



**CRISTIANE CARVALHO PEREIRA**

**SWEET CORN SEEDS TREATMENT AND DETERIORATION  
UNDER MODIFIED ATMOSPHERE**

**LAVRAS - MG  
2021**

**CRISTIANE CARVALHO PEREIRA**

**SWEET CORN SEEDS TREATMENT AND DETERIORATION  
UNDER MODIFIED ATMOSPHERE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Everson Reis Carvalho  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Cristiane Carvalho.

Sweet corn seeds treatment and deterioration under modified  
atmosphere / Cristiane Carvalho Pereira. - 2021.  
98 p.

Orientador(a): Everson Reis Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.  
Bibliografia.

1. Sementes. 2. Milho doce. 3. Armazenamento. I. Carvalho,  
Everson Reis. II. Título.

**CRISTIANE CARVALHO PEREIRA**

**TRATAMENTO DE SEMENTES E DETERIORAÇÃO DE MILHO DOCE EM  
ATMOSFERA MODIFICADA  
SWEET CORN SEEDS TREATMENT AND DETERIORATION UNDER MODIFIED  
ATMOSPHERE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 30 de agosto de 2021.  
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho UFLA  
Dra. Denise Cunha Fernandes Dias UFV  
Dra. Marcela Carlota Nery UFVJM  
Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho UFLA

Prof. Dr. Everson Reis Carvalho  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), em especial ao Setor de Sementes pela oportunidade concedida para realização desse trabalho.

Agradeço aos professores Maria Laene Moreira de Carvalho e Everson Reis Carvalho, pela orientação, pela paciência, amizade, dedicação e por todos os ensinamentos e conselhos durante todos esses anos.

A Wageningen University and Research, em especial ao Steven Groot e Jan Kodde, pela oportunidade de fazer o doutorado sanduíche, por todo ensinamento, amizade e pela inesquecível experiência de vida.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes, pelos conhecimentos transmitidos e disposição em colaborar sempre.

Aos estudantes do Setor de Sementes, que além de fundamental ajuda na execução dos experimentos, me trouxe amigos que nunca vou esquecer. Em especial ao Venícius, Ana Maria e Dayliane, que tornaram possível a realização deste trabalho, através de muita ajuda e dedicação.

Ao Laboratório de Patologia de Sementes do Setor de Fitopatologia, pelo auxílio com o desenvolvimento do experimento de sanidade das sementes.

À banca examinadora, pela avaliação deste trabalho.

À Seminis Sementes, na pessoa do Eng. Agrônomo, Paulo Felici, pelas sementes cedidas para a condução dos experimentos.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos funcionários do Departamento de Agricultura e do Setor de sementes, pela ajuda na execução das atividades.

À Marli, secretária da pós-graduação do Departamento de Agricultura, pela atenção e colaboração de sempre.

À minha família, em especial os meus pais Eunice e Dehon, minha irmã Gabrielle e meus avós (*in memoriam*), meu infinito agradecimento, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a seguir os caminhos do conhecimento, capaz de transformar as pessoas sempre para melhor, por acreditarem sempre em mim, pelas orações, ensinamentos e conselhos, pelo amor e atenção dedicados em todos os momentos.

A todos os meus amigos pela presença em todos os momentos de dificuldade, descontração, diversão e estudos.

Aos amigos do setor de sementes, companheiros de estudos, pesquisa e de muitos momentos de alegria.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Mas, principalmente à Deus, pela presença constante em minha vida, por proporcionar tantas oportunidades maravilhosas e por colocar em meu caminho pessoas incríveis.

## RESUMO

Sementes de milho doce possuem elevados teores de açúcares no endosperma, em detrimento do amido e essa característica faz com que as sementes apresentem uma maior susceptibilidade a pragas e doenças, baixa germinação e vigor. O tratamento de sementes é uma alternativa de suma importância para garantir o desenvolvimento das plântulas na fase inicial, evitando prejuízos causados por pragas e doenças e assim afetar positivamente o potencial produtivo de lavouras. Entretanto, alguns produtos podem provocar fitotoxidez quando aplicados de forma antecipada à sementeira, e esse efeito pode se agravar durante o armazenamento. Dentre os fatores que influenciam a qualidade fisiológica de sementes durante o armazenamento, a umidade relativa, a temperatura e a presença de oxigênio são consideradas fundamentais na sua conservação. Neste contexto, dois estudos foram realizados com o objetivo de investigar o efeito das condições de armazenamento na deterioração de sementes de milho doce. No primeiro estudo, sementes de milho doce foram submetidas ao tratamento de sementes com três diferentes misturas de fungicida e inseticidas, Metalaxil-M + Fludioxonil (M), Metalaxil-M + Fludioxonil + Clotianidina (MP) e Metalaxil-M + Fludioxonil + Clotianidina + Clorantniliprole (MPD), e armazenadas por um ano em câmara fria em embalagem de papel multifoliado e plástico à vácuo. A avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes foram feitas antes do início do armazenamento, aos quatro e doze meses, com os testes de germinação, de frio, envelhecimento acelerado, massa seca de hipocótilo, índice de velocidade de emergência, emergência de plântulas e sanidade. O uso de inseticidas como Clotianidina + Clorantniliprole, afeta negativamente o vigor de sementes de milho doce ao longo do armazenamento por um ano na temperatura de 10 °C. O tipo de embalagem e o tratamento com inseticidas Clotianidina + Clorantniliprole, associadas ao fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil, afetam a incidência fúngica em sementes de milho doce armazenadas. A embalagem a vácuo proporciona maior armazenabilidade e manutenção da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho doce durante o armazenamento em câmara fria, quando comparada à embalagem de papel multifoliado. No segundo estudo, sementes de milho doce e milho ceroso foram utilizadas para construir isotermas de sorção e dessorção e para avaliar o consumo de oxigênio, a produção de gás carbônico e etanol durante o armazenamento em embalagens herméticas. Além disso, sementes de milho doce foram armazenadas por dezoito meses em diferentes condições de umidade relativa (30, 45 e 60%), temperatura (20 °C e 30 °C) e concentrações de oxigênio (1, 5, 10, 21, 50 e 99%), e avaliadas quanto ao consumo de oxigênio, produção de gás carbônico e etanol e germinação após seis e dezoito meses de armazenamento. O armazenamento de sementes de milho doce e ceroso em condições de restrição de oxigênio com níveis de atividade da água acima de 0,7 provoca respiração anaeróbica e acelera os processos de deterioração das sementes. Sementes de milho doce se conservam mais quando armazenadas em condições de 30% de umidade relativa e teores de oxigênio de 1% a 10%, sob temperatura de 30 °C. No entanto, quando armazenadas sob temperatura de 20 °C, apenas a redução da umidade relativa para 30% ou 45% é suficiente para prolongar a armazenabilidade de sementes de milho doce.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L. Armazenamento. Anoxia. Umidade relativa. Armazenamento seguro.

## ABSTRACT

Sweet corn seeds have high sugar content in the endosperm, to the detriment of starch, this characteristic makes the seeds more susceptible to pests and diseases, and causes low germination and vigor. Seed treatment is an extremely important alternative to ensure the development of seedlings in the initial phase, avoiding damages caused by pests and diseases and, positively affecting the productive potential of the crop. However, some products can cause phytotoxicity when applied in advance of sowing, and this effect can worsen over the storage period. Among the factors that influence the physiological quality of seeds during storage, relative humidity, temperature and the presence of oxygen are considered fundamental factors for seed conservation. Oxygen-restricted conditions prolong seed longevity during storage, however, relative humidity and storage temperature in airtight conditions are important, since high temperatures and relative humidity can intensify respiration processes. In this context, two studies were carried out with the aim of investigating the effect of storage conditions on the deterioration of sweet corn seeds. In the first study, sweet corn seeds were subjected to seed treatment using three different mixtures of fungicide and insecticides, Metalaxil-M + Fludioxonil (M), Metalaxil-M + Fludioxonil + Clotianidina (MP) and Metalaxil-M + Fludioxonil + Clotianidina + Cloranthraniliprole (MPD), and stored for one year in a cold chamber with vacuum plastic and paper packaging. The evaluation of the physiological and sanitary quality of the seeds was carried out before the beginning of storage, at four and twelve months, through germination, cold test, accelerated aging, hypocotyl dry mass, emergence speed index, seedling emergence and seed health test. The use of insecticides such as Clotianidin + Chloranthraniliprole, negatively affects the vigor of sweet corn seeds during storage for one year at a temperature of 10 °C. The type of packaging and treatment with insecticides Clotianidin + Chloranthraniliprole, associated with the fungicide Metalaxyl-M + Fludioxonil, affect the fungal incidence of stored sweet corn seeds. Vacuum packaging provides greater longevity and maintenance of the physiological and sanitary quality of sweet corn seeds during storage in a cold chamber, when compared to paper packaging. In the second study, sweet corn and waxy corn seeds were used to construct sorption and desorption isotherms and to evaluate oxygen consumption, carbon dioxide and ethanol production during storage in airtight packaging. In addition, sweet corn seeds were stored for eighteen months under different conditions of relative humidity (30, 45 and 60%), temperature (20 and 30 °C) and oxygen concentrations (1, 5, 10, 21, 50 and 99%), and evaluated by measuring oxygen consumption, carbon dioxide and ethanol production and through the germination test after six and eighteen months of storage. The storage of sweet and waxy corn seeds under oxygen-restricted conditions with water activity levels above 0.7 causes anaerobic respiration and accelerates seed deterioration processes. Sweet corn seeds have a greater longevity when stored under conditions of 30% relative humidity and oxygen contents of 1% to 10%, at a temperature of 30 °C. However, when stored at a temperature of 20 °C, only a reduction in relative humidity to 30% or 45% is enough to prolong the longevity of sweet corn seeds.

**Keywords:** *Zea mays* L. Storage. Anoxia. Relative humidity. Seed safety.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1 - Porcentagem de germinação (%) e umidade (%) dos diferentes híbridos de milho doce antes do início do armazenamento.....37
- Tabela 2 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem de germinação, do teste de frio, da massa seca de hipocótilo (g) e do teste de emergência em sementes de milho doce, do híbrido A, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....38
- Tabela 3 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais da primeira contagem de germinação e do teste de frio, em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....39
- Tabela 4 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado, em sementes de milho doce, do híbrido A, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....39
- Tabela 5 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado, em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....40
- Tabela 6 - Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....41
- Tabela 7 - Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....41
- Tabela 8 - Incidência de *Penicillium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....41
- Tabela 9 - Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em

duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	42
Tabela 10 - Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....	42
Tabela 11 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem de germinação em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	44
Tabela 12 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem de germinação em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado e tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....	44
Tabela 13 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem de germinação em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	45
Tabela 14 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, e tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....	45
Tabela 15 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais no teste de frio em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	46
Tabela 16 - Médias provenientes da massa seca de hipocótilo (g), em sementes de milho doce, do híbrido B, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	46
Tabela 17 - Médias provenientes da massa seca de hipocótilo (g), em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....	47
Tabela 18 - Médias provenientes do índice de velocidade de emergência e do teste de emergência de sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....	47

Tabela 19 - Incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	48
Tabela 20 - Incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....	49
Tabela 21 - Incidência de <i>Penicillium</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....	49
Tabela 22 - Incidência de <i>Fusarium</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....	49
Tabela 23 - Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, em duas épocas de avaliação.....	50
Tabela 24 - Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.....	50
Tabela 25 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação, no teste de germinação e da massa seca de hipocótilo em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	51
Tabela 26 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação, e do teste de emergência em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	51
Tabela 27 - Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação, e no teste de germinação em sementes de milho doce, do híbrido C, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.....	52
Tabela 28 - Incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	53
Tabela 29 - Incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	53
Tabela 30 - Incidência de <i>Penicillium</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle)	

e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	54
Tabela 31 - Incidência de <i>Penicillium</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	54
Tabela 32 - Incidência de <i>Penicillium</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	55
Tabela 33 - Incidência de <i>Fusarium</i> sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.....	55
Tabela 34 - Incidência de outros fungos, em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	56
Tabela 35 - Incidência de outros fungos, em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	56

## CAPÍTULO 2

Table 1 - Germination (%) of sweet corn seeds after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature and relative humidity (%).....	81
Table 2 - Germination (%) of sweet corn seeds after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).....	81
Table 3 - Germination (%) of sweet corn seeds after eighteen months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).....	84
Table 4 - Germination (%) of sweet corn seeds after eighteen months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).....	84

## APÊNDICE

Tabela 1A - Resumo da análise de variância dos resultados da primeira contagem de germinação (PC), de germinação (G) e do envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho
--

doce do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	92
Tabela 2A - Resumo da análise de variância dos resultados do teste de frio (TF), massa seca do hipocótilo (MS), índice de velocidade de emergência (IVE) e de porcentagem de emergência (EM) de sementes de milho doce do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	92
Tabela 3A - Resumo da análise de variância dos resultados de incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (ASP), <i>Penicillium</i> sp. (PEN), <i>Fusarium</i> sp. (FUS) e de outros fungos (OUT) de sementes de milho doce do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	93
Tabela 4A - Resumo da análise de variância dos resultados da primeira contagem de germinação (PC), de germinação (G) e do envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho doce do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	93
Tabela 5A - Resumo da análise de variância dos resultados do teste de frio (TF), massa seca do hipocótilo (MS), índice de velocidade de emergência (IVE) e de porcentagem de emergência (EM) de sementes de milho doce do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	94
Tabela 6A - Resumo da análise de variância dos resultados de incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (ASP), <i>Penicillium</i> sp. (PEN), <i>Fusarium</i> sp. (FUS) e de outros fungos (OUT) de sementes de milho doce do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	94
Tabela 7A - Resumo da análise de variância dos resultados da primeira contagem de germinação (PC), de germinação (G) e do envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho doce do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....	95

Tabela 8A - Resumo da análise de variância dos resultados do teste de frio (TF), massa seca do hipocótilo (MS), índice de velocidade de emergência (IVE) e de porcentagem de emergência (EM) de sementes de milho doce do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....95

Tabela 9A - Resumo da análise de variância dos resultados de incidência de *Aspergillus* sp. (ASP), *Penicillium* sp. (PEN), *Fusarium* sp. (FUS) e de outros fungos (OUT) de sementes de milho doce do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.....96

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1 Características das sementes de milho doce</b> .....	17
<b>2.2 Tratamento de sementes</b> .....	18
<b>2.3 Deterioração e armazenamento de sementes tratadas</b> .....	21
<b>2.4 Restrição de oxigênio</b> .....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>CAPÍTULO 2 ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE MILHO DOCE APÓS O TRATAMENTO INDUSTRIAL COM INSETICIDAS</b> .....	31
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	32
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>2.1 Avaliações física, fisiológicas e bioquímicas das sementes</b> .....	35
<b>2.2 Análise estatística</b> .....	36
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>3.1 Híbrido A</b> .....	37
<b>3.2 Híbrido B</b> .....	44
<b>3.3 Híbrido C</b> .....	52
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
<b>CAPÍTULO 3 - OXYGEN EFFECT, RELATIVE HUMIDITY AND TEMPERATURE ON SWEET AND WAXY CORN SEEDS STORAGE</b> .....	66
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	67
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	68
<b>2.1 Experiment 1: Sweet and waxy corn seeds sorption and desorption isotherm</b> .....	68
<b>2.2 Experiment 2: Relationship between oxygen uptake, ethanol production and water activity for sweet and waxy corn seeds</b> .....	69
<b>2.3 Experiment 3: Evaluation of the effect of oxygen on sweet corn seeds storage</b> .....	71
<b>3. RESULTS</b> .....	72
<b>3.1 Experiment 1: Sweet and waxy corn seeds sorption and desorption isotherm</b> .....	72
<b>3.2 Experiment 2: Relationship between oxygen uptake, ethanol production and water activity for sweet and waxy corn seeds</b> .....	74
<b>3.3 Experiment 3: Evaluation of the effect of oxygen on sweet corn seeds storage</b> .....	80
<b>4. CONCLUSIONS</b> .....	90
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	90
<b>REFERENCES</b> .....	91
<b>APÊNDICE – Tabelas das Análises de Variância</b> .....	94

## CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

Sementes de milho doce diferem do milho comum, devido ao alto teor de açúcares solúveis e baixo teor de amido. Essa característica, muito explorada pela indústria de conservas e enlatados no Brasil, é causada pela ação de genes recessivos que alteram a composição química. Devido a essa diferença na sua composição, as sementes de milho doce apresentam menor germinação e longevidade quando comparadas ao milho comum (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

A alta concentração de açúcares em sementes de milho doce torna as sementes mais suscetíveis a insetos e patógenos presentes no solo, que prejudicam o desenvolvimento da cultura na fase inicial. O tratamento de sementes é uma importante ferramenta empregada no controle de pragas e patógenos e na manutenção da qualidade das sementes, aumentando as taxas de emergência de plântulas e consequentemente a produtividade da cultura.

Atualmente, o tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas tem grande adoção na agricultura, devido suas vantagens. O tratamento de sementes com inseticidas, dependendo da molécula, possui efeito sistêmico na planta, no qual o ingrediente ativo se desprende da semente e é absorvido pelas raízes da plântula de forma gradativa através da solução do solo. Entretanto, em função de diversos fatores, dentre essas moléculas, espécie e qualidade da semente, e condições de armazenamento, podem ocorrer efeitos fitotóxicos causados pelos produtos químicos. Os tratamentos com moléculas inseticidas tendem a afetar mais a germinação de sementes, em relação à fitotoxidez em relação aos fungicidas (ROCHA et al., 2020). Assim, pesquisas para amenizar esses possíveis efeitos são relevantes.

O armazenamento de sementes tem como objetivo a manutenção da qualidade fisiológica das sementes do momento da colheita à semeadura. Dentre os fatores que influenciam na qualidade fisiológica de sementes durante esse período estão o genótipo, os danos inerentes aos processos de pós-colheita, a presença de oxigênio, a umidade relativa e a temperatura do ambiente de armazenamento, além de ocorrência de pragas e doenças. Para reduzir a taxa de deterioração durante o armazenamento, condições de baixa temperatura e umidade relativa são geralmente empregadas (CARVALHO et al., 2014; ZHANG et al., 2021). No entanto, a presença de oxigênio (O<sub>2</sub>) também deve ser considerada um fator importante,

uma vez que acelera os processos de deterioração de sementes devido a oxidação causada pela ocorrência de espécies reativas de oxigênio (GROOT et al., 2015; WANG et al., 2015).

Embora o armazenamento sob condições de restrição de oxigênio seja associado à redução dos processos de deterioração das sementes em decorrência da redução dos processos oxidativos (GROOT et al., 2015; SCHWEMBER; BRADFORD, 2010), o ambiente hermético também pode desencadear os processos de respiração anaeróbica das sementes, quando as sementes são armazenadas sob condições de alta umidade relativa do ar e alta temperatura (MARCOS VALLE et al., 2021).

A respiração anaeróbica resulta do acúmulo de compostos fermentativos, como etanol e acetaldeído, que estão associados aos processos deteriorativos que ocorrem na semente durante o armazenamento. Em estudo realizado com sementes de milho foi observada redução na germinação e na massa seca de plântulas, e aumento na respiração, quando as sementes foram armazenadas com maiores teores de água (16 a 22%) em ambiente hermético por 75 dias (WEINBERG et al., 2008). Além disso, condições de alta umidade relativa podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, que também são responsáveis pela deterioração de sementes. Dessa forma, é imprescindível a determinação da umidade relativa ideal para o armazenamento de sementes de milho doce em ambiente ou embalagens herméticas.

Portanto, a análise e estudo dos diversos fatores envolvidos na conservação da qualidade de sementes é de suma importância, sobretudo quando envolvem sementes de milho doce, devido à maior sensibilidade e menor disponibilidade de informações científicas. Desta maneira, no presente trabalho, o objetivo foi estudar os efeitos do tratamento de sementes e da restrição de oxigênio no armazenamento de sementes de milho doce, e os efeitos do oxigênio, da umidade relativa e da temperatura na deterioração de sementes de milho doce e milho ceroso.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características das sementes de milho doce

O milho doce (*Zea mays* L. grupo saccharata) é considerado uma hortaliça de alto valor alimentar, destinada ao processamento industrial ou consumo in natura. É amplamente utilizado pela indústria brasileira para a produção de conservas processadas, embalagens congeladas na forma de espigas ou grãos, além de baby corn ou minimilho (LUZ et al., 2014). A sua comercialização é feita ao longo de todo o ano (TEIXEIRA et al., 2001), o que impõe ao mercado a necessidade da disponibilidade de sementes de alta qualidade que possibilitem a semeadura regular, independentemente da época.

As sementes de milho doce possuem alto teor de açúcares e baixo teor de amido, quando comparado ao milho comum, causado pela presença de genes recessivos mutantes individuais ou associados que afetam o desenvolvimento do endosperma (SILVA, 1994; TRACY, 2001). Cultivares com grãos de milho possuem apenas 3% de açúcares no grão, enquanto o milho doce possui em torno de 9 a 14 % de açúcares e o super doce possui de 15 a 25% de açúcares (TRACY, 2001). Os genes responsáveis por essa característica no milho doce são brittle1 (bt1), brittle2 (bt2), shrunken2 (sh2), sugary1 (su1), e sugary enhancer1 (se1), sendo que o milho doce tradicional carrega o su 1, enquanto o milho super doce carrega o sh2 ou bt2, sendo os dois últimos os mais utilizados em escala comercial (CREECH, 1965; PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016). O gene waxy1 (w1) também é utilizado no desenvolvimento de cultivares comerciais de milho-doce e é encontrado no milho ceroso, que possui grãos opacos e menor teor de sacarose em relação ao milho doce (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016; TRACY, 2001).

Devido à alta concentração de açúcares solúveis em detrimento do amido no endosperma, ocorre a formação de espaços internos entre a camada de aleurona e o pericarpo e a cristalização de açúcares no endosperma, durante o período de secagem (CHEN, 2014). Esses fatores conferem às sementes um aspecto enrugado, e conseqüentemente um pericarpo mais frágil, mais susceptível à danos e à entrada de patógenos (DOUGLASS; JUVIK; SPLITTSTOESSER, 1993), o que leva à deterioração mais rápida em relação às sementes convencionais de milho.

Segundo Azanza, Bar-Zur e Juvik (1996) além da composição química, algumas das diferenças em relação ao milho comum fazem com que as sementes de milho doce sejam consideradas como problemáticas, principalmente em relação à sua tolerância ao

armazenamento e ao baixo vigor, a ponto de ser tolerado um limite mínimo de 65% de germinação para comercialização de sementes certificadas, segundo a Instrução Normativa nº 45 (BRASIL, 2013).

As cultivares de milho comum e de milho doce que possuem os genes *bt* e *su1* possuem melhor germinação e vigor do que aquelas que possuem *sh2*, tanto em condições de laboratório, quanto em campo (STYER; CANTLIFFE; HANNAH, 1980). Os híbridos de milho super doce possuem alta qualidade industrial, no entanto, baixa qualidade fisiológica e o menor estabelecimento de plântulas no campo culminando com baixas produtividades e desuniformidade do tamanho das espigas e maturação (TRACY, 2001).

Também as sementes de milho doce geralmente são mais sujeitas aos danos causados pelos processos de colheita, beneficiamento e secagem do que o milho comum, devido à fragilidade do sistema de membranas e a composição e textura do endosperma (ARAÚJO et al., 2002). Os efeitos provocados por essas características não se limitam apenas à germinação logo após a colheita, mas também afetam a deterioração e armazenabilidade das sementes. Dessa forma, a escolha de condições de armazenamento que prolonguem a longevidade dessas sementes é de fundamental importância. Camargo e Carvalho (2008), ao estudarem o armazenamento de sementes de milho doce, observaram que o armazenamento em câmara refrigerada proporciona maior qualidade fisiológica das sementes quando comparado ao ambiente natural.

A alta concentração de açúcares solúveis em cultivares de milho super doce torna as sementes suscetíveis aos fungos e patógenos presentes no solo (STYER; CANTLIFFE, 1984). A aplicação de fungicidas e inseticidas por meio do tratamento de sementes pode auxiliar no controle de patógenos e na manutenção da qualidade das sementes, e aumento das taxas de emergência de plântulas. Todavia pesquisas e resultados com esse tipo de milho são mais restritas e escassas, em relação ao milho comum.

## **2.2 Tratamento de sementes**

O tratamento de sementes tem o potencial de melhorar a emergência e o crescimento de plântulas no solo devido à proteção para sementes e plântulas nas fases iniciais após a semeadura, onde as sementes estão suscetíveis ao ataque de ampla variedade de insetos e microrganismos patogênicos. Os insetos e microrganismos presentes no solo, ou mesmo na própria semente, podem reduzir o estabelecimento do estande, causar falhas na emergência de plântulas e conseqüentemente reduzir a produtividade da cultura. As pragas iniciais atacam as

sementes, raízes e plântulas do milho após a semeadura. Reduzem o número de plantas na área cultivada e o potencial produtivo da lavoura. Esses insetos são de hábito subterrâneo ou superficiais e a maioria das vezes passam despercebidos pelo agricultor, dificultando o emprego de medidas para o seu controle. As principais espécies que atacam a cultura do milho doce nos estágios iniciais são a lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), larva-da-vaquinha (*Diabrotica speciosa* e *D. viridula*), bichobolo ou coró (*Eutheola humilis*, *Dyscinetus dubius*, *Stenocrates* sp. *Lyogenis* sp.), percevejo-castanho (*Scaptocoris castânea* e *Atarsocoris brachiariae*) e a larva-aramé (*Conoderus* spp., *Melatonus* spp.) (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Desta forma, o tratamento de sementes com inseticidas é um procedimento muito importante da produção de sementes, uma vez que proporciona proteção contra o ataque de insetos nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas. Smiderle e Cicero (1999) ao estudar o efeito do tratamento com inseticidas no armazenamento de sementes de milho observaram que os produtos aplicados possibilitaram a manutenção da qualidade fisiológica e o controle de insetos-praga ao longo de um período de 12 meses de armazenamento, enquanto a testemunha, sem inseticidas, não poderia ser comercializada com dois meses de armazenamento, uma vez que houve níveis de infestação por insetos acima do permitido. O êxito do plantio depende de sementes de alta qualidade e o uso de inseticidas pode auxiliar na prevenção de futuras perdas provocadas por diversas pragas que podem afetar o desenvolvimento da cultura nos estágios iniciais.

A ação dos produtos fitossanitários pode ser classificada como de contato ou sistêmica. Produtos que atuam por contato agem apenas no contato direto do ingrediente ativo com o alvo, e são absorvidos pela quitina e exoesqueleto do inseto, ou pelas vias respiratórias (CORRÊA; SALGADO, 2011), não sendo absorvidos pela plântula. Produtos com ação sistêmica são rapidamente absorvidos pelas raízes da plântula e pelos tecidos, garantindo proteção no início do crescimento da planta (SANCHEZ-BAYO; A.; GOK, 2013).

São várias as moléculas empregadas no tratamento de sementes de milho, dentre elas, o Clorantraniliprole, Ciantraniliprole e Clotianidina. São utilizadas principalmente no tratamento industrial de sementes (TSI). O Clorantraniliprole e o Ciantraniliprole pertencem à classe inseticida das Diamidas antranílicas, ambos são moléculas de ação sistêmica, mas o Ciantraniliprole também possui ação de contato. Os inseticidas Diamidas causam no organismo dos insetos a perda da habilidade de regular Cálcio, que resulta em letargia, interrupção na alimentação e conseqüentemente morte dos insetos (TEIXEIRA; ANDALORO, 2013). O leque de ação das Diamidas é amplo e sua ação apresenta uma alta eficácia, o Clorantraniliprole atua

no controle da mosca-branca, minador das folhas, besouro, cupim, além de lepidópetos. O Ciantranilprole tem ação sob espécies de Lepidopteras, Homopteras, Coleopteras, Dipteras e Thysanopteras (TEIXEIRA; ANDALORO, 2013).

A Clotianidina pertence à classe dos inseticidas Neonicotinóides, e possui ação sistêmica, através da ingestão da planta ou raiz pelos insetos. Os Neonicotinóides são amplamente utilizados no manejo de pragas importantes, que causam prejuízos à produtividade, podendo ser aplicados via foliar, adição no solo ou tratamento de sementes (BLACQUIÈRE et al., 2012).

Entretanto, em função de diversos fatores, dentre estes tipos de moléculas, espécie e qualidade da semente, e armazenamento, podem ocorrer efeitos fitotóxicos causado pelos produtos químicos. Os tratamentos com moléculas inseticidas tendem a afetar a germinação de sementes, com maior fitotoxidez em relação aos fungicidas (ROCHA et al., 2020). Ao estudar a fitotoxicidade causada pelo tratamento de sementes em sementes de soja, Carvalho et al. (2020) concluíram que a antecipação do tratamento de sementes na cultura da soja causou danos no início do desenvolvimento das plantas, mas não prejudicou a produtividade final.

Em diversos trabalhos foram estudados os efeitos do tratamento de sementes com inseticidas em sementes de milho comum, foi observado que existe variação do efeito em função do genótipo. Tamindzic et al. (2013), ao comparar o uso de Maxim XL® (Fludioxonil + Metalaxyl-M) em combinação com diferentes inseticidas (Poncho® (Clotianidina), Gaucho® (Imidacloprido), Cruiser® (Tiametoxam), Force Zea® (Tefluthrin + Tiametoxam) e Cosmos® (Fipronil) em quatro linhagens de milho observou que o efeito das preparações aplicadas na qualidade das sementes depende do genótipo, e melhor germinação quando o Maxim foi utilizado em combinação com outros produtos. O mesmo foi observado por outros autores ao testar diferentes inseticidas em diferentes híbridos de milho (BITTENCOURT et al., 2000; TONIN et al., 2014; ROSA et al., 2012). De forma contrária, Espindola et al. (2018) encontraram melhor germinação e vigor em sementes não tratadas de milho quando comparado com diversos inseticidas.

O tratamento de sementes pode também, em alguns casos, reduzir os riscos de perda da qualidade fisiológica de sementes durante o armazenamento, dependendo do produto utilizado (DEUNER et al., 2014; TONIN et al., 2014). No entanto, Oliveira et al. (2020) observaram que apesar de ser eficiente no controle de microrganismos durante o armazenamento, o tratamento de sementes com Poncho® (Clotianidina), Cruiser® (Thiamethoxam) e Shelter® (Fipronil) causou redução na qualidade fisiológica de sementes híbridas de milho após nove meses de armazenamento. Da mesma forma, Mariucci et al. (2018) concluíram que o vigor de sementes

de milho híbrido foi reduzido pelos tipos de tratamentos estudados, no entanto a intensidade da redução depende do tipo de produto utilizado e do período de armazenamento das sementes. Os autores utilizaram Maxim XL® (Fludioxonil + Metalaxyl-M) e Cruiser® (Thiamethoxam) em combinação com diferentes inoculantes, micronutrientes e bioreguladores e observaram que o fungicida e inseticida avaliados mantiveram o vigor, germinação e emergência de plântulas aceitáveis durante 90 dias de armazenamento.

Em poucos trabalhos foi avaliado o efeito da aplicação de inseticidas no tratamento de sementes de milho doce. Kuhar et al. (2002) observaram que o efeito fitotóxico do tratamento de sementes em plântulas de milho doce depende da qualidade fisiológica do lote de sementes, uma vez que sementes com alto vigor são mais tolerantes ao tratamento. Sementes com baixo vigor podem ser drasticamente afetadas pelo uso de inseticidas no tratamento de sementes, podendo apresentar redução do estande. Além disso, o efeito fitotóxico de produtos químicos em sementes varia com o genótipo e com o tipo de produto utilizado. Oliveira (2016) não encontrou diferenças no teste de germinação quando comparou o uso de Maxim Advanced® (Metalaxil-M, Tiabendazol e Fludioxonil), Cruiser® (Tiametoxam) e Poncho® (Clotianidina) no tratamento industrial em quatro lotes de sementes de milho doce. No entanto, em sementes de um dos lotes tratados com Poncho® e Cruiser® foi observado desempenho inferior de emergência em campo.

O desenvolvimento de produtos para o tratamento de sementes, principalmente aqueles que possuem efeito sistêmico é importante para o controle de uma ampla variedade de insetos praga, sobretudo sugadores. Além disso, a aplicação de produtos químicos via tratamento de sementes resulta em menos exposição dos produtos ao ser humano e ao meio ambiente. No entanto, existe variação da resposta à aplicação de inseticidas entre diferentes espécies e híbridos/variedades, o que pode justificar as controvérsias encontradas na literatura quanto ao efeito dos inseticidas na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho. Assim, se faz necessário o estudo dos efeitos provocados pelo tratamento de sementes na qualidade fisiológica e sanitária para diferentes genótipos de milho, principalmente doce.

### **2.3 Deterioração e armazenamento de sementes tratadas**

A deterioração das sementes é um processo inevitável e irreversível que afeta as características físicas, químicas, fisiológicas e sanitárias das sementes. As alterações causadas pela deterioração são em níveis tanto bioquímico como citológico, físico e fisiológico, com início na maturidade fisiológica provocando uma inativação progressiva do metabolismo,

causando assim a redução da qualidade e culminando com a morte da semente (MARCOS FILHO, 2005). Manifestações de deterioração são associadas ao armazenamento, mas tem início na maturidade fisiológica e podem ser aceleradas nas etapas pós-maturidade.

A perda da viabilidade das sementes está associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) e peroxidação de lipídeos (ARAUJO et al., 2012; BERJAK et al., 2011). As EROS são formas reduzidas do oxigênio atmosférico que causam a oxidação de vários componentes celulares, podendo levar a morte da célula (DAT et al., 2000).

A peroxidação de lipídeos de membranas ou de organelas intracelulares é um indicativo de estresse oxidativo, que ocorre devido a interação da EROS com ácidos graxos insaturados (SCANDALIOS, 1993). Os danos causados às membranas celulares pela peroxidação dos lipídeos causam mudanças metabólicas, desorganização da membrana e perda do material intracelular (BEWLEY, J. D.; BLACK, 1994; BEWLEY et al., 2013), podendo levar à deterioração e conseqüentemente à morte da célula.

Vários fatores influenciam na qualidade fisiológica de sementes, antes e após o armazenamento, como o genótipo, os danos inerentes aos processos de pós-colheita, a presença de oxigênio, a umidade relativa e a temperatura do ambiente de armazenamento, além de ataques de pragas e doenças. A temperatura, a umidade relativa e o tipo de embalagem, geralmente são os fatores citados como os mais importantes, que são determinantes na taxa de deterioração das sementes e, por conseguinte, na manutenção da qualidade fisiológica (ANTONELLO et al., 2009). A umidade relativa do ar e a temperatura podem ser manipulados pelo armazenamento em ambiente com umidade e temperatura controladas por equipamentos.

A temperatura é um dos principais fatores que interferem no armazenamento de sementes (ROBERTS, 1972; WALTERS; WHEELER; STANWOOD, 2004). Assim, tecnologias que possibilitam o resfriamento do ambiente vem sendo cada vez mais utilizadas, com o objetivo de prolongar a qualidade fisiológica das sementes (CAMARGO; CARVALHO, 2008; CARVALHO et al., 2014). Em sementes de milho doce armazenadas em câmara refrigerada a 10 °C e 50% U.R. houve maior conservação da qualidade fisiológica quando comparadas ao ambiente natural (CAMARGO; CARVALHO, 2008). Ao estudar o armazenamento de sementes de milho em temperaturas de 5, 15, 25 e 35 °C, Paraginski et al. (2015) observaram que acima de 15 °C ocorrem redução na germinação e aumento na condutividade elétrica, devido ao aumento dos processos metabólicos.

O armazenamento em ambiente resfriado é uma técnica que permite a conservação da qualidade fisiológica de sementes de milho por longos períodos de tempo, mas o tipo de embalagem utilizada influencia a intensidade do efeito do resfriamento (CARVALHO; SILVA,

1994). Camargo e Carvalho (2008) observaram que ao armazenar sementes de milho doce em ambiente resfriado, a embalagem de papel foi mais eficiente na manutenção da qualidade fisiológica das sementes. No entanto, ao armazenar as sementes em ambiente natural, em embalagem plástica a vácuo houve melhores resultados após o armazenamento por 18 meses.

Outro fator que tem grande importância na conservação das sementes ao longo do armazenamento é a umidade relativa do ar. Bilia et al. (1994) observaram que ao controlar a umidade relativa do ar e a temperatura do ambiente de armazenamento de sementes de milho híbrido foi possível prolongar a conservação das sementes. No entanto, os autores observaram que a umidade relativa possui maior efeito, uma vez que no armazenamento em câmara seca foram observados resultados superiores aos observados em câmara fria. A umidade relativa também tem grande importância no armazenamento de sementes em ambiente com restrição de oxigênio, uma vez que armazenadas em condições de alta umidade relativa em embalagens herméticas a respiração acontece rapidamente e conseqüentemente ocorre a deterioração das sementes (ZHANG et al., 1995). Weinberg et al. (2008) também observaram aumento na respiração de sementes de milho armazenadas em embalagens herméticas com o aumento da umidade relativa, além de redução na germinação e na massa seca dos grãos.

O tratamento de sementes tem como objetivo prevenir possíveis danos causados por pragas e insetos, tanto durante o armazenamento, quanto nos estágios iniciais de desenvolvimento da plântula. Entretanto, em alguns estudos têm sido mostrado possível influência negativa do tratamento na qualidade fisiológica de sementes, devido a fitointoxicação de plântulas durante o armazenamento. Fessel et al. (2003) ao avaliarem combinações de inseticidas e fungicidas na conservação de sementes de milho também observaram redução na germinação e vigor das sementes provocados pelo uso dos produtos químicos. Lorenzetti et al. (2014) observaram variação entre os inseticidas testados, Cropstar® (Imidacloprido + Tiodicarbe), Cruiser® (Thiametoxan) e Standak® (Fipronil), no vigor de sementes de milho durante o armazenamento, e os autores concluíram que o tratamento de sementes de milho com inseticidas deve ser realizado próximo à época de semeadura, uma vez que no início do armazenamento os inseticidas avaliados não causaram redução na germinação e vigor. Em outros trabalhos foi evidenciado que ao longo do período de armazenamento ocorre aumento do efeito do tratamento químico causando redução no vigor de sementes de milho (BITTENCOURT et al., 2000; FESSEL et al., 2003; ROSA, 2012; TONIN et al., 2014).

O objetivo do armazenamento é manter a qualidade de sementes do momento da colheita até a semeadura, reduzindo os danos causados pelo processo de deterioração, por isso é

essencial o estudo e identificação das melhores condições ambientes que possibilitem a conservação das sementes por um período prolongado para cada espécie e/ou mesmo cultivar.

## **2.4 Restrição de oxigênio**

Em alguns estudos têm sido observados efeitos positivo ou neutro quando ao uso de condições de impermeabilidade ao oxigênio na conservação de sementes (BARZALI et al., 2005; BENNICI et al., 1984; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2011; ROBERTS; ABDALLA, 1968; SHEJBAL, 1979; SHRESTHA; SHEPERD; TURNBULL, 1985). Groot et al. (2015) enfatizaram que condições de ambiente secas combinadas com a restrição de oxigênio são essenciais para o prolongamento do armazenamento de sementes de aipo. Schwember e Bradford (2010) ao avaliarem o armazenamento de sementes de alface, observaram maior longevidade das sementes no armazenamento sob condição de falta de oxigênio, sob umidade relativa do ar de 33%.

Em alguns estudos foi avaliada a eficiência do armazenamento a vácuo para sementes de milho doce. Camargo e Carvalho (2008) ao estudarem o uso de diferentes tipos de embalagens em duas temperaturas de armazenamento de sementes de milho doce, verificaram que o armazenamento em câmara refrigerada a 10°C em embalagem de papel, foi o método mais eficiente para a manutenção da qualidade das sementes por 18 meses. No entanto, em condições de ambiente natural, o armazenamento a vácuo em embalagem plástica foi o que proporcionou melhores resultados da manutenção da qualidade fisiológica pelo mesmo período. No entanto, Rivera et al. (2011) não observaram diferenças na qualidade fisiológica das sementes armazenadas em embalagens permeáveis ou impermeáveis no armazenamento de sementes de milho doce, independentemente das condições de armazenamento.

Levando em consideração que o armazenamento de sementes sob nenhum ou baixos níveis de oxigênio pode prolongar a longevidade das sementes, Groot et al. (2012) avaliaram o armazenamento de sementes de cevada, repolho, alface e soja sob condições de pressão parcial elevada de oxigênio (EPPO) e concluíram tais condições podem ser uma alternativa para o estudo da deterioração de sementes, em diferentes níveis de umidade relativa e temperatura.

O armazenamento em condições de restrição de oxigênio tem como vantagem a preservação das sementes e o controle de insetos e pragas do armazenamento, reduzindo a atividade microbiana. Embora o armazenamento em ambiente hermético possa prolongar a longevidade de sementes por meio da redução de processos oxidativos (GROOT et al., 2015), também pode ocorrer mais respiração das sementes.

A respiração das sementes está relacionada com vários efeitos negativos na qualidade fisiológica das sementes. Zhang et al. (1995) observaram que a deterioração de sementes de soja armazenadas em condições de alta umidade relativa foi causada pela respiração. Além disso, a taxa de respiração pode aumentar devido ao início da atividade metabólica no embrião e a ativação de microrganismos facultativos, em condições de alta umidade relativa e alta temperatura (MARCOS VALLE et al., 2021).

A respiração pode ocorrer quando o grau de umidade das sementes ou a temperatura do ambiente aumenta (RAUDIENÉ et al., 2017). O ambiente de armazenamento das sementes precisa ser controlado de forma que os processos biológicos que acontecem em sementes, sejam benéficos ou não afetem a sua qualidade. Inferir sobre qual o teor de água crítico para o armazenamento de sementes em ambiente hermético é importante, para evitar os processos de respiração, o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e consequentemente a deterioração das sementes.

## REFERÊNCIAS

- ANTONELLO, L. M. et al. Maize seed quality after storage in different packages. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 7, p. 2191–2194, 2009.
- ARAUJO, A. C. F. B. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Journal of Experimental Botany**, v. 76, n. 1, p. 695–709, 2012.
- ARAÚJO, E. F. et al. QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO-DOCE SUBMETIDAS À DEBULHA, COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE | ARAÚJO | Revista Brasileira de Milho e Sorgo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 101–110, 2002.
- AZANZA, F.; BAR-ZUR, A.; JUVIK, J. A. Variation in sweet corn kernel characteristics associated with stand establishment and eating quality. **Euphytica**, v. 87, n. 1, p. 7–18, 1 jan. 1996.
- BARZALI, M. et al. Effects of different temperatures and atmospheres on seed and seedling traits in a long-term storage experiment on rye (*Secale cereale* L.). **Seed Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 713–721, 2005.
- BENNICI, A. et al. Ageing in *Triticum durum* wheat seeds: Early storage in carbon dioxide prolongs longevity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 24, n. 2, p. 159–165, 1 jan. 1984.
- BERJAK, P. et al. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, 2011.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 3. ed. New York, 1994.
- BEWLEY, J. D. et al. Longevity, Storage, and Deterioration. In: **Seeds**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 341–376.
- BILIA, D. A. C. et al. Comportamento de sementes de milho híbrido durante o armazenamento sob condições variáveis de temperatura e umidade relativa do ar. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 1, p. 153–157, abr. 1994.
- BITTENCOURT, S. R. M. et al. Desempenho de sementes de milho tratadas com inseticidas sistêmicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 86–93, 30 dez. 2000.
- BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology** 2012 21:4, v. 21, n. 4, p. 973–992, 18 fev. 2012.
- BRASIL. **Instrução Normativa Nº 45, de 17 de setembro de 2013**, 2013. Disponível em: <<https://apps.agr.br/instrucao-normativa-no-45-de-17-de-setembro-de-2013/>>. Acesso em: 17 fev. 2021

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

CARVALHO, M. L. M. DE; SILVA, W. R. DA. Refrigeração e qualidade de sementes de milho armazenadas em pilhas com diferentes embalagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 1319–1332, 1 set. 1994.

CARVALHO, E. R. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 12, p. 967–976, 2014.

CARVALHO, E. R. et al. Phytotoxicity in soybean seeds treated with phytosanitary products at different application times. **Journal of Seed Science**, v. 42, p. 1–12, 7 dez. 2020.

CHEN, L.-Q. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. **New Phytologist**, v. 201, n. 4, p. 1150–1155, 1 mar. 2014.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.

CREECH, R. G. Genetic Control of Carbohydrate Synthesis in Maize Endosperm. **Genetics**, v. 52, p. 1175–1186, 1965.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 5, p. 779–795, 2000.

DEUNER, C. et al. Physiological performance during storage of corn seed treated with insecticides and fungicide. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 204–212, 2014.

DOUGLASS, S. K.; JUVIK, J. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. Sweet corn seedling emergence and variation in kernel carbohydrate reserves. **Seed Science and Technology**, v. 21, n. 2, p. 433–436, 1993.

ESPINDOLA, F. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas com diferentes inseticidas. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 26, n. 4, p. 306–312, 31 ago. 2018.

FESSEL, S. A. et al. Efeito do tratamento químico sobre a conservação de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 25–28, jul. 2003.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E. et al. Effect of the gaseous environment and water content on seed viability of four Brassicaceae species after 36 years storage. **Seed Science and Technology**, 2011.

GROOT, S. P. C. et al. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. **Annals of Botany**, v. 110, n. 6, p. 1149–1159, 1 nov. 2012.

GROOT, S. P. C. et al. Prolonging the longevity of ex situ conserved seeds by storage under anoxia. **Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation**, v. 13, n. 1, p. 18–26, 2015.

KUHAR, T. P. et al. Control of corn flea beetle and Stewart's wilt in sweet corn with imidacloprid and thiamethoxam seed treatments. **Crop Protection**, v. 21, n. 1, p. 25–31, 1 fev. 2002.

LORENZETTI, E. R. et al. Influência de inseticidas sobre a germinação e vigor de sementes de milho após o armazenamento. **Cultivando o Saber**, v. 7, n. 1, p. 14–23, 2014.

LUZ, J. M. Q. et al. Produtividade de genótipos de milho doce e milho verde em função de intervalos de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 163–167, 2014.

MARCOS FILHO, J. M. F. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MARCOS VALLE, F. J. et al. Study and modelling the respiration of corn seeds (*Zea mays* L.) during hermetic storage. **Biosystems Engineering**, v. 208, p. 45–57, 1 ago. 2021.

MARIUCCI, G. E. G. et al. Physiological potential of maize seeds submitted to different treatments and storage periods. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 1, p. 60–66, 1 jan. 2018.

OLIVEIRA, T. L. DE et al. Biochemical changes and physiological quality of corn seeds subjected to different chemical treatments and storage times. **Journal of Seed Science**, v. 42, 7 dez. 2020.

OLIVEIRA, V. R. DE. **Tratamento industrial de sementes: quantificação do ingrediente ativo em lotes de milho doce**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 15 jun. 2016.

PARAGINSKI, R. T. et al. Qualidade de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 358–363, 2015.

PEREIRA FILHO, I. A.; TEIXEIRA, F. F. **O cultivo do milho doce**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2016.

RAUDIENĖ, E. et al. Carbon dioxide respiration rates in wheat at various temperatures and moisture contents. **Mapan - Journal of Metrology Society of India**, 2017.

RIVERA, A. A. C. et al. Efeito do ácido giberélico na qualidade fisiológica de sementes redondas de milho doce, sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 3, p. 247–256, 2011.

ROBERTS, E. H. Storage Environment and the Control of Viability. In: **Viability of Seeds**. 1972.

ROBERTS, E. H.; ABDALLA, F. H. The Influence of Temperature, Moisture, and Oxygen on Period of Seed Viability in Barley, Broad Beans, and Peas. **Annals of Botany**, v. 32, n. 1, p. 97–117, 1 jan. 1968.

ROCHA, D. K. et al. Does the substrate affect the germination of soybean seeds treated with phytosanitary products? **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, p. 2020, 11 maio 2020.

ROSA, K. C. **Armazenamento de sementes de milho híbrido tratadas com tiametoxam**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2012.

SANCHEZ-BAYO, F.; A., H.; GOK, K. Impact of Systemic Insecticides on Organisms and Ecosystems. **Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies**, 30 jan. 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4423–4436, 1 out. 2010.

SHEJBAL, J. Preservation of cereal grains in nitrogen atmospheres. **Resource Recovery and Conservation**, v. 4, n. 1, p. 13–29, 1 maio 1979.

SHRESTHA, K. B.; SHEPERD, K. R.; TURNBULL, J. W. S. Controlled atmosphere storage for *Pinus radiata* seed. **The Commonwealth Forestry Review**, v. 64, n. 2, p. 141–150, jun. 1985.

SILVA, N. **Melhoramento de milho doce**. ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO. **Anais...**Piracicaba: ESALQ, 1994Disponível em: <[https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=SILVA%2C+N.+Melhoramento+de+milho+doce.&btnG=>](https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=SILVA%2C+N.+Melhoramento+de+milho+doce.&btnG=>)>. Acesso em: 9 abr. 2020

SMIDERLE, O. J.; CICERO, S. M. Tratamento inseticida e qualidade de sementes de milho durante o armazenamento. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1245–1254, 1999.

STYER, R. C.; CANTLIFFE, D. J. Dependence of Seed Vigor during Germination on Carbohydrate Source in Endosperm Mutants of Maize. **Plant Physiology**, v. 76, n. 1, p. 196, 1984.

STYER, R. C.; CANTLIFFE, D. J.; HANNAH, L. C. Differential seed and seedling vigor in shrunken-2 compared to three other genotypes of corn at various stages of development. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 105, n. 3, p. 329–332, maio 1980.

TAMINDZIC, G. et al. Effect of seed treatments with neonicotinoids on maize inbred lines seed quality. **Ratarstvo i povrtarstvo**, v. 50, n. 3, p. 37–44, 2013.

TEIXEIRA, F. F. et al. Avaliação da capacidade de combinação entre linhagens de milho doce. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 483–488, 2001.

TEIXEIRA, L. A.; ANDALORO, J. T. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 76–78, 1 jul. 2013.

TONIN, R. F. B. et al. Potencial fisiológico de sementes de milho híbrido tratadas com inseticidas e armazenadas em duas condições de ambiente. **Scientia Agropecuaria**, v. 5, n. 1, p. 7–16, 30 mar. 2014.

TRACY, W. F. Sweet corn. In: HALLAUER, A. R. (Ed.). . **Specialty corns**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 155–198.

WALTERS, C.; WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**, v. 48, n. 3, p. 229–244, 1 jun. 2004.

WANG, Y. et al. Reactive oxygen species-provoked mitochondria-dependent cell death during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. **The Plant Journal**, v. 81, n. 3, p. 438–452, 1 fev. 2015.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of moisture level on high-moisture maize (*Zea mays* L.) under hermetic storage conditions—in vitro studies. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 2, p. 136–144, 1 jan. 2008.

ZHANG, K. et al. Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 475–485, 1 jan. 2021.

ZHANG, M. et al. Aging of Soybean Seeds in Relation to Metabolism at Different Relative Humidities. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 7, p. 1189–1195, 1 out. 1995.

## **CAPÍTULO 2 ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE MILHO DOCE APÓS O TRATAMENTO INDUSTRIAL COM INSETICIDAS**

### **RESUMO**

Sementes de milho doce possuem elevados teores de açúcares no endosperma, em detrimento do amido e essa característica faz com que as sementes apresentem uma maior susceptibilidade a pragas e doenças, baixa germinação e vigor. O tratamento de sementes é uma alternativa de suma importância para garantir o desenvolvimento das plântulas na fase inicial, evitando prejuízos causados por pragas e doenças e assim afetar positivamente o potencial produtivo de lavouras. Entretanto, alguns produtos podem provocar fitotoxidez quando aplicados de forma antecipada à semeadura, e esse efeito pode se agravar durante o armazenamento. Neste contexto, o objetivo com este trabalho foi investigar o efeito das condições de armazenamento na deterioração de sementes de milho doce. Sementes de milho doce foram submetidas ao tratamento de sementes com três diferentes misturas de fungicida e inseticidas, Metalaxil-M + Fludioxonil (M), Metalaxil-M + Fludioxonil + Clotianidina (MP) e Metalaxil-M + Fludioxonil + Clotianidina + Clorantraniliprole (MPD), e armazenadas por um ano em câmara fria em embalagem de papel multifoliado e plástico à vácuo. A avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes foram feitas antes do início do armazenamento, aos quatro e doze meses, com os testes de germinação, de frio, envelhecimento acelerado, massa seca de hipocótilo, índice de velocidade de emergência, emergência de plântulas e sanidade. O uso de inseticidas como Clotianidina + Clorantraniliprole, afeta negativamente o vigor de sementes de milho doce ao longo do armazenamento por um ano na temperatura de 10 °C. O tipo de embalagem e o tratamento com inseticidas Clotianidina + Clorantraniliprole, associadas ao fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil, afetam a incidência fúngica em sementes de milho doce armazenadas. A embalagem a vácuo proporciona maior armazenabilidade e manutenção da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho doce durante o armazenamento em câmara fria, quando comparada à embalagem de papel multifoliado.

## 1 INTRODUÇÃO

Sementes de milho doce (*Zea mays* L. grupo saccharata) possuem alto teor de açúcares solúveis e baixo teor de amido. Durante a fase de enchimento dos grãos de milho, normalmente, os açúcares são convertidos em amido, mas o milho doce possui genes recessivos mutantes que são responsáveis pelo acúmulo de açúcar solúveis em detrimento do amido. Os genes mais conhecidos e utilizados em programas de melhoramento para essa característica são brittle-1 (bt), brittle-2 (bt2), shrunken-2 (sh) e sugary-1 (su1) (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016; TRACY, 2001).

O fato de o milho doce possuir endosperma e embrião pequenos aliado a alta concentração de açúcares solúveis no endosperma, resultam em sementes de baixa qualidade, o que leva a uma rápida deterioração quando armazenadas por um longo período e fazem com que o milho seja muito susceptível a patógenos do solo (STYER; CANTLIFFE, 1984). Além disso, as pragas do solo e do desenvolvimento inicial das plantas têm grande contribuição na redução das perdas na lavoura, uma vez que danificam sementes e plântulas, e são favorecidas pelo tipo de manejo utilizado na cultura, caracterizado pela produção durante todo o ano e uso frequente de irrigação (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

A utilização de sementes de alta qualidade aliada à aplicação de fungicidas e inseticidas por meio do tratamento industrial de sementes pode ser uma alternativa para o aumento da produtividade e rendimento, pois atuam de forma preventiva, evitando possíveis perdas decorrentes das ações de pragas que danificam sementes e plântulas.

Em sementes de milho doce sh2, o uso de fungicidas no tratamento de sementes se mostrou um método efetivo para favorecer a emergência de plântulas (CALLAN; MATHRE; MILLER, 1990). O tratamento com fungicidas também foi eficiente no controle de patógenos presentes e favoreceu o vigor de sementes de milho doce (RAMOS; MARCOS FILHO; GALLI, 2008). Entretanto, diversos fatores dentre essas moléculas, espécie e qualidade da semente e condição de armazenamento podem influenciar em efeitos fitotóxicos causados pelos produtos químicos fitossanitários. Os tratamentos com moléculas inseticidas tendem a afetar mais a germinação de sementes, em relação à fitotoxidez em relação aos fungicidas (ROCHA et al., 2020).

Também, o efeito do tratamento na qualidade de sementes pode variar em função do tipo de molécula inseticida utilizada, ou mesmo com a associação dessas, e a resposta pode ser diferente entre diferentes genótipos. O uso do inseticida Tiametoxan provocou redução da germinação de sementes e aumento de plântulas anormais em sementes de milho doce

(PELLOSO et al., 2019). Ao avaliar o uso do fungicida Maxim Advanced® (Metalaxyl-M + Fludioxonil + Thiabendazol, e dos inseticidas Cruiser® (Thiamethoxam) e Poncho® (Clotianidina) aplicados separadamente no tratamento industrial de sementes, não foram observadas diferenças significativas na germinação de sementes de milho doce quando comparados com a testemunha (OLIVEIRA, 2016). Produtos como Tiodicarbe, Imidacloprid, Tiametoxan e a associação de Tiodicarbe + Imidacloprid no tratamento industrial de sementes de milho híbrido utilizados por Antoniazzi et al. (2016) não afetaram a produtividade das plantas de milho, mas os resultados variaram em função do híbrido testado.

O tratamento industrial além de eliminar a operação de tratar as sementes no campo, também possui uma maior eficiência, porém, a maioria dos trabalhos e relatos de fitotoxicidade em função da molécula inseticida, tempo de armazenamento e híbrido estão relacionados ao milho comum (CUNHA, 2012; LORENZETTI et al., 2014; MARIUCCI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020).

Além do tratamento, as condições do ambiente de armazenamento também são importantes na manutenção da qualidade fisiológica até o período da semeadura. Vários fatores afetam a taxa de deterioração das sementes, sendo a umidade relativa do ar e a temperatura citados como os mais importantes (BEWLEY et al., 2013). A umidade relativa do ar e a temperatura podem ser manipulados pelo armazenamento em ambiente com umidade e temperatura controladas por equipamentos. Em alguns estudos têm sido mostrado efeito positivo ou neutro do uso de condições de impermeabilidade de oxigênio na conservação de sementes (BARZALI et al., 2005; BENNICI et al., 1984; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2011; GROOT et al., 2015; ROBERTS; ABDALLA, 1968; SCHWEMBER; BRADFORD, 2010; SHEJBAL, 1979; SHRESTHA; SHEPERD; TURNBULL, 1985).

A presença do oxigênio no armazenamento é uma fonte para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos aos tecidos vegetais, levando à deterioração e conseqüentemente à perda da viabilidade de sementes (BERJAK et al., 2011; GROOT et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011). Em estudos foi avaliada a eficiência do armazenamento com restrição de oxigênio para sementes de milho doce. Camargo e Carvalho (2008), verificaram que o armazenamento em câmara refrigerada a 10°C em embalagem de papel, foi o método mais eficiente para a manutenção da qualidade de sementes de milho doce por 18 meses. Por outro lado, Rivera et al. (2011) não observaram diferenças na qualidade fisiológica durante o armazenamento de sementes de milho doce em embalagens permeáveis ou impermeáveis.

São necessários estudos que levam em consideração diferentes combinações de inseticidas e tipos de embalagem e genótipos para a compreensão e escolha das melhores

condições de armazenamento. Desta maneira, objetivou-se com este trabalho investigar o efeito de diferentes produtos utilizados no tratamento industrial de sementes e embalagens no armazenamento de sementes híbridas de milho doce.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia, Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL), Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG.

Foram utilizadas sementes de milho super doce de três híbridos, A, B e C, fornecidas pela empresa Seminis®. As sementes foram adquiridas com tratamento químico industrial feito na própria empresa, tendo sido utilizados fungicida e inseticidas indicados para armazenamento como descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Produtos e doses utilizados no tratamento de sementes.

Tratamento	Princípio ativo	Classe	Dose produto <sup>1</sup>
Maxim (M)	Advanced® Metalaxil-M Fludioxonil Tiabendazol	+ Fungicida +	12 mL/60.000 sementes
Maxim Poncho® (MP)	+ + Clotianidina	Fungicida + Inseticida	70 mL/60.000 sementes
Maxim Poncho + Dermacor® (MPD)	+ + Clorantraniliprole	Fungicida + Inseticida + Inseticida	120 mL/60.000 sementes

Após o tratamento das sementes, as mesmas foram avaliadas em relação a sua qualidade fisiológica e sanitária, e posteriormente, acondicionadas em dois tipos de embalagens: papel multifoliado, e à vácuo em embalagem plástica bilaminada de 18 micras. O empacotamento a vácuo das sementes foi realizado com o auxílio de bomba de vácuo ajustada para fornecer pressão de 0,1 atm. Posteriormente, as sementes foram armazenadas em câmara fria sob condições de 55% de umidade relativa e  $10^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ . Avaliações fisiológicas foram feitas após quatro e 12 meses de armazenamento.

## 2.1 Avaliações física, fisiológicas e bioquímicas das sementes

*Teor de água:* A determinação de teores de água das sementes foi realizada pelo método da estufa à  $105 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 3 \text{ } ^\circ\text{C}$ , durante 24 horas, conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

*Germinação:* O teste de germinação foi realizado de acordo com as RAS (BRASIL, 2009), empregando-se quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram acondicionadas em rolo de papel germitest previamente umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso seco do papel e colocadas em germinador, sob temperatura constante de  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ . As avaliações foram efetuadas aos quatro e sete dias após a semeadura, computando-se as porcentagens de plântulas normais, anormais e sementes mortas.

*Teste de frio:* conduzido em bandejas com quatro repetições de 50 sementes, sendo que a semeadura foi realizada em substrato composto de mistura de areia e terra previamente utilizada pela cultura do milho na proporção de 2:1. A umidade do substrato foi ajustada para 70% da capacidade de retenção e as bandejas foram mantidas à temperatura de  $10^\circ\text{C}$  durante sete dias, quando foram transferidas para câmara de crescimento vegetal à  $25^\circ\text{C}$  por cinco dias, avaliando-se a porcentagem de plântulas emergidas ao final do período (VIEIRA; CARVALHO, 1994).

*Emergência sob condições controladas:* O teste de emergência foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, e a semeadura realizada em substrato composto de mistura de areia e terra na proporção de 2:1 e a umidade ajustada para 70% da capacidade de retenção. As caixas foram mantidas em câmara de crescimento a  $25^\circ\text{C}$  e a emergência de plântulas foi determinada de acordo com completa estabilização do estande.

*Envelhecimento acelerado:* Foram utilizadas caixas tipo "gerbox", possuindo em seu interior uma bandeja com tela de alumínio onde as sementes foram distribuídas de maneira a formarem uma camada uniforme. Dentro de cada caixa gerbox foram adicionados 40 ml de água destilada. As caixas foram mantidas em câmara do tipo BOD, a  $42^\circ\text{C}$ , por período de 72 horas. Em seguida, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, sendo avaliadas após

cinco dias e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais de acordo com a RAS (BRASIL, 2009).

*Sanidade:* O teste de sanidade para detecção de fungos foi realizado pelo método de papel de filtro modificado, com congelamento por vinte e quatro horas (MACHADO, 1988). As sementes foram distribuídas em oito repetições de 25 sementes por placa de Petri de 15 cm de diâmetro, sobre folha de papel de filtro, umedecidas com ágar. Após 24 horas de incubação a 25° C, as placas contendo as sementes foram transferidas para um freezer à temperatura de -20 °C, no qual permaneceram por 24 horas. Em seguida, as placas foram mantidas em sala de incubação a 25 °C, sob regime alternado de 12 horas de luz branca e 12 horas de escuro, durante dez dias. Após esse período, com auxílio do microscópio estereoscópico, computou-se a porcentagem de fungos nas sementes.

*Extração e quantificação da enzima álcool desidrogenase (ADH):* A solução de extração foi obtida à partir da maceração das sementes em nitrogênio líquido, e destes foram retirados 0,2 g, aos quais foram adicionados 0,8 mL de tampão de extração contendo HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico) 0,2 M (pH 7,5), glicerol 87%,  $\beta$ -mercaptoetanol, água e 6% de PVP (polivinilpirrolidona). A solução de extração foi centrifugada a 14000 RPM durante 10 minutos a 4 ° C, e os sobrenadantes foram coletados e aplicados em microplacas de ELISA de 96 poços, em triplicata. A atividade da ADH foi avaliada pela adição de uma alíquota de 9  $\mu$ L da amostra a 180  $\mu$ L da solução de incubação. O etanol a 1% (v / v) foi adicionado no momento da leitura, realizada por espectrofotometria a 340 nm por três minutos, após a redução do NAD + (Nicotinamida adenina dinucleotídeo), segundo Yamanoshita et al. (2005), com modificações. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NADH produzida por minuto de incubação. A atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) foi avaliada para os híbridos A e C, antes do armazenamento e após um ano de armazenamento, em duas replicatas para cada tratamento.

## **2.2 Análise estatística**

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo três tipos de tratamentos industrial de sementes (M, MP e MPD), dois tipos de embalagem usadas no armazenamento (papel e plástico a vácuo) e duas épocas de armazenamento (aos 4 e 12 meses). O controle foi representado pelos três tipos de tratamentos

industriais de sementes isoladamente (M, MP e MPD) analisados antes do início do armazenamento.

As análises estatísticas foram realizadas para cada híbrido por meio da análise de variância com auxílio do software Sisvar® (FERREIRA, 2014) a 5% de probabilidade pelo teste F ( $p < 0,05$ ), os dados obtidos foram comparados entre si pelo teste de Scott-Knott para o fatorial e comparados ao controle pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da germinação e grau de umidade inicial das sementes dos híbridos A, B e C de milho doce avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Porcentagem de germinação (%) e grau de umidade das sementes (%) dos diferentes híbridos de milho doce antes do armazenamento.

Híbrido	Tratamento de sementes					
	M		MP		MPD	
	Germinação (%)	Grau de umidade (%)	Germinação (%)	Grau de umidade (%)	Germinação (%)	Grau de umidade (%)
A	88	12	85	11	81	12
B	73	12	83	12	83	12
C	87	12	86	12	89	12

#### 3.1 Híbrido A

De acordo com os resultados da análise de variância dos dados do híbrido A, não houve interação dos fatores tipos de tratamento, tipos de embalagem e épocas de armazenamento para os testes da primeira contagem de germinação, teste de frio, massa seca de hipocótilo e emergência de plântulas (TABELA 1A e 2A, APÊNDICE). Apenas para o teste de envelhecimento acelerado foi observada interação significativa entre os fatores, tipos de tratamento de sementes e épocas de armazenamento. O teste de envelhecimento acelerado pode apresentar resultados divergentes do teste de germinação em laboratório, sendo indicado para identificar diferenças entre os lotes, principalmente aqueles de germinação semelhante (MARCOS FILHO, 1999). Segundo o autor, esse teste tem mais sensibilidade para a avaliação

do vigor, o que pode explicar os resultados diferentes na análise de variância em relação aos demais testes.

Independentemente do tratamento a que foram submetidas, as sementes do híbrido A tiveram a sua qualidade comprometida ao longo do armazenamento, uma vez que os resultados observados no teste de primeira contagem de germinação, massa seca de hipocótilo e emergência sofreram uma redução após um ano de armazenamento, com exceção dos resultados observados no teste de frio (TABELA 2). Essa divergência nos resultados pode ser explicada devido à maior presença de fungos, como de *Aspergillus* sp., no início e após quatro meses de armazenamento (TABELA 6). A presença de microrganismos em milho doce, mesmo imediatamente após colheita é comum, Douglass, Juvik e Splittstoesser (1993), devido ao enrugamento do endosperma por ocasião da secagem .

Observa-se também, pela Tabela 2 que houve diferença na qualidade fisiológica das sementes armazenadas, em relação a época inicial de tratamento (controle).

**Tabela 2** :Plântulas normais (%), observadas na primeira contagem de germinação, no teste de frio, na massa seca de parte aérea (g) e no teste de emergência em sementes de milho doce, do híbrido A, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	Germinação (%)	Primeira contagem (%)	Teste de frio (%)	Massa seca de hipocótilo (g)	Emergência (%)
4 meses	87	75 A	64 B*	1,72 A*	88 A*
12 meses	87	69 B*	78 A*	1,56 B*	83 B
Controle	85	76*	73*	1,83*	80*
CV (%)	5,36	8,73	10,2	10,74	6,31

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Pelos resultados observados nos testes de primeira contagem de germinação e de frio houve diferença entre os tratamentos inseticidas/fungicidas, sendo a média do tratamento apenas com fungicida (M) superior às médias dos tratamentos com inclusão de inseticidas MP e MPD, que não diferiram entre si (TABELA 3). Esses resultados corroboram com estudos realizados com outros inseticidas na cultura do milho. Fessel et al. (2003) ao avaliar diferentes combinações de inseticidas e fungicidas na conservação de sementes de milho também

observaram redução da germinação e vigor das sementes, com o aumento das dosagens e ao longo do período de armazenamento de 12 meses. Espindola et al. (2018) encontraram melhor germinação e vigor em sementes não tratadas de milho quando comparado com diversos inseticidas.

**Tabela 3:** Plântulas normais (%), observadas na primeira contagem de germinação e no teste de frio, em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Tratamento	Primeira contagem (%)	Teste de frio (%)
M	76,0 A	79,0 A
MP	69,0 B	68,0 B
MPD	70,0 B	65,0 B
CV (%)	8,7	10,2

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observa-se com os resultados do teste de envelhecimento acelerado (TABELA 4), que as sementes de milho doce embaladas a vácuo apresentaram os melhores resultados, indicando um maior vigor das sementes. Da mesma forma, Marcos Valle et al. (2021) concluíram que o armazenamento de sementes de milho doce em embalagens herméticas prolongam o armazenamento. Camargo e Carvalho (2008) observaram que o armazenamento de sementes de milho doce em temperatura ambiente foi beneficiado pelo acondicionamento em embalagens plásticas à vácuo. A restrição de oxigênio no armazenamento à vácuo tem um efeito positivo na armazenabilidade das sementes, uma vez que a presença de oxigênio molecular provoca danos oxidativos (GROOT et al., 2015).

**Tabela 4:** Plântulas normais (%) no teste de envelhecimento acelerado, em sementes de milho doce, do híbrido A, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Embalagem	Envelhecimento acelerado (%)
Papel	33 B
Vácuo	40 A*
Controle	32
CV (%)	28,2

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Pelos resultados do teste de envelhecimento acelerado, foi possível observar quais sementes do híbrido A apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com MPD após um ano de armazenamento (TABELA 5), tratamento esse com dois ingredientes ativos de ação

inseticida. Os tratamentos com moléculas inseticidas tendem a maior fitotoxidez em relação à fungicidas (ROCHA et al., 2020). Conforme relatado em diferentes pesquisas com sementes de milho armazenadas, Mariucci et al. (2018) também observaram redução do vigor de sementes de milho tratadas ao longo do armazenamento e Oliveira et al. (2020) observaram que os inseticidas utilizados no tratamento de sementes, incluindo Clotianidina, causaram redução da qualidade fisiológica de sementes híbridas de milho após nove meses de armazenamento.

**Tabela 5:** Plântulas normais (%) no teste de envelhecimento acelerado, em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	M	MP	MPD
4 meses	34 Aa	42 Aa*	42 Aa*
1 ano	38 Aa	37 Aa*	26 Ba
Controle	45	28	25*
CV (%)		28,15	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Lorenzetti et al. (2014) também observaram variação entre os inseticidas testados no vigor de sementes de milho durante o armazenamento. Além disso, concluíram que o tratamento de sementes de milho com inseticidas deve ser realizado próximo à época de semeadura, uma vez que no início do armazenamento os inseticidas estudados não causaram redução da germinação e vigor. Em outros trabalhos foi evidenciado que ao longo do período de armazenamento ocorre aumento do efeito do tratamento químico causando redução no vigor de sementes de milho (BITTENCOURT et al., 2000; FESSEL et al., 2003; ROSA, 2012; TONIN et al., 2014).

Na análise de variância da qualidade sanitária das sementes de milho doce do híbrido A, constatou-se interação dupla entre os fatores época e tratamento de semente, e embalagem e tratamento de sementes para a incidência de *Aspergillus* sp. (TABELA 3A, APÊNDICE). Quanto à incidência de *Penicillium* sp., foi verificado efeito significativo apenas para os tipos de tratamentos químicos avaliados. Com relação à incidência de *Fusarium* sp., não houve efeito significativo entre os tratamentos estudados. Para a presença de outros fungos constatou-se interação dupla entre os fatores época e tratamento de sementes e época e tipos de embalagem.

Observa-se na Tabela 6 que ao longo do armazenamento não houve diferença entre as épocas para o tratamento com M e MPD, no entanto a incidência de *Aspergillus* sp foi maior na época inicial, como pode ser visto nos resultados do controle, e diminuiu logo após quatro

meses de armazenamento. Com relação ao tratamento com MP, ocorreu maior incidência de *Aspergillus* sp. no início e após quatro meses de armazenamento, mas após um ano de armazenamento diminuiu significativamente. Em relação ao controle, todos os valores ao longo do armazenamento foram menores, com exceção das sementes tratadas com MP e avaliadas aos 4 meses.

**Tabela 6:** Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

Época	M	MP	MPD
4 meses	2,25Aa*	7 Bb	2,5 Aa*
1 ano	1,75 Aa*	1 Aa*	0,75 Aa*
Controle	7*	8*	5,5*
CV (%)	48,25		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

A incidência de *Aspergillus* sp., também foi maior ao utilizar a combinação de MP no tratamento de sementes com a embalagem de papel multifoliado (TABELA 7), que não diferiu do tratamento controle.

**Tabela 7:** Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Embalagem	M	MP	MPD
Papel	1,25 Aa*	6 Bb	1,75 Aa*
Vácuo	2,75 Aa	2 Aa*	1,5 Aa*
Controle	7*	8*	5,5*
CV (%)	48,25		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Da mesma forma como ocorreu com o *Aspergillus* sp., a incidência de *Penicillium* sp. foi maior quando utilizado o tratamento com MP (TABELA 8). Esses resultados indicam possíveis interações entre o fungicida Maxim e o inseticida Poncho, afetando a atuação sobre os fungos.

**Tabela 8:** Incidência de *Penicillium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Tratamento	<i>Penicillium</i> sp. (%)
M	0,13 a
MP	1,25 b
MPD	0,25 a
CV (%)	41,24

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Outros fungos, como *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp. e *Trichoderma* sp. também foram detectados nas sementes do híbrido A. Quanto à presença dos mesmos nas sementes, houve aumento significativo após um ano de armazenamento quando utilizados os tratamentos com M e MPD, sendo que ao comparar os três tipos de tratamentos após um ano de armazenamento o tratamento com MPD foi responsável pela maior incidência de outros fungos (TABELA 9), podendo ter relação com a interação entre misturas. O controle foi significativo estatisticamente aos 12 meses de armazenamento e não apresentou diferença com relação aos quatro meses de armazenamento.

**Tabela 9:** Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	M	MP	MPD
4 meses	2,0 Aa	1,0 Aa	0,75 Aa
1 ano	10,75 Ba*	5,75 Aa*	48,5 Bb*
Controle	0,5*	0,0*	1,5*
CV (%)	57,71		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Na Tabela 10 observa-se que tanto em sementes armazenadas em embalagem de papel multifoliado, quanto em embalagem a vácuo houve aumento na incidência de outros fungos após um ano de armazenamento quando comparada com o armazenamento aos quatro meses. No entanto, com um ano de armazenamento em sementes que foram embaladas a vácuo houve menor incidência de outros fungos. Nota-se também, que a porcentagem de outros fungos foi diferente do controle apenas após um ano de armazenamento.

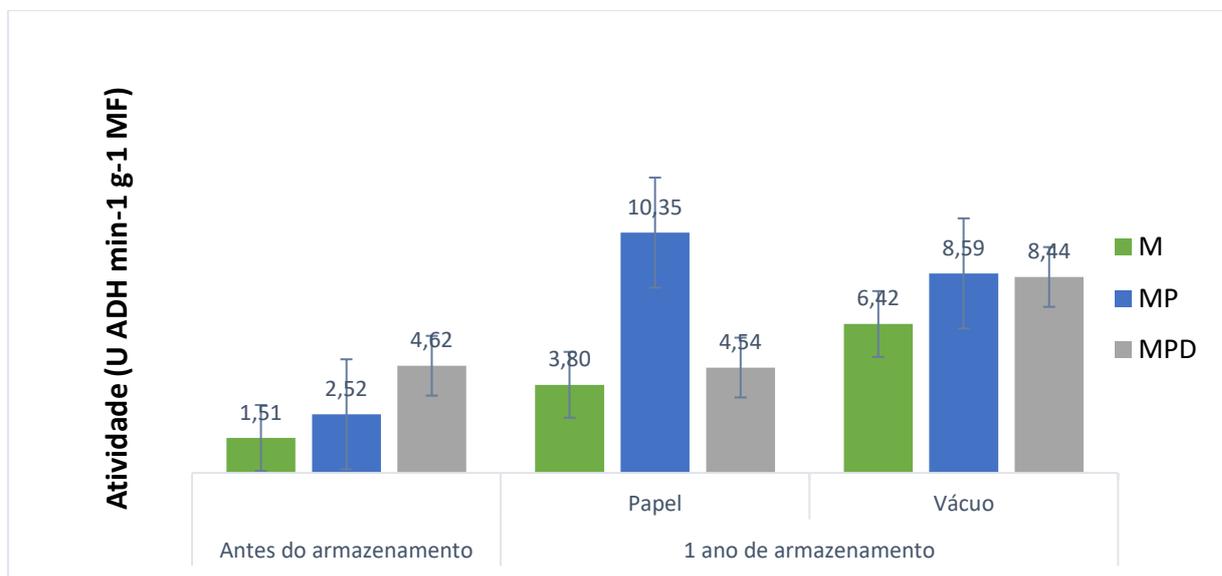
**Tabela 10:** Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido A, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Época	Papel	Vácuo
4 meses	1,67 Aa	0,83 Aa
1 ano	28,5 Bb*	14,83 Ba*
Controle	0,66*	0,66*
CV (%)	57,71	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

De acordo com os resultados observados na quantificação da álcool desidrogenase (ADH), enzima importante no metabolismo anaeróbico, nas sementes do híbrido A, houve aumento na atividade da enzima após um ano de armazenamento, principalmente em sementes armazenadas a vácuo, sendo que em sementes tratadas com MP observaram-se as maiores médias de atividade da enzima em ambas as embalagens, mas não foram diferentes entre si (FIGURA 1).

**Figura 1** - Quantificação da atividade da enzima álcool desidrogenase por espectrofotometria, em sementes de milho doce, do híbrido A, antes do armazenamento e após um ano de armazenamento, tratadas com diferentes produtos fitossanitários e embaladas a vácuo e em papel multifoliado.



A ADH opera no mecanismo da respiração anaeróbica, reduzindo o acetaldeído a etanol (ZHANG et al., 1995). O acetaldeído causa a deterioração das sementes (ZHANG et al., 1994, 1995). Dessa forma, o aumento na atividade da ADH resulta na redução de acetaldeído, e conseqüentemente, na proteção contra a ação nociva desse composto, uma função importante em sementes armazenadas, sobretudo em ambiente anaeróbico.

### **3.2 Híbrido B**

Pelos resultados da análise de variância do híbrido B houve interação significativa entre os fatores período de armazenamento e tratamento fitossanitário para os testes de primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência e emergência (TABELA 4A e 5A, APÊNDICE). Nos resultados da massa seca de parte aérea foram observadas diferenças significativas para os fatores: épocas de armazenamento e tipos de embalagem isoladamente.

Nos resultados do teste de primeira contagem de germinação, foi observada redução na porcentagem de plântulas normais após quatro meses de armazenamento para as sementes tratadas com MPD (TABELA 11). No entanto, em sementes tratadas com MP houve queda na qualidade apenas após um ano de armazenamento. Para o controle foi observada diferença significativa dos tratamentos com MP após um ano de armazenamento e dos tratamentos com MPD independente da época de armazenamento, fato que reitera a influência dessas moléculas inseticidas, Clotianidina e Clorantraniliprole, na deterioração das sementes armazenadas. Relatos de deterioração em sementes armazenadas com alguns inseticidas são comuns, sobretudo para inseticidas do grupo dos neonicotinóides sistêmicos (DEUNER et al., 2014; FERREIRA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; TONIN et al., 2014).

**Tabela 11:** Plântulas normais (%) na primeira contagem de germinação em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	M	MP	MPD
4 meses	61 Aa	62 Aa	51 Ab*
1 ano	58 Aa	52 Ba*	55 Aa*
Controle	55	67,5*	64*
CV(%)		12,43	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Com relação aos tipos de embalagem estudados foi observado que para as sementes tratadas com MP houve maior média de plântulas normais ao utilizar a embalagem a vácuo (TABELA 12). Além disso, quando a embalagem de papel foi utilizada em sementes tratadas com inseticidas, MP e MPD, houve redução significativa da qualidade, fato não constatado na embalagem a vácuo. O tratamento controle não diferiu estatisticamente do tratamento fitossanitário somente com fungicida, M. Entretanto, ocorreram diferenças significativas entre o tratamento controle e os resultados observadas em sementes tratadas com inseticidas, com MP e armazenadas em embalagem de papel multifoliado e os resultados das sementes tratadas com MPD para os dois tipos de embalagem avaliados.

**Tabela 12:** Plântulas normais (%) na primeira contagem de germinação em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado e tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Embalagem	M	MP	MPD
Papel	61 Aa	53 Bb*	51 Ab*
Vácuo	58 Aa	62 Aa	56 Aa*
Controle	55	67,5*	64*
CV (%)		12,43	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

A porcentagem de plântulas normais na primeira contagem de germinação das sementes de milho doce armazenadas a vácuo por 12 meses foi inferior aos 4 meses (TABELA 13). Com

um ano de armazenamento, não houve diferença significativa entre as embalagens de vácuo e papel. No entanto, aos quatro meses de armazenamento em embalagem a vácuo foram observados melhores resultados do que os observados em embalagem de papel multifoliado.

**Tabela 13:** Plântulas normais (%) na primeira contagem de germinação em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

Época	Papel	Vácuo
4 meses	54 Ab*	62 Aa
1 ano	56 Aa	55 Ba*
Controle	62,17*	
CV(%)	12,43	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Não foram observadas diferenças significativas no teste de envelhecimento acelerado entre os tipos de tratamentos fitossanitários avaliados quando a embalagem a vácuo foi utilizada (TABELA 14). Mas quando a embalagem de papel multifoliado foi utilizada, os tratamentos com inseticidas proporcionaram melhores médias de plântulas normais, do que apenas com M.

**Tabela 14:** Porcentagem de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, e tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Embalagem	M	MP	MPD
Papel	43,0 Bb*	61,0 Aa	55,0 Aa
Vácuo	61,0 Aa	50,0 Aa	45,0 Aa
Controle	65*	66	46,5
CV (%)	27,12		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Nos resultados do teste de frio, observa-se que aos quatro meses de armazenamento os tratamentos com MP e MPD prejudicaram a qualidade das sementes de milho doce do híbrido B (TABELA 15). Mas após um ano de armazenamento não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados neste estudo. Com relação aos tratamentos de sementes, ao utilizar apenas o M, não houve alteração na qualidade das sementes ao longo do

armazenamento e as médias não se diferenciaram do controle. Ao utilizar o tratamento com MP e MPD, houve redução da qualidade das sementes aos quatro meses de armazenamento, tanto quando comparado ao controle quanto à época de um ano de armazenamento, reforçando a ocorrência de efeitos desses inseticidas sobre a qualidade das sementes de milho doce armazenadas.

**Tabela 15:** Porcentagem de plântulas normais no teste de frio em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	M	MP	MPD
4 meses	75 Aa	63 Bb*	61 Bb*
1 ano	79 Aa	78 Aa	78 Aa
Controle	78,5	75*	78*
CV(%)		10,15	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Por meio dos resultados da massa seca de mesocótilo pode-se observar que houve redução da qualidade das sementes ao longo do armazenamento, uma vez que em sementes com um ano de armazenamento foi observado resultado inferior quando comparadas às sementes com quatro meses de armazenamento, e ambas se diferenciaram estatisticamente do tratamento controle (TABELA 16). De uma forma geral, a redução na qualidade fisiológica do híbrido B ao longo do armazenamento foi pequena ou inexistente, quando armazenadas a 10°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo, Silva e Corrêa (2000) e Rivera et al. (2011) com sementes de milho doce armazenadas em diferentes condições, em que ao armazenar em ambiente controlado à 10 °C houve maior conservação da qualidade fisiológica.

**Tabela 16:** Médias provenientes da massa seca de hipocótilo (g), em sementes de milho doce, do híbrido B, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	Massa seca de hipocótilo (g)
4 meses	2,25 a*
1 ano	2,04 b*
Controle	2,51*
CV (%)	8,05

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Ao analisar o tipo de embalagem, observa-se que a utilização de embalagem a vácuo foi responsável por uma maior massa seca de mesocótilo das plântulas de milho doce (TABELA 17). O controle apresentou maior média, que foi diferente estatisticamente tanto da embalagem a vácuo quando de papel, o que já era esperado, uma vez que sementes do tratamento controle não foram submetidas ao armazenamento e, portanto, ao processo de deterioração.

**Tabela 17:** Massa seca de hipocótilo (g), em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Embalagem	Massa seca de hipocótilo (g)
Papel	2,06 b*
Vácuo	2,23 a*
Controle	2,51*
CV (%)	8,05

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Pelos resultados do teste de emergência e índice de velocidade de emergência pode-se observar que ao armazenar as sementes de milho doce em embalagem a vácuo não houve diferença entre os tratamentos utilizados (TABELA 18), demonstrando maior eficiência na manutenção da qualidade de sementes tratadas, mesmo com inseticidas. Ao armazenar as sementes em embalagem de papel multifoliado observa-se que o tratamento com MPD teve um menor índice velocidade de emergência e uma menor emergência de plântulas, o tratamento com MP também apresentou uma menor emergência de plântulas quando comparado ao tratamento apenas com fungicida Maxim.

**Tabela 18:** Índice de velocidade de emergência e do teste de emergência de sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Embalagem	IVE			Emergência (%)		
	M	MP	MPD	M	MP	MPD
Papel	22,11 Aa*	21,56 Aa*	19,18 Bb*	88,0 Aa	83,0 Ab	79,0 Bb
Vácuo	21,08 Aa*	21,39 Aa*	23,1 Aa	87,0 Aa	83,0 Aa	88,0 Aa*
Controle	30,20*	25,62*	23,29*	87	79,5	73,5*
CV (%)		10,15			5,91	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Ocorreram algumas discrepâncias entre os resultados observados nos testes fisiológicos para as sementes tratadas, sobretudo com a adição de moléculas inseticidas. Fato esse relacionado ao tipo de substrato utilizado no teste, solo + areia ou papel. Metodologias com água prontamente disponível tendem a apresentar maior fitotoxidez, sobretudo para sementes tratadas com alguns inseticidas (ROCHA et al., 2020). O tratamento de sementes com inseticidas, dependendo da natureza da molécula, possui um efeito sistêmico na planta, no qual o ingrediente ativo se desprende da semente e é absorvido pelas raízes da plântula de forma gradativa através da solução do solo (SILVA, 1998). Portanto, o contato do tratamento químico com as sementes nos testes de frio e emergência é menor, uma vez que são conduzidos em solo + areia, levando a resultados diferentes aos do teste de germinação por exemplo, que propicia um maior contato dos produtos químicos com a plântula em desenvolvimento.

De acordo com os resultados da análise de variância da qualidade sanitária das sementes do híbrido B foi observada interação significativa apenas entre os fatores tipos de embalagem e tratamentos de sementes para incidência de *Aspergillus* sp., no entanto, o fator épocas apresentou significância isoladamente para este fungo (TABELA 6A, APÊNDICE). Com relação à incidência de *Penicilium* sp. apenas o fator tipos de embalagem apresentou significância. Já quanto à incidência de *Fusarium* sp. os resultados foram significativos apenas entre os diferentes tipos de tratamentos fitossanitários. Para a presença de outros fungos foram observadas diferenças significativas entre os tipos de tratamentos e as épocas de armazenamento, isoladamente.

Da mesma forma como ocorreu para o híbrido A, a incidência de *Aspergillus* sp. para o híbrido B diminuiu ao longo do armazenamento, uma vez que o controle foi significativamente diferente dos quatro meses e de um ano de armazenamento, sendo a maior média de incidência do fungo no tratamento controle (TABELA 19). Aos quatro meses de armazenamento a porcentagem de fungos presentes nas sementes de milho doce foi maior que após um ano de armazenamento. O tempo maior de armazenamento dessas sementes pode ter beneficiado a ação do fungicida, que foi aplicado em todas as sementes. Oliveira et al. (2020) também observaram uma redução da incidência de fungos ao longo do armazenamento para sementes híbridas de milho comum tratadas com inseticidas e fungicidas.

**Tabela 19:** Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	<i>Aspergillus</i> sp. (%)
4 meses	9,83 b*
1 ano	2,08 a*
Controle	19,17*
CV (%)	47,32

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

A porcentagem de *Aspergillus* sp. foi maior ao aplicar o tratamento com MPD quando a embalagem utilizada foi a de papel multifoliado. No entanto, ao utilizar a embalagem a vácuo houve maior incidência desse fungo em sementes tratadas com M (TABELA 20). Pode-se observar também que ao utilizar apenas M e MP como tratamento de sementes não houve diferenças significativas entre os tipos de embalagens, mas ao utilizar MPD no tratamento de sementes, embaladas a vácuo verificaram-se melhores resultados no controle do fungo. As médias do controle foram significativamente maiores que as observadas após o armazenamento em papel ou a vácuo para M e MP, o que indica a influência do tipo de embalagem sobre a proliferação e incidência do fungo.

**Tabela 20:** Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Embalagem	M	MP	MPD
Papel	5 Aa*	3,5 Aa*	14 Bb
Vácuo	7,75 Ab	3,5 Aa*	2 Aa*
Controle	14*	30,5*	13*
CV (%)		47,32	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Quando ao uso da embalagem a vácuo houve menor incidência de *Penicillium* sp. (TABELA 21). Além disso, nesta embalagem também identificou-se menor incidência que em sementes do tratamento controle.

**Tabela 21:** Incidência de *Penicillium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Embalagem	<i>Penicillium</i> sp. (%)
Papel	2,5 b
Vácuo	0,25 a*
Controle	2,5*
CV (%)	58,87

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Pelo teste de sanidade observa-se que a presença de *Fusarium* sp. foi influenciada apenas pelo tipo de tratamento de sementes e que em sementes tratadas com M houve maior incidência do fungo (TABELA 22). Esses resultados permitem inferir que os inseticidas avaliados também têm algum efeito sobre os fungos para o híbrido B.

**Tabela 22:** Incidência de *Fusarium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Tratamento	<i>Fusarium</i> sp. (%)
M	17,25 b
MP	9,38 a
MPD	7,5 a
CV (%)	47,26

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao contrário dos resultados encontrados para a incidência de *Aspergillus* sp., a porcentagem de outros fungos nas sementes de milho doce do híbrido B foi maior após um ano de armazenamento, e aumentou ao longo do armazenamento. A incidência destes patógenos em sementes submetidas ao tratamento controle, se diferenciou estatisticamente da observada aos quatro e 12 meses de armazenamento (TABELA 23). Assim como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. são considerados fungos de armazenamento, uma vez que a incidência destes fungos tende a aumentar ao longo do período de armazenamento de diversas sementes (CATÃO et al., 2013; FERREIRA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; STEFANELLO et al., 2015).

**Tabela 23:** Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, em duas épocas de avaliação.

Época	Outros fungos
4 meses	5,42 a*
1 ano	16,92 b*
Controle	2,17*
CV (%)	58,02

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Com relação aos tipos de tratamentos fitossanitários estudados, na Tabela 24 observa-se que a menor incidência de outros fungos ocorreu em sementes tratadas com MP.

**Tabela 24:** Incidência de outros fungos (%), em sementes de milho doce, do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Tratamento	Outros fungos
M	14,38 b
MP	6,25 a
MPD	12,88 b
CV (%)	58,02

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### a. Híbrido C

Não foi observada interação na análise de variância entre os fatores estudados para o híbrido C (TABELA 7A e 8A, APÊNDICE). No entanto, foi observada significância entre os fatores época, tipos de tratamento e tipos de embalagem isoladamente, para algumas variáveis analisadas.

Na Tabela 25 pode-se observar reduções de germinação e vigor das sementes de milho doce do híbrido C ao longo do armazenamento e que todas as épocas foram significativamente diferentes do tratamento controle. Devido às diferenças na composição do endosperma, sementes de milho doce apresentam baixo vigor quando comparadas ao milho comum (STYER; CANTLIFFE, 1984), além de apresentar maior susceptibilidade aos danos mecânicos e infestação e ou infecção de patógenos (CHEN, 2014), o que resulta em menor longevidade da sementes.

**Tabela 25:** Plântulas normais (%) na primeira contagem do teste de germinação, no teste de germinação e da massa seca de hipocótilo em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	Primeira contagem (%)	Germinação (%)	Massa seca de hipocótilo (g)
4 meses	76 a*	89 a	1,84 a*
1 ano	67 b*	85 b*	1,68 b*
Controle	81,5*	86,83*	2,03*
CV (%)	9,2	6,11	7,74

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Na primeira contagem de germinação em sementes tratadas com M observaram-se as menores médias de plântulas normais do que as observadas nos demais tratamentos fitossanitários (TABELA 26), resposta diferente do constatado para os demais híbridos. No teste de emergência (TABELA 26), no tratamento com MPD foi observada a menor média do que nos demais tratamentos de sementes, seguindo o constatado para os demais híbridos, que adição desses ativos inseticidas podem afetar a qualidade fisiológica das sementes armazenadas. De forma parecida, Oliveira (2016) não encontrou diferenças no teste de germinação quando comparou o uso de Maxim Advanced® (Metalaxil-M, Tiabendazol e Fludioxonil), Cruiser® (Tiametoxam) e Poncho® (Clotianidina) no tratamento industrial em quatro lotes de sementes de milho doce, no entanto as sementes de um dos lotes tratadas com Poncho® e Cruiser® apresentaram desempenho inferior de emergência em campo.

**Tabela 26:** Médias provenientes da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação, e do teste de emergência em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Tratamento	Primeira contagem (%)	Emergência (%)
M	67,0 b	90,0 a
MP	78,0a	91,0 a
MPD	73,0 a	87,0 b
CV (%)	9,2	5,04

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O teste da primeira contagem de germinação e o teste de emergência são testes de vigor, porém o teste de emergência se aproxima mais das condições reais de campo. Ao avaliar o uso

de diferentes inseticidas em combinação com Maxim XL® (Fludioxonil + Metalaxyl-M) em quatro linhagens de milho Tamindzic et al. (2013) também observou variação nos resultados de germinação e vigor, e para algumas linhagens foi encontrada melhor germinação e vigor quando o Maxim XL® foi utilizado em combinação com Poncho® (Clotianidina).

Com relação aos tipos de embalagem utilizados, em sementes acondicionadas em embalagem a vácuo observaram-se os melhores resultados de qualidade fisiológica do que em embalagem de papel multifoliado, sendo os dois tipos de embalagens estatisticamente diferentes do tratamento controle apenas na primeira contagem de germinação (TABELA 27), superioridade essa também constatada nos demais híbridos (TABELAS 4,13, 17 E 18), reiterando a adequação desse tipo de embalagem nessas condições.

**Tabela 27:** Porcentagem de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação, e no teste de germinação em sementes de milho doce, do híbrido C, embaladas a vácuo e em papel multifoliado.

Embalagem	Primeira contagem (%)	Germinação (%)
Papel	68,0 b*	85,0 b
Vácuo	75,0 a*	89,0 a
Controle	82,0*	87,0
CV (%)	9,2	6,11

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Na análise de variância da qualidade sanitária do híbrido C, não foi observada interação entre os fatores para a incidência de *Aspergillus* sp., no entanto, os fatores épocas de armazenamento e tipos de tratamentos, foram estatisticamente significativos isoladamente (TABELA 9A, APÊNDICE). Com relação à incidência de *Penicillium* sp., ocorreram interações duplas entre os três fatores avaliados. Já a presença de *Fusarium* sp. foi caracterizada pela diferença entre épocas de armazenamento apenas. Enquanto a incidência de outros fungos apresentou interação tripla entre os fatores estudados nesse trabalho.

Apesar de apresentar índices elevados de germinação e vigor, o híbrido C também apresentou altos índices de infestação pelos fungos de armazenamento *Aspergillus* sp. e principalmente por *Fusarium* sp. Nos resultados da incidência de *Aspergillus* sp., observa-se que após um ano de armazenamento houve queda na incidência dos fungos nas sementes do híbrido C, da mesma forma como ocorreu com os híbridos A e B (TABELA 28).

**Tabela 28:** Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	<i>Aspergillus</i> sp. (%)
4 meses	28,08 b
1 ano	7,67 a*
Controle	30,00*
CV (%)	36,46

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Com relação aos tratamentos de sementes observa-se na Tabela 29, que o tratamento com MPD foi o mais eficiente no controle de *Aspergillus* sp. nas sementes de milho doce do híbrido C, o que reitera o discutido para o híbrido B, com algum efeito dos inseticidas químicos sobre a incidência fúngica, mas não constatado para o híbrido A.

**Tabela 29:** Incidência de *Aspergillus* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários.

Tratamento	<i>Aspergillus</i> sp. (%)
M	19,63 b
MP	24,88 c
MPD	9,13 a
CV (%)	36,46

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A incidência de *Penicillium* sp. também foi maior aos quatro meses de armazenamento do que após um ano de armazenamento das sementes do híbrido C, independentemente do tipo de tratamento fitossanitário utilizado (TABELA 30). No entanto, ao analisar as épocas separadamente, aos quatro meses de armazenamento a menor porcentagem deste fungo nas sementes foi responsável pelo tratamento com M, seguido do tratamento com MPD e do tratamento com MP. Após um ano de armazenamento, as sementes com MP também foram as que apresentaram a maior incidência de *Penicillium* sp. Esses resultados foram semelhantes aos observados para o híbrido A, que também apresentou maior incidência de *Penicillium* sp. quando o tratamento com MP foi utilizado.

**Tabela 30:** Incidência de *Penicillium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	M	MP	MPD
4 meses	10,25 Ba*	33,25 Bc*	22 Bb*
1 ano	1 Aa	5,25 Ab	0,5 Aa
Controle	3,5*	9,5*	0,5*
CV(%)		41,54	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

De forma semelhante ao híbrido B, a utilização de embalagem a vácuo auxiliou na redução da incidência de *Penicillium* sp. nas sementes de milho doce do híbrido C, independentemente do tipo de tratamento estudado (TABELA 31). Ao utilizar a embalagem de papel o tratamento com MP foi o responsável pela maior porcentagem de *Penicillium* sp. nas sementes. No entanto, ao utilizar a embalagem a vácuo, não foi observada diferença significativa entre os tipos de tratamentos analisados.

**Tabela 31:** Incidência de *Penicillium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Embalagem	M	MP	MPD
Papel	9,5 Ba	31,25 Bb*	18 Ba*
Vácuo	1,75 Aa	7,25 Aa	4,5 Aa*
Controle	3,5	9,5*	0,5*
CV (%)		41,54	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Na Tabela 32, observa-se que a presença de *Penicillium* sp. nas sementes do híbrido C, reduziu após um ano de armazenamento, quando comparada aos quatro meses de armazenamento, independentemente do tipo de embalagem estudado. Aos quatro meses de armazenamento a embalagem de papel multifoliado apresentou maior incidência deste fungo, quando comparada aos resultados do uso de embalagem a vácuo. Mas após um ano de armazenamento, não houve diferença entre o uso de embalagem a vácuo ou papel multifoliado.

**Tabela 32:** Incidência de *Penicillium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	Papel	Vácuo
4 meses	36 Bb*	7,67 Ba
1 ano	3,17 Aa	1,33 Aa
Controle	4,5*	4,5
CV (%)	41,54	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

A incidência de *Fusarium* sp. nas sementes do híbrido C foi alta para todos os tratamentos avaliados, no entanto houve uma diferença entre as épocas de armazenamento, em que após um ano de armazenamento houve aumento na incidência do fungo (TABELA 33). O controle foi diferente estatisticamente tanto da época de quatro meses de armazenamento, quanto após um ano de armazenamento. Esse resultado pode ter sido devido à alta incidência inicial do fungo nas sementes, provavelmente por alguma falha no processo produtivo do mesmo, associado a alta susceptibilidade das sementes desse híbrido ao fungo. Apresentando próximo a 100% de incidência de *Fusarium* sp. no controle. Foi verificado em vários estudos que a presença de *Fusarium* sp. pode provocar uma redução da germinação e tombamento na emergência de plântulas de milho (CUBBY; WALLEN, 1965; GOULART; FIALHO, 1998; TANAKA; BALMER, 1980). No entanto, assim como neste trabalho Von Pinho et al. (1995) não observaram um efeito negativo da incidência de *Fusarium moniliforme* na germinação, teste de frio e emergência em campo de sementes de milho e concluíram que sementes de alta qualidade fisiológica apresentam baixas respostas ao tratamento químico. Galli et al. (2000) também verificaram que a presença de fungos em sementes de milho não causou alterações na germinação.

**Tabela 33:** Incidência de *Fusarium* sp. (%), em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento em diferentes condições.

Época	<i>Fusarium</i> sp. (%)
4 meses	76,08 b*
1 ano	88,25 a*
Controle	98,33*
CV (%)	21,53

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Após um ano de armazenamento, a incidência de outros fungos aumentou tanto para a embalagem a vácuo, quanto de papel multifoliado, para as sementes que foram tratadas com M e MP (TABELA 34). Também pode-se observar que não houve diferença entre os tratamentos de sementes aos quatro meses de armazenamento, mas o tratamento com M e MP tiveram maior incidência de outros fungos quando armazenadas em papel multifoliado, e quando embaladas a vácuo, apenas o tratamento com MP foi responsável pela maior incidência de outros fungos. Reforçando os efeitos do armazenamento a vácuo sobre a incidência dos fungos.

**Tabela 34:** Incidência de outros fungos, em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

Época	Papel			Vácuo		
	M	MP	MPD	M	MP	MPD
4 meses	1,5 Aa	4,5 Aa	2,5 Aa*	1 Aa	2,5 Aa	3,5 Aa
1 ano	28,5 Bb*	24 Bb*	5,5 Aa*	9 Ba	26 Bb*	4 Aa
Controle	3,5*	1*	0,5*	3,5	1*	0,5
CV(%)	40,89					

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

Ao analisar a presença de outros fungos nas sementes do híbrido C, observa-se que aos quatro meses de armazenamento não houve diferença entre os tipos de embalagens avaliados, independente dos tipos de tratamento (TABELA 35). No entanto, após um ano de armazenamento a embalagem a vácuo foi mais eficiente no controle de outros fungos quando comparada à embalagem de papel multifoliado para o tratamento fungicida M.

**Tabela 35:** Incidência de outros fungos, em sementes de milho doce, do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, antes do armazenamento (controle) e em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

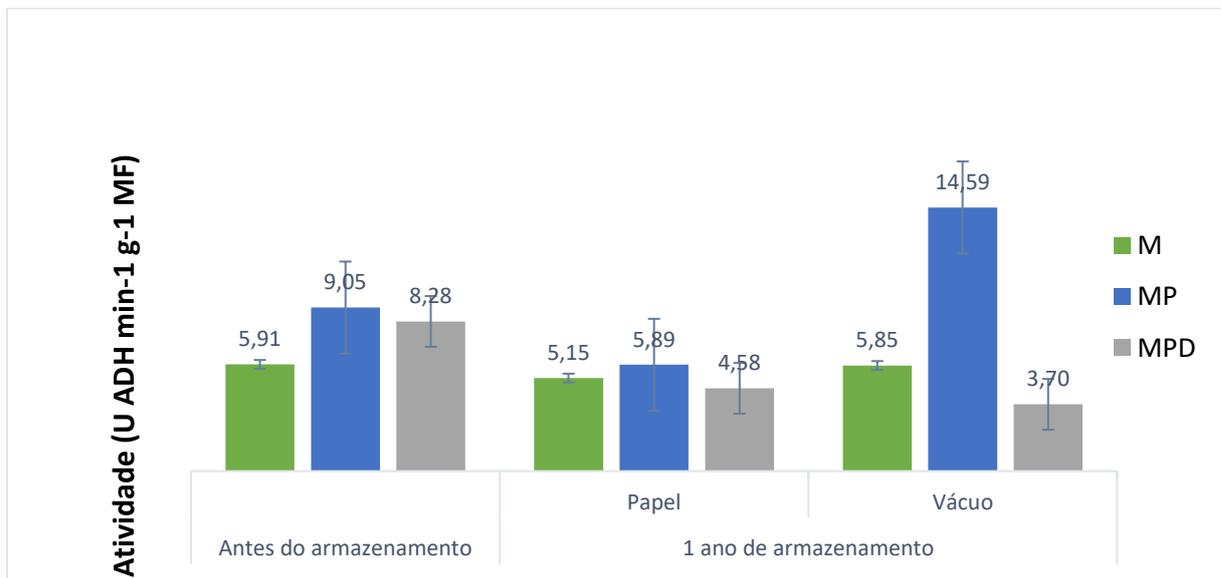
Época	4 meses			1 ano		
	M	MP	MPD	M	MP	MPD
Papel	1,5 Aa	4,5 Aa	2,5 Aa*	28,5 Bb*	24 Ab*	5,5 Aa*
Vácuo	1 Aa	2,5 Aa	3,5 Aa	9 Aa	26 Ab*	4 Aa
Controle	3,5	1	0,5*	3,5*	1*	0,5*
CV(%)	40,89					

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo Teste T.

A atividade da enzima ADH para as sementes de milho doce do híbrido C foi maior para as sementes tratadas com MP e embaladas a vácuo (FIGURA 2). Esse fato pode estar

relacionado à condição de maior anaerobiose nesse tipo de embalagem e a importante função dessa enzima nessa situação, favorecendo a manutenção da qualidade fisiológica nessa embalagem (Tabela 27). Oliveira et al. (2020) também observaram maior atividade da ADH em sementes híbridas de milho tratadas com Clotianidina e concluíram que a maior toxicidade desse inseticida pode ter causado maior deterioração, e contribuído para o aumento da taxa de respiração das sementes.

**Figura 2** - Quantificação da atividade da enzima álcool desidrogenase por espectrofotometria, em sementes de milho doce, do híbrido C, antes do armazenamento e após um ano de armazenamento, tratadas com diferentes produtos fitossanitários e embaladas a vácuo e em papel multifoliado.



De forma geral, as sementes de milho doce do híbrido A e C apresentaram maior germinação e vigor aos quatro meses de armazenamento do que após um ano de armazenamento. Os tratamentos com MP e MPD apresentaram efeito negativo na qualidade fisiológica das sementes do híbrido A, enquanto as sementes do híbrido B sofreram uma influência negativa do tratamento com MP e MPD, tratamentos com a adição de inseticidas, apenas quando armazenadas em papel multifoliado. Pesquisas realizadas com sementes de milho também relataram em algumas situações, redução da germinação e na sobrevivência de plântulas causadas pela aplicação de produtos fitossanitários isoladamente ou em combinação no tratamento de sementes devido ao efeito da fitotoxicidade (MARIUCCI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; TAMINDZIC et al., 2013; TONIN et al., 2014).

O tratamento de sementes com inseticidas é uma etapa muito importante da produção de sementes, uma vez que proporciona proteção contra ataques de insetos nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas, porém o tratamento e armazenamento dessas sementes demandam atenção ao período seguro à qualidade fisiológica, principalmente para determinadas moléculas. Smiderle e Cicero (1999) ao estudar o efeito do tratamento com inseticidas no armazenamento de sementes de milho observaram que os produtos aplicados possibilitaram a manutenção da qualidade fisiológica e o controle de insetos-praga ao longo de um período de 12 meses, enquanto a testemunha, sem inseticidas aplicados, não poderia ser comercializada com 2 meses de armazenamento, uma vez que apresentou níveis de infestação por insetos acima do permitido. No entanto, o êxito do plantio depende de sementes de alta qualidade e o uso de inseticidas pode auxiliar na prevenção de futuras perdas provocadas por diversas pragas que podem afetar o desenvolvimento da cultura nos estágios iniciais.

Além disso, o efeito do tratamento com inseticidas varia em função do genótipo, devido à variação na composição química da semente. Tamindzic et al. (2013) ao comparar o uso de Fludioxonil + Metalaxyl-M em combinação com diferentes inseticidas (Clotianidina, Imidacloprido, Tiametoxam, Tefluthrin + Tiametoxam e Fipronil) em quatro linhagens de milho observaram que o efeito das preparações aplicadas na qualidade das sementes depende da composição genética das espécies. O mesmo foi observado por outros autores ao testar diferentes inseticidas em híbridos de milho (BITTENCOURT et al., 2000; ROSA, 2012; TONIN et al., 2014). Além das diferentes classes e grupos químicos de inseticidas, a variação na resposta à aplicação de inseticidas entre os diferentes híbridos pode justificar as controvérsias encontradas na literatura quanto ao efeito dos inseticidas na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho. Portanto, se faz necessário o estudo dos efeitos provocados pelo tratamento de sementes na qualidade fisiológica e sanitária para diferentes genótipos em função de determinados grupos químicos.

Com relação ao tipo de embalagem, as sementes do híbrido A e C resultaram em maior qualidade fisiológica quando armazenadas em embalagem a vácuo. As sementes do híbrido B apresentaram menor vigor quando armazenadas em papel multifoliado e tratadas com MPD, quando os demais tratamentos foram utilizados não houve diferença entre a utilização da embalagem de papel multifoliado e vácuo. De forma contrária, Camargo e Carvalho (2008) concluíram que a embalagem de papel é mais eficiente na manutenção da qualidade de sementes de milho doce, ao testar vários tipos de embalagem após dezoito meses de armazenamento em câmara fria. No entanto, ao armazenar em ambiente natural, eles notaram que a embalagem a vácuo proporcionou um melhor desempenho na qualidade das sementes. Sementes de milho

doce submetidas ao condicionamento fisiológico e armazenadas a vácuo, em embalagem de alumínio revestidos com polietileno, apresentaram maior longevidade e vigor após um ano de armazenamento, do que sementes armazenadas no mesmo tipo de embalagem sem vácuo (CHIU; CHEN; SUNG, 2003). Os autores concluíram que o vácuo foi responsável pela diminuição das respostas peroxidativas mediadas por radicais livres.

#### **4 CONCLUSÕES**

O uso de inseticidas como Clotianidina + Clorantraniliprole, afeta negativamente o vigor de sementes de milho doce 12 meses de armazenamento na temperatura de 10 °C.

O tipo de embalagem e o tratamento com inseticidas Clotianidina + Clorantraniliprole, associadas ao fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil afetam a incidência fúngica em sementes de milho doce armazenadas.

A embalagem a vácuo proporciona armazenabilidade e mantém a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho doce durante o armazenamento em câmara fria.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

## REFERÊNCIAS

- ANTONIAZZI, A. P. . et al. **Avaliação do tratamento de sementes industrial com diferentes princípios ativos na cultura do milho. - Portal Embrapa.** XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo. **Anais...**Bento Gonçalves: 2016Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1054178/avaliacao-do-tratamento-de-sementes-industrial-com-diferentes-principios-ativos-na-cultura-do-milho>>. Acesso em: 13 ago. 2021
- ARAÚJO, E. F.; SILVA, R. F.; CORRÊA, P. C. Efeitos imediatos e latentes da temperatura e da umidade relativa do ar de secagem na qualidade fisiológica de sementes de milho-doce, cultivar BR 400. **Revista Brasileira e Sementes**, v. 22, n. 2, p. 21–30, 30 dez. 2000.
- BARZALI, M. et al. Effects of different temperatures and atmospheres on seed and seedling traits in a long-term storage experiment on rye (*Secale cereale* L.). **Seed Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 713–721, 2005.
- BENNICI, A. et al. Ageing in *Triticum durum* wheat seeds: Early storage in carbon dioxide prolongs longevity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 24, n. 2, p. 159–165, 1 jan. 1984.
- BERJAK, P. et al. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, 2011.
- BEWLEY, J. D. et al. Longevity, Storage, and Deterioration. In: **Seeds**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 341–376.
- BITTENCOURT, S. R. M. et al. Desempenho de sementes de milho tratadas com inseticidas sistêmicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 86–93, 30 dez. 2000.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- CALLAN, N. W.; MATHRE, D.; MILLER, J. B. Bio-Priming Seed Treatment for Biological Control of *Pythium Ultimum* Preemergence Damping-Off in SH-2 Sweet Corn. **Plant Disease**, v. 74, p. 368–372, 1990.
- CAMARGO, R. DE; CARVALHO, M. L. M. DE. Armazenamento a vácuo de semente de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 131–139, 2008.
- CATÃO, H. C. R. M. et al. Incidência e viabilidade de sementes crioulas de milho naturalmente infestadas com fungos em pré e pós-armazenamento. **Ciência Rural**, v. 43, n. 5, p. 764–770, maio 2013.
- CHEN, L.-Q. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. **New Phytologist**, v. 201, n. 4, p. 1150–1155, 1 mar. 2014.
- CHIU, K. Y.; CHEN, C. L.; SUNG, J. M. Partial vacuum storage improves the longevity of primed sh-2 sweet corn seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 2, p. 99–111, 18 abr. 2003.

CRUZ, J. et al. **Manual de identificação de pragas da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1997.

CUBBY, T. F.; WALLEN, J. R. Seed-borne disease of corn in 1964 and their effect on germination. **Canadian Plant Disease Survey**, v. 45, n. 1, p. 33–34, 1965.

CUNHA, S. B. T. DA. **Tratamento inseticida e armazenamento na germinação e vigor de sementes de milho**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 3 ago. 2012.

DEUNER, C. et al. Physiological performance during storage of corn seed treated with insecticides and fungicide. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 204–212, 2014.

DOUGLASS, S. K.; JUVIK, J. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. Sweet corn seedling emergence and variation in kernel carbohydrate reserves. **Seed Science and Technology**, v. 21, n. 2, p. 433–436, 1993.

ESPINDOLA, F. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas com diferentes inseticidas. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 26, n. 4, p. 306–312, 31 ago. 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

FERREIRA, T. F. et al. Sanitary quality of soybean seeds treated with fungicides and insecticides before and after storage. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 3, p. 293–300, 9 set. 2019.

FESSEL, S. A. et al. Efeito do tratamento químico sobre a conservação de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 25–28, jul. 2003.

GALLI, J. A. et al. Influência do tratamento químico na população de fungos, na germinação e no vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 245–249, 2000.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E. et al. Effect of the gaseous environment and water content on seed viability of four Brassicaceae species after 36 years storage. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 443–451, 2011.

GOULART, A. C. P.; FIALHO, W. F. B. Ocorrência de fungos em sementes de milho “BR 201” produzidas na região de Dourados, MS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 79, 1998.

GROOT, S. P. C. et al. Prolonging the longevity of ex situ conserved seeds by storage under anoxia. **Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation**, v. 13, n. 1, p. 18–26, 2015.

LORENZETTI, E. R. et al. Influência de inseticidas sobre a germinação e vigor de sementes de milho após o armazenamento. **Cultivando o Saber**, v. 7, n. 1, p. 14–23, 2014.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras:

ESAL/FAEPE, 1988.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C. (Ed.). . **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. v. 1p. 1–21.

MARCOS VALLE, F. J. et al. Study and modelling the respiration of corn seeds (*Zea mays* L.) during hermetic storage. **Biosystems Engineering**, v. 208, p. 45–57, 1 ago. 2021.

MARIUCCI, G. E. G. et al. Physiological potential of maize seeds submitted to different treatments and storage periods. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 1, p. 60–66, 1 jan. 2018.

OLIVEIRA, C. F. et al. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 3, p. 520–532, 2011.

OLIVEIRA, T. L. DE et al. Biochemical changes and physiological quality of corn seeds subjected to different chemical treatments and storage times. **Journal of Seed Science**, v. 42, 7 dez. 2020.

OLIVEIRA, V. R. DE. **Tratamento industrial de sementes: quantificação do ingrediente ativo em lotes de milho doce**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 15 jun. 2016.

PELLOSO, M. F. et al. Efeito do tratamento de sementes com inseticida sistêmico sobre a germinação do milho doce. **Encontro Internacional de Produção Científica**, p. 1–4, 30 out. 2019.

PEREIRA FILHO, I. A.; TEIXEIRA, F. F. **O cultivo do milho doce**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2016.

RAMOS, N. P.; MARCOS FILHO, J.; GALLI, J. A. Tratamento fungicida em semente de milho super-doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 24–31, 2008.

RIVERA, A. A. C. et al. Efeito do ácido giberélico na qualidade fisiológica de sementes redondas de milho doce, sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 3, p. 247–256, 2011.

ROBERTS, E. H.; ABDALLA, F. H. The Influence of Temperature, Moisture, and Oxygen on Period of Seed Viability in Barley, Broad Beans, and Peas. **Annals of Botany**, v. 32, n. 1, p. 97–117, 1 jan. 1968.

ROCHA, D. K. et al. Does the substrate affect the germination of soybean seeds treated with phytosanitary products? **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, p. 2020, 11 maio 2020.

ROSA, K. C. **Armazenamento de sementes de milho híbrido tratadas com tiametoxam**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2012.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4423–4436, 1 out. 2010.

- SHEJBAL, J. Preservation of cereal grains in nitrogen atmospheres. **Resource Recovery and Conservation**, v. 4, n. 1, p. 13–29, 1 maio 1979.
- SHRESTHA, K. B.; SHEPERD, K. R.; TURNBULL, J. W. S. Controlled atmosphere storage for *Pinus radiata* seed. **The Commonwealth Forestry Review**, v. 64, n. 2, p. 141–150, jun. 1985.
- SILVA, M. T. B. Inseticidas na proteção de sementes e plantas. **Seed News**, p. 26–27, 1998.
- SMIDERLE, O. J.; CICERO, S. M. Tratamento inseticida e qualidade de sementes de milho durante o armazenamento. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1245–1254, 1999.
- STEFANELLO, R. et al. Physiological and sanitary qualities of maize landrace seeds stored under two conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 339–347, 31 jul. 2015.
- STYER, R. C.; CANTLIFFE, D. J. Dependence of Seed Vigor during Germination on Carbohydrate Source in Endosperm Mutants of Maize. **Plant Physiology**, v. 76, n. 1, p. 196, 1984.
- TAMINDZIC, G. et al. Effect of seed treatments with neonicotinoids on maize inbred lines seed quality. **Ratarstvo i povrtarstvo**, v. 50, n. 3, p. 37–44, 2013.
- TANAKA, M. A. S.; BALMER, E. Efeito da temperatura e dos microorganismos associados ao tombamento na germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 87–93, 1980.
- TONIN, R. F. B. et al. Potencial fisiológico de sementes de milho híbrido tratadas com inseticidas e armazenadas em duas condições de ambiente. **Scientia Agropecuaria**, v. 5, n. 1, p. 7–16, 30 mar. 2014.
- TRACY, W. F. Sweet corn. In: HALLAUER, A. R. (Ed.). **Specialty corns**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 155–198.
- VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994.
- VON PINHO, E. V. R. et al. Efeitos do tratamento fungicida sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 1, p. 23–28, 1995.
- YAMANOSHITA, T. et al. Effects of flooding on downstream processes of glycolysis and fermentation in roots of *Melaleuca cajuputi* seedlings. **Journal of Forest Research** 2005 **10:3**, v. 10, n. 3, p. 199–204, jun. 2005.
- ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, v. 4, n. 1, p. 49–56, 1 mar. 1994.
- ZHANG, M. et al. Aging of Soybean Seeds in Relation to Metabolism at Different Relative Humidities. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 7, p. 1189–1195, 1 out. 1995.

### **CAPÍTULO 3 - OXYGEN EFFECT, RELATIVE HUMIDITY AND TEMPERATURE ON SWEET AND WAXY CORN SEEDS STORAGE**

#### **ABSTRACT**

Sweet corn seeds have high sugar content in the endosperm, to the detriment of starch, this characteristic makes the seeds more susceptible to pests and diseases, and causes low germination and vigor. Among the factors that influence the physiological quality of seeds during storage, relative humidity, temperature and the presence of oxygen are considered fundamental factors for seed conservation. Oxygen-restricted conditions prolong seed longevity during storage, however, relative humidity and storage temperature in airtight conditions are important, since high temperatures and relative humidity can intensify respiration processes. Therefore, this study was carried out with the aim of investigating the effect of storage conditions on the deterioration of sweet corn seeds. Sweet corn and waxy corn seeds were used to construct sorption and desorption isotherms and to evaluate oxygen consumption, carbon dioxide and ethanol production during storage in airtight packaging. In addition, sweet corn seeds were stored for eighteen months under different conditions of relative humidity (30, 45 and 60%), temperature (20 and 30 °C) and oxygen concentrations (1, 5, 10, 21, 50 and 99%), and evaluated by measuring oxygen consumption, carbon dioxide and ethanol production and through the germination test after six and eighteen months of storage. The storage of sweet and waxy corn seeds under oxygen-restricted conditions with water activity levels above 0.7 causes anaerobic respiration and accelerates seed deterioration processes. Sweet corn seeds have a greater longevity when stored under conditions of 30% relative humidity and oxygen contents of 1% to 10%, at a temperature of 30 °C. However, when stored at a temperature of 20 °C, only a reduction in relative humidity to 30% or 45% is enough to prolong the longevity of sweet corn seeds.

## 1 INTRODUCTION

Sweet corn seeds have high sugar content and low starch content when compared to corn, which is caused by the presence of individual or associated mutant recessive genes that affect endosperm development (CREECH, 1965; TRACY, 1997). The composition of the sweet corn seeds endosperm is responsible for the quality maintenance problems of the seeds, which is attributed to the crystallization of sugars in the endosperm and the formation of internal spaces between the aleurone layer and the pericarp, caused during drying (DOUGLASS; JUVIK; SPLITTSTOESSER, 1993). Due to this characteristic, the seeds have a wrinkled appearance and consequently a more fragile pericarp, which is more susceptible to post harvest damages and the entry of pathogens.

Deterioration of seeds manifests itself throughout time during storage, causing negative reflexes in vigor. Manifestations of the deteriorative process include loss of membrane integrity, changes in enzymatic activities, decline in protein and nucleic acid synthesis, and DNA injuries (MCDONALD, 1999). Those alterations of cellular, metabolic and chemical levels have been related to the increase of reactive oxygen species and lipid peroxidation (BERJAK et al., 2011; MCDONALD, 1999).

Antioxidative enzymes are affected to Maillard reactions and a decline in the ability of the cell to prevent from oxidative damages during germination is responsible for a decline in seed vigor and viability (MURTHY; KUMAR; SUN, 2003). Some studies have associated loss of sweet corn seeds viability during storage with lower activities of antioxidative systems (CHANG; SUNG, 1998; CHIU; CHEN; SUNG, 2003), as a result oxidative events may be intensified leading to loss of viability of the seeds.

The environment conditions of the storage also influence the rate of seed deterioration. Temperature, relative humidity and oxygen (O<sub>2</sub>) are the most important factors that affect the physiological quality of seeds during storage (BEWLEY, J. D.; BLACK, 1994; GROOT et al., 2015). Low temperature and low seed moisture are effective means of maintaining seed quality for longer storage of orthodox seeds (ROBERTS, 1973). However, the storage becomes very expensive when reduced temperature is used in most parts of the world. In some cases, it is more economical to store the seeds with reduced moisture content in association with a reduced presence of molecular O<sub>2</sub>.

During long storage of seeds mold and insects are practically unavoidable. Oxygen free storage may allow to reduce insect presence and fungi growth, maintain quality and reduce financial losses. However, an environment with reduced oxygen atmosphere and high relative

humidity can cause respiration, therefore the moisture content of the seeds ideal for storage must be determined. When exceeds a critical moisture dew forms in the package, which starts respiration and can enhance the metabolic activity of the seeds. In addition, high moisture contents can induce microorganism growth, mostly fungi and bacteria, which have a great impact on the quality of the seeds and the storage time (RAUDIENĖ et al., 2017).

The balance between the ideal moisture content of the seeds and oxygen restriction must be weighed in each situation. Raudienė et al. (2017) observed that the respiration production increased for wheat grains as moisture content and temperature increased. On the other hand, Araujo and Barbedo (2017) observed that drying *Caesalpinia echinata* seeds reduces respiratory activity, which reduces reserve consumption, but intensifies oxidation processes, accelerating deterioration. The effects of moisture content on seed longevity may be species specific, depending on the nature of the storage and seed composition.

It is of great significance during seeds production to have a long-term preservation of the seeds. Therefore, the conditions of the storage environment as relative humidity, temperature and O<sub>2</sub> concentration must be evaluated for different species or even varieties. In this way, the present study was conducted to ameliorate sweet corn seed storage by examining storage with oxygen restriction and different relative humidity levels for different varieties.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

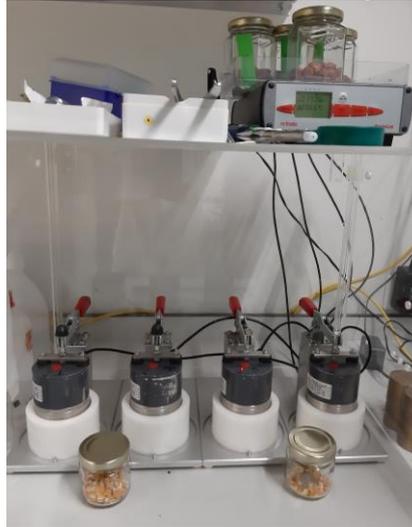
Sweet and waxy corn seeds provided by the East West Seed company were used to study the oxygen effect on viability of the seeds during storage. Upon arrival, a fraction of the seeds was separated to determine the sorption isotherm and O<sub>2</sub> consumption of the seeds, and equilibrated for 24 hours at 20 °C and 30% relative humidity and the water activity was measured using a hygrometer. The rest of the seeds were stored hermetically sealed in the freezer at -28 °C with 30% relative humidity until the beginning of the third experiment.

### **2.1 Experiment 1: Sweet and waxy corn seeds sorption and desorption isotherm**

A sample of 400g seeds of three varieties of sweet corn (SC1, SC2 and SC3) and two varieties of waxy corn seeds (WC1 and WC2) were used to construct the curve of the relationship between water activity and moisture content of sweet corn seeds. The seeds were divided in ten samples of 40 g and dried in a chamber with circulating air at 30% relative humidity to obtain the desorption isotherm and humidified at 95% relative humidity to obtain

the sorption isotherm. Subsequently the samples were stored for at least 24 hours in a closed jar to equilibrate. Thereafter, the water activity was determined using a hygrometer (FIGURE 1) and the moisture content was determined using the oven at 103 °C / 17h according to ISTA rules (ISTA, 2018).

Figure 1 - Measurements of the water activity using hygrometers.



## **2.2 Experiment 2: Relationship between oxygen uptake, ethanol production and water activity for sweet and waxy corn seeds**

A sample of 750 seeds of three varieties of sweet corn (SC1, SC2 and SC3) and two varieties of waxy corn seeds (WC1 and WC2) was taken to determine the relationship between oxygen uptake, ethanol production and water activity. The seeds were humidified in a chamber set at 95% relative humidity and 20 °C, and were retrieved after different durations of time, to obtain ten water activity levels.

Jars of 50 ml, with the proportion around 25 g, were prepared. An oxygen sensor dot was placed inside the jars to allow the measurement of the O<sub>2</sub> concentration with the PreSens system during the storage period. In the lid of the jars a hole was made for analysis of ethanol, O<sub>2</sub> and carbon-dioxide concentrations at the end of the storage experiment. The opening was closed with sticky aluminum tape to prevent leakage. On top of the aluminum sticky tape also a rubber seal was fixed to reduce leakage upon sampling with the Oxybaby and breath analyzer.

Subsequently, the seeds were placed in the glass jars until fully filled, and planted at a 20 °C chamber in three replicates randomized positioned. Measurements of the oxygen concentration were taken with the PreSens system, through the oxygen sensor dots for 42 days (FIGURE 2). After this period, oxygen and carbon dioxide concentrations in the jars was

measured using gas analyzer Oxybaby (FIGURE 3). Ethanol concentrations was also measured in the headspace of the jars with a modified breath analyzer (FIGURE 4) (KODDE et al., 2012).

Figure 2 - Measurements of oxygen concentration with the PreSens system, through the oxygen sensor dots on the jars.



Figure 3 - Measurements of oxygen and carbon dioxide concentrations using gas analyzer Oxybaby.



Figure 4 - Measurements of ethanol concentrations in the headspace of the jars using a modified breath analyzer.



The activity of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) was also evaluated after the storage, for sweet corn 1 and waxy corn 1, at four water activity levels, from 0,6 to 0,8, in two replicates for each treatment. The extract was obtained by maceration of the seeds in liquid nitrogen, and from it 0.2 g were taken, to which 0.8 mL of extraction buffer containing HEPES (2-[4- (2-hydroxyethyl) acid - piperazin-1-yl]-ethanesulfonic) 0.2 M (pH 7.5), 87% glycerol,  $\beta$ -mercaptoethanol, water and 6% PVP (polyvinylpyrrolidone). The extraction solution was centrifuged at 14,000 RPM for 10 minutes at 4 °C, and the supernatants were collected and applied in triplicate to 96-well ELISA microplates.

The ADH activity was assessed by adding an aliquot of 9  $\mu$ L of the enzymatic extract to 180  $\mu$ L of the incubation solution. Ethanol at 1% (v / v) was added at the time of reading, which was performed by spectrophotometry at 340 nm for three minutes, after the reduction of NAD + (Nicotinamide adenine dinucleotide), according to Yamanoshita et al. (2005), with modifications. The calculation of enzymatic activity was given by the amount of NADH produced per minute of incubation.

### 2.3 Experiment 3: Evaluation of the effect of oxygen on sweet corn seeds storage

For this experiment, the seeds of the sweet corn 1 used in the first and second experiment were taken from the freezer and equilibrated in the laboratory bench at 20 °C for at least 24 hours before the experiment start. The seeds were then equilibrated to 30, 45 and 60% relative humidity and placed in hermetic glass jars. The jars, 106 ml in volume and containing around 7g seeds, were flushed with air-oxygen mixtures in concentrations of 1, 5, 10, 21, 50 and 99%

oxygen. Thereafter, the jars were placed in temperature-controlled chambers, at 20 °C and 30 °C. Control samples were stored in the freezer at -28 °C in ten replicates.

Sampling of the jars were made in different periods during the storage, with the samples stored under the most deteriorating conditions (60% eRH, 99% Oxygen and 30 °C). Only when the germination test showed that seeds stored under those conditions begun to decline in germination quality, samples stored at all conditions were evaluated.

The first evaluation was made with six months of storage and the second evaluation was made with eighteen months of storage. In each evaluation, the physiological quality of the seeds was assessed through germination test in two replicates of 25 seeds on filter paper moistened with water, in a growth cabinet at 22 °C under light for seven days. The percentage of normal germinated seeds at the end of the test was calculated (ISTA, 2018).

Before opening, O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations in the jars was measured using the gas analyzer Oxybaby and analysis of ethanol production with a modified breath analyzer.

### **3 RESULTS**

#### **3.1 Experiment 1: Sweet and waxy corn seeds sorption and desorption isotherm**

The acquired sorption and desorption isotherms exhibit an increase in moisture content with increasing water activity at the constant temperature of 20 °C, with a sigmoidal shape (FIGURE 5), for all sweet and waxy corn seeds. The sigmoidal shape can be explained by the strength with which water is bound to the seed tissues, which indicates three regions in the moisture isotherm. The first region is represented by structural water, in which the molecules are connected through hydrogen bonds on a monolayer and absorbed by hydrophilic and polar groups of the seed (LABUZA, 1975). In the second region of the isotherm, several layers of water connect to the first layer by hydrogen bonding, and is followed by the third region where the water molecules are held capillary in the empty spaces. Different varieties of the same species have the ability of bounding different amount of water to the binding sites (CHATTERJEE; NAGARAJAN, 2006), which results in different isotherms.



The sweet corn varieties had higher values of moisture content in relation to the water activity, when compared to the waxy corn varieties, this may have occurred due to the significant difference in the composition of the varieties. Dong et al. (2019) observed that sweet corn varieties had an average of 7,38% to 10,28% of soluble sugars in kernels of fresh ears, whereas waxy corn had below 2% sugar content. The same happened with sweet corn when compared with supersweet corn in the study of desorption isotherms of sweet corn cultivars, in which sweet corn cultivars had higher values of moisture content in comparison with the supersweet corn cultivar, that has higher sugar content (OLIVEIRA et al., 2010). The shape of the isotherm is characteristic of products with high sugar, which exhibit relatively small amounts of moisture content at low water activity levels and a substantial increase at high water activities, as a result of the solute-solvent effect interactions associated with sugar dissolution (SARAVACOS; TSIOURVAS; TSAMI, 1986).

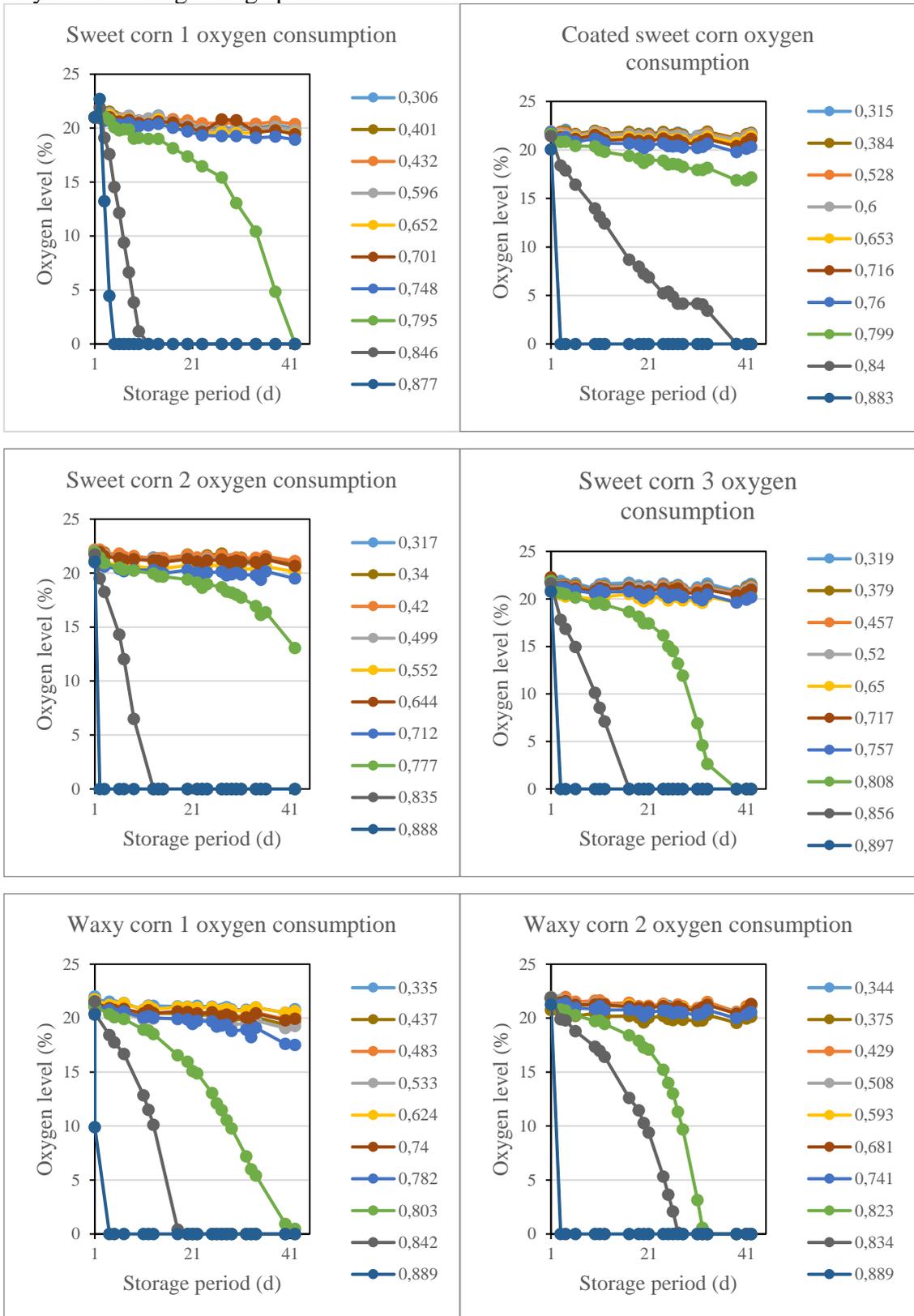
Obtaining the sorption and desorption isotherm of seeds is important to understand the moisture variations during storage and determine the moisture content suitable for storage under different relative humidity conditions. Seeds stored with higher water activity levels are subjected to insect propagation and fungi development, besides faster deterioration, rapidly reducing viability during storage (ZHANG et al., 2021). Isotherms are unique for each agricultural product, and can exhibit a different behavior between species and even between different varieties, since the hygroscopicity of the product varies according to the relations that exist between water and the components present in the product. Therefore, it is important to obtain the sorption and desorption isotherm that best represent each material.

### **3.2 Experiment 2: Relationship between oxygen uptake, ethanol production and water activity for sweet and waxy corn seeds**

The rate of O<sub>2</sub> consumption measured in the headspace of the hermetically closed jars for each variety of sweet and waxy corn is reported in Figure 6. O<sub>2</sub> concentration showed a progressive reduction for high water activity levels through observation period regardless of the corn type, however, the rate of O<sub>2</sub> uptake varied between the corn varieties. The O<sub>2</sub> concentration in the sealed jars dropped to zero within three to five days of storage for sweet corn and waxy corn seeds at water activity levels higher than 0,88. The seeds with 0,80 to 0,85 water activity followed the same pattern, reducing the O<sub>2</sub> concentration in the jars to zero over different periods, depending on the corn type. Waxy corn 2 seeds with 0,8 water activity

exhibited a faster O<sub>2</sub> consumption than waxy corn 1, followed by sweet corn 1, 3, 2 and coated sweet corn, which had the lowest rate of O<sub>2</sub> consumption (FIGURE 6).

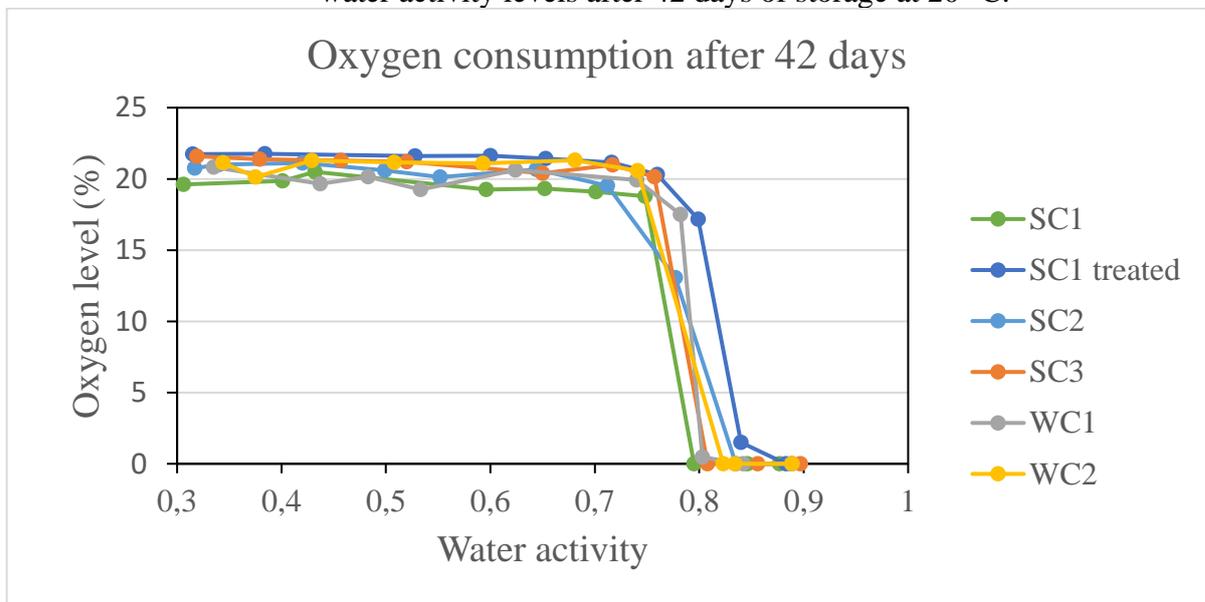
Figure 6 - Rate of oxygen consumption of sweet and waxy corn seeds at different water activity levels during storage period



The period of time at which O<sub>2</sub> uptake by the seeds is consumed faster is determined by the moisture content in the seeds. Analyzing the O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration during hermetic storage of corn seeds, Marcos Valle et al. (2021) observed that the higher the moisture content of the seeds, less days were taken to decrease O<sub>2</sub> to zero and start respiration.

Figure 7 illustrates O<sub>2</sub> consumption after 42 days by the sweet corn and waxy corn seeds during hermetic storage at different water activities at 20 °C. In general, the O<sub>2</sub> concentration decreased more rapidly with the increase in water activity. After 42 days of storage the O<sub>2</sub> levels in the headspace of the jars were depleted for water activity levels higher than 0.8 (FIGURE 7), which shows that is no longer safe to store sweet corn seeds at water activity levels above 0.75.

Figure 7 - Rate of oxygen consumption of sweet (SC) and waxy corn (WC) seeds at different water activity levels after 42 days of storage at 20 °C.

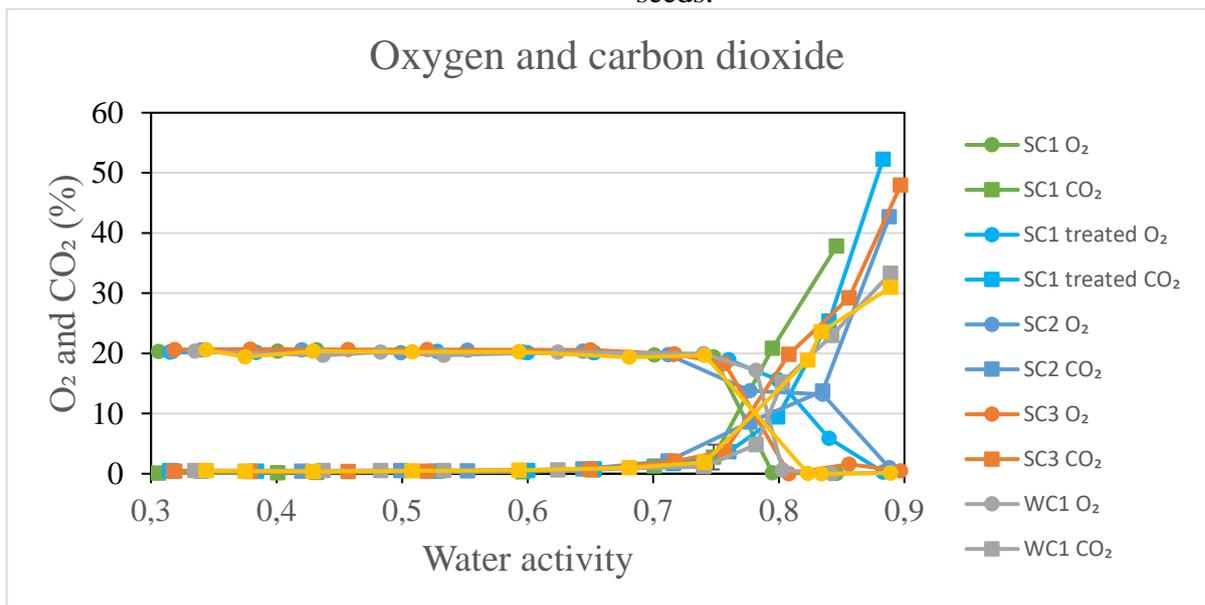


If the storage temperature increases, the water activity levels will rise and storage should be at even lower water activity levels. When comparing the rate of O<sub>2</sub> consumption in hermetic storage at different temperatures and moisture contents, Marcos Valle et al. (2021) observed that for corn seeds stored at 35 °C and higher moisture content (18,4%), the O<sub>2</sub> concentration depleted in one day, whereas when stored at 25 °C, in 3,5 days and at 15 °C in 12 days for the same moisture content. Moreover, an increase in temperature enhances enzyme activity and consequently O<sub>2</sub> consumption and ethanol production by the seeds.

At the end of the experiment the O<sub>2</sub> concentration in the headspace of the jars was measured once again using gas analyzer Oxybaby for more accurate data (FIGURE 8). Similar data were observed as with the measurements using the oxygen dots. In general, the peak of

carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) increased with water activity. The levels of CO<sub>2</sub> started to rise at a water activity of 0.65 and increased with the water activity level (FIGURE 8). CO<sub>2</sub> is mainly a product of aerobic respiration, but some CO<sub>2</sub> can also be released in the lipid degradation pathway (VERTUCCI, 1989). It may be that the CO<sub>2</sub> produced at a water activity 0.65 or 0.7 is due to that latter pathway, but low levels of aerobic respiration can't be excluded.

Figure 8 - Oxygen and carbon dioxide percentages measured in the headspace of the jars with oxybaby after 42 days of storage at 20 °C, for sweet (SC) and waxy corn (WC) seeds.

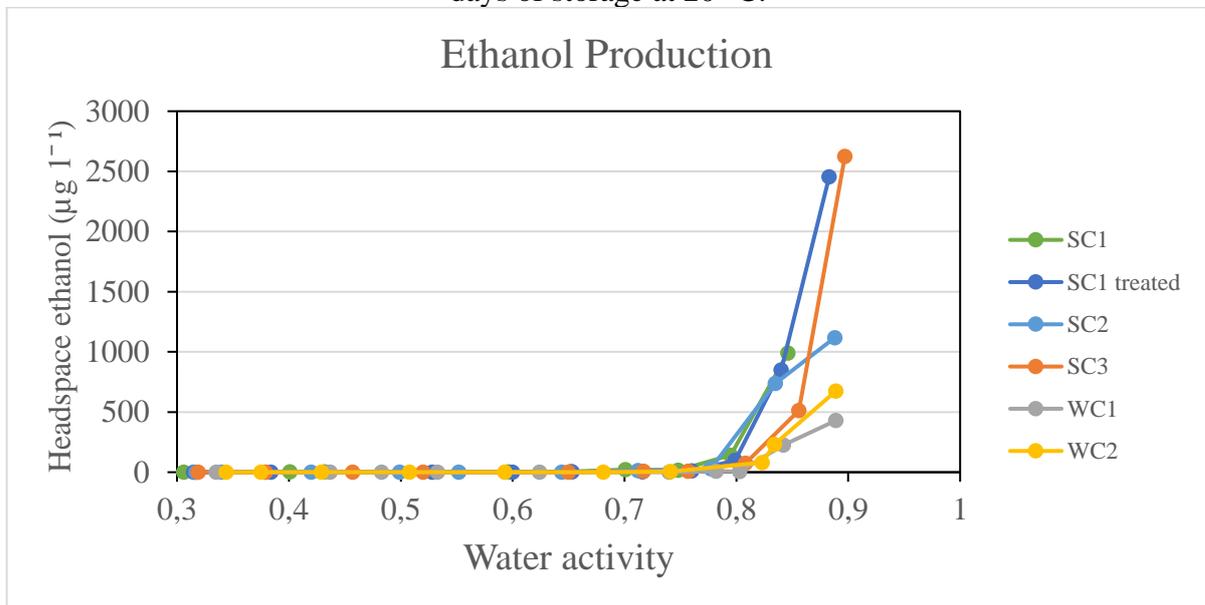


The humidity of the seeds is responsible for the O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> production that affect the dynamics of respiration in the seeds and microorganism propagation (MARCOS VALLE et al., 2021). The O<sub>2</sub> effect in the longevity of seeds is more pronounced at higher moisture levels, as a result of an increase in oxidation, resulting in membrane degradation and seed deterioration (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2021). At higher water activity levels enzymes that consume O<sub>2</sub> can become active and respiration can start (VERTUCCI, 1989).

During the storage, water activity levels higher than 0,90 can also stimulate the propagation of facultative aerobic or anaerobic microorganisms, that are capable of generate CO<sub>2</sub> even when O<sub>2</sub> is no longer available (MAGAN; LACEY, 1984). The maximum CO<sub>2</sub> reached in this work confirm this assumption, since CO<sub>2</sub> was still generated when O<sub>2</sub> was depleted. Marcos Valle et al. (2021) observed the same results when studying the respiration of corn seeds under hermetic storage.

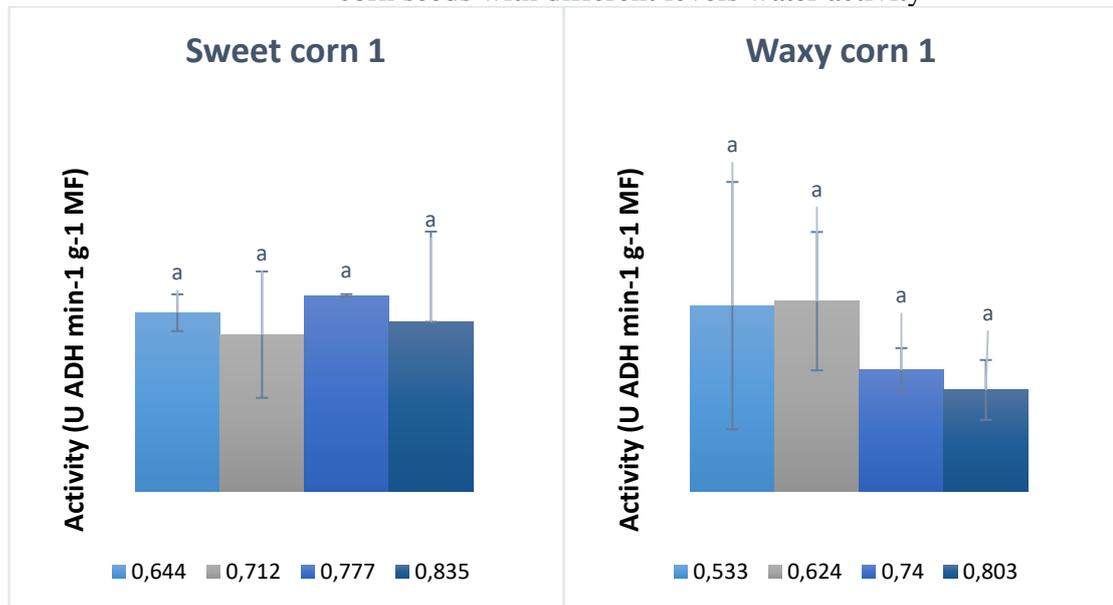
In the absence of  $O_2$ , anaerobic respiration results in ethanol production, which is related with seed deterioration (BUCKLEY; HUANG, 2011; CHAENGSAKUL et al., 2019; KODDE et al., 2012). Figure 9 illustrates the ethanol production in the headspace of the jars after 42 days of storage, with similar results to those for  $CO_2$  in that there was an increase at water activity levels above 0.75 for all corn varieties. The highest ethanol production was observed for the seeds with 0.89 water activity, which got to  $2623 \mu g l^{-1}$ . The ethanol accumulation in jars with seeds with higher water activity is also an indication of anaerobic respiration under lack of  $O_2$  environment, in which ethanol is a product of fermentation (ZHANG et al., 1995).

Figure 9 - Headspace ethanol production by sweet (SC) and waxy corn (WC) seeds after 42 days of storage at 20 °C.



The alcohol dehydrogenase (ADH) activity was quantified for SC1 and WC1 seeds with 0,5 to 0,8 water activity levels (FIGURE 10). For both corn seeds there was no difference on the enzyme activity between the different activity levels. ADH enzyme is responsible for ethanol reduction to acetaldehyde (BEWLEY et al., 2013), and acetaldehyde is a compound that causes deterioration in seeds (ZHANG et al., 1994). Although there was ethanol production above 0,75 water activity (FIGURE 9), the ADH enzyme was already active from 0,64 water activity for sweet corn and 0,53 for waxy corn, and acetaldehyde could have been produced. However, more activity levels of sweet and waxy corn seeds need to be analyzed for ADH enzyme activity.

Figure 10 - Quantification of the alcohol dehydrogenase enzyme activity, in sweet and waxy corn seeds with different levels water activity



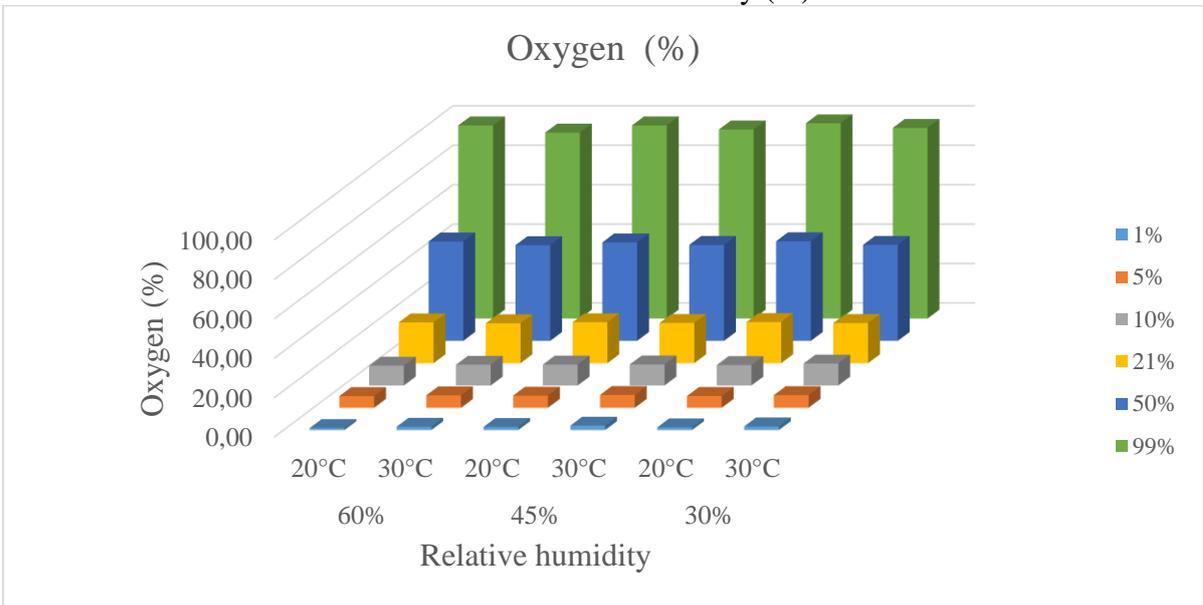
Means followed by the same letter do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.

The relation between seed water activity and seed moisture content varies between seeds due to the differences in composition, since sweet corn seeds have different compositions when compared to waxy corn seeds or even when compared to different sweet corn varieties, which have different sugar content. Based on the results, it can be confirmed that anoxia storage of sweet and waxy corn seeds is not recommended at water activity levels of 0.7 or higher. This water activity corresponds to a moisture content of 11 to 13%, depending on the corn variety, according to the isotherms obtained in the first experiment.

### 3.3 Experiment 3: Evaluation of the effect of oxygen on sweet corn seeds storage

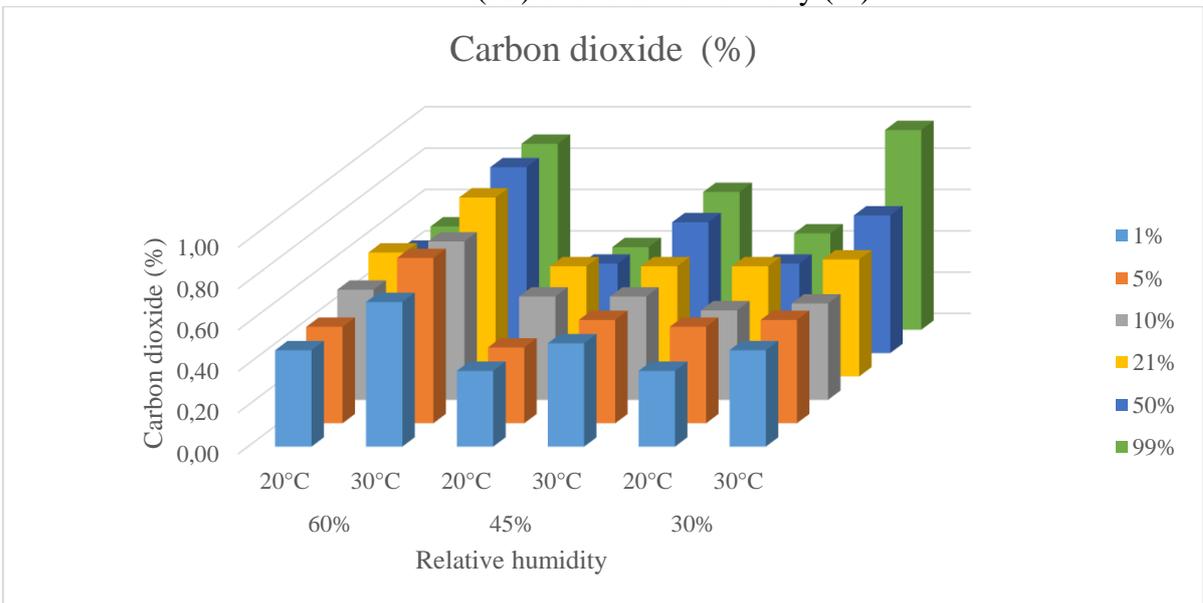
Oxygen levels within hermetically closed jars containing sweet corn seeds didn't change within six months of storage, indicating that there was no oxygen uptake by the seeds during the period, even for the seeds with 99% O<sub>2</sub> (FIGURE 11).

Figure 11 - Oxygen percentages measured in the headspace of the jars with oxybaby after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).



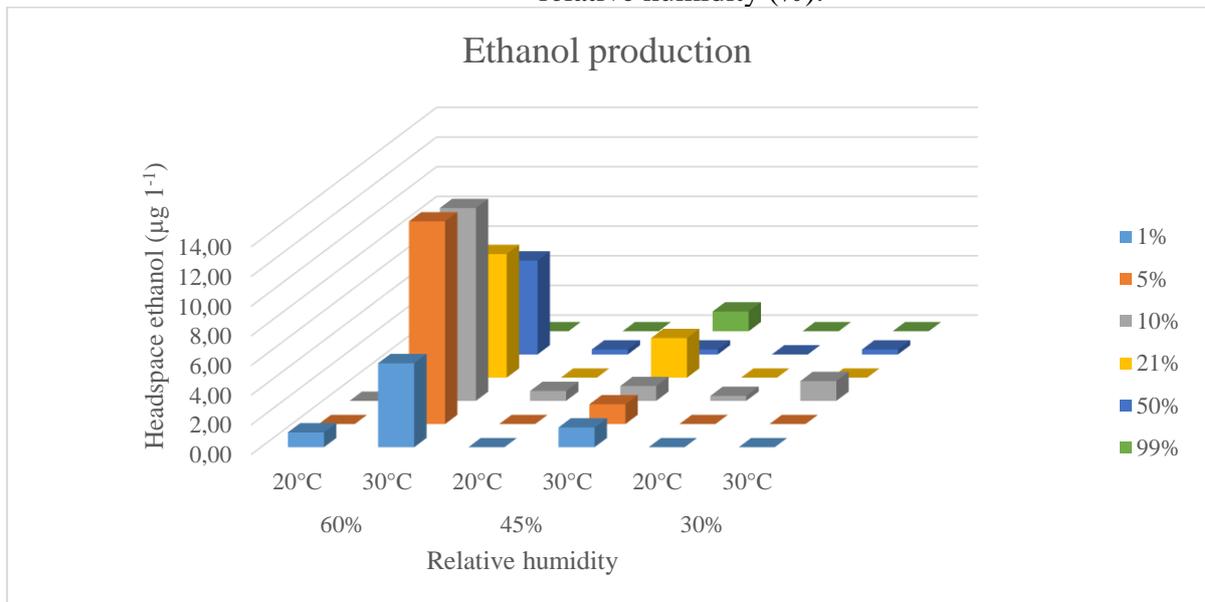
During the period of six months the CO<sub>2</sub> in the headspace of the jars didn't increase for the jars stored at 20 °C, remaining between 0,4% - 0,5 % for all relative humidity conditions and oxygen concentrations (FIGURE 12). However, the jars stored at 30 °C and 60% relative humidity, had an increase on the CO<sub>2</sub> concentrations varying from 0,7% - 0,9% for all oxygen concentrations. The jars stored at 30 °C with 50% and 99% oxygen concentrations had a higher average of CO<sub>2</sub>, ranging from 0,6% - 0,9%.

Figure 12 Carbon dioxide percentages measured in the headspace of the jars with oxybaby after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).



Ethanol production from the sweet corn seeds was analyzed after six months of storage with the breath analyzer right after measuring CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> with the oxybaby. The samples showed a marked variation in ethanol production (FIGURE 13). In general, seeds stored at 20 °C for all relative humidity conditions, and seeds stored at 30 °C with 30% relative humidity did not produce or produced less than 1 µg l<sup>-1</sup> of ethanol regardless of the oxygen concentration in the jars. However, seeds stored at 30 °C with 45% and 60% relative humidity resulted in ethanol production. The highest ethanol production at 30 °C was observed for the seeds stored with 60% relative humidity and 5 and 10% oxygen concentrations.

Figure 13 - Ethanol measured in the headspace of the jars with a breath analyzer after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).



According with the results of the statistical analysis, a triple interaction was observed between the three factors studied, oxygen concentration, temperature and relative humidity for the results of the germination test after six months of storage. The seeds stored at 30 °C had lower germination when compared to 20 °C at 60% relative humidity for all oxygen concentrations. At 30 and 45% relative humidity the germination percentages did not variate regardless of the oxygen concentration in the jars and the temperature of storage (Table 1).

**Table 1** Germination (%) of sweet corn seeds after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature and relative humidity (%).

Oxygen (%)	Temperature (°C)	Relative humidity (%)		
		30	45	60
1	20	88aA	88aA	88aA
	30	88aA	80aA	44bB
5	20	84aA	88aA	80aA
	30	84aA	84aA	48bB
10	20	88aA	88aA	84aA
	30	80aA	84aA	44bB
21	20	88aA	92aA	84aA
	30	80aA	76aA	32bB
50	20	92aA	88aA	84aA
	30	84aA	80aA	32bB
99	20	88aA	92aA	92aA
	30	80aA	80aA	36bB

Means followed by the same uppercase letter in the column and lowercase letter in the row, do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.

With regard to the oxygen concentration in the jars, seeds stored at 30 °C, with 60% relative humidity, had a higher germination when stored with 1, 5 and 10 % oxygen compared to seeds stored with 21, 50 and 99% oxygen in the jars (Table 2). For the seeds stored at 30 °C, with 45% and 30% relative humidity and all the seeds stored at 20 °C the germination didn't change for the different oxygen concentrations analyzed.

**Table 2** Germination (%) of sweet corn seeds after six months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).

Relative humidity (%)	Temperature (°C)	Oxygen (%)					
		1	5	10	21	55	99
30	20	88a	84a	88a	88a	92a	88a
	30	88a	84a	80a	80a	84a	80a
45	20	88a	88a	88a	92a	88a	92a
	30	80a	84a	84a	76a	80a	80a
60	20	88a	80a	84a	84a	84a	92a
	30	44a	48a	44a	32b	32b	36b

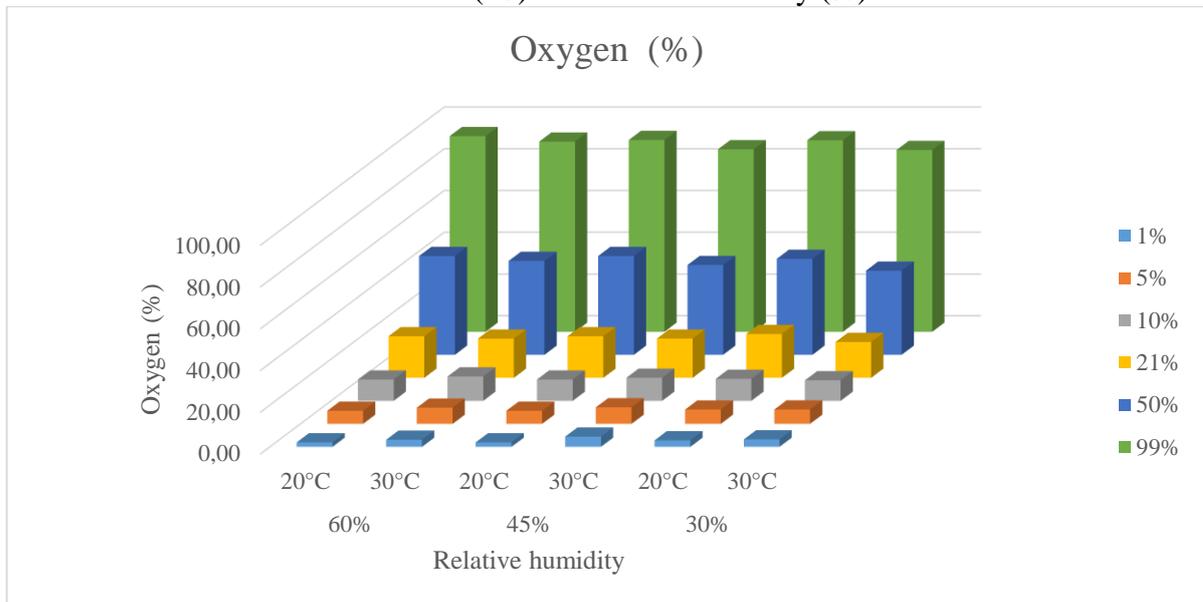
Means followed by the same letter in the row do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.

When studying the storage of maize under hermetic conditions at 30 °C for different moisture levels, Weinberg et al. (2008) also observed higher germination and vigor for the grains stored at low moisture content, however the highest germination for 75 days of storage was 58% at 14% moisture content. Although both studies worked with the same species, the

present study shows that for sweet corn seeds it is possible to maintain a higher germination for six months of storage at 30 °C at lower moisture contents, since the relative humidity of 30% and 45% includes the range of 7 to 9% moisture content, according to the isotherms of the first experiment.

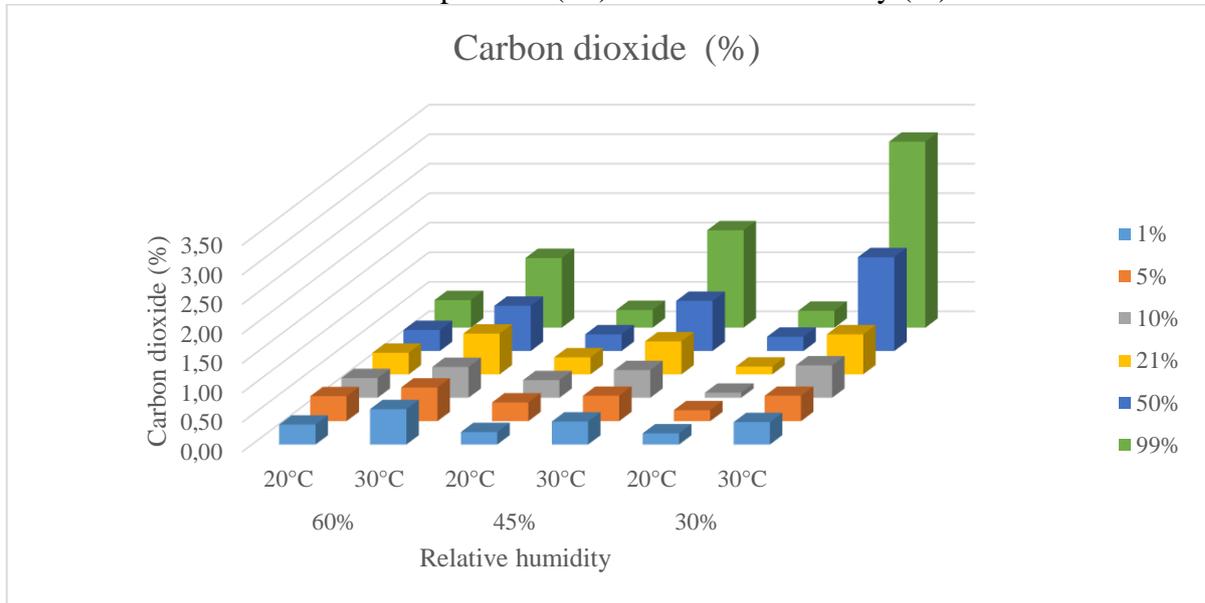
After eighteen months of storage another sampling was made, and the oxygen and carbon dioxide percentages were measured in the jars. The seeds stored with 1% oxygen had an increase on the oxygen concentration to 2% - 4,9%, and the seeds stored with 5% oxygen increased the oxygen concentration to 7% - 7,9% (FIGURE 14). While the seeds stored with 10% oxygen did not have a change on the oxygen concentrations and the seeds stored at 21% relative humidity had a decrease of 2% in the oxygen concentrations, the seeds stored at 50% had a decrease of 3% when stored at 20 °C and of 5% when stored at 30 °C, and the seeds stored at 99% oxygen decreased 7% when stored at 20 °C and 9% - 11% when stored at 30 °C.

Figure 14 - Oxygen percentages measured in the headspace of the jars with oxybaby after eighteen months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).



The highest CO<sub>2</sub> measured in the jars after eighteen months of storage was observed for the seeds stored at 30 °C, with 99% oxygen for all relative humidity conditions, followed by the seeds stored with 50% oxygen (FIGURE 15). The seeds stored at 20 °C with 30% relative humidity had the lowest percentages of carbon dioxide production in the jars. An increase of the production of CO<sub>2</sub> at higher humidity levels in sealed containers during the storage of maize was also observed by (WEINBERG et al., 2008).

Figure 15 - Carbon dioxide percentages measured in the headspace of the jars with oxybaby after eighteen months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).



Differently from the evaluation made after six months of storage, that only seeds with 60% relative humidity had a lower germination, after eighteen months of storage, seeds with 30%, 45% and 60% had lower germination when stored at 30 °C than at 20 °C for all oxygen concentrations (Table 3). With regard to the relative humidity, seeds stored at 20 °C had the lowest germination when stored with 60% relative humidity for all oxygen concentration levels. Seeds stored at 30 °C, also had the lowest germination when stored with 60% relative humidity, which was 0% for all oxygen concentrations. However, seeds stored at 30 °C, with 50 and 99% relative humidity did not statistically differentiate in between the three relative humidity conditions evaluated, having very low percentages of normal seedlings for all of them.

**Table 3** Germination (%) of sweet corn seeds after eighteen months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).

Oxygen (%)	Temperature (°C)	Relative humidity (%)		
		30	45	60
1	20	88 Aa	83 Aa	67 Ab
	30	42 Ba	28 Bb	0 Bc
5	20	87 Aa	89 Aa	72 Ab
	30	43 Ba	31 Bb	0 Bc
10	20	85 Aa	87 Aa	69 Ab
	30	38 Ba	31 Ba	0 Bb
21	20	82 Aa	89 Aa	69 Ab
	30	29 Ba	25 Ba	0 Bb
50	20	87 Aa	86 Aa	66 Ab
	30	5 Ba	7 Ba	0 Ba
99	20	80 Aa	83 Aa	69 Ab
	30	1 Ba	0 Ba	0 Ba

Means followed by the same uppercase letter in the column and lowercase letter in the row, do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.

The sweet corn seeds stored at 20 °C did not statistically differentiate between the oxygen concentrations for all relative humidity conditions in the germination test (Table 4). When the seeds were stored at 30 °C and with 30% relative humidity, they had higher germination when stored at 1, 5 and 10% oxygen than at 21%, followed by the seeds stored at 50 and 99% relative humidity, which had the lowest germination percentage. At the condition of 30 °C and 45 % relative humidity, the seeds stored with 50 and 99% oxygen had the lowest germination, and all seeds with 60 % relative humidity were dead, regardless of the oxygen concentration in the jars.

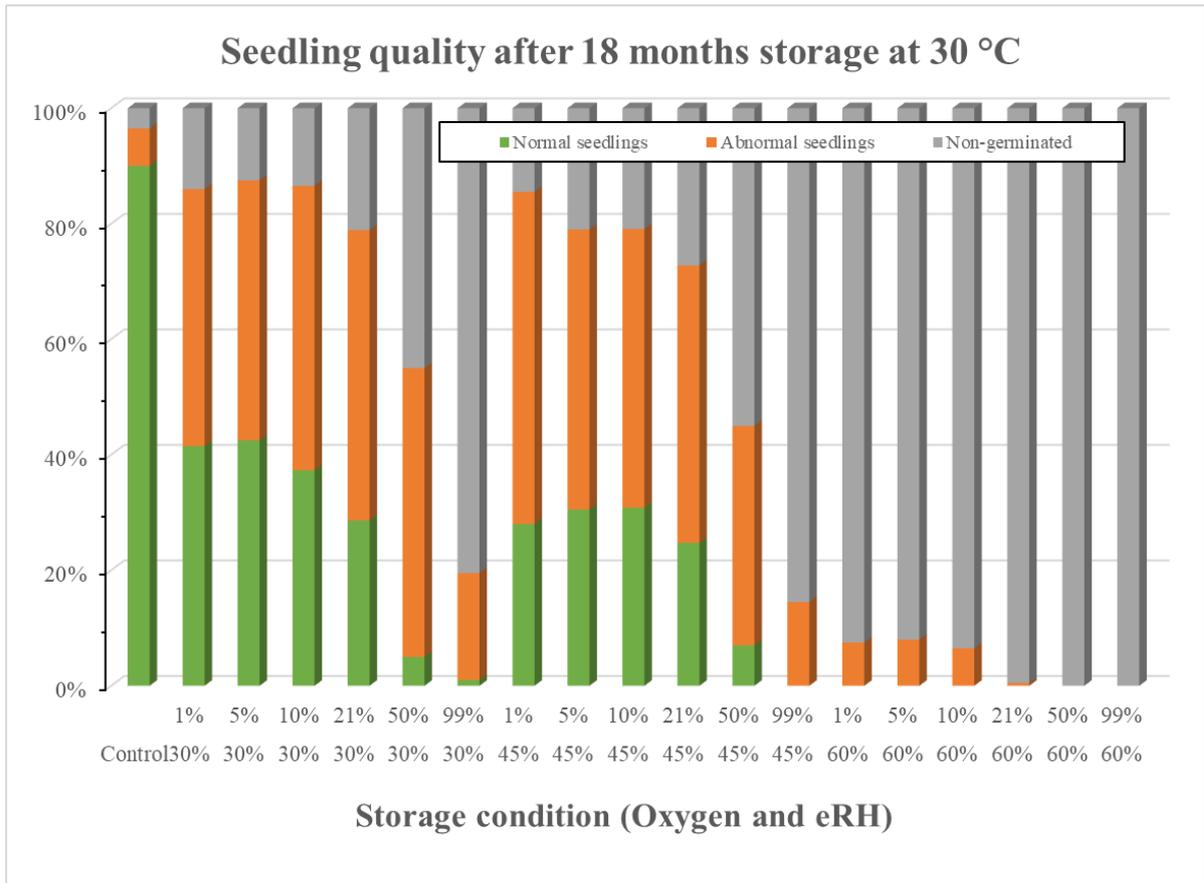
**Table 4** Germination (%) of sweet corn seeds after eighteen months of storage under various conditions of oxygen (%), temperature (°C) and relative humidity (%).

Relative humidity (%)	Temperature (°C)	Oxygen (%)					
		1	5	10	21	50	99
30	20	88 a	87 a	85 a	82 a	87 a	80 a
	30	42 a	43 a	38 a	29 b	5 c	1 c
45	20	83 a	89 a	87 a	89 a	86 a	83 a
	30	28 a	31 a	31 a	25 a	7 b	9 b
60	20	67 a	72 a	69 a	69 a	66 a	69 a
	30	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

Means followed by the same letter in the row do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.

Figure 16 shows the results of normal, abnormal, and non-germinated sweet corn seeds in the germination test after eighteen months of storage at 30 °C. The results show that with 60% relative humidity there was no normal seedlings regardless of the oxygen concentration in the jars. At 30% and 45% relative humidity there was a high number of abnormal seedlings and the seeds with the highest number of normal seedlings were stored with 1, 5 and 10% oxygen. The control, which was stored with 30% relative humidity at 30 °C had the highest percentage of normal seedlings in the germination test.

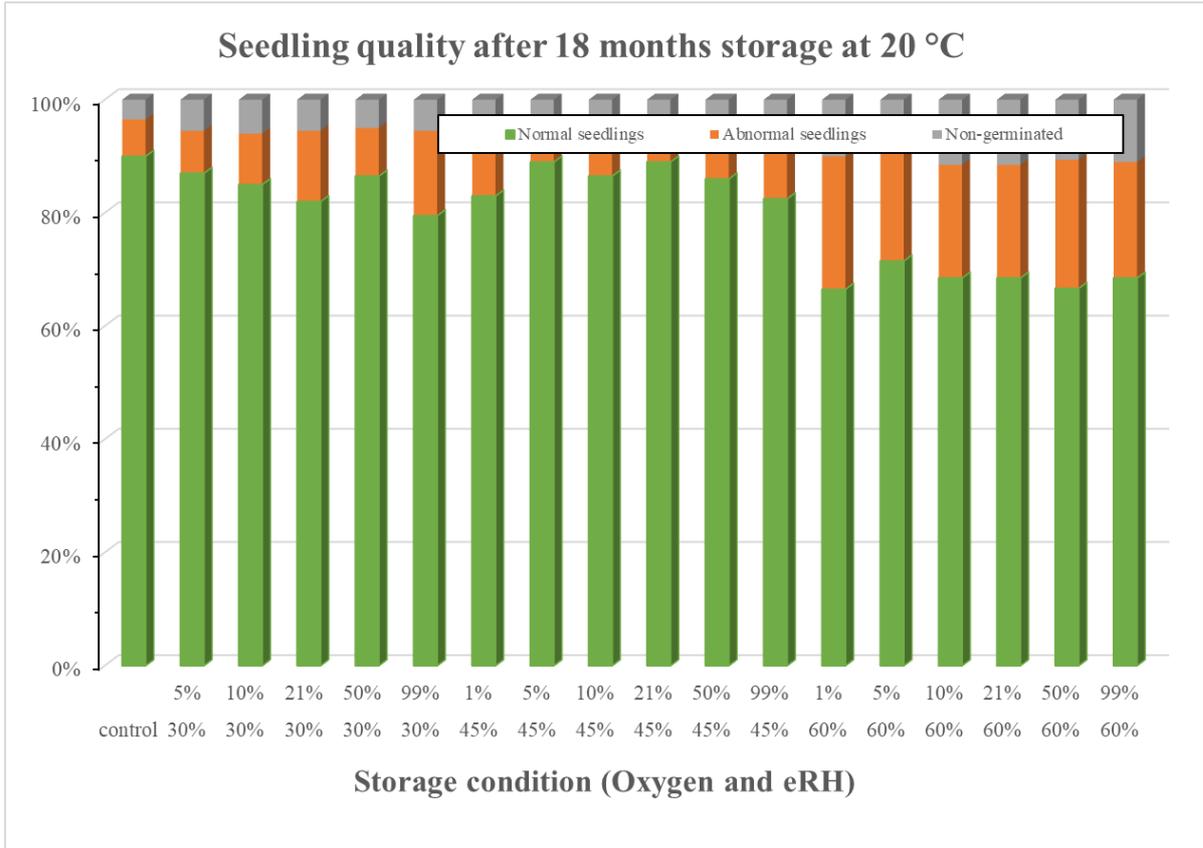
Figure 16 - Normal seedlings, abnormal seedlings and non-germinated seeds after eighteen months of storage at 30 °C under various conditions of oxygen (%), and relative humidity (%).



The hermetic storage for seeds have the benefit of reducing the probability of fungal growth and the presence of insects (SAMAPUNDO et al., 2007; WEINBERG et al., 2008) and prolonging seed storability by reducing oxidation caused by reactive oxygen species (ROS) (GROOT et al., 2015). However, O<sub>2</sub> reduced atmospheres can cause respiration at high water activity, which is related to seed deterioration (ZHANG et al., 1995). The O<sub>2</sub> consumption by the seeds after eighteen months of storage was higher in jars stored at 30 °C than at 20 °C, and with O<sub>2</sub> concentrations of 50% and 99%, the same samples that had higher CO<sub>2</sub> production and the lowest percentage of germination.

In the same way, the seeds stored at 20 °C, had a higher number of normal seedlings when stored with 30% and 45% relative humidity, than when stored with 60% relative humidity for all oxygen concentrations, except 1%, which also had a higher percentage of normal seedlings in the germination test (FIGURE 17).

Figure 17 - Normal seedlings, abnormal seedlings and non-germinated seeds after eighteen months of storage at 20 °C under various conditions of oxygen (%), and relative humidity (%).



The sweet and waxy corn seeds sorption and desorption isotherms exhibit an increase in moisture content with increasing water activity at the constant temperature of 20 °C, with a sigmoidal shape (FIGURE 5). The sweet corn varieties had higher values of moisture content in relation to the water activity, when compared to the waxy corn varieties, which is due to the significant difference in the composition of the varieties.

Based on the results of the oxygen uptake by the seeds in a hermetic environment, it can be concluded that anoxia storage of sweet and waxy corn seeds is not recommended at water activity levels of 0.7 or higher. This water activity corresponds to a moisture content of 11 to 13%, depending on the corn variety, according to the isotherms obtained in the first experiment.

The sweet corn seeds which had the most negative results on the germination test, were the seeds stored in the ambient conditions of 60% relative humidity with 30 °C. The results showed that for a longer storage in an ambient of 30 °C it is necessary to reduce both the relative humidity conditions and the oxygen concentration on the seeds package. However, for the storage at 20 °C, only reducing the relative humidity to 30 or 45% is adequate to prolong the storability of sweet corn seeds, with no need to apply oxygen restriction.

#### **4 CONCLUSIONS**

The storage of sweet and waxy corn seeds under hermetic conditions, is not recommended at water activity levels of 0.7 or higher. This water activity corresponds to a moisture content of 11 to 13%, depending on the variety.

To prolong the storability of sweet corn seeds, where cool storage is high-priced and outside chance, it is necessary to reduce both the relative humidity conditions and the oxygen concentration on the seeds package. However, if the storage at 20 °C is a possibility, only reducing the relative humidity to 30 or 45% is adequate to prolong the storability of sweet corn seeds, with no need to apply oxygen restriction.

#### **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso de inseticidas como Clotianidina + Clorantraniliprole, afeta negativamente o vigor de sementes de milho doce ao longo do armazenamento por um ano na temperatura de 10 °C.

O tipo de embalagem e o tratamento com inseticidas Clotianidina + Clorantraniliprole, associadas ao fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil, afetam a incidência fúngica de sementes de milho doce armazenadas.

A embalagem a vácuo proporciona maior armazenabilidade e manutenção da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho doce durante o armazenamento em câmara fria, quando comparada à embalagem de papel multifoliado.

O armazenamento de sementes de milho doce e ceroso em condições de restrição de oxigênio com níveis de atividade da água acima de 0,7 provoca respiração anaeróbica e acelera os processos de deterioração das sementes.

Sementes de milho doce apresentam uma maior armazenabilidade quando armazenadas à 30 °C e a umidade relativa de 30% e o teor de oxigênio para 1 a 10%. Em temperatura de 20 °C, a redução da umidade relativa para 30 ou 45% prolonga a armazenabilidade das sementes.

## REFERENCES

- ARAUJO, A. C. F. B.; BARBEDO, C. J. Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. Seeds. **Journal of Seed Science**, 2017.
- BERJAK, P. et al. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, 2011.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 3. ed. New York, 1994.
- BEWLEY, J. D. et al. Germination. In: **Seeds - Physiology of Development, Germination and Dormancy**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 133–181
- BUCKLEY, W. T.; HUANG, J. An ethanol-based seed vigour assay for canola. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 510–526, 2011.
- CHAENGSAKUL, C. et al. Ethanol production and mitochondrial-related gene expression of maize (*Zea mays*) seed during storage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 11, p. 2435–2445, 1 nov. 2019.
- CHANG, S. M.; SUNG, J. M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 613–626, 1998.
- CHATTERJEE, N.; NAGARAJAN, S. Evaluation of water binding, seed coat permeability and germination characteristics of wheat seeds equilibrated at different relative humidities. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 43, n. 4, p. 233–238, 1 ago. 2006.
- CHIU, K. Y.; CHEN, C. L.; SUNG, J. M. Partial vacuum storage improves the longevity of primed sh-2 sweet corn seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 2, p. 99–111, 18 abr. 2003.
- CREECH, R. G. Genetic Control of Carbohydrate Synthesis in Maize Endosperm. **Genetics**, v. 52, p. 1175–1186, 1965.
- CRUZ, J. et al. **Manual de identificacao de pragas da cultura do milho..** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1997.
- DONG, L. et al. Supersweet and waxy: meeting the diverse demands for specialty maize by genome editing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 10, p. 1853, 1 out. 2019.
- DOUGLASS, S. K.; JUVIK, J. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. Sweet corn seedling emergence and variation in kernel carbohydrate reserves. **Seed Science and Technology**, v. 21, n. 2, p. 433–436, 1993.
- GROOT, S. P. C. et al. Prolonging the longevity of ex situ conserved seeds by storage under anoxia. **Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation**, v. 13, n. 1, p. 18–26, 2015.
- ISTA. Introduction to the ISTA Rules. **International Rules for Seed Testing**, v. 2019, n. 1,

2018.

KODDE, J. et al. A fast ethanol assay to detect seed deterioration. **Seed Science Research**, v. 22, n. 1, p. 55–62, 18 mar. 2012.

LABUZA, T. P. **Interpretation of Sorption Data in Relation to the State of Constituent Water**. Academic Press, 1975.

MAGAN, N.; LACEY, J. Effects of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, n. 2, p. 305–314, 1 mar. 1984.

MARCOS VALLE, F. J. et al. Study and modelling the respiration of corn seeds (*Zea mays* L.) during hermetic storage. **Biosystems Engineering**, v. 208, p. 45–57, 1 ago. 2021.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration : physiology, repair and assessment. **Seed science and technology**, v. 27, n. 1, p. 177–237, 1999.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: Lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, 2003.

OLIVEIRA, G. H. H. DE et al. Desorption isotherms and thermodynamic properties of sweet corn cultivars (*Zea mays* L.). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 3, p. 546–554, 1 mar. 2010.

RAUDIENĖ, E. et al. Carbon dioxide respiration rates in wheat at various temperatures and moisture contents. **Mapan - Journal of Metrology Society of India**, 2017.

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

SAMAPUNDO, S. et al. Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of whole yellow dent corn. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 1, p. 168–175, 1 mar. 2007.

SARAVACOS, G. D.; TSIOURVAS, D. A.; TSAMI, E. Effect of Temperature on the Water Adsorption Isotherms of Sultana Raisins. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 2, p. 381–383, 1 mar. 1986.

TRACY, W. F. History, Genetics, and Breeding of Supersweet (shrunken2) Sweet Corn. In: **Plant Breeding Reviews**. 14. ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1997. p. 189–236.

VERTUCCI, C. W. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 77, n. 1, p. 172–176, 1 set. 1989.

WANG, Y. et al. Reactive oxygen species-provoked mitochondria-dependent cell death during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. **The Plant Journal**, v. 81, n. 3, p. 438–452, 1 fev. 2015.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of moisture level on high-moisture maize (*Zea mays* L.) under hermetic storage conditions—in vitro studies. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 2, p. 136–144, 1 jan. 2008.

YAMANOSHITA, T. et al. Effects of flooding on downstream processes of glycolysis and fermentation in roots of *Melaleuca cajuputi* seedlings. **Journal of Forest Research 2005 10:3**, v. 10, n. 3, p. 199–204, jun. 2005.

ZHANG, K. et al. Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 475–485, 1 jan. 2021.

ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, v. 4, n. 1, p. 49–56, 1 mar. 1994.

ZHANG, M. et al. Aging of Soybean Seeds in Relation to Metabolism at Different Relative Humidities. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 7, p. 1189–1195, 1 out. 1995.

### APÊNDICE – Tabelas das Análises de Variância

Tabela 1A Resumo da análise de variância dos resultados da primeira contagem de germinação (PC), de germinação (G) e do envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho doce do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios		
		PC	G	EA
Época (E)	1	507,0000**	5,3333	290,0833
Tratamento (T)	2	186,333*	32,3333	89,3333
Embalagem (EM)	1	33,3333	40,3333	660,0833*
E x T	2	28,0000	24,3333	342,3333*
T x EM	2	97,3333	6,3333	2,3333
E x EM	1	0,0000	3,3333	216,75
E x T x EM	2	63,0000	22,3333	31,0000
Erro	36	39,0556	21,7222	106,7500
CV (%)	-	8,73	5,36	28,15

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 2A Resumo da análise de variância dos resultados do teste de frio (TF), massa seca do hipocótilo (MS), índice de velocidade de emergência (IVE) e de porcentagem de emergência (EM) de sementes de milho doce do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios			
		TF	MS	IVE	EM
Época (E)	1	2380,0833**	0,3062**	11,1169	341,3333**
Tratamento (T)	2	882,3333**	0,0387	7,0641	39,0833
Embalagem (EM)	1	0,7500	0,0835	11,9002	96,3333
E x T	2	56,3333	0,0114	1,5371	20,0833
T x EM	2	31,0000	0,0138	2,2567	6,0833
E x EM	1	6,7500	0,0150	0,7057	0,3333
E x T x EM	2	9,0000	0,0048	6,1611	35,0833
Erro	36	52,1389	0,0309	5,5769	28,8889
CV (%)	-	10,20	10,74	12,17	6,31

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 3A Resumo da análise de variância dos resultados de incidência de *Aspergillus* sp. (ASP), *Penicillium* sp. (PEN), *Fusarium* sp. (FUS) e de outros fungos (OUT) de sementes de milho doce do híbrido A, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios			
		ASP	PEN	FUS	OUT
Época (E)	1	181,5000**	4,1667	88,1667	10004,1667**
Tratamento (T)	2	52,1667*	12,1667*	19,5000	4232,6667**
Embalagem (EM)	1	20,1667	1,5000	13,5000	1261,5000**
E x T	2	66,5000**	2,1667	41,1667	4514,6667**
T x EM	2	63,1667**	4,5000	12,5000	434,0000
E x EM	1	60,1667**	1,5000	280,1667*	988,1667*
E x T x EM	2	12,1667	0,5000	120,1667	584,6667*
Erro	84	12,1190	3,8810	70,6905	151,3571
CV (%)	-	48,25	41,24	58,57	57,71

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 4A Resumo da análise de variância dos resultados da primeira contagem de germinação (PC), de germinação (G) e do envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho doce do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios		
		PC	G	EA
Época (E)	1	90,7500	200,0833	140,0833
Tratamento (T)	2	320,6667	87,5833	134,3333
Embalagem (EM)	1	168,7500	0,7500	2,0833
E x T	2	196,0000*	55,0833	196,3333
T x EM	2	163,0000*	12,2500	1102,3333**
E x EM	1	310,0833*	36,7500	216,75
E x T x EM	2	97,3333	27,7500	67,0000
Erro	36	49,4167	52,3611	201,13897
CV (%)	-	12,43	8,94	27,12

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 5A Resumo da análise de variância dos resultados do teste de frio (TF), massa seca do hipocótilo (MS), índice de velocidade de emergência (IVE) e de porcentagem de emergência (EM) de sementes de milho doce do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios			
		TF	MS	IVE	EM
Época (E)	1	1692,1875**	0,5415**	8,1181	82,6875
Tratamento (T)	2	275,0625*	0,0547	0,9003	81,3958*
Embalagem (EM)	1	72,5208	0,3458**	9,7741	72,5208
E x T	2	202,5625*	0,0811	4,4931	14,3125
T x EM	2	57,1458	0,0737	27,9199**	111,3958*
E x EM	1	4,6875	0,0307	6,9008	0,1875
E x T x EM	2	46,3125	0,0522	7,2458	23,3125
Erro	36	53,6597	0,0298	4,7158	24,9931
CV (%)	-	10,15	8,05	10,15	5,91

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 6A Resumo da análise de variância dos resultados de incidência de *Aspergillus* sp. (ASP), *Penicillium* sp. (PEN), *Fusarium* sp. (FUS) e de outros fungos (OUT) de sementes de milho doce do híbrido B, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios			
		ASP	PEN	FUS	OUT
Época (E)	1	52,1719**	2,0946	0,3999	50,0874**
Tratamento (T)	2	3,5778*	0,0364	16,6132**	14,5958**
Embalagem (EM)	1	4,7761*	5,5703**	0,3376	0,6753
E x T	2	2,6729	0,4288	1,8030	7,9524
T x EM	2	13,4303**	0,0365	1,5361	2,8956
E x EM	1	0,0826	1,4279	0,0458	2,8563
E x T x EM	2	2,8246	0,2622	1,5866	4,4255
Erro	84	1,1038	0,6022	2,2267	2,8567
CV (%)	-	47,32	58,87	47,26	58,02

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 7A Resumo da análise de variância dos resultados da primeira contagem de germinação (PC), de germinação (G) e do envelhecimento acelerado (EA) de sementes de milho doce do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios		
		PC	G	EA
Época (E)	1	990,0833**	234,0833**	44,0833
Tratamento (T)	2	351,0000**	31,7500	59,0833
Embalagem (EM)	1	602,0833**	140,0833*	30,0833
E x T	2	30,3333	46,0833	18,5833
T x EM	2	54,3333	2,0833	8,0833
E x EM	1	168,7500	70,0833	6,7500
E x T x EM	2	43,0000	6,0833	29,2500
Erro	36	43,6944	28,1944	63,5833
CV (%)	-	9,2	6,11	11,34

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 8A Resumo da análise de variância dos resultados do teste de frio (TF), massa seca do hipocótilo (MS), índice de velocidade de emergência (IVE) e de porcentagem de emergência (EM) de sementes de milho doce do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios			
		TF	MS	IVE	EM
Época (E)	1	16,3333	0,2847**	0,7651	40,3333
Tratamento (T)	2	111,5833	0,0059	2,1299	74,0833*
Embalagem (EM)	1	56,3333	0,0039	1,4491	5,3333
E x T	2	39,0833	0,0389	5,8512	46,0833
T x EM	2	29,0833	0,0396	21,1562	60,0833
E x EM	1	176,3333	0,0079	0,0008	8,3333
E x T x EM	2	77,5833	0,0315	13,5328	53,0833
Erro	36	43,8889	0,0186	7,4170	20,2222
CV (%)	-	7,76	7,74	12,18	5,04

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 9A Resumo da análise de variância dos resultados de incidência de *Aspergillus* sp. (ASP), *Penicillium* sp. (PEN), *Fusarium* sp. (FUS) e de outros fungos (OUT) de sementes de milho doce do híbrido C, tratadas com diferentes produtos fitossanitários, embaladas a vácuo e em papel multifoliado, em duas épocas de avaliação durante o armazenamento.

FV	GL	Quadrados Médios			
		ASP	PEN	FUS	OUT
Época (E)	1	139,5605**	159,4074**	24,3459*	108,8789**
Tratamento (T)	2	35,6554**	23,4991**	5,4967	15,8064**
Embalagem (EM)	1	0,0433	70,9298**	10,1450	5,4506*
E x T	2	2,1070	4,4526*	1,0753	17,7491**
T x EM	2	0,4810	4,5219*	1,7479	3,3321
E x EM	1	0,8597	36,2110**	11,2252	3,6069
E x T x EM	2	1,9731	1,9049	5,6164	4,3122*
Erro	84	1,9740	1,4314	3,6701	1,2088
CV (%)	-	36,46	41,54	21,53	40,89

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.