 °C. A presença de inibidores de proteases foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade trípica, na presença ou na ausência de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico: para a análise do teste, 100 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂; e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M foram adicionados em um tubo de ensaio. Para o controle da enzima, foram adicionados, num outro tubo de ensaio, 600 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂; 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M. Essa mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após este tempo foram retirados 500 µL da mistura de incubação, do teste e do respectivo controle e adicionados a outro tubo com

500 µL Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂ e 500 µL da solução de D,L-BApNA 1,2 mM. A absorvância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas em triplicatas.

Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P}, \text{ sendo}$$

A = Absorvância a 410 nm do padrão – Absorvância a 410 nm da amostra;

B = Diluição da amostra;

P = Concentração, em g/mL, de proteína do extrato; e

C = Fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BApNa dá uma leitura de absorvância em 410 nm de 0,019 (KAKADE et al., 1974).

3.2.4. Determinação de lipídios

A determinação de lipídios foi realizada em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 24 horas. Foram utilizadas três subamostras de três gramas para cada tratamento. Foram utilizados balões previamente aquecidos por uma hora em estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, resfriados em dessecadores até a temperatura ambiente e pesados. Após a extração, o éter foi recuperado e os balões contendo o óleo foram colocados em estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de cinco horas. Posteriormente, os balões foram resfriados em dessecadores, sendo então pesados. Após a primeira pesagem, os balões foram novamente levados à estufa por uma hora, resfriados e pesados seguindo o mesmo procedimento já descrito. Esse processo foi repetido até atingir peso constante. A determinação da porcentagem de lipídios foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{P2 \times P1}{PA} \times 100, \text{ sendo}$$

P2= Peso do balão após extração e secagem;

P1= Peso do balão vazio; e

PA= Peso da subamostra utilizada na análise.

3.2.5. Determinação de ácidos graxos

A separação e a identificação de ácidos graxos foram feitas por cromatografia gasosa. Foram moídas aproximadamente três gramas de sementes, sendo retiradas três subamostras de 20 mg. A cada subamostra foi adicionado 1,0 mL de hexano, sendo a mistura mantida a 4°C por cerca de 15 horas, sob atmosfera de N₂. Após esse período, a solução de lipídios em hexano foi transferida para outro tubo, sendo o solvente evaporado por borbulhamento de N₂. Para obtenção dos ésteres metílicos, utilizou-se a metodologia descrita por JHAM et al. (1982). Esse método consiste em, após a saponificação dos triglicerídeos pela adição de uma solução de KOH 0,5 M em metanol, seguida de aquecimento a 100°C, por cinco minutos, promover a esterificação dos ácidos graxos pela adição de uma solução HCl 36% (p/p) e metanol (4:1 v/v) e o aquecimento a 100°C, durante 15 minutos. Após a adição de 2 mL de água e três consecutivas extrações com 2 mL de éter de petróleo, à fase orgânica é adicionado sulfato de sódio anidro, sendo essa concentrada e redissolvida em hexano. Finalmente 1,0 µL da fase orgânica foi injetado em coluna carbowax (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm), utilizando a técnica de injeção com divisão de fluxo, na proporção 1:10. Foi utilizado um cromatógrafo a gás GC-17 A, equipado com detector de ionização de chama, auto-injetor AOC-17 e integrador C-R7A, marca SHIMADZU. As condições de análise empregadas foram: temperatura da coluna de 215°C; do injetor, 240°C; e do detector, 280°C. Foi utilizado o nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 1,3 mL/min. A quantificação foi realizada pelo método de normalização.

3.3. Análise estatística

3.3.1. Experimento 1- Armazenamento das sementes (envelhecimento natural):

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, e analisado num esquema de parcelas subdivididas. As variedades (Fabrika e IAC-20 RR) e as condições de armazenamento (ambiente e câmara fria) foram

alocadas em esquema fatorial nas parcelas e os períodos de armazenamento (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses) nas subparcelas.

3.3.2. Experimento 2- Envelhecimento artificial:

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, e analisado num esquema de parcelas subdivididas. As parcelas constaram das mesmas variedades utilizadas no envelhecimento natural (experimento 1) e as subparcelas foram constituídas pelos períodos de envelhecimento (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas).

Nos dois experimentos, os testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram conduzidos com quatro repetições, enquanto que os bioquímicos foram conduzidos com três repetições.

Os dados dos dois experimentos foram inicialmente submetidos a testes de normalidade, os quais evidenciaram um ajuste adequado à distribuição normal e dispensaram a transformação. Posteriormente, foram submetidos à análise tradicional de variância em parcela subdividida. Sempre que a interação simples foi significativa foi feito o desdobramento. A fonte de variação referente a interação tripla, quando não significativa, foi inserida no erro b. O arranjo em parcela subdividida presume que os pares de medidas tomados sobre a mesma parcela são igualmente correlacionados. Como isso nem sempre ocorre, foi então realizada a análise de medidas repetidas também em parcela subdividida. Nesta última, estão envolvidas análises de variância uni e multivariada, estabelecendo-se relação entre elas e verificando a validação dos testes F para os efeitos de período de armazenamento e de envelhecimento artificial (meses e horas, respectivamente), bem como para todas as interações envolvendo estes efeitos. Procedeu-se também, a aferição das probabilidades para os testes F por meio das condições estabelecidas por Huynh-Feldt (H-F) e Greenhouse-Geisser (G-G), assim como o teste de esfericidade ou critério de Mauchly, que indica se os testes F univariados usuais para os efeitos período de armazenamento e envelhecimento artificial são válidos. A análise de medidas repetidas foi tratada por LITTEL (1989) e está sendo aplicada em tecnologia de sementes (DIAS et al., 2002).

Para os períodos de armazenamento e envelhecimento artificial, foram aplicadas análises de regressão. Todas as análises de variância foram processadas com o uso do programa SAS (SAS, 1989), procedimentos GLM e REPEATED.

Foram estimados ainda os coeficientes de correlação de Pearson entre os testes empregados para a avaliação da qualidade fisiológica e as determinações bioquímicas nas sementes, para cada condição de armazenamento, considerando-se todo o período de armazenagem.

Com o objetivo de se verificar o grau de associação entre os resultados obtidos nos testes fisiológicos e determinações bioquímicas realizados durante o armazenamento em relação aos realizados após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado, foram determinadas as distâncias generalizadas de Mahalanobis (MAHALANOBIS, 1936).

Para avaliar o potencial de armazenamento das sementes, também foi aplicada uma análise das distâncias generalizadas de Mahalanobis entre os resultados obtidos nos testes de vigor e nas determinações bioquímicas, realizadas antes do armazenamento, relacionando estes resultados aos percentuais de germinação, obtidos nos diferentes períodos de armazenamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Grau de umidade das sementes

O Quadro 1 apresenta os valores dos graus de umidade das sementes, determinados no decorrer do armazenamento, para cada variedade e ambiente de armazenamento. Verifica-se que o grau de umidade inicial das sementes da variedade IAC-20 RR era superior ao das sementes da variedade Fabrika. No entanto, a partir dos dois meses de armazenamento, praticamente, não houve diferenças nos graus de umidade das sementes das duas variedades, armazenadas no mesmo ambiente.

Nota-se também que o grau de umidade das sementes mostrou-se semelhante nas duas condições de armazenamento, praticamente durante todo o período de armazenamento.

Quadro 1 - Graus médios de umidade (base úmida) em porcentagem, determinados durante o armazenamento de sementes de duas variedades de algodoeiro, armazenadas em ambiente e câmara fria (CF)

Variedades	Condição de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)						
		0	2	4	6	8	10	12
Fabrika	Ambiente	10,9	11,5	10,7	10,0	11,4	11,4	10,2
	CF	10,9	11,3	10,8	9,7	10,8	10,3	10,0
IAC-20 RR	Ambiente	11,8	11,7	10,9	10,1	11,6	11,2	10,3
	CF	11,8	11,5	10,7	9,9	10,9	10,4	9,9

No Quadro 2 encontram-se os graus de umidade determinados após cada período de envelhecimento artificial das sementes. Observa-se acréscimo no grau de umidade das sementes à medida que os períodos de envelhecimento aumentaram, sendo esse incremento mais acentuado no primeiro período de envelhecimento, ou seja, após 24 horas. A partir deste período, o grau de umidade das sementes continuou aumentando, porém em proporções bem menores quando comparadas ao primeiro período de envelhecimento, mostrando, portanto, que as sementes secas, por apresentarem baixo potencial mátrico, absorvem água rapidamente quando colocadas em atmosfera úmida (BEWLEY & BLACK, 1994).

Quadro 2 - Graus médios de umidade (base úmida) em porcentagem, determinados após cada período de envelhecimento artificial das sementes de duas variedades de algodoeiro

Variedades	Períodos de envelhecimento (horas)					
	0	24	48	72	96	120
Fabrika	10,9	22,6	26,5	30,3	31,4	32,5
IAC-20 RR	11,8	22,5	26,3	30,5	31,5	34,8

O aumento no grau de umidade das sementes implica em acréscimo na taxa respiratória e, conseqüentemente, aumento na taxa de deterioração (BEWLEY & BLACK, 1994).

4.2. Qualidade fisiológica das sementes

4.2.1. Germinação

O Quadro 3 apresenta as médias e o resumo da análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação das sementes realizados durante o armazenamento. O fator variedade mostrou-se não significativo, assim como as interações entre ele e os demais fatores. Observa-se a existência de efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) para os fatores condição e período de armazenamento, bem como para a interação entre eles, evidenciando o efeito simultâneo destes fatores sobre a germinação das sementes.

Observa-se, no Quadro 3, que a probabilidade ajustada para o teste F, por meio das condições estabelecidas por Huynh-Feldt (H-F) e Greenhouse-Geisser (G-G), assim como o teste F multivariado, mostraram-se semelhantes ao teste F univariado, para o efeito de período de armazenamento e suas interações. O teste de esfericidade ou critério de Mauchly apresentou um valor de $\chi^2_{20gl}=17,55$ ($P=0,6169$), indicando portanto, que os F univariados são válidos.

Ainda no Quadro 3, observa-se que os valores médios obtidos no teste de germinação para as sementes das duas variedades mostraram-se semelhantes, confirmando o efeito não significativo da fonte de variação variedade. Por outro lado, as sementes armazenadas em câmara fria apresentaram germinação superior em relação às armazenadas em ambiente. Pela Figura 3a, verifica-se que enquanto o avanço no período de armazenamento reduziu linearmente o percentual de germinação das sementes armazenadas em ambiente, as que foram mantidas em condições controladas (câmara fria) praticamente não mostraram alteração na germinação. MEDEIROS FILHO et al. (1996) também constataram, durante o

Quadro 3 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação das sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	85,93	85,30	90,00	81,23	85,62	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	0,45	0,5148			
Condição (C)	1	88,64	0,0001			
V x C	1	0,01	0,9252			
Resíduo (a)	12					
Período (P)	6	21,03	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	1,01	0,4238	0,4293	0,4444	0,4382
C x P	6	15,29	0,0001	0,0001	0,0001	0,0004
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	5,13	0,0429			
C/P3	1	4,90	0,0470			
C/P4	1	4,96	0,0459			
C/P5	1	18,15	0,0011			
C/P6	1	168,20	0,0001			
C/P7	1	86,94	0,0001			
Resíduo (b)	78					
C.V. (a) (%)	5,75					
C.V. (b) (%)	4,82					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

armazenamento de sementes de algodoeiro, redução significativa da germinação quando as sementes foram armazenadas em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa. FREITAS et al. (2000a), PÁDUA & VIEIRA (2001a) e PÁDUA et al. (2002) também verificaram que a redução na germinação das sementes de algodão foi mais acentuada com o aumento do período de armazenamento.

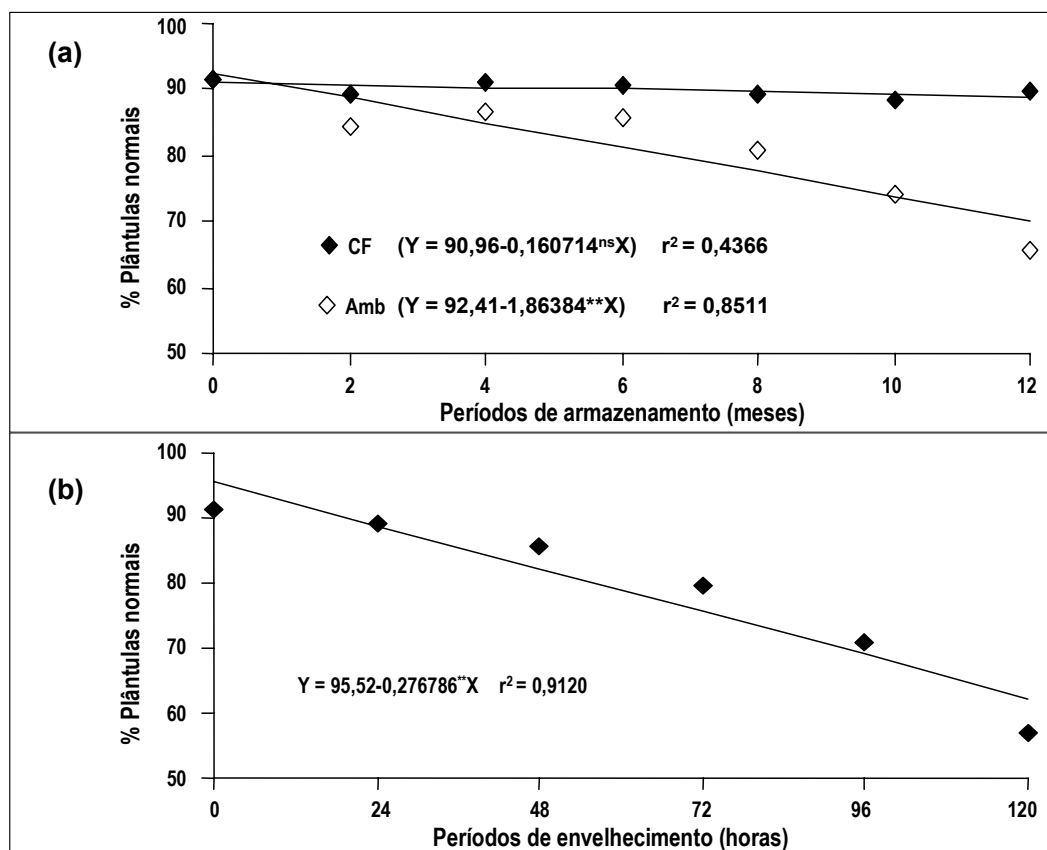


Figura 3 - Estimativa da porcentagem de plântulas normais, obtidas no teste de germinação, em função dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial.

A análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação realizados após os diferentes períodos de envelhecimento artificial indicou que os fatores variedade e período de envelhecimento apresentaram efeitos significativos ($P < 0,0101$ e $P < 0,0001$, respectivamente). No entanto, a interação entre eles mostrou-se não significativa (Quadro 4). Verifica-se que os testes H-F e G-G apresentaram probabilidades semelhantes às do teste F univariado. Já as probabilidades dos testes F multivariado foram superiores às dos demais testes. O teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{14gl} = 14,64$ ($P = 0,4033$), provando a validade dos F univariados.

Verifica-se ainda no Quadro 4, que as sementes da variedade Fabrika apresentaram germinação superior às da variedade IAC-20 RR, evidenciando

Quadro 4 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação das sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

Média	Variedades					Média
	Fabrika		IAC-20 RR			
	81,50		76,33			
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	13,66	0,0101			
Resíduo (a)	6					
Período (P)	5	54,09	0,0001	0,0001	0,0001	0,0272
V x P	5	1,32	0,2812	0,2980	0,2812	0,6435
Resíduo (b)	30					
C.V. (a) (%)	6,13					
C.V. (b) (%)	6,34					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks' Lambda.

portanto, diferenças entre os processos de envelhecimento natural e artificial, uma vez que o teste de germinação das sementes das duas variedades realizado após os vários períodos de armazenamento apresentou valores médios semelhantes. Para PRIESTLEY & LEOPOLD (1983), o envelhecimento acelerado, apesar de proporcionar redução no vigor provoca alterações nas sementes de forma diferente do que é observado no envelhecimento natural. POWELL & HARMAN (1985) questionaram se os eventos fisiológicos ocorridos durante o envelhecimento acelerado refletiam aqueles ocorridos durante o envelhecimento natural.

Na Figura 3b, observa-se que a germinação obtida após os diferentes períodos de envelhecimento apresentou resposta linear e decrescente ao longo do período de envelhecimento. O aumento do tempo de exposição a condições de alta temperatura e alta umidade relativa acelera o processo de deterioração, com reflexos sobre a germinação das sementes (ROBERTS, 1981).

4.2.2. Envelhecimento acelerado

Verifica-se a existência de efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) dos fatores variedade, condição e período de armazenamento no teste de envelhecimento acelerado realizado durante o armazenamento das sementes. A interação dupla entre estes fatores também mostrou-se significativa (Quadro 5). Observa-se que a significância entre as interações variedade x período de armazenamento e condição x período de armazenamento aumenta com o aumento do período de armazenamento. Os testes H-F, G-G e F multivariado, foram concordantes com o F univariado. O teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=24,91$ ($P=0,2049$), mostrando a validade dos testes F univariados.

Verifica-se ainda no Quadro 5, que a qualidade das sementes da variedade Fabrika foi superior à da variedade IAC-20 RR, mostrando que a queda do vigor antecede a redução da germinação, pois pelos resultados de germinação (Quadro 3) as sementes das duas variedades apresentaram qualidade fisiológica semelhante. A finalidade da utilização dos testes de vigor é justamente revelar diferenças na qualidade fisiológica, que não são detectadas no teste de germinação (MARCOS FILHO, 1999b). Observa-se ainda que as sementes apresentaram maior percentual de germinação quando armazenadas em câmara fria (Quadro 5).

Pelo teste de envelhecimento acelerado (Figura 4a), verifica-se que as sementes das duas variedades sofreram redução no vigor, à medida que aumentou o período de armazenamento. A variedade IAC-20 RR mostrou-se mais sensível à deterioração das sementes que a variedade Fabrika, sendo o efeito linear com o decorrer do armazenamento. FREITAS et al. (2000a) também constataram decréscimo linear no vigor, obtido por meio do teste de envelhecimento acelerado, em sementes de algodão durante o armazenamento.

Para PÁDUA & VIEIRA (2001a) e PÁDUA et al. (2002), a manutenção da qualidade de sementes de algodoeiro depende da qualidade inicial do lote e do período de armazenamento. Os últimos autores observaram que lotes de sementes de algodão apresentando alto vigor mantiveram valores

Quadro 5 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de envelhecimento acelerado das sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	75,98	67,61	77,80	65,78	71,79	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	105,77	0,0001			
Condição (C)	1	217,79	0,0001			
V x C	1	10,39	0,0073			
Resíduo (a)	12					
Período (P)	6	32,41	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	2,75	0,0176	0,0303	0,0117	0,0170
V/P1	1	13,24	0,0034			
V/P2	1	0,56	0,4682			
V/P3	1	1,93	0,1900			
V/P4	1	6,76	0,0232			
V/P5	1	52,03	0,0001			
V/P6	1	41,26	0,0001			
V/P7	1	25,41	0,0003			
C x P	6	16,28	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	1,56	0,2356			
C/P3	1	10,93	0,0063			
C/P4	1	5,86	0,0322			
C/P5	1	82,72	0,0001			
C/P6	1	95,15	0,0001			
C/P7	1	158,82	0,0001			
Resíduo (b)	78					
C.V. (a) (%)	6,00					
C.V. (b) (%)	7,20					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks' Lambda.

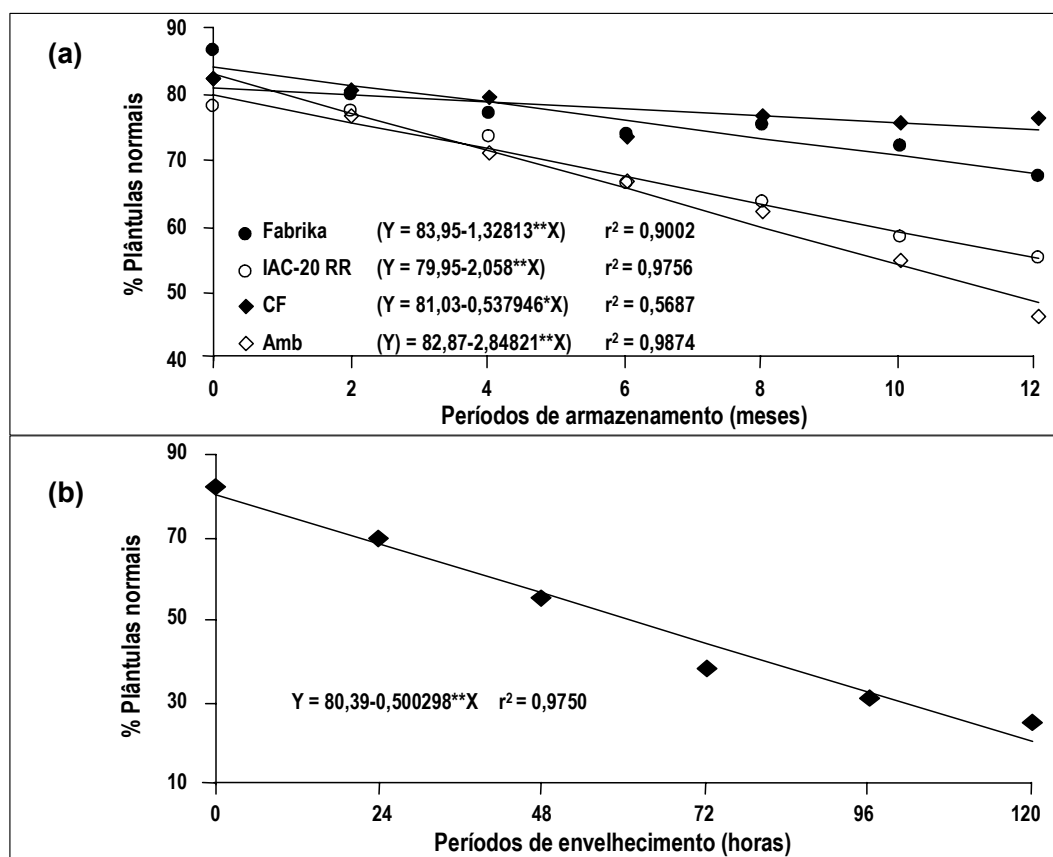


Figura 4 - Estimativa da porcentagem de plântulas normais, obtidas no teste de envelhecimento acelerado, em função dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial.

de germinação acima do padrão mínimo para comercialização (70%) até 10 meses de armazenamento em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa. Por outro lado, lotes de baixo vigor apresentaram perda significativa na germinação e no vigor, avaliado pelos testes de envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura, a partir do segundo mês de armazenamento.

À semelhança do que ocorreu no teste de germinação, a qualidade das sementes mantidas em câmara fria foi superior à das que permaneceram em ambiente, apresentando respostas lineares e decrescentes ao longo do período de armazenamento.

O Quadro 6 apresenta as médias e o resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de envelhecimento acelerado das sementes, realizados após os diferentes períodos de envelhecimento artificial das sementes. Os fatores variedade e período de envelhecimento revelaram-se significativos, porém a interação entre eles foi não significativa. As probabilidades apresentadas pelos testes de H-F e G-G foram semelhantes às do teste F univariado. O teste F multivariado, embora não tenha apresentado probabilidades próximas às do teste F univariado, não discordou deste. O valor de χ^2_{14gl} do teste de Mauchly foi de 12,14 (P=0,5952), indicando portanto, que os F univariados são válidos.

Quadro 6 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de envelhecimento acelerado de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

Média	Variedades					Média
	Fabrika		IAC-20 RR			
	52,92	47,83			50,37	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	24,53	0,0026			
Resíduo (a)	6					
Período (P)	5	163,61	0,0001	0,0001	0,0001	0,0070
V x P	5	0,49	0,7786	0,6625	0,7786	0,5594
Resíduo (b)	30					
C.V. (a) (%)	7,05					
C.V. (b) (%)	9,98					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

Ainda no Quadro 6, verifica-se que, à semelhança do que ocorreu anteriormente, as sementes da variedade IAC-20 RR apresentaram qualidade fisiológica inferior às das sementes da variedade Fabrika.

Verifica-se que as sementes apresentaram redução no vigor, mostrando resposta linear e decrescente nos resultados de envelhecimento acelerado, à medida que aumentou o período de envelhecimento das sementes (Figura 4b). Nota-se que com o prolongamento do período de envelhecimento houve redução no vigor. As sementes não envelhecidas (período zero) apresentaram 80% de germinação no teste de envelhecimento acelerado e após serem envelhecidas a 42°C por 120 horas e 100% UR, este valor caiu para 20%.

4.2.3. Germinação a baixa temperatura

O Quadro 7 apresenta as médias e o resumo da análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação à baixa temperatura das sementes realizados durante o armazenamento. Observa-se a existência de efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) dos fatores variedade, condição e período de armazenamento. Entretanto, apenas a interação condição x período de armazenamento mostrou-se significativa. Observa-se que as probabilidades ajustadas para o teste F por meio das condições estabelecidas por H-F e G-G, mostraram-se semelhantes ao teste F univariado, para o efeito de período de armazenamento e suas interações. Embora para a interação variedade x período de armazenamento o teste F multivariado tenha estabelecido probabilidade diferente da do teste univariado, ainda assim, não apresentou significância considerada. O teste de esfericidade ou critério de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=18,51$ ($P=0,5535$), indicando portanto, que os F univariados são válidos.

Seguindo a mesma tendência dos resultados obtidos nos testes anteriores, as sementes da variedade IAC-20 RR apresentaram qualidade fisiológica inferior às da variedade Fabrika (Quadro 7). No decorrer do armazenamento, as sementes mantidas em câmara fria mostraram-se superiores em relação às armazenadas em ambiente.

À semelhança dos testes discutidos anteriormente, as curvas ajustadas, relativas às porcentagens de germinação a baixa temperatura em função dos períodos de armazenamento (Figura 5a), mostraram que o vigor decresceu

Quadro 7 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação à baixa temperatura das sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	59,43	55,57	63,61	51,39	57,50	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	32,46	0,0001			
Condição (C)	1	325,50	0,0001			
V x C	1	2,50	0,1395			
Resíduo (a)	12					
Período (P)	6	77,84	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	0,73	0,6255	0,5482	0,5827	0,1045
C x P	6	22,31	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	2,28	0,1567			
C/P3	1	4,84	0,0482			
C/P4	1	9,17	0,0105			
C/P5	1	270,97	0,0001			
C/P6	1	130,80	0,0001			
C/P7	1	134,44	0,0001			
Resíduo (b)	78					
C.V. (a) (%)	6,23					
C.V. (b) (%)	8,23					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

linearmente ao longo do período de armazenamento. Observa-se que as sementes mantidas em câmara fria apresentaram redução menos acentuada no vigor em relação às que permaneceram em ambiente.

Dentre os testes utilizados por FREITAS et al. (2000a) o teste de germinação à baixa temperatura mostrou-se o mais eficiente para avaliar o vigor das sementes durante o armazenamento, permitindo a classificação dos lotes em níveis de vigor já no início do armazenamento. PÁDUA et al. (2002)

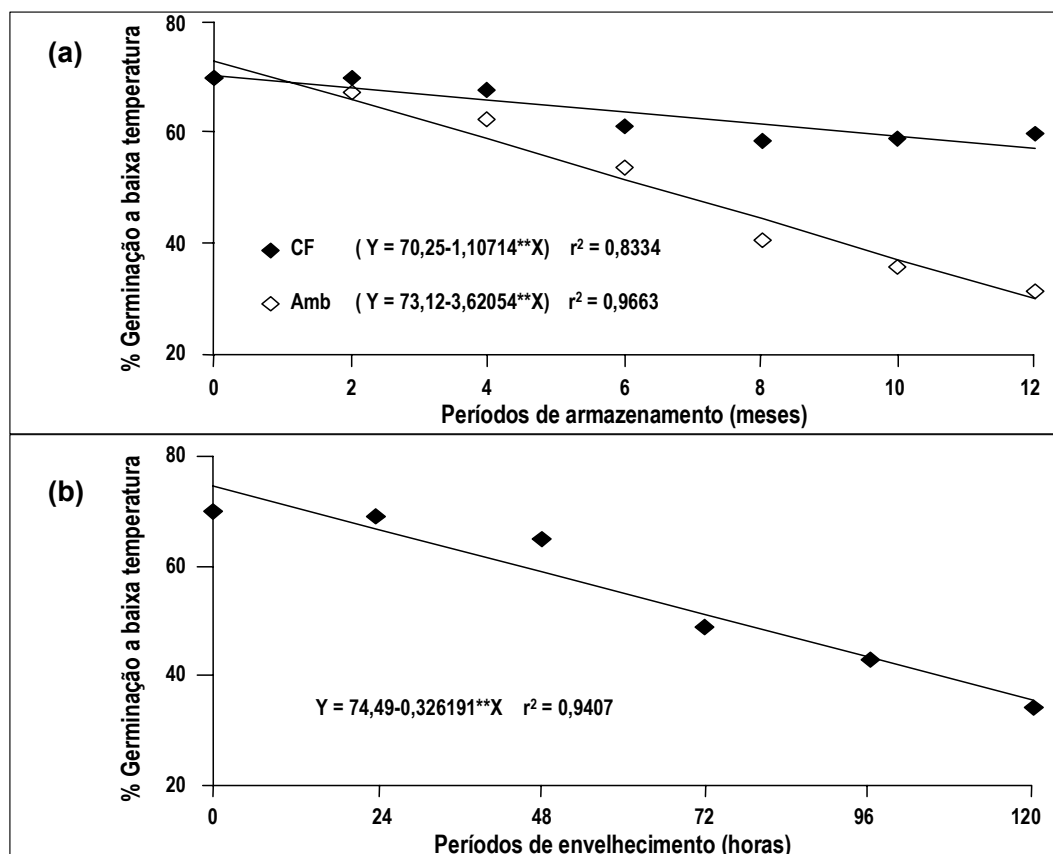


Figura 5 - Estimativa da porcentagem de plântulas normais, obtidas no teste de germinação a baixa temperatura, em função dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial.

utilizaram este teste para monitorar a qualidade de sementes de algodão durante o armazenamento e verificaram que houve redução no vigor a partir do décimo mês.

A análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação à baixa temperatura realizados em sementes submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial (Quadro 8), constatou efeito altamente significativo

do fator período de envelhecimento ($P < 0,0001$). Verifica-se que os testes H-F, G-G e o F multivariado foram concordantes ao teste F univariado. No entanto, o valor de χ^2_{14gl} do teste de Mauchly foi de 33,34 ($P = 0,0026$), evidenciando portanto, que se os testes F univariados não tivessem concordando com os multivariados, os univariados não seriam válidos.

Quadro 8 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de germinação à baixa temperatura de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

	Variedades					Média
	Fabrika		IAC-20 RR			
Média	57,83		52,00			54,92
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	5,94	0,0507			
Resíduo (a)	6					
Período (P)	5	53,16	0,0001	0,0001	0,0001	0,0039
V x P	5	0,31	0,9048	0,7384	0,8436	0,0575
Resíduo (b)	30					
C.V. (a) (%)	15,10					
C.V. (b) (%)	10,66					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

Verifica-se ainda no Quadro 8, que o vigor das sementes das duas variedades, avaliado pelo teste de germinação à baixa temperatura, mostrou-se semelhante, discordando portanto, do que ocorreu no envelhecimento natural e no teste de envelhecimento acelerado. Verifica-se, pela Figura 5b, queda linear no vigor com o aumento do período de envelhecimento, à semelhança de que foi observado nos resultados do teste de envelhecimento acelerado independentemente da variedade

Dessa forma, verifica-se a importância da utilização de mais de um teste para determinar o vigor das sementes, em função da influência dos procedimentos adotados e do uso de situações específicas de estresse para

avaliação do potencial fisiológico das sementes, conforme destacou MARCOS FILHO (1999b).

4.2.4. Condutividade elétrica

Verifica-se a existência de efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) dos fatores variedade, condição e período de armazenamento nos testes de condutividade elétrica realizados durante o armazenamento das sementes. As interações duplas e tripla entre estes fatores também mostraram-se significativas (Quadro 9). Os testes de H-F, G-G e o F multivariado, foram concordantes com o teste F univariado. O teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl} = 23,51$ ($P = 0,2646$), revelando mais uma vez a validade dos F univariados.

A distinção das variedades em relação ao potencial fisiológico das sementes, obtido por meio do teste de condutividade elétrica, confirma a superioridade da qualidade das sementes da variedade Fabrika, também verificada pelos testes de envelhecimento acelerado, germinação a baixa temperatura e emergência das plântulas em leito de areia. Verificou-se, ainda que as sementes apresentaram menor valor de condutividade elétrica, portanto maior vigor, quando armazenadas em câmara fria. De acordo com VIEIRA et al. (2001), o armazenamento sob baixa temperatura atenua os efeitos da deterioração das sementes, possivelmente devido à redução nos danos às membranas, que se mantêm melhor estruturadas nessa condição de armazenamento.

Pelo teste de condutividade elétrica (Figura 6), verifica-se que as sementes das duas variedades sofreram redução no vigor e que houve um aumento na quantidade de eletrólitos liberados pelas sementes à medida que estas permaneceram armazenadas, sendo os efeitos lineares e crescentes com os períodos de armazenamento.

A desestruturação do sistema de membranas e conseqüente lixiviação de exsudatos na fase de embebição das sementes têm sido citados como uma das primeiras alterações bioquímicas provocadas pelo processo deteriorativo

(DELOUCHE & BASKIN, 1973). Dessa forma, constata-se que embora as sementes armazenadas em câmara fria tenham apresentado pequena redução na germinação e emergência das plântulas durante o armazenamento verifica-se que, pelo teste de condutividade elétrica, mesmo as sementes mantidas em câmara fria apresentaram redução no vigor. Desse modo, o teste de

Quadro 9 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de condutividade elétrica de areia de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	138,00	181,51	155,86	163,66	159,76	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	957,55	0,0001			
Condição (C)	1	30,79	0,0001			
V x A	1	7,63	0,0172			
Resíduo (a)	12					
Período (P)	6	58,70	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	3,03	0,0107	0,0332	0,0107	0,0091
V/P1	1	327,43	0,0001			
V/P2	1	219,50	0,0001			
V/P3	1	67,70	0,0001			
V/P4	1	216,66	0,0001			
V/P5	1	119,00	0,0001			
V/P6	1	1308,25	0,0001			
V/P7	1	173,71	0,0001			
C x P	6	10,61	0,0001	0,0001	0,0001	0,0008
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	0,80	0,3889			
C/P3	1	2,49	0,1403			
C/P4	1	50,65	0,0001			
C/P5	1	27,37	0,0002			
C/P6	1	147,93	0,0001			
C/P7	1	2,83	0,1184			
V x C x P	6	7,39	0,0001	0,0002	0,0001	0,0058
Resíduo (b)	72					
C.V. (a) (%)	4,65					
C.V. (b) (%)	4,15					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

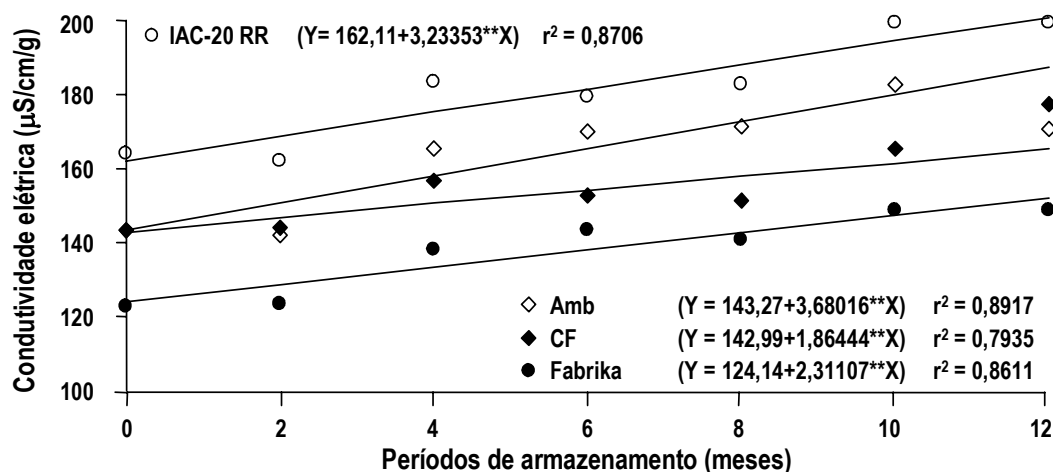


Figura 6 - Estimativa da condutividade elétrica das sementes de algodoeiro (μS/cm/g), em função do período de armazenamento.

condutividade elétrica mostrou-se eficiente para a avaliação do vigor dessas sementes, detectando alterações no vigor já a partir dos primeiros meses de armazenamento. Entretanto, PÁDUA & VIEIRA (2001b) comentam que este teste não foi adequado para avaliar o vigor das sementes de algodão, havendo necessidade de ajustar a metodologia.

4.2.5. Emergência das plântulas em leito de areia

A análise de variância do teste de emergência das plântulas em leito de areia (Quadro 10) revelou efeitos significativos de variedade, ambiente e período de armazenamento, bem como para a interação entre ambiente e período de armazenamento. Verifica-se que a probabilidade ajustada para o teste F por meio das condições estabelecidas por H-F e G-G, assim como o

teste F multivariado, mostraram-se semelhantes ao teste F univariado, para o efeito de período de armazenamento e suas interações. O teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=17,71$ ($P=0,6065$), indicando portanto, que os F univariados são válidos.

Quadro 10 - Médias (%) e resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de emergência das plântulas em leito de areia de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	83,39	80,93	87,57	76,75	82,16	
F.V.	G.L.	Teste F	P >F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	5,62	0,0354			
Condição (C)	1	108,31	0,0001			
V x A	1	1,45	0,2525			
Resíduo (a)	12					
Período (P)	6	33,76	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	1,62	0,1529	0,1832	0,1565	0,1830
C x P	6	18,75	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	5,40	0,0385			
C/P3	1	1,92	0,1907			
C/P4	1	7,88	0,0158			
C/P5	1	23,57	0,0004			
C/P6	1	178,20	0,0001			
C/P7	1	102,75	0,0001			
Resíduo (b)	78					
C.V. (a) (%)	6,69					
C.V. (b) (%)	5,31					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

Ainda no Quadro 10, observa-se que os valores médios obtidos no teste de emergência das plântulas em leito de areia, para as sementes das duas variedades mostraram-se significativamente diferentes pelo teste F a 5% de

probabilidade. Acompanhando a mesma tendência dos testes anteriores, as sementes armazenadas em câmara fria apresentaram germinação superior em relação às armazenadas em ambiente. O armazenamento em câmara fria contribuiu para reduzir a velocidade dos processos deteriorativos, mostrando-se mais favorável à conservação das sementes em relação ao armazenamento em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa. Segundo CARVALHO & NAKAGAWA (2000), a velocidade das transformações degenerativas depende, dentre outros fatores, das condições às quais as sementes foram submetidas durante o armazenamento.

Pela Figura 7, observa-se que, à semelhança do que ocorreu nos testes anteriores, as sementes apresentaram redução linear na sua qualidade, avaliada pela emergência das plântulas em areia, à medida que permaneceram armazenadas. Contudo, as sementes mantidas em ambiente mostraram-se mais sensíveis à deterioração.

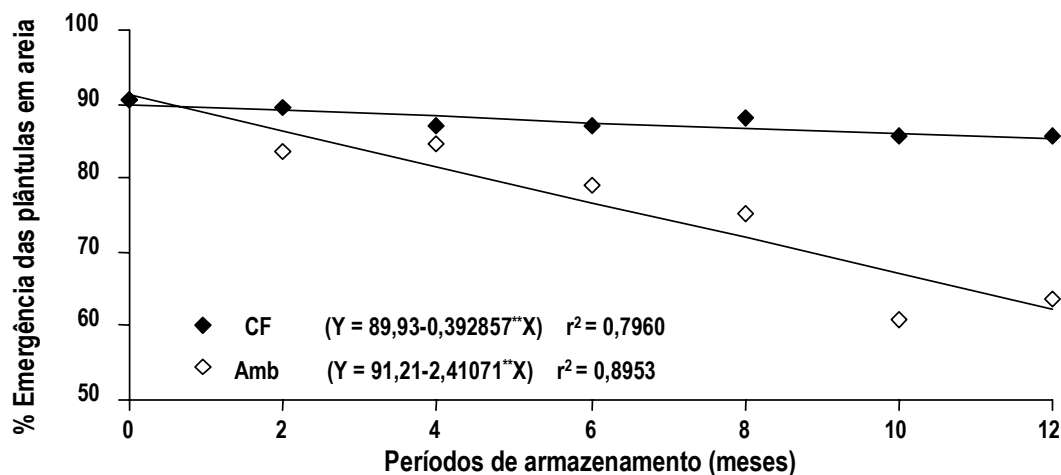


Figura 7 - Estimativa da porcentagem de emergência das plântulas em leito de areia em função do período de armazenamento.

4.3. Avaliação bioquímica nas sementes

4.3.1. Atividade de lipoxigenase

A análise de variância da determinação da atividade da enzima lipoxigenase (Quadro 11) revelou efeitos significativos de todos os fatores estudados, bem como para as interações entre eles. Verifica-se que as

Quadro 11 - Médias ($\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ de proteína) e resumo da análise de variância da determinação da atividade específica de lipoxigenases de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	10,596	8,195	10,578	8,213	9,395	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	1109,38	0,0001			
Condição (C)	1	1076,06	0,0001			
V x C	1	18,15	0,0028			
Resíduo (a)	8					
Período (P)	6	290,61	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002
V x P	6	2,39	0,0422	0,1002	0,0431	0,0772
V/P1	1	30,84	0,0005			
V/P2	1	146,63	0,0001			
V/P3	1	310,35	0,0001			
V/P4	1	106,13	0,0001			
V/P5	1	205,48	0,0001			
V/P6	1	61,04	0,0001			
V/P7	1	67,01	0,0001			
C x P	6	25,41	0,0001	0,0001	0,0001	0,0087
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	37,78	0,0003			
C/P3	1	181,20	0,0001			
C/P4	1	125,61	0,0001			
C/P5	1	303,20	0,0001			
C/P6	1	203,92	0,0001			
C/P7	1	255,14	0,0001			
V x C x P	6	2,44	0,0386	0,0954	0,0394	0,3333
Resíduo (b)	48					
C.V. (a) (%)	3,51					
C.V. (b) (%)	5,01					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks' Lambda.

probabilidades ajustadas por meio das condições estabelecidas por G-G, assim como o teste F multivariado, nem sempre foram concordantes às estabelecidas para o teste F univariado. No entanto, o teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=24,77$ (P=0,2102), revelando a validade dos F univariados.

Pela Figura 8a, verifica-se que as sementes das duas variedades sofreram redução linear na atividade da enzima lipoxigenase, à medida que aumentou o período de armazenamento. A atividade desta enzima para as sementes mantidas em câmara fria foi superior à das sementes que permaneceram em condições ambiente, apresentando respostas lineares e decrescentes ao longo do período de armazenamento.

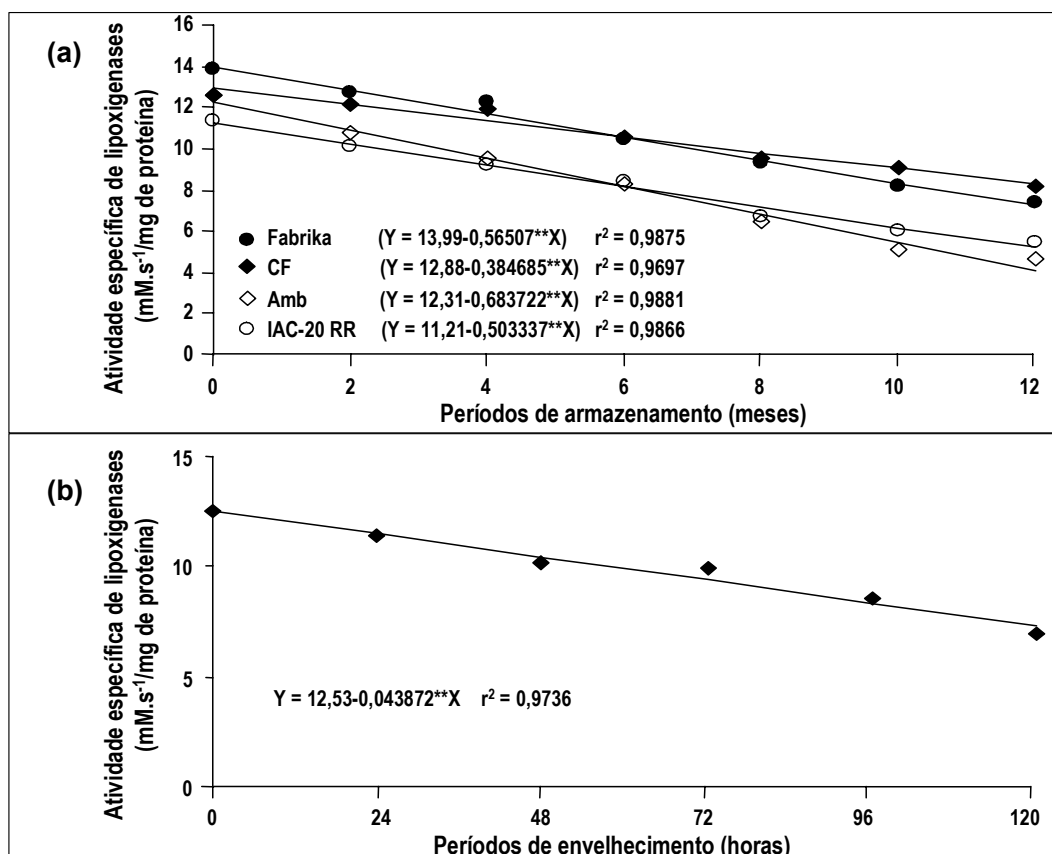


Figura 8 - Estimativa da atividade específica de lipoxigenases ($\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ de proteína) em sementes de duas variedades de algodoeiro, em função dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial.

LEONI et al. (1985) demonstraram que as lipoxigenases de sementes de girassol perdem a atividade durante o armazenamento a 4°C . Utilizando sementes de soja, COELHO (1993) testou a estabilidade da LOX-1 e LOX-2, separadamente, durante sete dias de armazenamento a -20°C . O autor verificou que a atividade da isoenzima LOX-1 manteve-se inalterada e a atividade da LOX-2 reduziu dentro de poucas horas. LANNA et al. (1996) analisando o efeito do armazenamento sobre a atividade de lipoxigenases em folhas de soja, verificaram decréscimo da atividade com o tempo de armazenamento.

Segundo HILDEBRAND et al. (1988), a lipoxigenase catalisa a modificação peroxidativa de ácidos graxos polinsaturados, que conduz à formação de vários produtos secundários da oxigenação de lipídios. Há vários trabalhos relacionando os produtos da reação da enzima lipoxigenase com o

processo de deterioração, porém pouco se sabe sobre seu papel fisiológico na semente. Para LOISEAU et al. (2001), as lipoxigenases podem funcionar como proteínas de reservas, pelo fato delas estarem solúveis no citosol, tornam-se mais acessíveis às proteases e, conseqüentemente, seus aminoácidos podem ser rapidamente biodisponíveis. De acordo com AGRAWAL (1988), tem sido observado um incremento na atividade de protease durante o armazenamento, e esse incremento pode ser responsável pelo decréscimo na atividade de outras enzimas.

O Quadro 12 apresenta as médias e o resumo da análise de variância dos dados da determinação da atividade de lipoxigenases, realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento artificial das sementes. Os fatores variedade e período de envelhecimento revelaram-se significativos, porém a interação entre eles foi não significativa. As probabilidades apresentadas pelos testes de H-F e G-G foram concordantes com as do teste F univariado.

Observa-se que as sementes da variedade Fabrika apresentaram maior atividade específica de lipoxigenases que as da variedade IAC-20 RR (Quadros 11 e 12).

Com aumento do período de envelhecimento artificial verifica-se que ocorreu redução na atividade específica de lipoxigenases (Figura 8b). SUNG &

Quadro 12 - Médias ($\text{mM.s}^{-1}/\text{mg}$ de proteína) e resumo da análise de variância da atividade específica de lipoxigenases em sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

	Variedades				
	Fabrika	IAC-20 RR	Média		
Média	11,346	8,451	9,90		
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F	
				G-G ¹	H-F ²
Variedade (V)	1	323,08	0,0001		
Resíduo (a)	4				
Período (P)	5	104,87	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	5	2,48	0,0669	0,1489	0,0746
Resíduo (b)	20				
C.V. (a) (%)	4,88				
C.V. (b) (%)	4,82				

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt.

JENG (1994) também observaram redução na atividade de lipoxigenases em sementes de amendoim com o prolongamento do período de envelhecimento acelerado. O papel das lipoxigenases ainda não está claro. Enquanto alguns autores afirmam que essas enzimas e seus produtos formados estão diretamente relacionados ao processo de envelhecimento das sementes, para SUNG & JENG (1994) isso parece pouco provável, pelo menos em sementes de amendoim, uma vez que tanto o eixo embrionário quanto os cotilédones mostraram um rápido declínio na atividade desta enzima com o aumento do período de envelhecimento acelerado. No entanto, de acordo com KALPANA & MADHAVA RAO (1993) não são necessários altos níveis de atividade de lipoxigenase para propagar o processo peroxidativo, pois, uma vez desencadeado, o processo é auto propagativo.

Estudos realizados por TRAWATHA et al. (1995) sobre a longevidade de sementes de soja desprovidas de uma ou duas das três isoenzimas lipoxigenases comparadas com sementes de soja com presença das três isoenzimas, não evidenciaram aumento no potencial de armazenamento das sementes desprovidas de uma ou duas das isoenzimas lipoxigenases. Também analisando sementes de soja sem lipoxigenases, WANG et al. (1990) não detectaram resistência adicional ao envelhecimento acelerado. Por outro lado, DIAS (1999) observou que sementes de soja sem lipoxigenases foram mais sensíveis aos efeitos do retardamento de colheita do que as sementes com presença de lipoxigenase. OLIVEIRA (2002) estudando a influência das isoenzimas lipoxigenases na qualidade de sementes de soja, verificou que a presença desta enzima conferiu maior velocidade de emergência de plântulas. Segundo HILDEBRAND (1989), a alta atividade de lipoxigenases nas sementes em germinação pode acelerar a ruptura de membranas celulares e facilitar o transporte de produtos armazenados para o desenvolvimento do embrião. Assim, a ausência de lipoxigenases pode estar relacionada com a menor

mobilização de lipídios, refletindo em menor velocidade de emergência quando comparado com “bulks” com presença de lipoxigenases.

4.3.2. Atividade de fosfatase ácida

Verifica-se a existência de efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) dos fatores variedade, condição e período de armazenamento na determinação da atividade da fosfatase ácida realizadas durante o armazenamento das sementes. As interações entre condição e período de armazenamento, variedade e período de armazenamento e a interação tripla também mostraram-se significativas (Quadro 13). Os teste de H-F e G-G foram concordantes com o teste F univariado. O teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=16,12$ ($P=0,7090$), revelando mais uma vez a validade dos F univariados.

Ainda no Quadro 13, observa-se que essa enzima apresentou menor atividade nas sementes da variedade Fabrika, considerada nos testes de germinação e vigor como de melhor qualidade em relação às da variedade IAC-20 RR. As sementes armazenadas em câmara fria apresentaram maior atividade da fosfatase ácida em relação às armazenadas em condições ambiente, nas quais a redução da qualidade fisiológica foi mais acentuada. Pela Figura 9a, verifica-se redução na atividade de fosfatase ácida, à medida

Quadro 13 - Médias (Unidade de absorvância a 400 nm. minuto⁻¹. mg de semente⁻¹) e resumo da análise de variância da atividade de fosfatase ácida de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições		
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média
Média	56,791	72,584	66,841	62,533	64,687
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F G-G ¹ H-F ²	P > F Multivariado ³
Variedade (V)	1	8060,36	0,0001		
Condição (A)	1	599,66	0,0001		
V x C	1	0,00	0,9749		
Resíduo (a)	8				

Período (P)	6	1040,54	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	71,92	0,0001	0,0001	0,0001	0,0013
V/P1	1	1152,77	0,0001			
V/P2	1	1936,01	0,0001			
V/P3	1	1579,05	0,0001			
V/P4	1	976,05	0,0001			
V/P5	1	750,13	0,0001			
V/P6	1	2101,64	0,0001			
V/P7	1	599,97	0,0001			
C x P	6	46,44	0,0001	0,0001	0,0001	0,0146
C/P1	1	0,00	1,0000			
C/P2	1	70,09	0,0287			
C/P3	1	38,76	0,0003			
C/P4	1	62,79	0,0001			
C/P5	1	137,69	0,0001			
C/P6	1	498,21	0,0001			
C/P7	1	527,02	0,0001			
V x C x P	6	4,64	0,0009	0,0037	0,0009	0,2604
Resíduo (b)	48					
C.V. (a) (%)	1,25					
C.V. (b) (%)	1,25					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

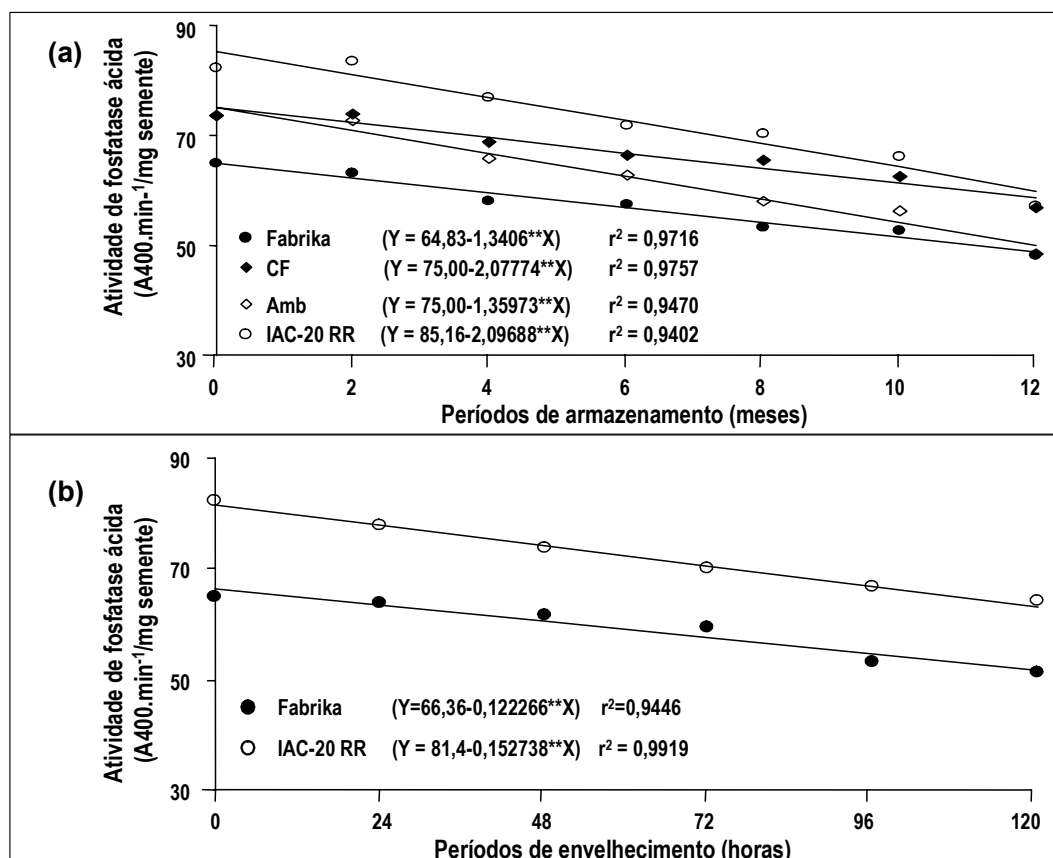


Figura 9 - Estimativa da atividade de fosfatase ácida (Unidade de absorvância a 400 nm. minuto⁻¹. mg de semente⁻¹) em sementes de duas variedades de algodoeiro, em função dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial.

que as sementes permaneceram armazenadas. Observa-se ainda que, nas sementes da variedade IAC-20 RR a redução da atividade enzimática foi um pouco mais acentuada que para as sementes da variedade Fabrika; a mesma relação é verificada para as sementes mantidas em condições ambiente em relação às armazenadas em câmara fria. Assim, parece haver uma relação entre redução na atividade da fosfatase ácida e decréscimo no vigor das sementes. Os resultados obtidos indicam que a atividade de fosfatase ácida parece ser uma característica de cada variedade, uma vez que as sementes da variedade Fabrika, consideradas de maior vigor apresentaram menor atividade desta enzima. Contudo, nestas sementes, o decréscimo na atividade da enzima durante o armazenamento foi menos acentuado.

Segundo CHING (1972), a fosfatase ácida pode estar envolvida com o processo de mobilização de fosfatos de reserva durante a germinação. Esses fosfatos são essenciais, de acordo com POPINIGIS (1985), por serem constituintes dos ácidos nucleicos, indispensáveis à síntese de proteínas. PASIN et al. (1991) detectaram que a atividade de fosfatase ácida aumenta durante os primeiros dias de germinação das sementes de feijão e decresce à medida que as reservas dos cotilédones vão se esgotando.

A análise de variância dos dados obtidos nas determinações da atividade de fosfatase ácida realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento artificial (Quadro 14) constatou efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) para todos os fatores e para a interação entre eles. Verifica-se que os testes H-F e G-G foram concordantes ao teste F univariado.

Seguindo a mesma tendência dos resultados obtidos no envelhecimento natural, observa-se que as sementes da variedade IAC-20 RR apresentaram atividade maior para a fosfatase ácida que as da variedade Fabrika (Quadro 14).

Pela Figura 9b, verifica-se que as sementes das duas variedades sofreram redução linear na atividade da enzima fosfatase ácida, à medida que prolongou o período de envelhecimento. Embora as sementes da variedade IAC-20 RR tenham apresentado maior atividade de fosfatase ácida em relação às da Fabrika, nas sementes daquela variedade houve também redução dessa enzima com o aumento do período de envelhecimento acelerado.

SPINOLA et al. (2000) observaram que esta enzima mostrou menor atividade nos períodos de 0h e 24h de envelhecimento acelerado para o lote considerado pelos testes determinantes da qualidade fisiológica como o de qualidade superior em relação aos outros lotes analisados. Porém, no período 48h de envelhecimento acelerado, a redução de intensidade das bandas foi, também, observada nos demais lotes e o desaparecimento por completo das referidas bandas foi constatado para todos os lotes a partir do período de 72h de envelhecimento acelerado. Segundo estes autores, esta enzima é uma hidrolase que participa das reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação destes. Também CHAUHAN et al. (1985) e JENG & SUNG (1994), trabalhando com sementes

Quadro 14 - Médias (Unidade de absorvância a 400 nm. minuto⁻¹. mg de semente⁻¹) e resumo da análise de variância da atividade de fosfatase ácida de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

Variedades					
	Fabrika		IAC-20 RR	Média	
Média	59,025		72,475	65,750	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F	
				G-G ¹	H-F ²
Variedade (V)	1	6022,90	0,0001		
Resíduo (a)	4				
Período (P)	5	360,09	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	5	11,89	0,0001	0,0018	0,0001
V/P1	1	576,39	0,0001		
V/P2	1	1385,41	0,0001		
V/P3	1	339,02	0,0001		
V/P4	1	607,00	0,0001		
V/P5	1	451,85	0,0001		
V/P6	1	269,35	0,0001		
Resíduo (b)	20				
C.V. (a) (%)	0,80				
C.V. (b) (%)	1,22				

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt.

de amendoim, confirmaram redução na atividade desta enzima com o envelhecimento. Em contrapartida, RAJAGOPAL & SEN-MANDI (1992) observaram alta atividade desta enzima em embriões de arroz após o envelhecimento artificial, o que também foi constatado por BRANDÃO JR. et al. (1999) em sementes de milho a partir de 96 horas de envelhecimento. Segundo estes autores, o aumento da peroxidação de lipídios pode ser explicado pelo aumento da atividade da fosfatase ácida.

4.3.3. Inibidor de tripsina

A análise de variância da determinação da atividade de inibidores de tripsina (Quadro 15) revelou efeitos significativos de variedade, condição e período de armazenamento, bem como para as interações entre condição e período de armazenamento, variedade e período de armazenamento e para a interação tripla. Verifica-se que, de modo geral, a probabilidade ajustada para o teste F por meio das condições estabelecidas por H-F e G-G, assim como o teste F multivariado, mostraram-se semelhantes ao teste F univariado, para o efeito de período de armazenamento e suas interações. No entanto, o teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=48,40$ ($P=0,0004$), indicando portanto, que os F univariados não são válidos.

Ainda no Quadro 15, observa-se maior inibição da atividade de tripsina nas sementes da variedade Fabrika.

Os resultados mostram ainda que inibidores de tripsina em sementes de algodão foram afetados pelas condições de armazenamento das mesmas. As sementes armazenadas em câmara fria apresentaram maior inibição da atividade de tripsina em relação às armazenadas em ambiente. Estudos realizados por PIERGIOVANNI et al. (1993) demonstraram que a redução de inibidores de tripsina em sementes de *Vigna unguiculata* somente pode ser evitada quando as sementes foram mantidas à temperatura abaixo de -20°C.

Observa-se redução na inibição da atividade de tripsina (Figura 10a) à medida que as sementes permaneceram armazenadas, sendo os efeitos lineares com o decorrer do tempo. De acordo com ONIGBINDE & AKINYELE (1990), a redução do inibidor de tripsina pode ser explicada pelo aumento da degradação de proteínas observada durante o armazenamento das sementes.

A avaliação de inibidores de proteases em sementes tem sido geralmente realizada pelo fato destes inibidores estarem relacionados a fatores anti-nutricionais (LAM et al., 1999). No entanto, segundo RYAN (1973) os altos níveis de inibidores de proteases encontrados em sementes de muitas espécies vegetais levam a algumas suposições sobre seu papel fisiológico. Provavelmente, agem como proteínas de reserva ou armazenamento, como reguladores de enzimas endógenas ou como agentes de defesa contra insetos

Quadro 15 - Médias (mg de tripsina inibida/g de proteína) e resumo da análise de variância da inibição da atividade de tripsina de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

Variedades			Condições			
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente	Média	
Média	17,589	16,123	17,766	15,946	16,856	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	90,12	0,0001			
Condição (C)	1	138,79	0,0001			
V x C	1	1,38	0,2734			
Resíduo (a)	8					
Período (P)	6	1280,10	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	21,40	0,0001	0,0001	0,0001	0,0011
V/P1	1	53,06	0,0001			
V/P2	1	88,58	0,0001			
V/P3	1	14,63	0,0051			
V/P4	1	41,47	0,0002			
V/P5	1	4,86	0,0586			
V/P6	1	33,37	0,0004			
V/P7	1	72,50	0,0001			
C x P	6	23,43	0,0001	0,0001	0,0001	0,0117
C/P1	1	0,00	1.0000			
C/P2	1	5,97	0.0404			
C/P3	1	49,06	0,0001			
C/P4	1	121,67	0,0001			
C/P5	1	108,44	0,0001			
C/P6	1	129,26	0,0001			
C/P7	1	63,18	0,0001			
V x C x P	6	2,46	0,0371	0,0969	0,0425	0,0058
Resíduo (b)	48					
C.V. (a) (%)	4,20					
C.V. (b) (%)	2,31					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks'Lambda.

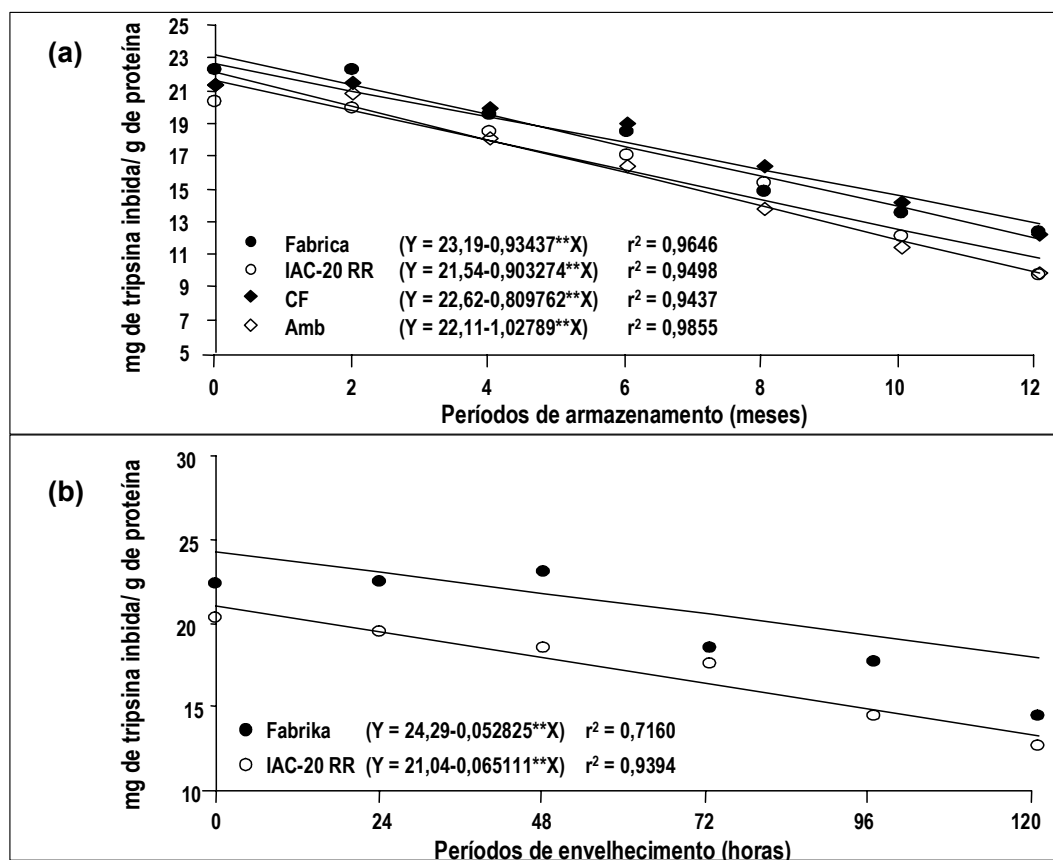


Figura 10 - Estimativa da inibição da atividade de tripsina (mg de tripsina inibida/g de proteína) de sementes de duas variedades de algodoeiro, em função dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial.

predadores ou microrganismos patogênicos. Para TREMACOLDI (2001), inibidores de proteases podem controlar proteases endógenas, prevenindo a hidrólise prematura de materiais de reserva.

As enzimas proteolíticas são capazes de clivar ligações peptídicas em cadeias de aminoácidos. São classificadas em endopeptidases (clivam resíduos de aminoácidos internos à cadeia peptídica) e em exopeptidases (agem em ligações peptídicas próximas ao grupo amino terminal). As endopeptidases são representadas por serino-protease, como a tripsina (RICHARDSON, 1991). Dessa forma, a presença de inibidores de proteases reduz a degradação de proteínas de reserva. Para CARVALHO & NAKAGAWA

(2000), tanto o vigor quanto o potencial de armazenamento são influenciados pelo conteúdo de compostos de reservas presentes na semente.

A análise de variância dos dados obtidos nas determinações da inibição da atividade de tripsina realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento artificial (Quadro 16), constatou efeitos altamente significativos ($P < 0,0001$) dos fatores estudados e da interação entre eles. Verifica-se que os testes H-F e G-G foram concordantes ao teste F univariado.

Ainda no Quadro 16, seguindo a mesma tendência dos resultados obtidos no envelhecimento natural, observa-se que as sementes da variedade Fabrika apresentaram inibição da atividade de tripsina maior em relação as da variedade IAC-20 RR.

Pela Figura 10b, verifica-se que as sementes das duas variedades sofreram redução linear na inibição da atividade de tripsina, à medida que aumentou o período de envelhecimento acelerado das mesmas. De acordo com ONIGBINDE & AKINYELE (1990), a redução do inibidor de tripsina pode ser explicada pelo aumento da degradação de proteínas observada durante o armazenamento das sementes. Os resultados obtidos mostram que esta redução também ocorre em sementes artificialmente envelhecidas.

4.3.4. Lipídios

A análise de variância da determinação do teor de lipídios (Quadro 17), revelou efeitos significativos de variedade e período de armazenamento, bem como para a interação entre eles. Verifica-se que, a probabilidade ajustada para o teste F por meio das condições estabelecidas por H-F e G-G, assim como o teste F multivariado, mostraram-se semelhantes ao teste F univariado, para o efeito de período de armazenamento e suas interações. O teste de Mauchly apresentou $\chi^2_{20gl}=28,78$ ($P=0,0920$), indicando portanto, que os F univariados são válidos.

As sementes da variedade IAC-20 RR apresentaram teor de lipídios superior às da variedade Fabrika. Os resultados mostram ainda que o teor de lipídios em sementes de algodão não foi afetado pelas condições de armazenamento das mesmas.

Quadro 16 - Médias (mg de tripsina inibida/g de proteína) e resumo da análise de variância da inibição da atividade de tripsina de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

Variedades					
	Fabrika		IAC-20 RR		Média
Média	21,125		17,139		19,13
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F	
				G-G ¹	H-F ²
Variedade (V)	1	1537,03	0,0001		
Resíduo (a)	4				
Período (P)	5	521,38	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	5	151,55	0,0001	0,0001	0,0001
V/P1	1	26,53	0,0067		
V/P2	1	59,84	0,0015		
V/P3	1	49,52	0,0021		
V/P4	1	1734,39	0,0001		
V/P5	1	190,27	0,0002		
V/P6	1	41,19	0,0030		
Resíduo (b)	20				
C.V. (a) (%)	1,59				
C.V. (b) (%)	2,07				

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt.

O teor de lipídios nas sementes decresceu com o aumento dos períodos de armazenamento e de envelhecimento artificial das sementes (Figura 11a e 11b). Esse resultado pode ser explicado pela oxidação dos lipídios presentes nas sementes, reação esta provocada pela intensificação do processo deteriorativo. WILSON JR. & McDONALD JR. (1986) apresentaram um modelo que considera a peroxidação dos lipídios uma das principais causas da deterioração das sementes, uma vez que o armazenamento das sementes submete os lipídios a um lento e consistente ataque por oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos graxos oxigenados e radicais livres, sendo este processo acelerado pela presença das isozimas lipoxigenases. Os radicais

Quadro 17 - Médias (%) e resumo da análise de variância do teor de lipídios de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento

	Variedades		Condições			Média
	Fabrika	IAC-20 RR	Câmara fria	Ambiente		
Média	23,650	24,499	24,099	24,051		24,075
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F		P > F Multivariado ³
				G-G ¹	H-F ²	
Variedade (V)	1	181,13	0,0001			
Condição (C)	1	0,58	0,4686			
V x C	1	4,91	0,0575			
Resíduo (a)	8					
Período (P)	6	73,54	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
V x P	6	19,32	0,0001	0,0001	0,0001	0,0013
V/P1	1	33,90	0,0004			
V/P2	1	27,71	0,0008			
V/P3	1	55,71	0,0001			
V/P4	1	84,47	0,0001			
V/P5	1	104,67	0,0001			
V/P6	1	20,33	0,0020			
V/P7	1	31,86	0,0005			
C x P	6	0,71	0,6460	0,5546	0,6460	0,2055
Resíduo (b)	54					
C.V. (a) (%)	1,20					
C.V. (b) (%)	1,24					

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt; ³Wilks' Lambda.

livres são instáveis e reagem com as moléculas próximas, transformando-as. Os hidroperóxidos, produtos primários da oxidação, decompõem-se com o rompimento da cadeia hidrocarbonada, formando diversos produtos intermediários, aldeídos, cetonas e álcoois. Os ácidos graxos oxigenados, por sua vez, acumulam-se na semente seca e, posteriormente, durante o processo de germinação, ocorre a sua degradação enzimática, resultando na formação de radicais livres e produtos secundários tóxicos.

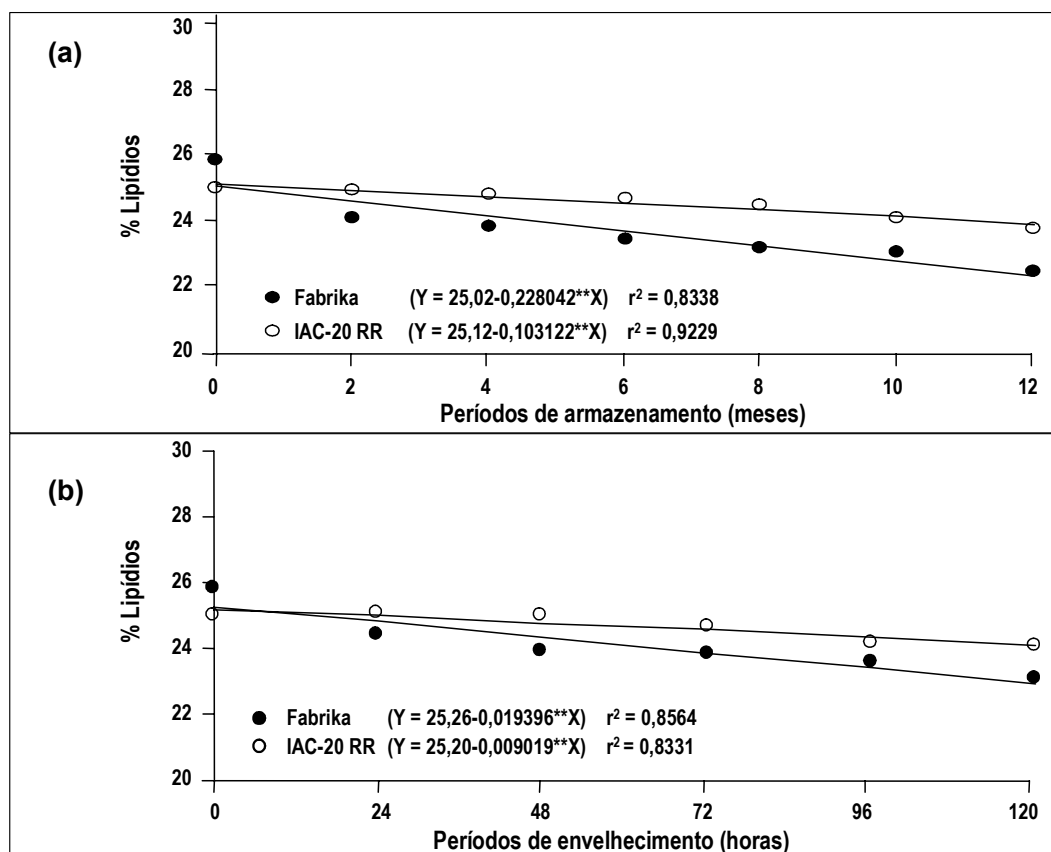


Figura 11 - Estimativa da porcentagem do teor de lipídios de sementes de duas variedades de algodoeiro em função do período de armazenamento e envelhecimento artificial.

É importante ressaltar que pela Figura 8a e 8b, houve redução na atividade da lipoxigenase com o decorrer do tempo de armazenamento e de envelhecimento.

A oxidação dos lipídios presentes nas membranas celulares tem sido proposta como principal mecanismo de deterioração das sementes. O processo oxidativo geralmente inicia-se nos ácidos graxos insaturados localizados na membrana plasmática, desta forma, considera-se que o primeiro passo para a deterioração das sementes seria a perda da integridade da membrana, levando a um aumento na sua permeabilidade e provocando o vazamento de solutos celulares durante o processo de embebição das sementes (DELOUCHE & BASKIN, 1973). Dessa forma, verifica-se pelo teste de condutividade elétrica

(Figura 6) que houve um aumento na quantidade de eletrólitos liberados das sementes à medida que estas permaneceram armazenadas.

A análise de variância dos dados obtidos nas determinações do teor de lipídios realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento artificial (Quadro 18), constatou efeitos significativos do fator período de envelhecimento e da interação entre variedade e período de envelhecimento. Verifica-se que os testes H-F e G-G foram concordantes ao teste F univariado.

Quadro 18 - Médias (%) e resumo da análise de variância do teor de lipídios de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

Variedades					
Fabrika		IAC-20 RR		Média	
Média	24,101		24,659	24,38	
F.V.	G.L.	Teste F	P > F Univariado	P ajustada > F	
				G-G ¹	H-F ²
Variedade (V)	1	7,61	0,0510		
Resíduo (a)	4				
Período (P)	5	24,78	0,0001	0,0002	0,0001
V x P	5	7,35	0,0005	0,0116	0,0005
V/P1	1	16,95	0,0146		
V/P2	1	2,42	0,1950		
V/P3	1	7,78	0,0494		
V/P4	1	4,74	0,0950		
V/P5	1	7,05	0,0567		
V/P6	1	59,31	0,0015		
Resíduo (b)	20				
C.V. (a) (%)	2,49				
C.V. (b) (%)	1,30				

¹Greenhouse-Geisser; ²Huynh-Feldt.

4.3.5. Ácidos graxos

Os valores médios da concentração dos ácidos graxos para as sementes das variedades Fabrika, IAC-20 RR armazenadas em ambiente e câmara fria (CF) e para as sementes envelhecidas artificialmente, encontram-se nos Quadros 19, 20, e 21 respectivamente.

De modo geral, observa-se que, com o aumento dos períodos de armazenamento e envelhecimento das sementes, ocorreram decréscimos nas concentrações de ácidos graxos polinsaturados como o linoléico. Comparando as condições de armazenamento, essa redução foi mais intensa para as sementes armazenadas em ambiente. Dentro da fração lipídica, os ácidos graxos polinsaturados, tais como o linoléico, são mais suscetíveis à degradação oxidativa por reações enzimática e não-enzimáticas.

Segundo BEWLEY & BLACK (1994) as primeiras substâncias a serem metabolizadas por ocasião da germinação são os açúcares, devido ao aumento na atividade respiratória das sementes. Contudo, em sementes com elevados teores de óleo, como o algodão, o metabolismo dos lipídios de reserva desempenha um importante papel no fornecimento de carboidratos para o processo respiratório. Os produtos da hidrólise dos triacilgliceróis (ácidos graxos e glicerol) podem ser usados, em parte, para a síntese dos fosfolipídios das membranas ou, então, serem convertidos em hexoses e, finalmente em sacarose. Assim, com a intensificação do processo de peroxidação de lipídios, as sementes perdem a sua qualidade fisiológica durante o armazenamento, principalmente quando armazenadas em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa, conforme também observaram MEDEIROS FILHO et al. (1996).

PRIESTLEY & LEOPOLD (1983) verificaram que o armazenamento das sementes de soja por 44 meses, em condição ambiente, promoveu declínio bastante acentuado na viabilidade e no vigor dessas sementes, o que estava associado com decréscimo na proporção de ácidos graxos poliinsaturados

HARMAN & MATTICK (1976) trabalhando com sementes de ervilha e STEWART & BEWLEY (1980) com sementes de soja, encontraram mudanças na concentração de ácidos graxos após o teste de envelhecimento acelerado.

Quadro 19 - Médias e desvios-padrão, em porcentagem, de ácidos graxos de sementes de algodoeiro da variedade Fabrika, armazenadas em ambiente e câmara fria (CF)

Condição de armazenamento	Período de armazenamento (meses)	Mirístico	Palmítico	Palmitoleico	Esteárico	Oléico	Linoléico
Ambiente	0	0,723±0,020	22,648±0,228	0,514±0,027	2,498±0,023	15,345±0,015	58,272±0,227
CF		0,723±0,020	22,648±0,228	0,514±0,027	2,498±0,023	15,345±0,015	58,272±0,227
Ambiente	2	0,757±0,019	22,684±0,293	0,459±0,006	2,760±0,097	15,640±0,117	57,663±0,283
CF		0,754±0,013	22,668±0,068	0,527±0,008	2,494±0,033	15,528±0,035	58,028±0,065
Ambiente	4	0,757±0,059	23,207±0,565	0,486±0,012	2,757±0,218	15,567±0,226	57,225±0,518
CF		0,754±0,009	22,731±0,146	0,504±0,018	2,604±0,117	15,439±0,118	57,968±0,136
Ambiente	6	0,771±0,029	23,153±0,654	0,496±0,017	3,070±0,403	15,240±0,222	57,270±0,734
CF		0,780±0,029	22,708±0,081	0,538±0,017	2,780±0,025	15,346±0,072	57,848±0,211
Ambiente	8	0,760±0,005	23,412±0,414	0,473±0,025	3,259±0,138	15,495±0,142	56,600±0,365
CF		0,737±0,005	22,682±0,066	0,517±0,017	2,654±0,033	15,842±0,023	57,568±0,031
Ambiente	10	0,867±0,078	23,341±0,349	0,544±0,025	3,068±0,153	15,566±0,041	56,613±0,393
CF		0,743±0,039	22,680±0,159	0,518±0,031	2,879±0,360	15,671±0,059	57,508±0,414
Ambiente	12	0,768±0,040	23,961±0,321	0,500±0,035	3,015±0,385	15,662±0,384	56,093±0,354
CF		0,795±0,071	22,886±0,388	0,508±0,035	2,896±0,235	15,466±0,406	57,449±0,274

Quadro 20 - Médias e desvios-padrão, em porcentagem, de ácidos graxos de sementes de algodoeiro da variedade IAC-20 RR, armazenadas em ambiente e câmara fria (CF)

Condição de armazenamento	Período de armazenamento (meses)	Mirístico	Palmítico	Palmitoleico	Esteárico	Oléico	Linoléico
Ambiente	0	0,685±0,011	21,575±0,095	0,532±0,020	2,427±0,041	16,434±0,073	58,346±0,039
CF		0,685±0,011	21,575±0,095	0,532±0,020	2,427±0,041	16,434±0,073	58,346±0,039
Ambiente	2	0,695±0,007	21,746±0,237	0,525±0,013	2,409±0,053	16,935±0,044	57,690±0,324
CF		0,672±0,015	21,336±0,209	0,522±0,006	2,622±0,248	17,076±0,126	57,773±0,359
Ambiente	4	0,786±0,087	22,443±1,092	0,535±0,049	3,005±0,223	16,192±0,340	57,039±0,717
CF		0,704±0,014	21,803±0,117	0,543±0,002	2,448±0,041	16,617±0,016	57,884±0,149
Ambiente	6	0,705±0,074	21,721±0,183	0,510±0,051	2,695±0,214	16,730±0,188	57,639±0,402
CF		0,685±0,038	20,929±0,368	0,524±0,043	2,453±0,070	17,482±0,421	57,926±0,142
Ambiente	8	0,720±0,015	22,200±0,046	0,509±0,031	2,466±0,071	16,873±0,188	57,230±0,263
CF		0,689±0,028	21,245±0,295	0,535±0,030	2,450±0,035	17,274±0,384	57,807±0,073
Ambiente	10	0,735±0,042	22,822±0,667	0,534±0,025	2,780±0,041	16,290±0,243	56,838±0,371
CF		0,690±0,016	21,635±0,396	0,530±0,028	2,262±0,182	16,980±0,355	57,902±0,764
Ambiente	12	0,735±0,037	23,317±0,620	0,518±0,030	3,342±0,277	16,088±0,225	56,000±0,657
CF		0,738±0,015	21,826±0,203	0,521±0,001	2,715±0,141	16,622±0,149	57,576±0,147

Quadro 21 - Médias e desvios-padrão, em porcentagem, de ácidos graxos de sementes de duas variedades de algodoeiro submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial

Variedades	Período de envelhecimento (horas)	Mirístico	Palmítico	Palmitoleico	Esteárico	Oléico	Linoléico
Fabrika	0	0,723±0,020	22,648±0,228	0,514±0,027	2,498±0,023	15,345±0,015	58,272±0,227
	24	0,750±0,013	22,685±0,054	0,511±0,011	2,503±0,250	15,180±0,063	58,369±0,101
	48	0,711±0,064	22,535±0,326	0,518±0,007	2,546±0,124	15,461±0,132	58,230±0,636
	72	0,749±0,008	22,512±0,072	0,519±0,012	2,728±0,053	15,554±0,073	57,937±0,059
	96	0,792±0,007	23,109±0,101	0,523±0,007	2,723±0,091	15,421±0,156	57,432±0,052
	120	0,803±0,038	22,934±0,141	0,517±0,010	2,928±0,041	15,709±0,017	57,108±0,107
IAC-20 RR	0	0,685±0,011	21,575±0,095	0,532±0,020	2,427±0,041	16,434±0,073	58,346±0,039
	24	0,679±0,011	21,401±0,074	0,542±0,029	2,492±0,011	17,082±0,017	57,804±0,098
	48	0,701±0,015	21,815±0,095	0,524±0,006	2,388±0,053	16,934±0,070	57,637±0,217
	72	0,735±0,013	22,057±0,082	0,559±0,023	2,443±0,022	16,604±0,102	57,601±0,120
	96	0,707±0,004	22,010±0,318	0,534±0,016	2,430±0,080	16,726±0,100	57,594±0,344
	120	0,736±0,023	22,410±0,535	0,527±0,006	2,534±0,213	16,798±0,211	56,995±0,642

Por outro lado, outros autores não confirmaram estas alterações. PRIESTLEY & LEOPOLD (1979) mostraram que os níveis de ácidos graxos insaturados não declinam durante o armazenamento de sementes de soja, sugerindo que a oxidação de lipídios pode não estar relacionada ao processo de envelhecimento da semente. PEARCE & ABDEL SAMAD (1980) analisando sementes de amendoim naturalmente e artificialmente envelhecidas, observaram redução no conteúdo de ácidos graxos mas, não constatarem alterações em suas proporções relativas, pois o declínio para cada ácido graxo foi relativo à quantidade presente antes do envelhecimento. PÉREZ & ARGÜELLO (1995) não observaram mudanças na proporção relativa dos ácidos oléico/linoléico em eixos embrionários de sementes de amendoim após exposição a diferentes períodos de envelhecimento acelerado. Os autores verificaram que o teste de germinação não foi eficiente para detectar o grau de deterioração das sementes. No entanto, ao utilizarem o teste de condutividade elétrica verificaram alterações no vigor das sementes, indicando perda da integridade das membranas causada pela deterioração.

4.4. Correlação entre testes para avaliação da qualidade fisiológica e determinações bioquímicas nas sementes

Os valores dos coeficientes de correlação, entre os testes de avaliação da qualidade fisiológica e determinações bioquímicas nas sementes armazenadas em ambiente, correspondentes aos sete períodos de armazenamento encontram-se no Quadro 22. Observa-se a existência de correlação positiva e altamente significativa entre os resultados de germinação, envelhecimento acelerado, emergência das plântulas em leito de areia, germinação a baixa temperatura, atividade de lipoxigenases e inibidor de tripsina, combinados entre si, confirmando as observações efetuadas anteriormente, no presente trabalho, pois, de acordo com as Figuras 3a, 4a, 5a, 7, 8a e 10a todas estas variáveis sofreram reduções lineares à medida que aumentou o período de armazenamento das sementes. Esses resultados sugerem que determinações da atividade da enzima lipoxigenase e de

Quadro 22 - Estimativas dos coeficientes de correlação entre os testes de germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), emergência das plântulas em leito de areia (AREIA), germinação a baixa temperatura (GBT), condutividade elétrica (CE), atividades de lipoxigenase (LOX), inibidor de tripsina (IT), fosfatase ácida (FA) e teor de lipídios (LI) de sementes de duas variedades de algodoeiro, correspondentes aos sete períodos de armazenamento em ambiente

	E A	AREIA	GBT	CE	LOX	IT	FA	LI
G	0,8659**	0,9226**	0,8745**	-0,4667*	0,7868**	0,8781**	0,6460**	0,6766**
EA		0,8642**	0,9047**	-0,8090**	0,9275**	0,9091**	0,3717	0,3971
AREIA			0,9124**	-0,5448*	0,8440**	0,9072**	0,6087*	0,6515**
GBT				-0,6501**	0,9278**	0,9579**	0,5799*	0,5791*
CE					-0,8365**	-0,6810**	0,1516	0,0484
LOX						0,9362**	0,3106	0,4238
IT							0,5651*	0,5832*
FA								0,8288**

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, pelo teste t.

inibidores de tripsina podem ser consideradas promissoras para avaliação do estágio deteriorativo das sementes do algodoeiro. FREITAS (1999), trabalhando com sementes do algodoeiro, também encontrou correlação positiva e significativa entre os testes de germinação, germinação a baixa temperatura e envelhecimento acelerado.

A condutividade elétrica correlacionou-se negativa e significativamente com os demais testes de qualidade fisiológica (Quadro 22). Correlação negativa e significativa entre condutividade elétrica e os testes de germinação, envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura foi também constatada por FREITAS (1999). Correlações negativas e significativas entre condutividade elétrica e os demais testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes indicam que maiores valores de condutividade elétrica estão relacionados à redução da viabilidade e do vigor das sementes. Verifica-se ainda, que os resultados de condutividade elétrica também correlacionaram-se negativa e significativamente com os de atividade de lipoxigenases e inibidor de tripsina.

Ainda no Quadro 22, verifica-se que inibidor de tripsina e a atividade da enzima lipoxigenase apresentaram correlação positiva e altamente significativa com todos os testes fisiológicos. Atividade de fosfatase ácida e o teor de lipídios correlacionaram-se positiva e significativamente entre si, sendo que estas determinações também mostraram correlações com a germinação, emergência das plântulas em leito de areia, germinação a baixa temperatura e inibidor de tripsina. Isto sugere portanto, que determinações da atividade da enzima fosfatase ácida e do teor de lipídios podem se constituir em promissores indicadores do estágio deteriorativo das sementes.

Quanto ao armazenamento em câmara fria observa-se, no Quadro 23, que os resultados de germinação não se correlacionaram com os de emergência em leito de areia, condutividade elétrica e atividade de fosfatase ácida, o que não ocorreu no armazenamento em ambiente. No entanto, a germinação apresentou correlação altamente significativa com germinação a baixa temperatura e com a atividade da enzima lipoxigenase, enquanto as demais correlações foram menos acentuadas. Isto pode ser explicado pelo fato de que, enquanto o aumento no período de armazenamento em câmara fria

Quadro 23 - Estimativas dos coeficientes de correlação entre os testes de germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), emergência das plântulas em leito de areia (AREIA), germinação a baixa temperatura (GBT), , condutividade elétrica (CE), atividades de lipoxigenase (LOX), inibidor de tripsina (IT), fosfatase ácida (FA) e teor de lipídios (LI) de sementes de duas variedades de algodoeiro, correspondentes aos sete períodos de armazenamento em câmara fria

	EA	AREIA	GBT	CE	LOX	IT	FA	LI
G	0,5471*	0,4044	0,6218**	-0,4551	0,6557**	0,5691*	-0,0237	0,4802*
EA		0,8252**	0,7398**	-0,7626**	0,8132**	0,5347*	-0,2742	0,1473
AREIA			0,6214**	-0,8005**	0,7762**	0,6457**	-0,2013	0,1833
GBT				-0,5255*	0,8661**	0,8469**	0,2608	0,5462*
CE					-0,7313**	-0,4843*	0,5280*	0,1597
LOX						0,8817**	-0,0017	0,3723
IT							0,3884	0,6342**
FA								0,7441**

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, pelo teste t.

reduziu linearmente as demais variáveis, o percentual de germinação das sementes mantidas nestas condições praticamente não apresentou alteração (Figura 3a).

O teste de envelhecimento acelerado e a atividade de lipoxigenase, para as sementes mantidas em câmara fria, se correlacionaram com os mesmos testes e determinações bioquímicas com os quais apresentaram correlação no armazenamento em ambiente (Quadros 22 e 23). Já a porcentagem de emergência das plântulas em leito de areia durante o armazenamento em câmara fria (Quadro 23) não se correlacionou com germinação, atividade de fosfatase ácida e teor de lipídios das sementes, diferentemente do que foi verificado no armazenamento em ambiente.

Verifica-se ainda no Quadro 23, que a lipoxigenase apenas não se correlacionou com a fosfatase ácida e teor de lipídios. A atividade da fosfatase ácida não mostrou associação com os testes fisiológicos e bioquímicos, exceto com teor de lipídios. Já no armazenamento em ambiente, esta enzima correlacionou-se também com a germinação, emergência das plântulas em leito de areia, germinação a baixa temperatura e inibidor de tripsina. É importante ressaltar que com exceção da germinação, mesmo no armazenamento em câmara fria, praticamente todos os testes conduzidos mostraram reduções lineares em função do período de armazenamento.

Houve correlação altamente significativa entre teor de lipídios e fosfatase ácida (Quadros 22 e 23). Pelas Figuras 9a e 11a, verifica-se que os valores obtidos para estas determinações foram lineares e decrescentes com o armazenamento tanto em câmara fria como em ambiente.

4.5. Relação entre as alterações provocadas pelo envelhecimento natural e artificial das sementes

Os efeitos provocados pelos diferentes períodos de armazenamento (envelhecimento natural) e de envelhecimento artificial na qualidade das sementes foram avaliados por meio de testes fisiológicos (germinação e vigor) e de determinações bioquímicas. Para comparação entre estes efeitos utilizaram-se as distâncias generalizadas de Mahalanobis, obtidas para os

testes fisiológicos e determinações bioquímicas realizados durante o armazenamento em relação aos realizados após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado, sendo que distâncias não significativas indicam resultados mais concordantes entre os períodos testados.

Observa-se que a germinação (Quadro 24), no início do período de armazenamento (mês zero) correspondeu ao não envelhecimento artificial das sementes e ao período de 24 horas de envelhecimento. No período de dois meses de armazenamento, para as sementes mantidas em ambiente, distância não significativa foi obtida com o envelhecimento acelerado por 48 horas. No entanto, os períodos de armazenamento de quatro e seis meses também se associaram com o envelhecimento artificial por 48 horas. Nota-se ainda que os períodos de quatro e seis meses de armazenamento também apresentaram distâncias não significativas em relação ao envelhecimento acelerado por 24 horas. No período de armazenamento de 10 meses verifica-se que distância não significativa ocorreu para o envelhecimento acelerado por 96 horas.

Ainda no Quadro 24 observa-se que, para as sementes mantidas em câmara fria, de maneira geral, distâncias não significativas ocorreram para os envelhecimentos acelerado por 0, 24 e 48 horas, indicando que as sementes que permaneceram em câmara fria sofreram menor perda do poder germinativo, de modo que o envelhecimento acelerado por menor período foi suficiente para retratar a redução da viabilidade das sementes durante o armazenamento.

MACHADO NETO et al. (2001) relacionando as alterações no vigor de sementes de feijão naturalmente e artificialmente envelhecidas, verificaram que o envelhecimento artificial a 41°C e 100% de umidade relativa por diferentes períodos de envelhecimento não produziu alterações na germinação, mas reduziu o comprimento do hipocótilo e raiz, indicando redução no vigor das plântulas, particularmente após 96 horas de envelhecimento artificial.

Quadro 24 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para os testes de germinação realizados durante o armazenamento em relação aos

realizados após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Períodos de envelhecimento(horas)					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	0,7	4,1*	19,2**	47,6**	135,0**
	2	7,8**	4,0*	2,2	13,0**	22,9**	88,8**
	4	3,6**	1,3	1,1	13,4**	29,2**	102,0**
	6	4,4*	1,5	0,3	9,3**	24,2**	92,8**
	8	13,9**	8,2**	3,1*	5,8**	10,9**	64,1**
	10	34,7**	25,6**	15,0**	6,2**	1,0	32,8**
	12	75,2**	61,3**	44,2**	24,1**	3,1*	8,7**
CF	0	0	0,7	4,1*	19,2**	47,6**	135,0**
	2	0,8	0,1	2,1	16,4**	39,1**	120,4**
	4	0,2	0,5	3,5*	19,3**	45,5**	131,4**
	6	0,6	0,5	3,3*	19,6**	43,7**	128,2**
	8	0,8	0,1	1,8	15,5**	37,9**	118,4**
	10	1,2	0,1	1,1	13,53**	34,9**	112,9**
	12	0,6	0,1	2,2	16,6**	40,1**	122,1**

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Pelo teste de envelhecimento acelerado (Quadro 25), verifica-se que no período zero de armazenamento, tanto para o armazenamento em ambiente quanto em câmara fria, as distâncias não significativas ocorreram com as sementes não envelhecidas. A deterioração obtida quando as sementes foram armazenadas em ambiente por quatro e seis meses correspondeu à deterioração das sementes submetidas ao envelhecimento acelerado por 24 horas apresentado, portanto, distâncias não significativas. Já o armazenamento das sementes em ambiente por 2, 8, 10 e 12 meses não apresentou resultados concordantes com nenhum dos períodos de envelhecimento acelerado o que está evidenciado pelas significâncias das distâncias.

Quadro 25 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para os testes de envelhecimento acelerado realizados durante o armazenamento

em relação aos realizados após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Períodos de envelhecimento(horas)					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	17,8**	81,4**	218,8**	300,2**	372,4**
	2	4,7**	5,2**	51,6**	165,9**	237,5**	303,7**
	4	15,9**	0,2	27,8**	119,7**	181,5**	240,0**
	6	27,2**	1,8	14,5**	91,9**	147,0**	198,2**
	8	46,6**	10,8**	7,7**	69,9**	117,9**	161,3**
	10	88,3**	34,1**	6,3**	42,2**	78,3**	110,6**
	12	147,5**	68,9**	13,5**	15,9**	37,3**	58,7**
CF	0	0	17,8**	81,4**	218,8**	300,2**	372,4**
	2	1,7	12,6**	71,3**	200,0**	277,9**	349,3**
	4	1,1	10,6**	66,0*	192,3**	268,9**	338,4**
	6	8,9**	1,5	36,7**	139,5**	205,9**	266,8**
	8	3,5*	5,6**	51,3**	167,1**	239,1**	304,1**
	10	5,4**	3,6*	45,3**	155,9**	225,6**	289,3**
	12	4,2*	4,8**	50,0**	164,1**	235,5**	300,7**

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Ainda no Quadro 25, para as sementes armazenadas em câmara fria, verifica-se nos períodos dois e quatro meses de armazenamento que as distâncias não significativas foram obtidas com as sementes não envelhecidas. O armazenamento em câmara fria por seis meses apresentou resultados concordantes com o envelhecimento por 24 horas.

Dessa forma, constata-se que no teste de envelhecimento acelerado, bem como no teste de germinação não houve uma definição precisa com relação à correspondência entre determinado período de armazenamento e período de envelhecimento artificial das sementes, ou seja, não foi possível definir um período de envelhecimento artificial que promovesse alterações no comportamento das sementes que fosse correspondente àsquelas proporcionadas por determinado período de envelhecimento natural. Apesar disso, tanto o armazenamento quanto o envelhecimento acelerado provocaram

decréscimos na germinação e no vigor das sementes (Figuras 3 e 4, respectivamente). MACHADO NETO et al. (2001) também observaram redução na germinação e no vigor das sementes de feijão envelhecidas natural e artificialmente.

Para as sementes armazenadas em ambiente, o teste de germinação a baixa temperatura (Quadro 26) foi o que permitiu melhor definir a relação entre períodos de armazenamento e de envelhecimento acelerado das sementes. Distâncias não significativas foram obtidas à medida em que se aumentou os períodos de armazenamento e de envelhecimento acelerado.

Para as sementes mantidas em câmara fria, o armazenamento por zero e dois meses apresentou distâncias não significativas para as sementes não envelhecidas e para as submetidas ao envelhecimento acelerado por 24 horas. Para o período de quatro meses de armazenamento, distâncias não significativas foram verificadas com os períodos de envelhecimento por 0, 24 e 48 horas. Já o armazenamento por 12 meses apresentou resultados mais concordantes com o envelhecimento por 48 horas (Quadro 26).

Essas observações indicam que o teste de germinação a baixa temperatura foi mais sensível que o teste de envelhecimento acelerado, uma vez que detectou a redução no vigor mesmo para as sementes armazenadas em câmara fria. DIAS & ALVARENGA (1999) relataram a importância do teste de germinação a baixa temperatura para a avaliação da qualidade de sementes de algodoeiro.

Assim, pelos resultados de germinação a baixa temperatura obtidos com sementes submetidas a diferentes períodos de envelhecimento acelerado, verifica-se que aquele teste foi o que mais refletiu o comportamento das sementes no armazenamento em condições ambiente, uma vez que, à medida em que se aumentou os períodos de armazenamento e de envelhecimento acelerado distâncias não significativas foram obtidas.

Nas determinações bioquímicas referentes à atividade de lipoxigenase, inibidor de tripsina e teor de lipídios (Quadros 27, 29 e 30, respectivamente) verifica-se que a maioria das distâncias mostraram-se não significativas.

Quadro 26 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para os testes de germinação a baixa temperatura realizados durante o

armazenamento em relação aos realizados após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Testes de vigor					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	0,2	3,7*	51,4**	82,7**	147,1**
	2	1,2	0,1	1,9	37,8**	65,6**	124,1**
	4	6,7**	5,7**	2,4	21,5**	43,7**	93,1**
	6	29,9**	26,5**	14,4**	3,0	13,1**	44,4**
	8	102,5**	94,9**	68,5**	11,8**	2,6	5,5**
	10	137,7**	130,7**	101,4**	20,9**	7,9**	2,0
	12	172,8**	163,8**	129,2**	36,8**	16,5**	1,0
CF	0	0	0,2	3,7*	51,4**	82,7**	147,1**
	2	0,1	0,4	3,9*	50,0**	81,3**	145,4**
	4	0,7	0,6	1,8	39,9**	68,2**	127,6**
	6	9,8**	8,6**	4,0*	17,1**	37,6**	84,1**
	8	15,9**	14,3**	7,5**	11,1**	28,5**	70,1**
	10	13,8**	11,3**	4,0*	12,4**	29,0**	70,9**
	12	12,5**	10,3**	3,6	13,4**	30,9**	73,8**

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Para as sementes armazenadas em ambiente, as distâncias obtidas para a atividade de fosfatase ácida (Quadro 28) seguiram tendências similares àquelas reveladas pelo teste de germinação a baixa temperatura, sendo que com o aumento dos períodos de armazenamento e de envelhecimento acelerado distâncias não significativas foram obtidas, indicando maior concordância entre os resultados.

As determinações das atividades de lipoxigenase, fosfatase ácida e inibidor de tripsina e do teor de lipídios (Figuras 8, 9, 10 e 11, respectivamente) mostraram-se relacionadas ao vigor das sementes, uma vez que todas estas determinações apresentaram redução no decorrer do armazenamento e com

Quadro 27 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para as determinações da atividade de lipoxigenase realizadas

durante o armazenamento em relação às realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Períodos de envelhecimento(horas)					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	0,2	0,7	0,8	1,8	3,6
	2	0,4	0,03	0,1	0,1	0,7	1,7
	4	1,0	0,4	0,03	0,01	0,1	0,8
	6	2,0	1,1	0,4	0,3	0,01	0,2
	8	4,2*	2,7	1,5	1,3	0,5	0,02
	10	6,3**	4,5*	2,8	2,6	1,3	0,4
	12	7,2**	5,3*	3,4	3,1	1,7	0,6
CF	0	0	0,2	0,7	0,8	1,8	3,6
	2	0,1	0,2	0,5	0,6	1,4	3,1
	4	0,06	0,05	0,4	0,5	1,3	2,8
	6	0,5	0,2	0,04	0,1	0,4	1,5
	8	1,0	0,5	0,1	0,05	0,1	0,8
	10	1,4	0,7	0,1	0,1	0,03	0,6
	12	2,2	1,3	0,5	0,4	0,02	0,2

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

aumento dos períodos de envelhecimento acelerado. No entanto, verifica-se que a determinação da atividade da enzima fosfatase ácida foi a que mais refletiu o comportamento das sementes no armazenamento em condições ambiente, uma vez que, à medida em que se aumentou os períodos de armazenamento e de envelhecimento acelerado distâncias de Mahalanobis não significativas foram obtidas, mostrando portanto, que a determinação desta enzima foi a mais eficiente para monitorar o processo deteriorativo das sementes.

Para VIEIRA (1996), variações eletroforéticas na enzima fosfatase ácida pode ser um promissor indicador do estágio deteriorativo das sementes de

Quadro 28 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para as determinações da atividade de fosfatase ácida realizadas

durante o armazenamento em relação às realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Períodos de envelhecimento(horas)					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	1,2	4,8*	10,3**	21,6**	29,2**
	2	0,5	1,9	5,2*	10,4**	19,4**	27,2**
	4	6,9**	3,9	2,4	2,9	5,4*	9,2**
	6	13,7**	7,5**	2,9	0,7	0,9	2,9
	8	27,1**	18,6**	11,2**	6,1*	0,7	0,5
	10	34,8**	24,7**	15,5**	8,9**	1,7	0,4
	12	74,5**	58,1**	42,7**	30,1**	16,1**	10,6**
CF	0	0	1,2	4,8*	10,3**	21,6**	29,2**
	2	0,2	2,1	6,2*	12,1**	23,2**	31,1**
	4	2,5	1,0	1,3	3,8	9,8**	15,1**
	6	6,0*	2,3	0,5	1,0	4,8*	8,8**
	8	7,6**	3,7	1,4	1,3	3,8	7,3**
	10	14,3**	7,7**	2,9	0,5	0,9	2,8
	12	32,9**	22,4**	13,3**	6,8**	1,3	0,3

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

algodão. SPINOLA et al. (2000) verificaram alterações nos perfis isoenzimáticos da fosfatase ácida e peroxidase em sementes de milho a partir de 72 horas de envelhecimento acelerado, o que provavelmente está relacionado ao efeito deteriorativo provocado pela exposição das sementes às condições de alta temperatura e alta umidade relativa, independentemente da qualidade dos lotes. Já os testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes não se mostraram sensíveis o suficiente para detectar o efeito deteriorativo provocado pelo envelhecimento acelerado, e, quando detectado, foi observado nos períodos mais longos de envelhecimento.

Quadro 29 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para as determinações da inibição da atividade de tripsina realizadas

durante o armazenamento em relação às realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Períodos de envelhecimento(horas)					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	0,04	0,4	3,8	3,2	6,8**
	2	0,04	0,003	0,2	3,7	2,6	6,1*
	4	1,2	1,0	0,2	7,4**	0,6	2,3
	6	2,7	2,3	1,1	9,1**	0,1	1,0
	8	6,7**	6,3**	3,9	16,5**	1,2	0,3
	10	11,2**	10,5**	7,5**	20,4**	2,5	0,5
	12	14,9**	14,0**	10,6**	24,2**	4,3*	1,6
CF	0	0	0,04	0,4	3,8	3,2	6,8**
	2	0,002	0,05	0,4	3,7	3,4	7,1**
	4	0,3	0,2	0,04	5,5	1,8	4,6*
	6	0,6	0,5	0,06	6,4**	1,1	3,4
	8	2,9	2,7	1,2	10,7**	0,4	1,0
	10	5,9*	5,4*	3,3	14,2**	0,6	0,1
	12	9,3**	8,7**	6,0	17,8**	1,7	0,2

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Em sementes de feijão naturalmente envelhecidas, os testes de qualidade fisiológica foram mais sensíveis que análises eletroforéticas para monitorar a deterioração, enquanto que nas sementes envelhecidas artificialmente, os perfis eletroforéticos foram mais eficientes, o que sugere que a degradação de proteínas é diferente no envelhecimento artificial e natural e provavelmente é dirigida por diferentes mecanismos fisiológicos (MACHADO NETO et al., 2001).

BASAVARAJAPPA et al. (1991), VARIER & DADLANI (1992) e VIEIRA (1996) encontraram acréscimo no número de bandas nos perfis eletroforéticos de proteínas de sementes envelhecidas artificialmente em relação às não

Quadro 30 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) para as determinações do teor de lipídios realizadas durante o

armazenamento em relação às realizadas após os diferentes períodos de envelhecimento acelerado

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Períodos de envelhecimento(horas)					
		0	24	48	72	96	120
Ambiente	0	0	0,1	0,21	0,23	0,3	0,5
	2	0,2	0,02	0,0001	0,01	0,05	0,1
	4	0,2	0,02	0,003	0,002	0,03	0,1
	6	0,4	0,1	0,04	0,03	0,03	0,03
	8	0,4	0,1	0,06	0,03	0,01	0,005
	10	0,5	0,2	0,1	0,06	0,01	0,00003
	12	0,9	0,4	0,3	0,2	0,1	0,06
CF	0	0	0,1	0,21	0,23	0,3	0,5
	2	0,2	0,009	0,008	0,006	0,04	0,1
	4	0,2	0,03	0,01	0,001	0,02	0,05
	6	0,3	0,06	0,02	0,0046	0,0048	0,3
	8	0,4	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01
	10	0,5	0,2	0,1	0,07	0,02	0,001
	12	0,6	0,2	0,2	0,1	0,04	0,01

envelhecidas, ao contrário de SPINOLA et al. (2000) que, avaliando os perfis eletroforéticos de proteínas totais em sementes de milho envelhecidas artificialmente, observaram que o número de bandas foi praticamente inalterado quando comparado com sementes não envelhecidas.

4.6. Avaliação do potencial de armazenamento das sementes

Para avaliar o potencial de armazenamento das sementes, foi aplicada uma análise das distâncias generalizadas de Mahalanobis entre os resultados obtidos nos testes de vigor e nas determinações bioquímicas, realizadas antes do armazenamento, relacionando estes resultados aos percentuais de

germinação obtidos nos diferentes períodos de armazenamento (Quadro 31). Distâncias não significativas indicam resultados mais concordantes entre os testes.

Verifica-se que para as sementes armazenadas em ambiente pelo teste de envelhecimento acelerado, distância não significativa foi obtida aos oito meses de armazenamento. Este resultado revela que o percentual de germinação obtido aos oito meses correspondeu ao valor obtido no teste de envelhecimento acelerado realizado antes do armazenamento das sementes. FREITAS et al. (2002) armazenando sementes de algodoeiro também em condições ambiente, constataram que o teste de envelhecimento acelerado, realizado antes do armazenamento, estimou a viabilidade das sementes após um período de nove meses de armazenamento. Cabe ressaltar que os referidos autores conduziram o teste de germinação em intervalos de três meses durante um ano. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho reforçam os de FREITAS et al. (2002), uma vez que foram utilizados intervalos de dois meses. O teste de envelhecimento acelerado realizado antes do armazenamento também permitiu uma estimativa do desempenho das sementes de sorgo após um período de 15 meses (ANDRADE et al. 1994).

Para as sementes armazenadas em câmara fria, o teste de envelhecimento acelerado realizado antes do armazenamento não forneceu estimativa do poder germinativo das sementes durante o armazenamento (Quadro 31).

O teste de germinação a baixa temperatura apresentou resultados concordantes com o percentual de germinação aos dez e doze meses de armazenamento em ambiente, indicando que este teste quando realizado no início do armazenamento permite estimar o desempenho que as sementes terão no intervalo do décimo ao décimo segundo mês de armazenamento. Já para as sementes armazenadas em câmara fria, à semelhança do teste de envelhecimento acelerado, este teste não permitiu estimar a viabilidade das sementes no período de armazenamento estudado.

Os resultados da emergência das plântulas em leito de areia foram similares aos obtidos no teste de germinação, uma vez que não permitiram estimar o potencial de armazenamento das sementes. Verifica-se que para as

Quadro 31 - Distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) entre as porcentagens de germinação obtidas em diferentes períodos de armazenamento e os resultados dos testes de envelhecimento acelerado (EA), germinação a baixa temperatura (GBT), emergência em areia (AREIA), condutividade elétrica (CE), atividades de lipoxigenase (LOX), inibidor de tripsina (IT), fosfatase ácida (FA) e teor de lipídios (LI) realizados antes do armazenamento

Condições de armazenamento	Períodos de armazenamento (meses)	Testes de vigor				Determinações bioquímicas			
		EA	GBT	Areia	CE	LOX	IT	FA	LI
Ambiente	0	10,5**	52,4**	0,1	360,6**	706,6**	559,3**	50,8**	496,5**
	2	6,4**	26,1**	6,8**	428,5**	587,0**	453,4**	18,8**	396,6**
	4	6,1**	32,9**	3,0*	404,8**	623,8**	485,8**	27,3**	427,0**
	6	3,4*	27,6**	3,4*	426,9**	602,8**	467,3**	26,4**	409,9**
	8	2,8	13,3**	11,8**	492,4**	524,9**	399,0**	15,4**	346,1**
	10	8,5**	1,8	30,9**	601,8**	428,2**	315,5**	14,8**	268,9**
	12	31,6**	2,0	69,5**	739,7**	321,1**	224,7**	22,0**	185,7**
CF	0	10,5**	52,4**	0,1	360,6**	706,6**	559,3**	50,8**	496,5**
	2	8,1**	43,4**	0,6	376,6**	670,8**	527,4**	39,2**	466,2**
	4	10,3**	50,1**	0,3	361,3**	697,3**	550,9**	46,1**	488,5**
	6	10,4**	48,2**	0,8	362,2**	688,3**	542,9**	41,8**	480,8**
	8	7,5**	42,2**	0,6	380,9**	666,5**	523,6**	38,9**	462,7**
	10	6,1**	38,9**	0,8	391,4**	653,6**	512,1**	36,8**	451,9**
	12	8,3**	44,4**	0,5	374,9**	675,2**	531,3**	40,7**	469,9**

* * significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

sementes mantidas em condições ambiente, distância não significativa foi obtida somente no início do armazenamento (Quadro 31). No entanto, para as sementes armazenadas em câmara fria todos os períodos de armazenamento apresentaram distâncias de Mahalanobis não significativas, indicando que os resultados deste teste quando realizado no início do armazenamento concordou com os obtidos no teste de germinação nos diferentes períodos de armazenamento em câmara fria. Vale ressaltar que as condições da câmara fria permitiram a manutenção da viabilidade das sementes (Figura 3a), razão pela qual todas essas distâncias mostraram-se não significativas, sendo portanto o teste de emergência das plântulas em leito de areia semelhante ao teste de germinação.

O teste de condutividade elétrica e as determinações das atividades de lipoxigenases, fosfatase ácida e inibidor de tripsina e teor de lipídios não permitiram uma estimativa do potencial de armazenamento das sementes em nenhuma das duas condições de armazenamento. No entanto, para VIEIRA (1996), variações eletroforéticas na enzima fosfatase ácida pode ser um promissor indicador do estágio deteriorativo das sementes de algodão.

5. CONCLUSÕES

Os envelhecimentos natural e artificial acarretaram decréscimos na viabilidade, no vigor, nas atividades de lipoxigenase, fosfatase ácida e inibidor de tripsina e nos teores de lipídios das sementes.

Não foi possível determinar associação entre as alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas nas sementes em ambos os processos de envelhecimento. Para as sementes armazenadas em ambiente, maior similaridade entre os resultados de envelhecimento acelerado e natural ocorreu quando se avaliou a germinação a baixa temperatura e a atividade de fosfatase ácida.

Os testes de envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura, realizados antes do armazenamento, estimaram a viabilidade das sementes, respectivamente, após oito e dez meses de armazenamento em ambiente.

As determinações bioquímicas realizadas antes do armazenamento não permitiram prever o potencial de conservação das sementes do algodoeiro; no entanto, estas determinações foram eficientes para monitorar o processo de deterioração durante o armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A. & ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWISKI, T.T. (ed.). **Seed biology**: germination control, metabolism and pathology. New York: Academic Press, 1972. v.2, p.283-315.
- AGRAWAL, P.K. Seed deterioration during storage. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PHYSIOLOGY, New Delhi, p.15-20, 1988.
- ANDERSON, J.D. Metabolic changes associated with senescence. **Seed Science and Technology**, v.1, p. 401-416, 1973.
- ANDRADE, R.V., AZEVEDO, J.T., BORBA, C.S., OLIVEIRA, A.C. Testes de vigor em sementes de sorgo para predizer o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.16, p.102-106, 1994.
- AOYAMA, H., CAVAGIS, A.D.M., TAGA, E.M., FERREIRA, C.V. Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. **Phytochemistry**, v.58, p.221-225, 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing: 1983. 88p. (Handbook on seed testing. Contribution, 32).
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, v.71, p.441-451, 1981.

- BAILLY, C., BENAMAR, A., CORBINEAU, F., CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.104-110, 1996.
- 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**, v.19, p.279-286, 1991.
- BELTRÃO, N.E.M., SOUZA, J.G. Fisiologia do algodão herbáceo (sistemática, organografia e anatomia) In: **O agronegócio do algodão no Brasil**. BELTRÃO, N.E.M. (Ed.) Embrapa/algodão, 1999, v.1, p.55-86.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BEWLEY, J.D. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: McDONALD JR., M.B., NELSON, C.J. (Eds.) **Physiology of seed deterioration**. Madison, EUA: Crop Science Society of America, 1986. p.27-45
- BRANDÃO JR., D.S., CARVALHO, M.L.M., VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, p.114-121, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BUBECK, D.M., FERH, W.R., HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Science**, v.29, p.652-656, 1989.
- CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.)**. Piracicaba, 1990. 121p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- CHAUHAN, K.P.S., GOPINATHAN, M.C., BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, v.13, p.629-641, 1985.
- CHING, T.M. Biochemical aspects of seed vigor. **Seed Science and Technology**, v.1, p.73-88, 1973.
- CHING, T.M. Metabolism of germinating seed. In: KOZLOWSKI, T.T. (Ed.) **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v.2, p.103-218.

- COELHO, I.C.C. **Caracterização físico-química das lipoxigenases 1 e 2 da semente de soja**. Viçosa, MG, 1993. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- COPELAND, L.O., McDONALD JR., M.B. **Principles of seed science and technology**. New York: McMillan, 1985. 321p.
- DELOUCHE, J.C., BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v.1, p.427-452, 1973.
- DELOUCHE, J.C., MATTHES, R.K., DOUGHERTY, G.M., BOYD, A.H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed Science and Technology**, v.1, p.671-700, 1973.
- DIAS, A.C.P. **Atividade de lipoxigenases durante a germinação e qualidade fisiológica de sementes de soja**. Viçosa, MG, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa.
- DIAS, D.C.F.S., ALVARENGA, E.M. Teste de germinação a baixa temperatura. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999. Cap.7.
- DIAS, D.C.F.S., MARCOS FILHO, J. Testes de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares: I. Condutividade elétrica. **Informativo ABRATES**, v.5, p.26-36, 1995.
- DIAS, L.A.S., DIAS, D.C.F.S., BHERING, M.C., SILVA, D.J.H. Análise de medidas repetidas no teste de envelhecimento acelerado em sementes de feijão-de-vagem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42 e CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HORTICULTURA, 11, 2002, Uberlândia, MG. **Resumos... Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, 2002. p.307.
- DUFF, S.M.G., SARATH, G., PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum**, v.90, p.791-800, 1994.
- FREITAS, R.A., DIAS, D.C.F.S., CECOM, P.R., REIS, M.S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.94-101, 2000a.
- FREITAS, R.A., DIAS, D.C.F.S., CECOM, P.R., REIS, M.S. Storability of cotton seeds predicted by vigour tests. **Seed Science and Technology**, v.30, p.403-410, 2002.

- FREITAS, R.A., DIAS, D.C.F.S., REIS, M.S, CECOM, P.R. Correlação entre testes para avaliação da qualidade de sementes de algodão e a emergência das plântulas em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.97-103, 2000b.
- FREITAS, R.A. **Testes para avaliação da qualidade de sementes do algodoeiro e suas relações com o potencial de armazenamento e emergência das plântulas em campo**. Viçosa, MG, 1999. 76p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa.
- HALDER, S., GUPTA, K. Effect of storage sunflower seeds in high and low relative humidity on solute leaching and internal biochemical changes. **Seed Science and Technology**, v.8, p.317-321, 1980.
- HALMER, P., BEWLEY, J.D. A physiology perspective on seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v.12, p.561-575, 1984.
- HARMAN, G.E., MATTICK, L.R. Association of lipid oxidation with seed aging and death. **Nature**, v.260, p.323-324, 1976.
- HARRINGTON, J.F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, v.1, p.453-461, 1973.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, v.7, p.201-219, 1988.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.249-253, 1989.
- HOPE, H.J., MAAMARI, R. Measurement of maize cold tolerance during germination. **Seed Science and Technology**, v.22, p.69-77, 1994.
- HOPPER, N.W., HINTON, H. R. Electrical conductivity as a measure of planting seed quality in cotton. **Agronomy Journal**, v.79, p.147-152, 1987.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo. 1985, v.1, 533p.
- 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**, v.22, p.531-539, 1994.
- JHAM, G.N., TELES, F.F.F, CAMPOS, L.G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal American Oil Chemical Society**, v.59, p.132-133, 1982.

- KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., McGHEE, J.E., PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376-382, 1974.
- KALPANA, R., MADHAVA RAO, K.V. Lipid changes during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. **Seed Science and Technology**, v.24, p.475-483, 1996.
- KALPANA, R., MADHAVA RAO, K.V. Lowered lipoxygenase activity in seeds of pigeonpea *Cajanus cajan* L. Millsp. cultivars during accelerated ageing. **Seed Science and Technology**, v.21, p.269-272, 1993.
- KERBY, T.A., KEELEY, M., JOHNSON, S. Weather and seed quality variables to predict cotton seedling emergence. **Agronomy Journal**, v.81, p.415-419, 1989.
- KOOSTRA, P., HARRINGTON, J. Biochemical effects of age on membranal lipids of *Cucumis sativus* L. seed. **Proceedings International Seed Testing Association**, v.34, p.329-340, 1973.
- LAGO, A.A. Testes de armazenabilidade para sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.7, p.63-84, 1985.
- LAM, J.M., PWEE, K.H., SUN, W.Q., CHUA, Y.L., WANG, X.J. Enzyme-stabilizing activity of seed trypsin inhibitors during desiccation. **Plant Science**, v.142, p.209-218, 1999.
- LANNA, A.C., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and from a line devoid of seed lipoxygenases. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p.87-92, 1996.
- LAPOSTA, J.A., VIEIRA, M.G.G.C., CARVALHO, M.L.M. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9, 1995, Florianópolis, SC. **Resumos...** Brasília: ABRATES, 1995. p.132.
- LEONI, O., IORI, R., PALMIERI, S. Purification and properties of lipoxygenase in germinating sunflower seeds. **Journal of Food Science**, v.50, p.88-92, 1985.
- LIKHACHEV, B.S., ZELENSKY, G.V., KIASHKO, Y.G., SHEVCHENKO, Z.N. Modelling of seed ageing. **Seed Science and Technology**, v.12, p.385-393, 1984.
- LITTELL, R.C. Statistical analysis of experiments with repeated measurements. **HortScience**, v.24, p.37-40, 1989.
- LOISEAU, J., VU, B.L., MACHEREL, M.H., DEUNFF, Y.L. Seed lipoxygenases: occurrence and functions. **Seed Science Research**, v.11, p.199-211, 2001.

- MACHADO NETO, N.B., CUSTÓDIO, C.C., TAKAKI, M. Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Seed Science and Technology**, v.29, p.137-149, 2001.
- MACK, A.J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154, 1987.
- MAIA, F.C., MORAES, D.M., MORAES, R.C.P. Atividade total da fosfatase ácida e da α -amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.259-263, 2000.
- MAHALANOBIS, P.C. On the generalized distance in statistics. **Proceedings of National Institute of Science**, v.12, p.49-55, 1936.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999a. Cap.3.
- MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999b. Cap.1.
- McDONALD JR., M.B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of Association of Official Seed Analysts**. v.65, p.109-139, 1975.
- McDONALD JR., M.B., KAMALAY, J.C. Determination of protein composition following snap bean seed regeneration. **Seed Science and Technology**, v.18, p.755-763, 1990.
- McDONALD JR., M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v.27, p.177-237, 1999.
- McDONALD JR., M.B. Standardization of seed vigour tests. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 24, 1995, Copenhagen, Denmark. **Proceedings...** Zurich, CH-Switzerland: ISTA, 1995. p.88-97.
- MEDEIROS FILHO, S., FRAGA, A.C., QUEIROGA, V.P., SOUSA, L.C.F. Efeito do armazenamento sobre a qualidade fisiológica de sementes deslindadas de algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.20, p.284-292, 1996.
- OLIVEIRA, D.A. **Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenases e teor de ácido linolênico com a qualidade fisiológica de sementes de soja**. Viçosa: UFV, 2002. 100p. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Viçosa.

- ONIGBINDE, A.O., AKINYELE, I.O. Compositional and protein digestibility changes in maize (*Z. mays*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) after storage at ambient conditions. **Food Chemistry**, v.36, p.315-321, 1990.
- PÁDUA, G.P., VIEIRA, R.D., BARBOSA, J.C. Desempenho de sementes de algodão tratadas quimicamente e armazenadas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, p.212-219, 2002.
- PÁDUA, G.P., VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, p.255-262, 2001a.
- PÁDUA, G.P., VIEIRA, R.D. Deterioration of cottons seeds, with two vigour levels and chemically treated, after storage. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 26, 2001, Angers, France. **Abstracts...** Zurich, CH-Switzerland: ISTA, 2001b. p.51.
- PAOLINELLI, G.P., BRAGA, S.J. Alterações da qualidade de sementes de algodão armazenadas com dois níveis de vigor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10, 1997, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Brasília: ABRATES, 1997. p.168.
- PASIN, N.H., SANTOS FILHO, B.G., SANTOS, D.S.B., MELLO, V.D.C. Desempenho de sementes de feijão provenientes de plantas submetidas a déficit hídrico em dois estádios de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.183-192, 1991.
- PEARCE, R.S., ABDEL SAMAD, I.M. Changes in fatty acid content of polar lipids during ageing of seeds of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.31, p.1283-1290, 1980.
- PÉREZ, M.A. & ARGÜELLO, J.A. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. Florman) seeds under natural and accelerated aging. **Seed Science and Technology**, v. 23, p.439-445, 1995.
- PERL, M., LURIA, I., GELMOND, H. Biochemical changes in sorghum seeds affected by accelerated ageing. **Journal of Experimental Botany**, v.29, p.497-509, 1978.
- PIERGIOVANNI, A.R., GATTA, C.D., PERRINO, P. Effects of storage conditions on the trypsin inhibitor content in flour and whole seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.26, p.426-429, 1993.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.
- POWELL, A.A., HARMAN, G.E. Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. **Seed Science and Technology**, v. 13, p.659-667, 1985.

- PRIESTLEY, D.A., LEOPOLD, A.C. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. **Plant Physiology**, v.63, p.726-729, 1979.
- PRIESTLEY, D.A., LEOPOLD, A.C. Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p.467-470, 1983.
- RAJAGOPAL, A.S.M., SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, v.20, p.215-222, 1992.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, v.5, p.259-305, 1991.
- ROBERTS, E.H. Loss of viability, ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, v.1, p.529-545, 1973.
- ROBERTS, E.H. Physiology of ageing and its application to drying and storage. **Seed Science and Technology**, v.9, p.359-372, 1981.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.173-196, 1973.
- SAS Institute. **Statistical user's guide**, version 6, fourth edition, volume 2 Cary, NC: SAS Institute Inc, 1989. 846p.
- SENARATNA, T., GUSSE, J.F., McKERSIE, B.D. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean seed axes. **Physiologia Plantarum**, v.73, p.85-91, 1988.
- SMITH, C.W., VARVIL, J.J. Fungicide and temperature affect leachate-predicted germination of cotton. **Agronomy Journal**, v.77, p.9-12, 1985.
- SMITH, P.K., KRHON, R.I., HERMASON, G.T., MALLIA, A.K., GARDNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1985.
- SPINOLA, M.C.M., CÍCERO, S.M., MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v.57, p.263-270, 2000.
- STEWART, R.R., BEWLEY, J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiology**, v.65, p.245-248, 1980.
- SUNG, J.M., JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p.51-55, 1994.

- TOLLIVER, J., SAVOY, B.R., DRUMMOND, E.A. Cool germination test on cotton - variability between seed- testing laboratories. In: THE BELTWIDE COTTON CONFERENCES, 1997, Memphis, TN. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1997. p.442-443.
- TORRES, S.B. Comparação entre diferentes testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10, 1997, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Brasília: ABRATES, 1997. p.95.
- TRAWATHA, S.E., TEKRONY, D.M., HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop Science**, v.35, p.862-868, 1995.
- TREMACOLDI, C.R. **Inibidor de tripsina em *Eucalyptus urophylla* e seu efeito sobre o crescimento micelial in vitro de *Pisolithus tinctorius* e *Rhizoctonia solani*.** Piracicaba, 2001. 83p. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- VARIER, A., DADLANI, M. Effects of ageing on profiles of soluble protein of cotton and esterase isoenzymes of pearl millet seeds. **Indian Journal of Plant Physiology**. v.35, p.145-151, 1992.
- VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).** Lavras, 1996. 114p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.
- 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: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999. Cap.4.
- 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**, v.29, p.599-608, 2001.
- VENTER, A.V. Seed vigor testing. **Journal of New Seeds**, v.24, p.51-58, 2000.
- WANG, J., FUJIMOTO, K., MIYAZAWA, T., ENDO, Y., KITAMURA, K. Sensitivities of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. **Phytochemistry**, v.29, p.3739-3742, 1990.
- WILSON JR., D.O., McDONALD JR., M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, v.14, p.269-300, 1986.