

**GILDA PIZZOLANTE DE PÁDUA**

**RETENÇÃO DE CLOROFILA E SEUS EFEITOS SOBRE  
A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTE DE SOJA**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Agronomia, área de  
concentração Fitotecnia, para a obtenção do  
título de “Doutor”.**

**Orientadora**

**Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Pádua, Gilda Pizzolante de

Retenção de clorofila e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de  
semente de soja / Gilda Pizzolante de Pádua. -- Lavras : UFLA, 2006.  
160 p. : il.

Orientadora: Maria Laene Moreira de Carvalho.  
Tese (Doutorado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Semente verde. 2. Estresse. 3. Temperatura. 4. Deficiência hídrica. 5.  
Germinação. 6. Vigor. 7. Clorofilase. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD-633.3421

**GILDA PIZZOLANTE DE PÁDUA**

**RETENÇÃO DE CLOROFILA E SEUS EFEITOS SOBRE  
A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTE DE SOJA**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Agronomia, área de  
concentração Fitotecnia, para a obtenção do  
título de “Doutor”.**

**APROVADA em 07 de agosto de 2006**

**Profa. Dra. Édila Vilela de Rezende Von Pinho**

**UFLA**

**Dr. José de Barros França Neto**

**Embrapa Soja**

**Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães**

**UFLA**

**Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira**

**UNESP**

**Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho  
(Orientadora)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

Ao meu Pai,

**João Renato de Pádua**

e minha Mãe,

**Gelta Menicucci Pizzolante de Pádua,**

pela dedicação, amor e orações durante toda a vida.

*OFEREÇO*

Aos meus queridos filhos,

amores de minha vida,

**ROBERTA e MATHEUS**

*DEDICO*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À PROFA. DRA.*

*MARIA LAENE MOREIRA DE CARVALHO, ORIENTADORA*

*E*

*AO PESQUISADOR DR.*

*JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO, CO-ORIENTADOR,*

*PELA COMPREENSÃO, PRECIOSA COLABORAÇÃO, AMIZADE  
SINCERA, APOIO CONSTANTES E PELOS ENSINAMENTOS QUE SERÃO MUITO  
IMPORTANTES DURANTE MINHA VIDA PESSOAL E PROFISSIONAL.*

*MUITO OBRIGADA!*

## AGRADECIMENTOS

*A DEUS, pela benção da vida, pela saúde, por minha força de vontade, pela Fé...*

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pela liberação, oportunidade de realizar a pós-graduação e pela concessão de bolsa de estudos.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pelo apoio e liberação para a pós-graduação.

Ao colega pesquisador Dr. Neylson Eustáquio Arantes, pelas sugestões oportunas indispensáveis na elaboração e execução deste trabalho.

Aos professores Dr. Roberval Daiton Vieira (UNESP/Jaboticabal), Dra. Édila Vilela de Rezende Von Pinho (UFLA) e Dr. Renato Mendes Guimarães (UFLA), pela valiosa colaboração.

Ao professor do Setor de Sementes, Dr. João Almir Oliveira e ao pesquisador Dr. Antônio Vieira, pelo bom convívio e ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Mário César Guerreiro, do Departamento de Química e a mestranda Maraísa Gonçalves, pela valiosa colaboração nas análises químicas.

À doutoranda em Estatística Verônica Yumi Kataoka, pela contribuição na análise estatística dos dados.

A todos os colegas de curso da pós-graduação, sem distinção, pelo bom convívio, amizade e incentivo constantes.

Às funcionárias Andréa, Dalva, D. Elza e Elenir, pelo apoio constante e agradável convivência.

Aos bolsistas e estagiários do Setor de Sementes, pela amizade, apoio e colaboração constantes.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Soja, pela colaboração, apoio na condução do experimento em casa de vegetação, durante a primeira parte da execução dos trabalhos.

À Sementes Adriana (Alto Garças, MT), na pessoa dos Eng<sup>os</sup>. Agr<sup>os</sup>. Odílio Balbinotti Filho e Odair Costa, pelo fornecimento das sementes utilizadas em alguns dos estudos relatados na presente tese.

**OBRIGADA!**

## BIOGRAFIA

**GILDA PIZZOLANTE DE PÁDUA**, natural de Lavras, Minas Gerais. Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Escola Superior de Agricultura de Lavras, em dezembro de 1977. Trabalhou na Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural, EMATER - Rio em 1978, no município de Niterói, RJ.

Desde abril de 1979 é funcionária da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) onde trabalhou no Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, hoje Embrapa Solos, até fevereiro de 1981. De março de 1981 até o momento está à disposição da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) no Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba, em Uberaba – MG, atuando na área de Produção e Tecnologia de Sementes, onde tem conduzido pesquisas nas áreas de armazenamento, controle de qualidade, fisiologia e tecnologia de sementes, com as espécies algodão e soja. Foi Responsável Técnica pelo Laboratório de Análise de Sementes da EPAMIG de 1984 a 2002. Exerceu a função de Diretora Executiva da Fundação Triângulo, nas gestões 1989/1991 e 1992/1994.

Em agosto de 1997, ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção e Tecnologia de Sementes na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP de Jaboticabal, concluindo-o em abril de 2000 com a dissertação “Germinação e vigor de sementes de algodão tratadas quimicamente e armazenadas”, sob a orientação do Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira.

Ingressou no Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no primeiro semestre de 2003, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, e vem desenvolvendo trabalhos de pesquisa relacionados à ocorrência de semente de soja esverdeada e seus efeitos sobre a sua qualidade.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Desenvolvimento da semente de soja.....	3
2.2 Características da semente na maturidade fisiológica.....	7
2.3 Acúmulo e degradação de clorofilas.....	13
2.4 Retenção de clorofilas e qualidade de sementes.....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
<b>CAPÍTULO 2: Retenção de clorofilas e qualidade de sementes de soja produzidas sob estresses, em diferentes estádios de desenvolvimento</b> .....	38
<b>RESUMO</b> .....	38
<b>ABSTRACT</b> .....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1 Localização do experimento.....	41
2.2 Condições de estresse.....	41
2.2.1 Estresse térmico.....	42
2.2.2 Estresse hídrico.....	42
2.3 Obtenção das sementes.....	42
2.4 Avaliações.....	44
2.4.1 Teste de germinação.....	44

	<b>Página</b>
2.4.2 Teste de tetrazólio.....	44
2.4.3 Teste de condutividade elétrica.....	44
2.5 Análise estatística.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1 Porcentagem de sementes verdes.....	46
3.2 Peso de 100 sementes.....	53
3.3 Análise de variância dos dados.....	60
3.4 Teste de germinação.....	61
3.5 Teste de tetrazólio.....	64
3.5.1 Tetrazólio – vigor.....	64
3.5.2 Tetrazólio – viabilidade.....	65
3.5.3 Tetrazólio – deterioração por umidade.....	68
3.6 Condutividade elétrica.....	69
3.7 Peso de 100 sementes.....	73
4. CONCLUSÕES.....	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CAPÍTULO 3: Retenção de clorofilas em sementes de genótipos de soja produzidos em condições de estresse.....	80
RESUMO.....	80
ABSTRACT.....	81
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1 Localização do experimento.....	84
2.2 Obtenção dos tratamentos.....	84
2.3 Obtenção das amostras.....	85

	<b>Página</b>
2.4 Determinação dos teores de clorofilas.....	85
2.5 Atividade de clorofilase.....	87
2.5.1 Obtenção do pó cetônico.....	87
2.5.2 Preparo do substrato para clorofilase.....	87
2.5.3 Determinação da atividade enzimática.....	88
2.6 Análise estatística.....	89
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
3.1 Porcentagem de sementes verdes.....	90
3.2 Peso de 100 sementes.....	95
3.3 Teores de clorofilas.....	100
3.3.1 Clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	101
3.4 Atividade de clorofilase.....	105
4. CONCLUSÕES.....	109
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
CAPÍTULO 4: Nível máximo de tolerância de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja após armazenamento.....	114
RESUMO.....	114
ABSTRACT.....	115
1. INTRODUÇÃO.....	116
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1 Caracterização das sementes.....	118
2.2 Obtenção dos tratamentos.....	118
2.3 Teste de germinação.....	119
2.4 Teste de envelhecimento acelerado.....	119
2.5 Teste de tetrazólio.....	119

	<b>Página</b>
2.6 Teste de condutividade elétrica.....	120
2.7 Determinação dos teores de clorofilas.....	120
2.8 Análise estatística.....	121
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
3.1 Análise de variância dos dados.....	122
3.2 Testes de germinação, de tetrazólio, de envelhecimento acelerado.	122
3.3 Teste de condutividade elétrica.....	128
3.4 Teores de clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	131
4. CONCLUSÕES.....	134
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
ANEXOS.....	138

## RESUMO

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Retenção de clorofila e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de semente de soja**. Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)<sup>1</sup>

Foram conduzidos três experimentos relativos à ocorrência de sementes verdes, em função de estresse hídrico e térmico, durante o período de maturação, ao comportamento de genótipos considerados tolerantes e suscetíveis ao problema e ao nível máximo de tolerância de sementes esverdeadas em lotes após armazenamento. Para verificar em qual estágio de desenvolvimento da planta a imposição de estresses propicia maiores ocorrências de sementes esverdeadas, foram cultivadas plantas da cultivar CD 206, em casa de vegetação. No final do processo de maturação das sementes, nos estádios R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>, as plantas foram transferidas para câmaras de crescimento (fitotrons), para a indução de estresse hídrico e térmico. As sementes colhidas em R<sub>9</sub> foram avaliadas pelo teste de germinação, de tetrazólio e de condutividade elétrica. Foram também determinados a porcentagem de semente verde e o peso de 100 sementes nos terços superior, médio e inferior de cada planta. No segundo experimento, plantas das cultivares BRS 133, CD 206, MG/BR 46 (Conquista) e BRS 251 (Robusta), produzidas em casa de vegetação, foram transferidas para fitotrons no estágio R<sub>6</sub>, para indução de estresses hídrico e térmico. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo percentual de semente verde e pelo peso de 100 sementes nos três terços da planta. Foram também determinados os teores de clorofila *a*, *b* e total e a atividade da enzima clorofilase. O terceiro experimento envolveu a determinação do nível máximo de tolerância de sementes esverdeadas, das cultivares CD 206 e FMT Tucunará, após armazenamento, mescladas com sementes amarelas, nas proporções de 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% e 100%. A qualidade das sementes foi avaliada pelos testes de germinação, envelhecimento acelerado, tetrazólio e condutividade elétrica. Determinaram-se, ainda, os teores de clorofila *a*, *b*, e total nas sementes. A imposição de estresses de elevada temperatura (28°C a 32°C) e o corte total de irrigação, no estágio de desenvolvimento R<sub>6</sub>, propiciam acentuada ocorrência de sementes verdes. Estresse hídrico intenso (20% de U<sub>g</sub> e corte total de irrigação) a partir de R<sub>6</sub>, quando associado com temperaturas amenas (19°C a 26°C), não resulta na ocorrência de índices significativos de semente verde. As cultivares Conquista e Robusta são suscetíveis à retenção de clorofilas nas sementes e a ‘BRS 133’ é menos suscetível às condições de

---

<sup>1</sup>Comitê de Orientação: Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho – UFLA (Orientadora), Dr. José de Barros França Neto – Embrapa Soja.

estresse que causam o esverdeamento. As cultivares BRS 133 e CD 206 apresentam menor índice de semente verde, menor retenção de clorofilas *a*, *b* e total e maior atividade da enzima clorofilase, em relação às cultivares Conquista e Robusta, sob condição de estresse. Plantas de soja submetidas às condições de estresse hídrico e térmico produzem altos índices de sementes verdes, menores e mais leves, com elevado teor de clorofilas e baixa atividade de clorofilase. O conteúdo de clorofilas *a*, *b* e total em sementes verdes de soja é inversamente proporcional à atividade da enzima clorofilase. Com relação aos níveis de tolerância de sementes esverdeadas, foi observado que a qualidade das sementes foi afetada negativamente após o armazenamento e os teores de clorofila se elevaram com o aumento dos percentuais de sementes esverdeadas. A partir de 6% de sementes esverdeadas, a sua qualidade apresenta reduções significativas. Níveis superiores a 9% comprometem a qualidade de lotes de sementes de soja para fins comerciais, por seus efeitos significativos na redução do potencial fisiológico.

## ABSTRACT

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Chlorophyll retention and its effects on physiological quality of soybean seed.** Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Thesis – Doctorate in Crop Science)\*

This study was composed by three experiments related to the effects of chlorophyll retention in soybean seeds. The first one determined the effects of water deficit and high temperature stresses during maturation on the expression level of green seeds. The second evaluated the susceptibility of different genotypes to the expression of this problem. The third determined the maximum level of green seed that can be tolerated in a seed lot after storage. With the objective of determining the stage of development of soybean plants in which environmental stresses can be imposed, resulting in the production of high levels of green seed, plants of ‘CD 206’ were cultivated in green house. At the end of R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub> plants were transferred to growth chambers (phytotrons) for imposition of water deficit and high temperature stresses. Seeds harvested at R<sub>9</sub> had their quality evaluated by germination, tetrazolium and electrical conductivity tests. Percentage of green seed and weight of 100 seed at the upper, medium and lower thirds of each plant were also evaluated. In the second experiment, plants of BRS 133, CD 206, MG/BR 46 (Conquista) and BRS 251 (Robusta) cultivars were transferred to phytotrons at R<sub>6</sub> for inducing water and temperature stresses. The effects of the treatments were evaluated by the percentage of green seed production and by the weight of 100 seeds in the three thirds of the plants. Contents of *a*, *b* and total chlorophylls and chlorophyllase activity were determined. The third experiment determined the maximum tolerated level of green seed in lots of CD 206 and FMT Tucunare cultivars after storage, by mixing green and yellow seed in the proportions of 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% and 100%. Seed quality was evaluated by germination, accelerated aging, tetrazolium and electrical conductivity tests. Additionally, seed contents of *a*, *b* and total chlorophylls were determined. Imposing high temperature stress (28°C to 32°C) associated with no water supply at R<sub>6</sub> resulted in high level of expression of green seed. Intensive water stress after R<sub>6</sub> associated with normal temperatures (19°C to 26°C) does not result in the occurrence of significant levels of green seed. The expression of green seed production under these unfavorable environmental conditions varies among cultivars: Conquista and Robusta were considered more susceptible to the production of green seeds under these stressful conditions as compared to ‘BRS 133’ and ‘CD 206’. These cultivars produced lower levels of green seeds,

---

\*Guidance Committee: Dr. Maria Laene Moreira de Carvalho – UFLA (Adviser), Dr. José de Barros França Neto – Embrapa Soybean.

lower retention of chlorophylls and higher activity of chlorophyllase when compared with Robusta and Conquista. Soybean plants submitted to water and temperature stresses produce high levels of green seed which are small and light and have high contents of chlorophylls and low chlorophyllase activity. The contents of *a*, *b* and total chlorophylls in green seeds was inversely proportional to the activity of the enzyme chlorophyllase. The study related to the level of tolerance of green seed indicated that seed quality was negatively affected after storage. Content of chlorophyll increased with the increment of the percentage of green seed. Levels above 6% of green seed significantly reduce the quality of the seed. Seed lots with 9% or more green seed have their physiological quality significantly reduced to the point their commercialization is not advised.

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] que é, hoje, a principal cultura do setor agrícola e agroindustrial do país, representando mais que 10% das exportações brasileiras. É uma cultura de grande expressão econômica, que se tornou uma “commodity” cada vez mais estratégica para o Brasil e cuja utilização mundial está em expansão.

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira sempre estiveram associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. Quando confrontada com as demais grandes culturas brasileiras, ao longo das três últimas décadas, constata-se que a soja foi não apenas a cultura que mais cresceu em volume de produção, como também a espécie que mais cresceu em área cultivada.

Dentre as iniciativas para incrementar e fortalecer a pesquisa com soja no país merece destaque o desenvolvimento de sementes de alta qualidade, adaptadas às baixas latitudes dos climas tropicais. A demanda por essas cultivares vem se intensificando sobremaneira, pelo alto nível tecnológico dos sistemas produtivos empregados pelos agricultores.

A qualidade da semente de soja, principalmente nas regiões produtoras do Brasil, pode ser influenciada por diversos fatores, como períodos prolongados de seca, danos por insetos, variações de temperatura e de umidade durante a maturação, que podem ocorrer nas diferentes fases de seu desenvolvimento e processamento.

A exposição das plantas às condições adversas no campo pode estar relacionada à variação e à desuniformidade na maturação das sementes que agravam o processo de deterioração. Além disso, a predisposição das plantas a

essas diferenças de maturação e a bloqueios metabólicos que impedem as transformações bioquímicas que, normalmente, ocorrem no final do processo de maturação, como, por exemplo, a degradação da clorofila presente nas sementes, pode estar associada ao genótipo.

O aparecimento de altos índices de sementes verdes em lotes de soja produzidos, principalmente no Brasil Central, tem ocasionado sérios problemas aos produtores nos últimos anos, já que, associada a esse problema, a qualidade fisiológica dos lotes vem sendo seriamente comprometida.

A intensidade da ocorrência de sementes com retenção de clorofila em um lote parece ser variável em função do tipo de estresse, durante a formação das sementes. Alterações tanto de temperatura quanto de umidade são relatadas como causas que impedem a degradação da clorofila na fase final de maturação. O estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra quando submetida a esses estresses é um fator a ser elucidado pela pesquisa. O comportamento das diversas cultivares é também variável, o que indica variabilidade genética para essa característica sob condições de estresse no campo.

Constituem ferramentas eficientes para a elucidação das causas e conseqüências do aparecimento de sementes verdes em lotes de soja a investigação do tipo de estresse que impede a degradação da clorofila, no final do período de maturação, bem como a avaliação da resposta do genótipo a essas condições adversas e o estudo das alterações isoenzimáticas decorrentes das transformações degenerativas das sementes com altos índices de clorofila.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Desenvolvimento da semente de soja

A semente desenvolve-se a partir do óvulo fecundado, sendo formada por tecidos maternos e por tecidos embrionários. O processo de desenvolvimento da semente é controlado geneticamente e compreende uma série de etapas, verificadas a partir da fecundação, até que as sementes se tornem maduras e independentes da planta-mãe.

O desenvolvimento da semente, da fertilização à semente madura, pode ser dividido em três fases. A fase I é caracterizada pelo crescimento inicial, devido à divisão celular e a um aumento rápido no peso fresco da semente. A fase II ocorre quando a semente acumula material de reserva. O conteúdo de água diminui enquanto a matéria seca substitui a água nas células. Finalmente, a fase III compreende a dessecação ou a desidratação das sementes, em função do declínio rápido do conteúdo de água e da diminuição do peso fresco. Ocorre redução gradual no metabolismo da semente e o embrião passa para um estado quiescente (Bewley & Black, 1994).

As sementes que sofrem processo drástico de dessecação ao final da maturação, como a soja, são chamadas de ortodoxas. Nestas, 90% a 95% da água é removida durante o desenvolvimento e a dessecação (Black & Pritchard, 2002).

A concentração de água (g H<sub>2</sub>O/g peso fresco) é muito alta durante a fase I e declina até a semente alcançar a maturidade fisiológica. A semente de soja contém níveis moderados de óleo e altos níveis de proteínas e tem alta concentração de água, ao redor de 800 g/kg, no início do desenvolvimento e declina expressivamente até atingir valores ao redor de 550 g/kg na maturidade fisiológica (Egli, 1998).

Assim, sementes de soja atingem a máxima massa de matéria seca quando o teor de água é de aproximadamente 50%. No entanto, os teores de água das sementes individuais podem variar de 40% a 65%, devido à desuniformidade de maturação entre as plantas. As modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente à evolução da transferência de matéria seca da planta para as sementes, ou seja, a proporção de sementes vigorosas aumenta com o decorrer da maturação, atingindo o máximo em época muito próxima ou coincidente com o máximo acúmulo de reservas (Marcos Filho, 2005).

Estudos da maturação têm sido conduzidos para a identificação da maturidade fisiológica. TeKrony et al. (1979), trabalhando com sementes de soja, utilizaram determinações do fluxo de matéria seca da relação planta/sementes, mediante exposição das plantas ao  $^{14}\text{C}$ . Os autores demonstraram a eficiência dessas determinações do fluxo de  $^{14}\text{C}$  da planta para as sementes, constatando o momento em que as sementes se desligam fisiologicamente da planta-mãe.

Grande parte do carbono necessário para o crescimento da semente vem diretamente da fotossíntese nas folhas. Entretanto, muitas espécies cultivadas acumulam amido ou outro carboidrato nas partes vegetativas das plantas e estes materiais de reserva são remobilizados durante o enchimento dos grãos para se tornarem fonte de carbono para as sementes. Muitas estruturas da semente ou do fruto são fotossinteticamente ativas e o carbono fixado por estas estruturas contribui também para o crescimento da semente (Egli, 1998).

A composição da semente também pode ser influenciada pelo suprimento de C e N para a semente. A regulação da composição da semente pelo suprimento de materiais brutos ou pela semente pode ser melhor entendida se forem consideradas duas fontes de variação na composição da semente: ambiental e genética. Segundo Egli (1998), mudanças no suprimento de assimilados, provavelmente, são explicadas por muitos dos efeitos ambientais

sobre a composição química, na qual diferenças genéticas são provavelmente reguladas pela semente. Claramente, as sementes não são simples receptores passivos de assimilados de C e N e nutrientes minerais provenientes da planta-mãe. Em vez disso, sementes têm a habilidade de sintetizar moléculas complexas em quantidades e proporções relativamente precisas.

A concentração de proteínas em sementes de soja é quase constante durante o desenvolvimento da semente, indicando uma constante razão de síntese, mas, a concentração de óleo é inicialmente lenta e aumenta durante o desenvolvimento da semente, alcançando o nível máximo tanto quanto a semente se aproxima da maturidade fisiológica (Blackman et al., 1992).

Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento podem aumentar o potencial de efeitos ambientais na composição da semente madura. O estresse hídrico durante a formação das sementes acelera a senescência de folhas e encurta o período de maturação das sementes de soja. As sementes, na ocorrência de estresse hídrico da planta, podem não completar a mesma seqüência de desenvolvimento como em plantas não estressadas e a composição química desde o estágio de desenvolvimento pode ser afetada na semente madura. Pouco se sabe sobre a interação entre a duração do período de formação da semente e a sua composição, na maioria das espécies cultivadas (Egli, 1998).

As sementes, normalmente, não germinam durante o desenvolvimento na planta-mãe, embora a maturação não seja um processo obrigatório para a aquisição de germinabilidade. Ocorre que a remoção das sementes das estruturas que a envolvem não conduz à germinação, na maioria das espécies, mas, quando o embrião é separado da semente, esse germina normalmente. A manutenção das sementes no programa de desenvolvimento parece ser influenciada principalmente por dois fatores: a) aumento no conteúdo de ácido abscísico (ABA) dentro do embrião e nas estruturas que o cercam e b) restrição à absorção de água (Xu et al., 1990).

Indicadores visuais da maturidade fisiológica têm sido desenvolvidos para muitas culturas e eles são freqüentemente baseados em mudanças na cor ou nas características da semente.

A descrição dos estádios de desenvolvimento da planta de soja foi proposta por Fehr & Caviness (1977), dividindo-os em estádios vegetativos (V) e estádios reprodutivos (R). No entanto, algumas modificações adaptadas de Ritchie et al. (1994) foram adicionadas à metodologia anterior, resultando na classificação apresentada na Tabela 1.

A conceituação da maturidade fisiológica, tomando-se como base a massa de matéria seca das sementes, constitui ponto de referência para se caracterizar o encerramento do processo de desenvolvimento da semente. Após a maturidade fisiológica, a semente pode ser considerada como armazenada no campo enquanto a colheita não se processa; se as condições climáticas forem favoráveis, a sua qualidade fisiológica pode ser menos prejudicada, porém, a ocorrência de chuvas, ou mesmo de orvalho, aliada a altas temperaturas e elevada umidade relativa do ar, diminui a qualidade das sementes pelas suas sucessivas retrações e por seus entumescimentos, na medida em que se retarda a colheita (França Neto & Krzyzanowski, 1990). Dessa maneira, pode-se constatar que o ponto de colheita e a maturidade fisiológica merecem abordagens específicas. A maturação é um processo caracterizado por uma seqüência ordenada de alterações de várias características, culminando com a maturidade, enquanto o ponto de colheita é uma atividade resultante de uma decisão baseada na análise de parâmetros tecnológicos e econômicos (Marcos Filho, 2005).

TABELA 1. Descrição dos estádios reprodutivos da planta de soja, observação na haste principal, proposta por Ritchie et al. (1994).

<b>Estádio</b>	<b>Denominação</b>	<b>Descrição</b>
<b>R<sub>1</sub></b>	Início da floração	Até 50% das plantas com flor
<b>R<sub>2</sub></b>	Floração plena	Maioria dos racemos com flores abertas
<b>R<sub>3</sub></b>	Final da floração	Flores e vagens com até 1,5cm
<b>R<sub>4</sub></b>	Vagem desenvolvida	Maioria das vagens no terço superior com 2-4cm
<b>R<sub>5.1</sub></b>	Enchimento do grão	Grãos perceptíveis ao tato a 10% da granação
<b>R<sub>5.2</sub></b>		Maioria das vagens com granação de 10%-25%
<b>R<sub>5.3</sub></b>		Maioria das vagens entre 25% e 50% de granação
<b>R<sub>5.4</sub></b>		Maioria das vagens entre 50% e 75% de granação
<b>R<sub>5.5</sub></b>		Maioria das vagens entre 75% e 100% de granação
<b>R<sub>6</sub></b>	Grãos desenvolvidos	Vagens com granação de 100% e folhas verdes
<b>R<sub>7.1</sub></b>	Início da maturação	Início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens
<b>R<sub>7.2</sub></b>		Entre 51% e 75% de folhas e vagens amarelas
<b>R<sub>7.3</sub></b>		Mais de 76% de folhas e vagens amarelas
<b>R<sub>8.1</sub></b>	Maturação plena	Início a 50% de desfolha
<b>R<sub>8.2</sub></b>		Mais de 50% de desfolha à pré-colheita
<b>R<sub>9</sub></b>	Maturação de colheita	Ponto de maturação de colheita

## 2.2 Características da semente na maturidade fisiológica

Em soja, a maturidade fisiológica pode ser caracterizada pelo início da redução do tamanho das sementes, ausência de sementes verde-amareladas e hilo

não apresentando mais a mesma coloração do tegumento. A maturação fisiológica total ocorre quando as sementes estão completamente amarelas. De acordo com Marcos Filho (1980), uma população de sementes de soja está madura quando aproximadamente 95% das sementes atingem a coloração amarela e apresentam hilo heterocromo, ou seja, de coloração diferente da do tegumento. É muito difícil, segundo Egli (1998), detectar diferenças significativas no campo, entre lotes colhidos no estágio de crescimento R<sub>7.1</sub> (início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens) e a total maturidade R<sub>8.1</sub> (início a 50% de desfolha).

A caracterização da semente na maturidade fisiológica é dificultada devido à grande desuniformidade na maturação dentro de uma população de plantas das cultivares de soja atualmente em uso. Mesmo nas regiões tradicionais de cultivo de soja, há uma certa desuniformidade na maturação, dentro das plantas da população de uma mesma cultivar, mas essa desuniformidade é mais pronunciada à medida que ocorre redução de latitude (Hamer, 1999).

A variabilidade existente entre 39 genótipos de soja de sementes grandes, avaliados na fase imatura e 15 genótipos na fase madura de desenvolvimento, foi estudada por Santos (1989). Segundo o autor, foram encontradas altas correlações entre as fases imatura e madura para todos os caracteres. As correlações genotípicas foram de magnitudes superiores às correlações fenotípicas e ambientais. O peso de 100 sementes foi positivamente correlacionado com largura de vagens e peso de sementes por planta, imatura e madura. A produtividade de sementes foi positivamente correlacionada com número e peso de vagens e de sementes por planta, imatura e madura.

Muitas pesquisas ressaltam que a máxima germinação da semente e o vigor também ocorrem na maturidade fisiológica, apesar desta concepção ter sido mudada recentemente por Ellis & Pieta Filho (1992). Eles sugeriram que o

máximo potencial fisiológico das sementes de cevada e de trigo ocorre após a maturidade fisiológica e propuseram o termo "maturidade de massa" para separar a ocorrência da máxima massa de matéria seca do máximo vigor das sementes. Assim, segundo os autores, a semente está fisiologicamente madura somente quando alcança o máximo vigor.

As modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente à evolução da transferência de matéria seca da planta para as sementes, ou seja, a proporção de sementes vigorosas aumenta com o decorrer da maturação, atingindo o máximo em época muito próxima ou coincidente com o máximo acúmulo de reservas (Marcos Filho, 2005).

A ocorrência de sementes com coloração intensa verde-escura, principalmente envolvendo a área do eixo embrionário (sementes verdes), foi relatada por Costa et al. (2001). Sementes de soja que apresentam essas características, geralmente, são detentoras de elevados índices de deterioração por umidade, que podem levar à redução da germinação, do vigor e da viabilidade. Verificaram que níveis superiores a 10% de sementes verdes reduzem a germinação com reflexo direto na comercialização de lotes de sementes.

O intervalo entre a maturidade fisiológica e a colheita é como um período de armazenamento no campo em que a ocorrência de chuvas e condições oscilantes de temperatura e umidade do ar causam o intumescimento diferenciado dos tecidos externos das sementes em relação aos internos. Esse processo leva ao desenvolvimento de rugas e rachaduras no tegumento e de fissuras no eixo embrionário e nos cotilédones, sintomas típicos de deterioração severa. Essa deterioração, geralmente, está associada à maior predisposição das sementes aos danos mecânicos e ao ataque de pragas e patógenos (Costa et al., 1987).

Segundo Marcos Filho (2005), um dos problemas determinantes da queda da qualidade das sementes após a maturidade é causado pela alternância de períodos secos e úmidos, aliada a temperaturas elevadas na fase final da maturação. Nessas condições, devido a expansões e contrações, ocorrem injúrias ao tegumento, principalmente enrugamento e, caso permaneçam as condições desfavoráveis, posteriormente acontece a sua ruptura. Essas lesões acentuam a fragilidade do tegumento, reduzem a proteção à semente e causam prejuízos ao seu desempenho.

O tegumento da semente é proveniente dos integumentos externo, que dá origem à testa e interno, que origina a tegma. O tegumento, sendo o envoltório da semente, exerce funções de: proteção ao eixo embrionário e ao tecido de reserva, os cotilédones; manutenção da união entre as partes internas da semente; de impedimento à entrada de microrganismos e insetos; de controle da velocidade de hidratação e de troca gasosa entre a semente e o meio, e de regulação da germinação, por intermédio da dormência (Carvalho & Nakagawa, 2000).

Após a maturidade fisiológica, alterações degenerativas começam a ocorrer nas sementes, de modo que a qualidade fisiológica pode ser mantida ou pode decrescer, dependendo das condições ambientais no período que antecede a colheita, da condução dos processos de colheita, secagem, beneficiamento e das condições de armazenamento (Delouche & Baskin, 1973; McDonald Jr., 1975).

Abdul-Baki & Anderson (1973) definiram deterioração como toda e qualquer transformação degenerativa ocorrida na semente, tratando-se de um processo contínuo, de progresso variável entre espécies, entre lotes de sementes da mesma espécie e entre sementes do mesmo lote. Essas transformações podem ser de origem bioquímica, física ou fisiológica (Delouche & Baskin, 1973).

As principais manifestações fisiológicas e bioquímicas de sementes deterioradas foram relatadas por Abdul-Baki & Anderson (1973). Entre as

alterações fisiológicas, foram citadas: alterações na cor, decréscimo à tolerância a condições subótimas, reduzido crescimento de plântulas, redução na germinação e aumento no número de plântulas anormais. Dentre as alterações bioquímicas, ocorrem mudanças na atividade enzimática e respiratória, nas vias de síntese, nas membranas, nos compostos de reserva e nos cromossomos.

De acordo com Roberts (1973), a degradação das membranas está intimamente associada à degeneração de organelas celulares, acompanhada de alterações funcionais. A desestruturação dos sistemas de membranas nas células tem sido relatada na literatura como consequência inicial da deterioração.

As membranas biológicas são constituídas por dupla camada lipoprotéica. Os principais constituintes da camada lipídica são lipídios polares, representados pelos fosfolipídios, de natureza anfipática, apresentando um grupo hidrofílico em uma extremidade da molécula e, na outra, dois ácidos graxos de longa cadeia hidrofóbica (Simon, 1974). Por essa razão, são denominados polares, uma vez que as extremidades de suas moléculas exibem comportamentos opostos em relação à água.

Desse modo, pode-se inferir que, durante a maturação da semente, seu sistema de membranas está sujeito às referidas transformações, em função das alterações do teor de água. Segundo Abdul-Baki (1980), a organização das membranas é máxima na maturidade fisiológica e, a partir desse momento, as organelas perdem sua organização estrutural, tornando-se menos ativas metabolicamente em sementes secas (12% a 14% de água). Outro aspecto a ser considerado na medida em que as sementes perdem água é que, nessa condição, ocorre uma desorganização das membranas celulares, com as camadas lipídicas exibindo configuração hexagonal. Níveis de água inferiores a 20% são considerados insuficientes para manter a configuração típica da camada dupla das membranas e, conseqüentemente, os fosfolipídeos arranjam-se na forma

hexagonal (Simon, 1974). Na maioria das espécies, no final da maturação, o conteúdo de água varia entre 5% a 10%.

As reações oxidativas são, em parte, responsáveis pela deterioração das sementes (Priestley et al., 1985; Wilson & McDonald Jr., 1986) e estas reações ocorrem por peroxidação, que é um processo não enzimático. A oxidação de ácidos graxos insaturados é citada, na maioria das vezes, como a primeira reação do processo de envelhecimento, produzindo radicais livres que atacam lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Harrington, 1973). De acordo com a literatura, tem sido relatado que as reações oxidativas do processo de envelhecimento podem envolver enzimas, como as lipoxigenases, que mantêm sua atividade em sementes de soja, mesmo em baixos níveis de água (Priestley et al., 1985).

As isoenzimas lipoxigenases (LOX) têm sido relacionadas em diversos processos fisiológicos em tecidos vegetais, tais como crescimento e desenvolvimento (Siedow, 1991), senescência (Macri et al., 1995), reserva vegetativa (Stephenson et al., 1998), germinação de sementes (Kato et al., 1992; Park et al., 1994) e biossíntese de moléculas sinalizadoras, como o ácido jasmônico (Anderson et al., 1989; Farmer & Ryan, 1992). A senescência induzida por ácido jasmônico em tecido foliar de várias espécies vegetais tem sido demonstrada pela promoção no decréscimo do conteúdo de clorofila, pelo aumento na respiração e proteólise, pela redução na taxa de fotossíntese e da atividade de enzimas do cloroplasto (Weidhase et al., 1987).

Ward et al. (1995) afirmam que a degradação da clorofila, como processo bioquímico de pós-colheita ou de senescência em sementes é pouco conhecida. Autores como Ward (1990) e McGregor (1991), observaram que essa degradação está relacionada com os níveis de teor de água e de etileno, atuando estes três fatores simultaneamente durante a maturação das sementes. Duas cultivares podem apresentar o mesmo teor de clorofila sem que apresentem, necessariamente, a mesma taxa de etileno ou de teor de água.

### 2.3 Acúmulo e degradação de clorofilas

As clorofilas são encontradas naturalmente nas folhas verdes de plantas e são pigmentos absorvedores de luz responsáveis pela fotossíntese. O processo fotossintético ocorre dentro dos cloroplastos, que são organelas citoplasmáticas (plastídeos) típicas das células vegetais. São localizados em células especializadas das folhas. A fotossíntese é um processo conduzido em duas etapas interdependentes e simultâneas: a fotoquímica ou reação luminosa e a etapa química ou reação de fixação do carbono. Os mais importantes pigmentos absorvedores de luz são as clorofilas, podendo haver também os pigmentos acessórios, como os carotenóides ( $\beta$ -caroteno e xantofila) e as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina). Os pigmentos que absorvem a luz estão arranjados em conjuntos ou feixes funcionais chamados de fotossistemas (Lehninger et al., 1995).

Para que a fotossíntese ocorra, os pigmentos fotossintéticos (clorofilas) devem absorver a energia de um fóton de um dado comprimento de onda e, então, utilizar essa energia para iniciar a cadeia de eventos da fase fotoquímica da fotossíntese. A energia luminosa absorvida é conservada na forma química de dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH. Simultaneamente, o  $O_2$  é produzido. Nas reações de fixação de carbono, o ATP e o NADPH são utilizados para reduzir o  $CO_2$  para formar glicose e outros compostos orgânicos. As duas reações acontecem nos cloroplastos. A primeira etapa da fotossíntese é a absorção de luz por uma molécula fotorreceptora. O principal fotorreceptor nos cloroplastos das plantas verdes é a clorofila *a* (Gross, 1991).

A síntese de clorofilas ocorre nos cloroplastos e seus anéis tetrapirrólicos são sintetizados a partir do aminoácido glutamato. Ela envolve a formação do ácido  $\alpha$ -aminolevulínico (ALA), a formação de pirrol simples, porfobilinogênio e sua polimerização pela descarboxilação e oxidação para produzir protoporfirina IX. Estes passos são comuns à síntese de todos os

compostos porfirínicos, incluindo a série das clorofilas, e ocorrem no escuro. A incorporação de magnésio (Mg) no centro da molécula e a ciclização do ácido propiônico no anel III levam à formação do protoclorofilídeo, que se associa a uma proteína específica para produzir o holocromo do protoclorofilídeo. O metabolismo posterior requer a redução fotoquímica do anel IV para produzir o holocromo da clorofila *a*. A fotoconversão em clorofilídeo é rápida e a longa cadeia lateral fitol é adicionada à molécula para produzir clorofila e as moléculas recém-formadas são incorporadas às membranas dos tilacóides. Contudo, em luz contínua, a fotoconversão prossegue e a síntese da clorofila *a* e *b* acaba sendo limitada apenas pela quantidade de membrana de tilacóide capaz de incorporá-la (Hall & Rao, 1980). Dessa maneira, o cloroplasto possui uma função central na síntese de compostos contendo anéis tetrapirrólicos.

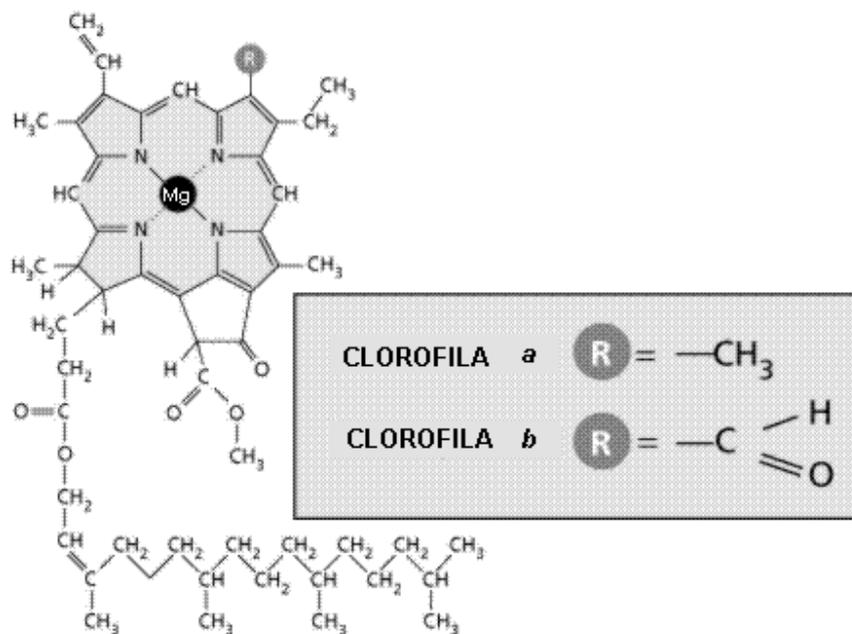
Os cloroplastos têm forma discóide, limitados por dupla membrana externa e interna. A membrana externa é contínua e permeável a moléculas pequenas e íons. Internamente, o cloroplasto é composto de um sistema complexo de membranas, conhecidas como membranas tilacoidais que, além dos pigmentos, contêm proteínas, lipídios, quinonas e íons metálicos necessários para a etapa fotoquímica da fotossíntese. As membranas tilacoidais formam os tilacóides, que são vesículas achatadas e, usualmente, são arranjadas em pilhas denominadas de grana. As membranas dos tilacóides são separadas da membrana interna do cloroplasto. As clorofilas e as enzimas requeridas para as reações luminosas encontram-se incrustadas nas membranas tilacóides, associadas a proteínas (Gross, 1991; Rüdiger & Schoch, 1988).

Segundo Bobbio & Bobbio (1989), a clorofila é uma mistura de duas substâncias relacionadas, clorofila *a* (verde azulada) e clorofila *b* (verde amarelada), que se encontram sempre na proporção 3:1 (clorofila *a*: clorofila *b*). São ésteres solúveis na maioria dos solventes orgânicos (etanol, acetona, benzeno, éter e clorofórmio), mas não são solúveis em água. Sensíveis à luz, ao

calor, ao oxigênio e à degradação química. Elas absorvem luz vermelha e azul-violeta, refletem luz verde e ocorrem em cinco formas conhecidas (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*). Tanto em acetona como em éter etílico, ela é máxima a 428-430 nanômetros (nm) e 660-662 nm. Todas as plantas verdes contêm clorofila *a* e clorofila *b* (Porra et al., 1989).

Quimicamente, todas as clorofilas são porfirinas, com estrutura formada por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico. No quarto anel possuem uma cadeia fitol, localizada no C<sub>20</sub>, que é o lado hidrofóbico da molécula, sendo o resto da molécula hidrofílico (Jackson, 1976). A clorofila *d* é similar à clorofila *a*, sendo que, no lugar do grupo vinil, existe um grupamento formil (Holt, 1961). A estrutura da clorofila *b* difere da clorofila *a*, exceto pelo fato de que o grupo metil (-CH<sub>3</sub>) é substituído por um grupo aldeído (-CHO) e isso altera ligeiramente a posição das duas principais faixas de absorção, segundo Hall & Rao (1980), pela mudança da distribuição dos elétrons (Figura 1).

A presença dos pigmentos fotossintéticos e sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* ocorre em todos os organismos fotossintéticos que liberam O<sub>2</sub> e é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica, enquanto os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Os principais pigmentos acessórios são clorofila *b* (plantas, algas verdes e algumas bactérias), clorofila *c* (Phaeophyta e diatomáceas), clorofila *d* (algas vermelhas),  $\alpha$ -caroteno (maioria das plantas e algumas algas),  $\beta$ -caroteno (plantas e a maioria das algas), luteína (plantas, algas verdes e vermelhas), violaxantina (plantas, algas verdes e marrons), fucoxantina (diatomáceas e algas marrons), neoxantina (Chlorophyceae), ficoeritrina (Rhodophyceae e algumas cianobactérias), ficocianina (cianobactérias e algumas Rhodophyceae) e aloficocianina (cianobactérias e Rhodophyceae) (Lehninger et al., 1995).



Cadeia de fitol (C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>OH)

**FIGURA 1-** Estrutura química das clorofilas. Fonte: Hall & Rao (1980).

Apesar da importância da transformação da clorofila em seus derivados durante o amadurecimento da soja, pouco se conhece sobre o mecanismo de degradação do pigmento nessa semente (Ward et al., 1995), durante o processo de maturação e armazenamento. Aparentemente, trata-se de um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico não-enzimático, que resulta em aumento de feofitinas e outros derivados fitilados (Heaton & Marangoni, 1996; Mangos & Berger, 1997; Suzuki et al., 1999).

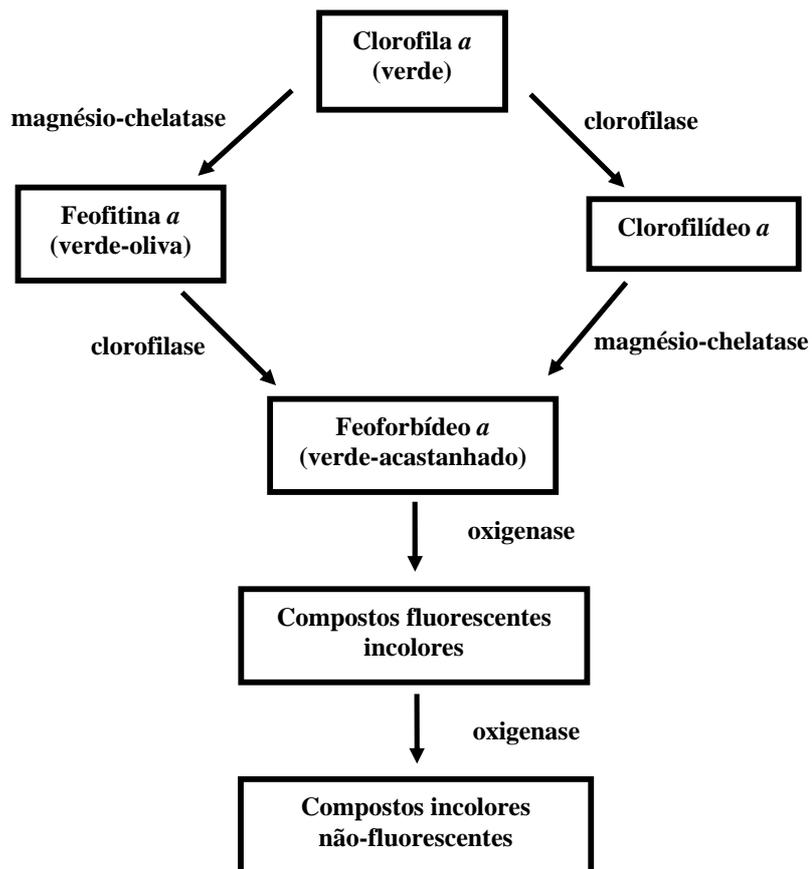
A degradação da clorofila é iniciada na senescência, por fatores endógenos e pode ser influenciada também por fatores externos, tais como estresse hídrico, redução de luz, mudanças de temperatura, aumento do teor de

etileno ou por fatores internos, tais como aumento de permeabilidade da membrana e mudança de pH. Esses fatores interferem no processo normal, levando a acelerar ou a retardar a degradação da clorofila (Heaton & Marangoni, 1996; Takamiya et al., 2000).

O mecanismo de degradação da clorofila foi proposto por Heaton & Marangoni (1996) e envolve cinco etapas (Figura 2). A primeira etapa corresponde à clivagem do grupo fitol da clorofila pela ação da enzima clorofilase (EC 3.1.1.14), enzima chave na rota de degradação, resultando na formação de clorofilídeo. Paralelamente, pode ocorrer a remoção do íon  $Mg^{2+}$  em meio ácido, pela atuação da enzima magnésio-chelatase (EC 6.6.1.1), formando feofitina. Numa segunda etapa da degradação, o clorofilídeo, por sua vez, pode ser convertido em feoforbídeo pela perda do seu íon  $Mg^{2+}$  e a feofitina pode ser também convertida em feoforbídeo pela perda do grupo fitol. As etapas posteriores envolvem a clivagem do anel da porfirina pela ação da enzima oxigenase, formando compostos fluorescentes e incolores. Segundo os autores, a remoção do grupo fitol causa um drástico aumento da polaridade da molécula de clorofila que, por consequência, diminui a sua estabilidade na membrana tilacóide. Isso resulta em ruptura das interações proteína-lipídeo e, possivelmente, em desnaturação das associações clorofila-proteína. Pequenas variações de pH podem também aumentar a especificidade enzimática para remover a molécula de clorofilídeo das ligações de proteína com clorofila *a/b* e, possivelmente, remover o átomo de Mg do centro.

O átomo central de Mg é facilmente removido da clorofila, principalmente em condições ácidas, sendo substituído por hidrogênio, formando as feofitinas, de cor verde-oliva, insolúveis em água. Enzimas presentes nos vegetais, como a clorofilase, hidrolizam o grupo fitila, formando a clorofilida, verde, mais solúvel em água que a clorofila. Os produtos resultantes da perda do grupo fitila e do  $Mg^{+2}$ , os feoforbídeos, têm cor verde-acastanhada e

sofrem, possivelmente, transformações oxidativas que dão origem a produtos incolores de degradação (Bobbio & Bobbio, 1992).



**FIGURA 2-** Mecanismo proposto para degradação da clorofila em tecidos vegetais. Fonte: Heaton & Marangoni (1996).

As clorofilas e as feofitinas são lipossolúveis, em decorrência de sua porção fitol, enquanto as clorofilidas e os feoforbídeos (sem fitol) são hidrofílicos (Belitz & Grosch, 1988).

Vários autores têm estudado a cinética de síntese e degradação da clorofila em diversas espécies de sementes, tais como canola (Endo et al., 1992; Johnson-Flanagan & Thiagarajah, 1990), couve, brócolis, repolho (Heaton et al., 1996; Khachik et al., 1986; Schwartz et al., 1981; Weemaes et al., 1999), feijão verde (Monreal et al., 1999), feijão (Stangarlin et al., 2000) e soja (Sinnecker, 2002). Alguns estudos baseiam-se em indicadores do teor de clorofila, como medida de cor ou atividade enzimática; outros investigam os pigmentos, monitorando o acúmulo e ou a retenção da clorofila, utilizando diversas técnicas como espectrofotometria, fluorescência de clorofila, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (Breemen et al., 1991; Jalink et al., 1998; Schwartz & Lorenzo, 1990).

O processo de degradação da clorofila é complexo e pode refletir ou não na qualidade do lote. Ainda existem fatores interferentes nesse processo que foram pouco elucidados. Tem sido relatado na literatura que o etileno promove aumento na atividade das enzimas clorofilase e oxidases (Shimokawa et al., 1978; Yamauchi et al., 1997), responsável pela degradação da clorofila e desaparecimento da cor verde, além de estimular a carotenogênese, o que promove o aparecimento da cor amarela (Stewart & Wheaton, 1972).

Por meio de estudos mais aprofundados, citados por Gossauer & Engel (1996), considerando a estrutura e os mecanismos do catabolismo da clorofila, têm demonstrado que duas enzimas, a clorofilase e a magnésio-chelatase, também conhecida como magnésio-dechelata-se, estão envolvidas nesse processo.

Em alguns estudos têm sido constatados que a enzima clorofilase possui características muito peculiares. *In vivo*, ela tem atividade latente nos

cloroplastos e *in vitro*, a sua ativação necessita de altas concentrações de solventes polares e, em meio aquoso, a temperatura ótima de atividade é entre 40°C e 60°C. Em temperaturas acima de 80°C, sua atividade é significativamente reduzida (Johnson-Flanagan & Thiagarajah, 1990; Takamyia et al., 2000). Como a clorofilase e a clorofila são encontradas nos tilacóides dos cloroplastos, o mecanismo pelo qual o contato entre enzima e substrato é controlado *in vivo* permanece um mistério, embora haja evidências de que a clorofila esteja complexada a apoproteínas (Matile et al., 1999) e de que a enzima possa estar latente sob condições naturais (Schoch & Brown, 1987).

A atividade de clorofilase tem sido estudada, principalmente, no processo de senescência de plantas ou mesmo em maturação de frutos. O mais óbvio sintoma da senescência foliar é o amarelecimento, devido à maior retenção de carotenóides em relação às clorofilas, que são degradadas. Isso ocorre porque a combinação de clorofila, luz e oxigênio em folhas senescentes produz radicais livres que poderiam destruir a compartimentalização celular e impedir, assim, a reciclagem de nutrientes para o resto da planta (Matile et al., 1989). Sabater & Rodríguez (1978) verificaram que a clorofilase parece ser responsável pela degradação de clorofila durante a senescência de folhas de aveia. Em canola, a degradação de clorofila durante a maturação de sementes está associada com o incremento da atividade de clorofilase e também de peroxidase (Johnson-Flanagan & Spencer, 1996). Rodríguez et al. (1987) também encontraram forte correlação entre o conteúdo de clorofila e o incremento na atividade de clorofilase durante a senescência de folhas de cevada. Stangarlin (1999) e Stangarlin et al. (2000), trabalhando com feijão, observaram relação inversa entre a concentração de clorofilas e a atividade de clorofilase, indicando que a redução no teor dos pigmentos, provavelmente, ocorre em função da lise enzimática e não pela supressão de sua síntese. Todos esses autores defendem a hipótese de que a clorofilase tem um papel importante

no catabolismo de clorofila durante a senescência das folhas e que a regulação hormonal da degradação da clorofila pode ser, em parte, devido à regulação da enzima.

Poucos estudos têm sido relatados a respeito da magnésio-chelatase (Mg-chelatase), enzima responsável pela remoção do íon  $Mg^{2+}$  da molécula de clorofila. De acordo com Gossauer & Engel (1996), as informações são escassas devido, parcialmente, à dificuldade de distinguir endogenamente esse processo enzimático. Entretanto, Nakayama et al. (1995), lançando mão dos avanços da biologia molecular, caracterizaram a estrutura, a localização subcelular e a expressão de uma subunidade da Mg-chelatase em soja. Walker & Willows (1997) relataram o mecanismo da Mg-chelatase em plantas superiores, além dos aspectos fisiológicos, como a localização da enzima, sua regulação nos pontos de ramificação e a regulação gênica. Em outra pesquisa, conduzida por Tewari & Tripathy (1998) em melão e trigo, foi constatado que o estresse de temperatura induz à diminuição na reação biosintética de clorofila, causada pela inativação das enzimas envolvidas no processo, principalmente a Mg-chelatase.

#### **2.4 Retenção de clorofilas e qualidade de sementes**

Para a maioria das espécies de sementes, a quantidade de clorofila diminui durante o processo de maturação. Ao mesmo tempo, a cor da semente muda de verde para uma cor característica, dependendo da espécie e da cultivar. Este processo é chamado de descoloração, porém, esta alteração na cor da semente ainda não é totalmente conhecida.

Um lote pode conter sementes em fases de maturação variadas. As diferenças de maturação entre sementes individuais podem ficar até maiores, devido às condições adversas de clima que precedem a colheita ou às diferenças de planta para planta.

Sob condições favoráveis, a planta amadurece e a enzima clorofilase degrada a clorofila para resultar na coloração normal das sementes de soja. No verão, quando o tempo é extremamente quente e seco, durante os últimos estádios de maturação da semente, esta atividade é influenciada. Acredita-se que, com a morte prematura das plantas e, conseqüentemente, a maturação forçada das sementes, a atividade da enzima clorofilase cessa antes que toda a clorofila seja degradada (Bohner, 2005).

O grau de coloração verde dependerá do estágio de desenvolvimento da planta e da intensidade dos estresses, que possam causar sua morte prematura. Se o estresse ocorrer no final da fase de enchimento das sementes, a coloração verde estará confinada ao tegumento e poderá diminuir durante o período de armazenamento. Se ocorrer no início ou no meio da fase de enchimento, essa coloração se distribuirá por toda a semente e permanecerá estável, mesmo após longo tempo de armazenamento (Wiebold, 2002, citado por Mandarino, 2005).

Segundo Bohner (2005), nos EUA, existem dois tipos de soja verde. A primeira categoria caracteriza-se pela coloração verde na parte externa da semente, enquanto que o interior permanece amarelo. Essas sementes são classificadas como “classe 2”. Na segunda categoria, entretanto, a coloração verde é encontrada por toda a semente, que é classificada como “semente danificada”, que é descontada dos produtores de soja americanos, uma vez que a clorofila é levada para o óleo, durante o processamento e tem efeito direto sobre a sua qualidade e reduz o rendimento do mesmo. No Brasil, lotes de grãos com mais de 10% de semente esverdeada, estão sujeitos a esse deságio.

Ward (1990) e McGregor (1991) concluíram que os níveis de clorofila presentes nas sementes na fase de colheita são afetados igualmente pelo genótipo e pelas condições climáticas, principalmente a temperatura no período de maturação das sementes. Da mesma maneira, Costa et al. (2001) observaram, nos estados de Goiás e Minas Gerais, que a ocorrência de sementes verdes

encontradas em lotes de soja, poderá estar associada a condições climáticas adversas durante o estágio de maturidade da soja ou à própria constituição genética das cultivares.

As condições climáticas são problemáticas para a qualidade das sementes em muitas culturas e, freqüentemente ocorrem no período entre a obtenção do máximo de peso seco na maturidade de colheita (TeKrony et al., 1980). Segundo Mondragon & Potts (1974), o processo de deterioração pode ocorrer em qualquer ponto, durante a fase de maturação, porém, seus efeitos negativos serão mais acentuados quando o teor de água das sementes for inferior a 25%. Os autores indicam claramente a influência marcante da temperatura como parâmetro determinante da qualidade da semente produzida. Em geral, altas temperaturas e umidade (individuais ou combinadas) são os fatores ambientais que mais contribuem para os danos ocasionados pelo clima.

Condições climáticas adversas, como intenso veranico durante as fases de histodiferenciação e maturação na cultura da soja, resultam na maturação forçada das sementes, acarretando baixos rendimentos e ocorrência de sementes esverdeadas, o que resultará em acentuada redução das suas qualidades, além de severa redução da produtividade da lavoura (França Neto et al., 2005). Tal problema foi relatado na região de Cerrado no Brasil Central, na China (Theanjumol, 2002), em várias regiões próximas de Ontário, no Canadá e na região de Kansas, nos EUA (Bohner, 2005).

Em determinadas regiões do estado do Paraná, o baixo potencial de germinação atribuído normalmente às condições climáticas desfavoráveis durante o período de maturação é o principal fator de eliminação de lotes de sementes (Costa et al., 1994). Estes mesmos autores, avaliando 1.226 amostras de sementes de soja da cv. Paraná, produzidas por produtores de sementes naquele estado, verificaram que existem áreas mais propícias à produção de sementes de soja de cultivares precoces. Nessas áreas, a ocorrência de

temperaturas mais amenas ( $< 22^{\circ}\text{C}$ ), durante a fase de maturação favorece a produção de sementes de qualidades fisiológica e sanitária superiores. Observaram, ainda, que a deterioração por umidade e danos mecânicos foram os principais fatores responsáveis pela redução da qualidade das sementes analisadas.

Outra pesquisa foi conduzida por Theanjumpol (2002), para verificar os efeitos do conteúdo de umidade da vagem e da temperatura de maturação sobre a cor e a qualidade da semente de soja, cultivar CM-60. O autor utilizou vagens com umidades de 24%, 19% e 14% e temperaturas de  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $32^{\circ}\text{C}$ ,  $39^{\circ}\text{C}$  e  $46^{\circ}\text{C}$  e constatou que os tratamentos com vagens a 19% de umidade e temperatura na maturação de  $39^{\circ}\text{C}$  poderiam diminuir a cor verde das sementes mais rapidamente do que nos outros tratamentos. Verificou que o valor médio de clorofila nas sementes submetidas a esse tratamento foi decrescendo para 0,00  $\mu\text{g/g}$ , em dois dias. Entretanto, a germinação e o vigor à  $39^{\circ}\text{C}$  eram 80% e 37%, enquanto que, na temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , eram de 84% e 40%, respectivamente.

Na soja, temperaturas superiores a  $32^{\circ}\text{C}$  são suficientes para acionar o sistema de proteção das sementes contra o excesso de calor, mediante a síntese de proteínas de choque térmico, cuja formação é mais eficiente em determinadas cultivares. A ausência dessas proteínas protetoras resulta na formação de sementes enrugadas e de baixa qualidade (França Neto & Krzyzanowski, 1990).

Temperaturas elevadas são consideradas as principais responsáveis pela maturação “forçada” em soja (França Neto et al., 2005). Os efeitos dos estresses ambientais, principalmente os causados pela temperatura, ainda não são completamente conhecidos. Estudos sobre o assunto sugerem que a elevação de temperatura, até atingir valores superiores a  $30^{\circ}\text{C}$ , durante o período de transferência de matéria seca da planta para as sementes, pode causar prejuízos severos à produção e à qualidade das sementes. Nessa condição, ocorre a translocação muito rápida das reservas, impedindo a degradação completa da

clorofila, provocando a formação de sementes esverdeadas, de baixa qualidade e com desempenho comprometido (Marcos Filho, 2005).

As conseqüências mais drásticas de condições climáticas adversas são a aceleração do processo de deterioração e a perda de viabilidade das sementes. Em diversos estudos tem sido observado que a deterioração das sementes está relacionada a alterações enzimáticas, como redução da atividade das enzimas catalase, diastase, peroxidase,  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase e desidrogenases (França Neto et al., 2000). Além disso, a deterioração das sementes e a atividade de alguns microrganismos podem interagir em diversos processos, resultando em acentuadas taxas de deterioração.

Outro fator que afeta a incidência de sementes esverdeadas é a infecção por fungos. Na literatura tem sido relatado que microrganismos produzem enzimas e toxinas exocelulares (Halloin, 1986), podendo causar aumento de danos às membranas, aumento da lixiviação de solutos das sementes na fase de embebição, inibição da atividade da clorofila, granulação do retículo endoplasmático e redução da germinação das sementes.

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, interfere no funcionamento dos tecidos, provocando a queda prematura das folhas, a qual evita a plena formação dos grãos. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior a perda de rendimento e de qualidade, devido à ocorrência de sementes esverdeadas. Outras doenças que podem acarretar o mesmo problema são a fusariose (raiz) e o cancro da haste (colmo), que resultam na morte prematura da planta ou em maturação forçada da mesma (França Neto et al., 2005).

De uma maneira geral, na literatura são poucos os trabalhos relacionados com a produção de sementes de soja esverdeada.

Utilizando quatro cultivares de soja e quatro níveis de sementes verdes, Costa et al. (2001) observaram que percentuais de sementes verdes superiores a

10% geralmente poderão levar a problemas na qualidade fisiológica. Esses autores verificaram que a incidência de sementes verdes tem relação direta com os índices de deterioração por umidade, sendo que, à medida que ocorrem acréscimos dos níveis de sementes verdes em lotes de elevado padrão fisiológico, normalmente, observa-se redução acentuada da germinação, do vigor e da viabilidade das sementes. Resultados similares foram também obtidos por Medina et al. (1997), por Pupim et al. (2005) e por Zorato et al. (2003), que concluíram que a presença de sementes verdes afetou de modo expressivo a qualidade das sementes de soja analisadas.

Sinnecker (2002) investigou a degradação da clorofila em sementes de três cultivares de soja, colhidas em seis estádios de maturação e secadas em três temperaturas de secagem, 25°C, 40°C e 75°C. O autor verificou que a degradação completa da clorofila somente pode ser obtida se as sementes forem colhidas a partir do estágio R<sub>7</sub>. Na secagem lenta à temperatura ambiente (25°C), a clorofila foi totalmente degradada. Em estufa, a 40°C e 75°C, houve acúmulo de clorofilas e feofitinas, sendo que, na temperatura mais elevada (75°C), a rápida perda de umidade causou a inativação de todas as enzimas, inclusive a clorofilase, que é a mais resistente termicamente.

Vários pesquisadores têm procurado investigar os pigmentos utilizando diversas técnicas e em várias espécies. Em trabalhos utilizando fluorescência de clorofila (FC) têm sido verificadas diferenças em quantidades relativas de clorofila em sementes individuais de um mesmo lote. Jalink et al. (1998), baseados na magnitude do sinal de fluorescência de clorofila, dividiram sementes em várias classes de maturidade, obtendo resultados evidenciando que a FC pode ser usada para melhor separar sementes de repolho, de diferentes graus de maturação, separando-se sementes mortas de viáveis e, dentre estas, as de maior qualidade fisiológica para fins de semeadura, proporcionando, assim, um estande mais uniforme.

Estudos visando quantificar a emissão de fluorescência de clorofila em sementes de repolho, usando um espectrofotômetro ótico, separando manualmente cada lote de sementes, foram realizados por Taylor et al. (1993), utilizando um comprimento de onda da luz de 365 nm. Após selecionadas, as sementes foram fotografadas sob luz ultravioleta e a porcentagem daquelas que apresentaram fluorescência foi determinada. Foram observados incrementos nos valores de germinação de sementes dos lotes submetidos a essa seleção, sendo os maiores incrementos nos lotes de média e alta qualidades. Os autores concluíram que a tecnologia da seleção por meio da coloração sob luz ultravioleta pode ser empregada visando à melhoria da qualidade do lote de sementes de repolho, pela retirada das sementes de baixa qualidade, ou seja, aquelas com altos teores de clorofila.

Steckel et al. (1989) colheram sementes de cenoura em diferentes fases de maturação e observaram uma diminuição no conteúdo total de clorofila na semente, durante seu desenvolvimento. Coincidentemente, com a diminuição no conteúdo de clorofila total, a germinação das sementes de cenoura aumentou.

Utilizando sementes de lentilha, Mills et al. (1999) efetuaram estudos visando estabelecer relações entre sua coloração, bem como suas variações, com alterações em seus pH e condutividade elétrica, relacionando-se com a germinação final. Observaram que mudanças no pH, na condutividade elétrica e na germinação estavam relacionadas com alterações na cor das sementes de lentilha, podendo ser usados como um método para avaliar sua qualidade.

Apesar da importância da transformação da clorofila em seus derivados durante o processo de maturação de sementes de soja, pouco se conhece sobre os mecanismos responsáveis pela degradação do pigmento nessas sementes, bem como as causas da ocorrência de sementes verdes e esverdeadas e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica, alterações bioquímicas e atividade enzimática em sementes.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigor. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 6, p. 765-771, Dec. 1980.
- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 6, p. 630-633, Nov./Dec. 1973.
- ANDERSON, J. M.; SPILATRO, S. R.; KLAUER, S. F.; FRANCESCHI, V. R. Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. **Plant Science**, Clare, v. 62, n. 1, p. 45-52, 1989.
- BELITZ, H. D.; GROSCHE, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. 813 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 412.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 100, n. 1, p. 225-230, Sept. 1992.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989. 223 p.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 151 p.
- BOHNER, H. **Green Soybeans**. Disponível em: <[http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct\\_1102a2.htm](http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct_1102a2.htm)> Acesso em: 12 jul. 2005.
- BREEMEN, R. B.; CANJURA, F. L.; SCHWARTZ, S. J. Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 8, p. 1452-1456, Aug. 1991.

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

COSTA, A. V.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R. F. **Alguns fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente de soja**. Goiânia: EMGOPA, 1987. 48 p.

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 102-107, 2001.

COSTA, N. P.; PEREIRA, L. A. G.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C. Zoneamento ecológico do estado do Paraná para produção de sementes de cultivares precoces de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 12-19, 1994.

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

EGLI, D. B. Seed growth and development. In: EGLI, D. B. (Ed.). **Seed Biology and the yield of grain crops**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 15-37.

ELLIS, R. H.; PIETA FILHO, C. The development of seed quality in spring and winter cultivars of barley and wheat. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 1, p. 9-15, Mar. 1992.

ENDO, Y.; THORTEINSON, C. T.; DAUN, J. K. Characterization of chlorophyll pigments present in canola seed, meal and oil. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 69, n. 6, p. 564-568, June 1992.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid active the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 2, p. 129-134, Feb. 1992.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Sementes enrugadas: novo problema na soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1990. 4 p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, n. 46).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: EMBRAPA Soja. **A cultura da soja no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 1CD-ROM.

FRANÇA NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M. de, COSTA, O.; BRUMATTI, P. S. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da, HENNING, A. A.; SANCHES, D. P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 38).

GOSSAUER, A.; ENGEL, N. Chlorophyll catabolism – structures, mechanisms, conversions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 32, n. 3, p. 141-151, Feb. 1996.

GROSS, J. **Pigments in vegetables chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351 p.

HALL, D. D.; RAO, K. K. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU, 1980. 89 p.

HALLOIN, J. M. Microorganisms and seed deterioration. In: McDONALD Jr.; M. B. e NELSON, C. J. (Ed.). **Physiology of seed deterioration**. Madison: Crop Science Society of America, 1986. v. 1, p. 98-99. (Special Publication, 11).

HAMER, E. **Maturação de sementes de soja no trópico úmido**. 1999. 58 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HARRINGTON, J. F. Problems of seed storage. In: HEYDECKER, W. H. (Ed). **Seed Ecology**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1973. p. 251-265.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 8-15, Jan. 1996.

HEATON, J. W.; YADA, R. Y.; MARANGONI, A. G. Discoloration of coleslaw is caused by chlorophyll degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 2, p. 395-402, Feb. 1996.

HOLT, A. S. Further evidence of the relation between 2-desvinyl-2-formyl-chlorophyll-d. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 39, p. 237, 1961.

JACKSON, A. H. Structure, properties and distribution of chlorophylls. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. 2. ed. London. New York: Academic Press, 1976. v. 2, 522 p.

JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; FRANDAS, A.; VAN PIJLEN, J. G.; BINO, R. J. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 4, p. 437-443, Dec. 1998.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; THIAGARAJAH, M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, cv. Westar) embryos under optimum conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 136, n. 2, p. 180-186, May 1990.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; SPENCER, M. S. Chlorophyllase and peroxidase activity during degreening of maturing canola (*Brassica napus*) and mustard (*Brassica juncea*) seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 2, p. 353-359, June 1996.

KATO, T.; OHTA, H.; TANAKA, K.; SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 1, p. 324-330, Jan. 1992.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WHITTAKER, N. F. Separation, identification and quantification of major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, n. 4, p. 603-616, July/Aug. 1986.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

MACRI, F.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; VIANELLO, A. Lipoxygenase activity of plasmalemma and its relation to plant cell senescence and stress response. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, Budapest, v. 30, n. 1/2, p. 81-87, 1995.

MANDARINO, J.M.G. **Coloração esverdeada nos grãos de soja e seus derivados**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 4p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico 77).

MANGOS, T. J.; BERGER, R. G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Zitschrift fur Lebensmittel –Untersuchung und-Forschung**, New York, v. 204, n. 5, p. 345-350, 1997.

MARCOS FILHO, J. Maturidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 4, p. 447-460, abr. 1980.

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

MATILE, P.; DÜGGELIN, T.; SCHELLENBERG, M.; RENTSCH, D.; BORTLIK, K.; PEISKER, C.; THOMAS, H. How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves? **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 27, n. 4, p. 595-604, July/Aug. 1989.

MATILE, P.; HÖRTENSTEINER, S.; THOMAS, H. Chlorophyll degradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 67-95, 1999.

McDONALD, Jr.; M. B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Lansing, v. 65, p. 109-139, 1975.

McGREGOR, D. I. Influence of environment and genotype on rapeseed/canola seed chlorophyll content. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 1, p. 107-116, 1991.

MEDINA, P. F.; LAGO, A. A.; RAZERA, L. F.; MAEDA, J. A. Composição física e qualidade de lotes de sementes de soja com incidência de sementes esverdeadas. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 7, n. 1/2, p. 36, 1997. Edição dos Resumos do X Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu, 1997.

MILLS, J. T.; WOODS, S. M.; WATTS, B. M.; LAMARI, L.; WHITE, N. D. G. Comparison of techniques to measure seed color and its relationship to other quality parameters in stored lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 3, p. 1015-1021, 1999.

MONDRAGON, R. L.; POTTS, H. C. Field deterioration of soybean as affected by environmen. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Beltsville, v. 64, p. 63-71, 1974.

MONREAL, M.; ANCOS, B.; CANO, M. P. Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs. Perona and Bobby). **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 1, p. 19-24, Jan. 1999.

NAKAYAMA, M.; MASUDA, T.; SATO, N.; YAMAGATA, H.; BOWLER, C.; OHTA, H.; SHIOI, Y.; TAKAMIYA, K. Cloning, subcellular localization and expression of CHLI, a subunit of magnesium-chelatase in soybean. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 215, n. 1, p. 422-428, Oct. 1995.

PARK, T. K.; HOLLAND, M. A.; LASKEY, J. G.; POLACCO, J. C. Germination-associated lipoxygenase transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Science**, Clare, v. 96, n. 1/2, p. 109-117, 1994.

PORRA, R.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 975, p. 384-394, 1989.

PRIESTLEY, D. A.; WERNER, B. G.; LEOPOLD, A. C.; McBRIDE, M. B. Organic free radical levels in seeds and pollen: The effects of hydration and aging. **Physiologia Plantarum**, Munksgaard, v. 64, n. 1, p. 88-94, 1985.

PUPIM, T. L.; CARVALHO, M. L. M.; PÁDUA, G. P.; NERY, M. C.; FRANÇA NETO, J. B. Ocorrência de sementes verdes e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 15, n. 1/3, p. 238, 2005. Edição dos Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu, 2005.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, C. E.; BENSON, G. O. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1994. 20 p. (Special Report, 53).

ROBERTS, E. H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 515-527, 1973.

RODRÍGUEZ, M. T.; GONZÁLEZ, M. P.; LINARES, J. M. Degradation of chlorophyll and chlorophyllase activity in senescing barley leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 129, n. 3/4, p. 369-374, Aug. 1987.

RÜDIGER, W.; SCHOCH, S. Chlorophylls. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Plant pigments**. New York: Academic Press, 1988. cap. 1, p. 1-53.

SABATER, B.; RODRÍGUEZ, M. T. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 274-276, 1978.

SANTOS, A. L. C. dos. **Variabilidade entre genótipos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] nas fases imatura e madura de desenvolvimento**. 1989. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SCHOCH, S.; BROWN, J. The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 126, n. 4/5, p. 483-494, Jan. 1987.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophylls in foods. **Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SCHWARTZ, S. J.; WOO, S. L.; VON ELBE, H. J. High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 29, n. 3, p. 533-535, May/June 1981.

SHIMOKAWA, K.; SHIMADA, S.; YAEO, K. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of Citrus unshiu Marc. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 129-135, 1978.

SIEDOW, J. N. Plant Lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 145-188, 1991.

SIMON, E. W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytologist**, London, v. 73, n. 2, p. 377-420, 1974.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja**. 2002. 103 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

STANGARLIN, J. R. **Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), clorofilase, B-1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces***

*appendiculaatus* Ou *Phaeoisariopsis griseola*. 1999. 119 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) c- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; LABATE, C. A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase,  $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 59-66, jan./mar. 2000.

STECKEL, J. R. A.; GRAY, D.; ROWSE, H. R. Relationships between indices of seed maturity and carrot seed quality. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 114, n. 1, p. 177-183, Feb. 1989.

STEPHENSON, L. C.; BUNKER, T. W.; DUBBS, W. E.; GRIMES, H. D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 3, p. 923-933, Mar. 1998.

STEWART, I.; WHEATON, T. A. Carotenoids in citrus: their accumulation induced by ethylene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, n. 2, p. 448-449, Mar./Apr. 1972.

SUZUKI, Y.; TANABE, K.; SHIOI, Y. Determination of chemical oxidation products of chlorophyll and porphyrin by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 839, n. 1/2, p. 85-91, Apr. 1999.

TAKAMYIA, K.; TSUCHIYA, T.; OHTA, H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? **Trends Plant Science**, London, v. 5, n. 10, p. 426-431, Oct. 2000.

TAYLOR, A. G.; CHURCHILL, D. B.; LEE, S. S.; BILSLAND, D. M.; COOPER, T. M. Color sorting of coated brassica seeds by fluorescent sinapine leakage to improve germination. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 4, p. 551-556, July 1993.

TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; BALLE, J.; PFEIFFER, T.; FELLOWS, J. R. Physiological maturity of soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v. 71, n. 5, p. 771-775, Sept./Oct. 1979.

TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; BALLE, J. The effect of the field production environment on soybean seed quality. In: HEBBLETHWAITE, P. D. (ed.). **Seed Production**. London: Butterworths, 1980. p. 403-425.

TEWARI, A. K.; TRIPATHY, B. C. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in Cucumber and Wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 3, p. 851-858, July 1998.

THEANJUMPOL, P. **Effect of moisture content and curing temperature on seed color and quality of soybean**. 2002. Thesis (M Sc.) – Chiang Mai University.

WALKER, C. J.; WILLOWS, R. D. Mechanism and regulation of Mg-chelatase. **Biochemistry Journal**, Great Britain, v. 327, n. 2, p. 321-333, Oct. 1997.

WARD, K. **The effect of genotype, environment and agronomic practices on the chlorophyll level in harvested canola seed**. Winnipeg, 1990. 127 p. Thesis (PhD) – University of Manitoba.

WARD, K.; SCARTH, R.; DAUN, J.; VESSEY, J. K. Chlorophyll degradation in summer rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, n. 2, p. 413-420, Apr. 1995.

WEEMAES, C. A.; OOMS, V.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in broccoli juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 6, p. 2404-2409, June 1999.

WEIDHASE, R. A.; KRAMELL, H. M.; LEHMANN, J. Methyl jasmonate induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf fragments. **Plant Science**, Clare, v. 51, n. 2/3, p. 177-186, 1987.

WILSON, Jr.; D. O.; McDONALD, Jr.; M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, n. 2, p. 269-300, 1986.

XU, N.; COULTER, K. M.; BEWLEY, J. D. Prevention of alfalfa germination during development. **Planta**, Berlim, v. 182, n. 3, p. 380-390, 1990.

YAMAUCHI, N.; AKIYAMA, Y.; KAKO, S.; HASHINAGA, F. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 35-42, 1997.

ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA NETO, J. B. Sementes de soja que retêm clorofila e qualidade fisiológica. **Informativo**

**ABRATES**, Curitiba, v. 13, n. 3, p. 295, 2003. Edição dos Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Sementes, Gramado, 2003.

## CAPÍTULO 2

### **RETENÇÃO DE CLOROFILAS E QUALIDADE DE SEMENTES DE SOJA PRODUZIDAS SOB ESTRESSES, EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO**

#### **RESUMO**

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Retenção de clorofilas e qualidade de sementes de soja produzidas sob estresses, em diferentes estádios de desenvolvimento.** Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).

Condições climáticas desfavoráveis, principalmente na região Central do Brasil, durante o período de maturação da soja, têm ocasionado o aparecimento de semente de soja verde. Essa incidência, em condições de campo, pode variar em função de aspectos como a época de ocorrência ou o tipo de estresse a que as plantas são submetidas. Os objetivos desta pesquisa foram: verificar em qual estádio de desenvolvimento da planta a imposição de estresses de temperatura e deficiência hídrica propicia maior ocorrência de semente verde, e observar a variação dessa ocorrência em diferentes partes da planta e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja. Sementes da cultivar CD 206 foram produzidas em casa de vegetação permanecendo até o estádio de desenvolvimento R<sub>5.5</sub>. Na fase final de maturação da soja, nos estádios R<sub>6</sub> e R<sub>7.2</sub>, as plantas foram transferidas para câmaras de crescimento (fitotrons), para a indução de estresse térmico, com temperaturas elevadas (variações de 28°C a 36°C) e temperaturas amenas (variações de 19°C a 26°C). Para o estresse hídrico, a quantidade de água nos vasos foi controlada nos seguintes níveis: testemunha (suprimento adequado de água); 30% de umidade gravimétrica (Ug); 20% de Ug; e sem água (corte total de irrigação). A qualidade da semente, colhida no estádio R<sub>9</sub>, foi avaliada pelos testes de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica. Determinou-se, ainda, o peso de 100 sementes e a porcentagem de semente verde em diferentes posições na planta. A porcentagem de ocorrência de semente verde variou de 8,6% a 86% em função da variação de umidade e de temperatura. A imposição de estresses de elevada temperatura e corte total de irrigação, no estádio de desenvolvimento R<sub>6</sub>, propiciaram acentuada ocorrência de sementes verdes. Estresse hídrico intenso (20% de Ug e corte total de irrigação) em R<sub>6</sub> e R<sub>7.2</sub>, quando associado com temperaturas amenas, não resulta na ocorrência de índices significativos de semente verde. Não existem variações de ocorrência de semente verde nas diferentes partes da planta, no que se refere a sua posição nos terços inferior, médio e superior. A qualidade fisiológica de sementes de soja é afetada negativamente pela incidência de semente verde.

## ABSTRACT

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Physiological quality and chlorophyll retention in soybean seed produced under environmental stresses imposed in different developmental stages.** Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Thesis – Doctorate in Crop Science).

The occurrence of unfavorable weather conditions during soybean seed filling is very common in tropical areas of South America, and it can result in the production of high content of green immature seed. It has been demonstrated that the level of expression of this problem is dependant on different factors, such as type of climatic stress and when it occurs. The objectives of this study were to determine the stage of development of soybean plants in which high temperature and water deficit stresses can be imposed, resulting in the production of high percentages of green seed, and to evaluate its consequences on seed physiological quality. Plants of the cultivar CD 206 were grown in pots under greenhouse conditions until the developmental phase R<sub>5.5</sub>. Plants were transferred to growing chambers (phytotrons) at the growing stages R<sub>6</sub> (pods with fully developed seed with green leaves) and R<sub>7.2</sub> (between 51% to 75% yellow leaves and pods), for the induction of water deficit and high temperature stresses. Two temperature regimes were imposed: high temperatures, ranging from 28°C to 36°C; and normal, from 19° to 26°C. Four soil water conditions were imposed: control (adequate water supply); 30% gravimetric moisture (GM); 20% GM; and no water supply. Seed were harvested at R<sub>9</sub> when the percentage of green seeds and weight of 100 seed at the upper, medium and lower thirds of each plant were evaluated. Seed quality was evaluated by germination, tetrazolium (viability and vigor) and electrical conductivity tests. The percentage of occurrence of green seed varied from 8.6% to 86% depending on the level of water and temperature stresses. Imposing high temperature stress associated with no water supply at the R<sub>6</sub> stage resulted in high level of expression of green seed. Intensive water stress (20% GM and no water supply) after R<sub>6</sub> and R<sub>7.2</sub> associated with normal temperatures did not result in the occurrence of significant levels of green seed. No difference in the percentage of green seed was detected in the three thirds of the plants. Physiological quality of soybean seed is negatively affected by the incidence of green seed.

## 1 INTRODUÇÃO

Alterações no processo de desenvolvimento ou maturação da semente podem ocorrer, principalmente, sob condições climáticas desfavoráveis, acarretando prejuízos consideráveis à qualidade das sementes.

A proporção dos danos está diretamente relacionada a um longo período de exposição da semente no campo. Aliado a esse fato, a dificuldade em se produzir sementes de boa qualidade tem sido aumentada devido à grande desuniformidade na maturação. Mesmo nas regiões tradicionais de cultivo de soja, há uma certa desuniformidade na maturação, dentro das plantas da população de uma mesma cultivar.

Alterações degenerativas por umidade começam a ocorrer nas sementes, principalmente após a maturidade fisiológica, causadas pela alternância de períodos secos e úmidos, aliada a temperaturas elevadas na fase final de maturação. A deterioração causada por umidade está diretamente relacionada à exposição das sementes a essa alternância, de modo que a qualidade fisiológica pode ser mantida ou pode decrescer, dependendo das condições ambientais que antecede a colheita (McDonald Jr., 1975).

Temperaturas elevadas são consideradas responsáveis pela maturação forçada em soja. Plantas imaturas, quando expostas a esse estresse ambiental, poderão produzir ou mesmo levar à formação de sementes verdes, o que acarreta prejuízos severos à produção e à qualidade das sementes.

Nesse sentido, os objetivos nessa pesquisa foram avaliar a ocorrência de soja verde em plantas submetidas a estresses de elevada temperatura e deficiência hídrica, bem como diagnosticar o efeito dessa ocorrência na qualidade fisiológica de sementes de soja.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Localização do experimento**

As sementes de soja da cultivar CD 206 foram produzidas em casa de vegetação na Embrapa Soja, em Londrina, PR. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Sementes da Embrapa Soja e do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no período de outubro de 2004 a agosto de 2005.

### **2.2 Condições de estresse**

Foram preparados 56 vasos, sendo 48 para o experimento e 8 para a determinação dos pesos das plantas e das raízes (para a definição do suprimento de água, por ocasião do início da imposição dos estresses térmico e hídrico), com mistura de terra e areia na proporção de 4:1. Cada vaso continha 6.000 g da mistura.

A indução de condições de estresse térmico e hídrico foi iniciada durante a fase de maturação da soja em dois diferentes estádios: R<sub>6</sub> (vagens com granação de 100% e folhas verdes) e R<sub>7,2</sub> (entre 51% a 75% de folhas e vagens amarelas).

Os estádios R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub> foram considerados com base nos estádios de desenvolvimento da soja, adaptado de Ritchie et al. (1994), em que, no estádio R<sub>6</sub>, a vagem contém sementes verdes que preenchem totalmente a sua cavidade, estando, portanto, completamente desenvolvida. Já no estádio R<sub>7,2</sub>, a semente encontra-se na maturidade fisiológica.

Foram utilizados três vasos com duas plantas cada por tratamento. Em casa de vegetação, as plantas foram irrigadas diariamente até os estádios R<sub>6</sub> ou R<sub>7,2</sub>, quando foram transferidas para os fitotrons, onde permaneceram sob condições predeterminadas de temperatura e de umidade do solo até a maturação final das sementes (R<sub>9</sub>), quando realizou-se a colheita manual.

### **2.2.1 Estresse térmico**

Para a indução de estresse térmico foram utilizadas duas câmaras de crescimento (fitotrons), uma com temperaturas elevadas (28°C das 17:00 h às 8:00 h; 32°C das 8:00 h às 10:00 h; 36°C das 10:00 h às 14:00 h; e 32°C das 14:00 h às 17:00 h) e outra com temperaturas amenas (19°C das 17:00 h às 8:00 h; 24°C das 8:00 h às 10:00 h; 26°C das 10:00 h às 14:00 h; e 24°C das 14:00 h às 17:00 h). O fotoperíodo utilizado foi de 12,5 h, das 07:00 h às 19:30 h.

### **2.2.2 Estresse hídrico**

O estresse hídrico foi realizado sob quatro condições de disponibilidade hídrica do solo. A quantidade de água nos vasos foi controlada nos seguintes níveis: testemunha, com suprimento adequado de água (cerca de 1,0 L de água administrado diariamente às plantas em cada vaso); 30% de umidade gravimétrica (Ug); 20% de Ug e sem água (corte total de irrigação). A umidade gravimétrica foi calculada pela relação entre a massa de água presente na amostra de terra e a massa seca da mesma amostra (Embrapa, 1997).

Diariamente, às 14:00 h, cada vaso foi pesado e os teores de água da terra ajustados, conforme as definições dos tratamentos. Foram coletadas 10 subamostras da mistura terra/areia para verificar o teor de água, pelo método de estufa a 105°C. Com base no peso seco médio da terra, calculou-se a quantidade de água que deveria ser adicionada por vaso, para atingirem-se os níveis de 30% ou 20% de Ug. Esses valores foram mantidos por meio de pesagem diária dos vasos, excluindo-se os pesos médios das plantas, das raízes e o peso do vaso.

### **2.3 Obtenção das sementes**

A colheita foi realizada manualmente, avaliando-se as plantas uma a uma, computando-se o percentual de sementes verdes e o peso de 100 sementes

nos terços inferior, médio e superior de cada planta, os quais foram obtidos dividindo-se a planta em três partes, a partir da inserção da primeira vagem até a parte mediana da planta (terço inferior), parte mediana (terço médio) e da parte mediana ao ápice (terço superior). As descrições dos tratamentos estão representadas no Quadro 1.

**QUADRO 1-** Descrição dos tratamentos relativos aos diferentes estádios de desenvolvimento, à disponibilidade hídrica e à posição das sementes na planta de soja, mantidas em câmaras de crescimento sob diferentes condições de temperatura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tratamento	Estádio (E)	Níveis de água (AG)	Terços da planta
t 01	R <sub>6</sub>	testemunha	superior
t 02	R <sub>6</sub>	testemunha	médio
t 03	R <sub>6</sub>	testemunha	inferior
t 04	R <sub>6</sub>	30% Ug	superior
t 05	R <sub>6</sub>	30% Ug	médio
t 06	R <sub>6</sub>	30% Ug	inferior
t 07	R <sub>6</sub>	20% Ug	superior
t 08	R <sub>6</sub>	20% Ug	médio
t 09	R <sub>6</sub>	20% Ug	inferior
t 10	R <sub>6</sub>	sem água	superior
t 11	R <sub>6</sub>	sem água	médio
t 12	R <sub>6</sub>	sem água	inferior
t 13	R <sub>7.2</sub>	testemunha	superior
t 14	R <sub>7.2</sub>	testemunha	médio
t 15	R <sub>7.2</sub>	testemunha	inferior
t 16	R <sub>7.2</sub>	30% Ug	superior
t 17	R <sub>7.2</sub>	30% Ug	médio
t 18	R <sub>7.2</sub>	30% Ug	inferior
t 19	R <sub>7.2</sub>	20% Ug	superior
t 20	R <sub>7.2</sub>	20% Ug	médio
t 21	R <sub>7.2</sub>	20% Ug	inferior
t 22	R <sub>7.2</sub>	sem água	superior
t 23	R <sub>7.2</sub>	sem água	médio

Após essas determinações, as sementes provenientes dos diferentes terços da planta foram agrupadas para a realização dos testes de germinação, de tetrazólio, de condutividade elétrica e peso de 100 sementes.

## **2.4 Avaliações**

### **2.4.1 Teste de germinação**

Foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes por tratamento, semeadas em substrato de papel na forma de rolo, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco. Os rolos foram mantidos em germinador previamente regulado à temperatura constante de 25°C. As avaliações foram feitas de acordo com Brasil (1992) e os resultados expressos em porcentagem.

### **2.4.2 Teste de tetrazólio**

Duas subamostras de 50 sementes por tratamento foram acondicionadas em substrato de papel umedecido, com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso, durante 16 horas, a 25°C. Posteriormente, as sementes foram colocadas em solução com concentração de 0,075% de 2,3,5-trifenil-cloreto-de-tetrazólio, no escuro, em estufa, com temperatura de 40°C, por 2,5 horas. Após esse período, as sementes foram lavadas em água corrente e analisadas individualmente, verificando-se a porcentagem de vigor, de viabilidade e de danos, conforme metodologia descrita por França Neto et al. (1998).

### **2.4.3 Teste de condutividade elétrica**

Foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes da fração sementes puras, pesadas com precisão de 0,01g, colocadas em copos plásticos

contendo 75 mL de água desionizada e mantidas em incubadora à temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. No mesmo ambiente foi deixado um copo contendo somente 75 mL de água desionizada (Vieira & Krzyzanowski, 1999). Após esse período, foi efetuada a leitura de condutividade elétrica das soluções, utilizando-se de um condutivímetro marca Digimed modelo CD 21A. Os resultados foram obtidos calculando-se a condutividade elétrica determinada para cada repetição, dividida pelo peso das sementes, sendo expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

## **2.5 Análise estatística**

Na primeira etapa das análises, quando foram avaliadas as sementes provenientes dos diferentes terços da planta, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $4 \times 2 \times 3$  (quatro níveis de água, dois estádios de desenvolvimento e três terços da planta), para as temperaturas elevada e amena. As variáveis peso de 100 sementes e porcentagem de sementes verdes foram avaliadas utilizando-se seis repetições por tratamento e apresentadas por meio da construção de Box-plots.

Foi realizada análise estatística para a variável porcentagem de sementes verdes, utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial reduzido para  $2 \times 3$ , com seis repetições, sendo dois níveis de água (20% de Ug e corte total de irrigação) e três terços da planta, fixando-se os fatores temperatura elevada e estádio de desenvolvimento R<sub>6</sub>. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância (Tabela 1A).

Para a variável peso de 100 sementes foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $4 \times 2 \times 3$  (quatro níveis de água, dois estádios de desenvolvimento e três terços da planta), para as temperaturas elevada e amena. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância (Tabelas 2A e 3A).

Após o agrupamento das sementes oriundas dos diferentes terços da planta, numa segunda etapa das análises, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2x2, com três repetições, duas plantas por repetição, sendo quatro níveis de água, dois regimes de temperatura e dois estádios de desenvolvimento, para todas as variáveis, exceto para porcentagem de sementes verdes. Foi realizada a análise de variância, sendo necessário, para algumas variáveis, utilizar transformações angulares ou logarítmicas (Tabela 4A). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para todas as análises estatísticas realizadas foram utilizados os softwares estatísticos R<sup>®</sup> v2.1.1 (R, 2005) e o SISVAR<sup>®</sup> v4.3 (Ferreira, 2000).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados das avaliações da porcentagem de sementes verdes e peso de 100 sementes, provenientes de diferentes posições na planta, foram obtidos na primeira fase de realização do experimento.

#### **3.1 Porcentagem de sementes verdes**

##### **a) Temperatura elevada**

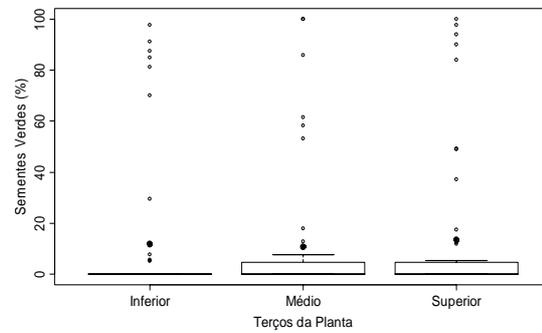
As porcentagens de sementes verdes, em função de estresse hídrico e em temperaturas elevadas, estão apresentadas na Figura 2. Houve uma pequena variação na ocorrência de sementes verdes da base da planta ao terço superior, cuja ocorrência média foi de 11,9% (inferior) a 10,8% (médio) para 13,6%, no terço superior (Figura 1a). Por outro lado, em estudos nesse sentido, relatados por França Neto et al. (2005), foi verificada variação na ocorrência de semente verde em plantas de soja no campo, que tiveram morte prematura e maturação

forçada devido à ocorrência de fusariose nas raízes, com maior concentração de semente verde em seu terço inferior das plantas, em relação ao terço superior.

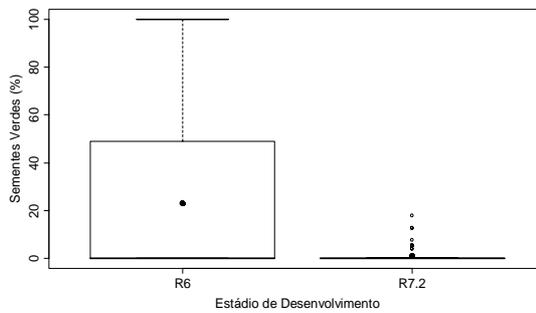
Marcos Filho (2005) relata que o desenvolvimento das sementes depende do suprimento de fotoassimilados e é de se esperar que também seja influenciado pela posição da semente na planta, em relação a outras sementes na mesma planta. Vagens localizadas em nós inferiores da planta de soja são produzidas anteriormente às localizadas nos apicais. De outra maneira, as sementes situadas na base de uma planta podem receber assimilados de folhas mais sombreadas que, provavelmente, apresentam menores taxas de fotossíntese. Ao mesmo tempo, sementes do terço superior da planta estão mais distantes da fonte de assimilados que as do terço inferior.

Após a indução de condições de estresse térmico e hídrico, para cada estágio de desenvolvimento  $R_6$  e  $R_{7,2}$ , foram computadas as porcentagens de sementes verdes cujos resultados são apresentados na Figura 1 (b). Pode-se observar que houve acentuada ocorrência de sementes verdes quando o estresse ocorreu no estágio  $R_6$ , com porcentagens de até 100%. A maioria dos resultados foi de porcentagens abaixo de 50%, representados dentro dos Box plots e cuja média (representada pelo ponto no interior dos Box plots) está em torno de 23%, enquanto que, em  $R_{7,2}$ , a porcentagem média ficou em torno de 1%. No presente experimento, ficou evidenciado que a indução de estresses no estágio  $R_6$  propicia maior ocorrência de semente verde. De acordo com Sinnecker (2002), a soja, no estágio de maturação  $R_6$ , contém um elevado teor de clorofila e, entre  $R_6$  e a maturidade fisiológica, ocorre a degradação praticamente total da clorofila, restando apenas quantidades residuais. Desse modo, estresses hídricos e térmicos a partir de  $R_6$  não resultam na ocorrência de índices significativos de semente verde.

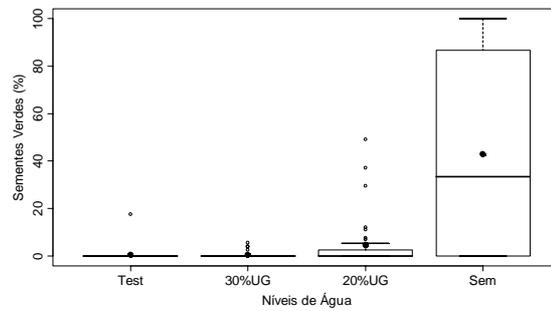
Os resultados obtidos da porcentagem de sementes verdes, em função dos estresses hídricos, são apresentados na Figura 1 (c).



(a)



(b)

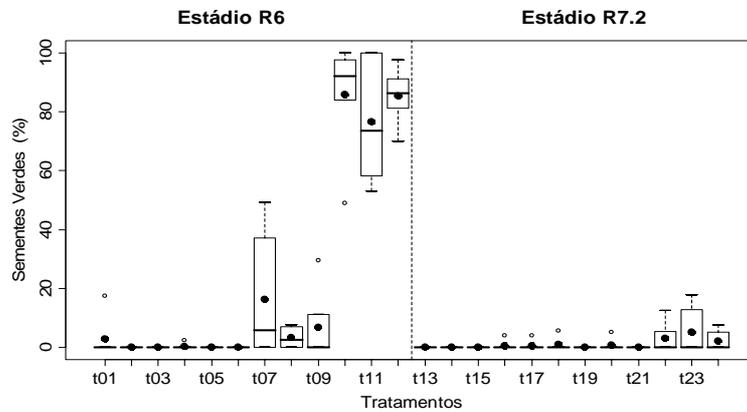


(c)

**FIGURA 1-** Ocorrência de semente verde (%), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico e de temperatura elevada, de acordo com o posicionamento na planta (a), com os estádios de desenvolvimento (b) e com as condições de disponibilidade hídrica do solo (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Verifica-se que praticamente não houve ocorrência de semente verde nas condições da testemunha e de 30% de Ug. Uma porcentagem média de 5% foi observada com 20% de Ug, no entanto, sem água ou corte total de irrigação, houve acentuada incidência de semente verde (86%), com porcentagem média de ocorrência de 43%. Desse modo, estresse hídrico drástico, associado a temperaturas elevadas (28°C a 36°C), ocasiona alta incidência de sementes verdes em plantas de soja.

Pela Figura 2, podem-se observar as variações da ocorrência dos índices de semente verde em plantas de soja, após indução das condições de estresse e em todos os tratamentos analisados (Quadro 1). Verifica-se que, com o suprimento adequado de água (tratamentos 01, 02, 03, 13, 14 e 15) e com 30% de Ug (tratamentos 04, 05, 06, 16, 17 e 18), associados aos estádios de desenvolvimento  $R_6$  e  $R_{7.2}$ , não foi observada ocorrência de semente verde. Do mesmo modo, não houve incidência de semente verde com o estresse de 20% de Ug e no estádio  $R_{7.2}$  (tratamentos 19, 20 e 21). Por outro lado, nessa mesma condição de deficiência hídrica, porém, no estádio  $R_6$ , foram observadas sementes verdes, nos diferentes terços da planta (tratamentos 07, 08 e 09), com ocorrências médias de 16% (terço superior), 3% (terço médio) e 7% (terço inferior). Em condições mais estressantes, quando houve corte total de irrigação, vale ressaltar o comportamento diferencial entre os dois estádios de desenvolvimento, tratamentos 10, 11 e 12 no estádio  $R_6$  e tratamentos 22, 23 e 24 no estádio  $R_{7.2}$ . Sementes no estádio  $R_{7.2}$ , apresentaram incidências de semente verde de 3%, 5% e 2%, inferiores em relação às do estádio  $R_6$ , cujos resultados foram de 86%, 76% e 85%, respectivamente.



**FIGURA 2-** Variação da ocorrência dos índices de semente verde (%), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico, de acordo com os estádios de desenvolvimento e a posição na planta, em condições de temperatura elevada. UFLA, Lavras, MG, 2006.

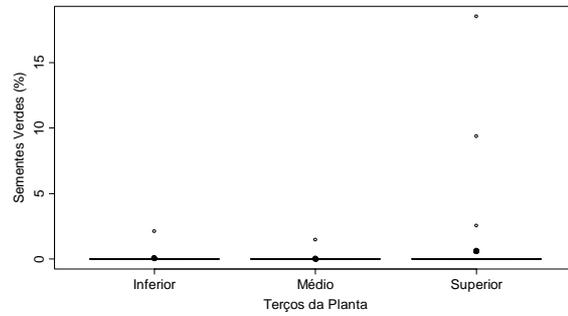
Pelos resultados da análise de variância dos dados, referentes à porcentagem de sementes verdes, para o estágio R<sub>6</sub>, nos níveis de deficiência hídrica de 20% de Ug e corte total de irrigação, nos diferentes terços da planta, pode-se observar que não existem diferenças significativas da ocorrência de semente verde nas partes da planta, no que se refere a sua posição nos terços inferior, médio e superior (Tabela 1A). Houve diferença estatística significativa, para o fator nível de água, cujos resultados médios foram de 9% de sementes verdes no tratamento de 20% de Ug e de 83%, quando houve corte total de irrigação.

#### **b) Temperatura amena**

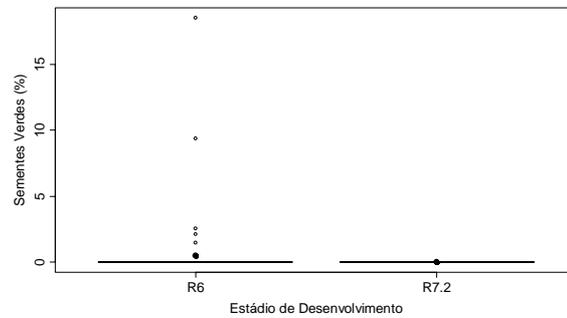
Na Figura 3 estão representadas as porcentagens de sementes verdes em função de estresse hídrico e de temperatura amena. A incidência de semente verde, quando as plantas foram submetidas aos estresses associados à

temperatura amena (Figuras 3a, 3b, 3c), foi muito baixa, com valores médios iguais ou muito próximos a 0%. Esses resultados se assemelham aos encontrados por Costa et al. (1994), que afirmaram que as temperaturas mais amenas (< 22°C), durante a fase de maturação, favorecem a produção de sementes de qualidade fisiológica e sanitária superiores. Os mesmos autores associaram a presença de sementes verdes no lote com a baixa qualidade fisiológica.

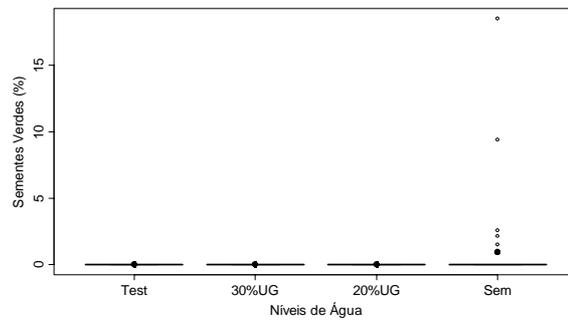
Pela Figura 4, podem-se observar as variações da ocorrência dos índices de semente verde, em todos os tratamentos analisados (Quadro 1), quando as condições de estresse ocorreram sob temperaturas amenas. Foi constatada uma pequena ocorrência, com média de 5%, em plantas submetidas ao corte total de irrigação, no estágio R<sub>6</sub>, no terço superior da planta (tratamento 10). Esses resultados sugerem que o fator temperatura é mais importante do que o estresse hídrico, pois, mesmo com a condição máxima de deficiência hídrica, houve somente um pequeno índice de ocorrência de semente verde. Vale ressaltar, ainda, que o nível de incidência de sementes de soja verde, nessas condições, não irá, provavelmente, afetar a qualidade de um lote de sementes, uma vez que, em trabalhos desenvolvidos por Costa et al. (2001), foi observado que somente percentuais de sementes verdes superiores a 10% em um lote de sementes poderão levar ao comprometimento significativo na sua qualidade fisiológica.



(a)

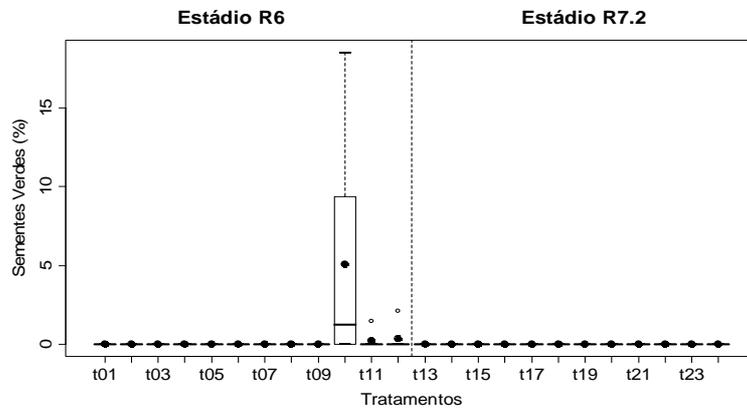


(b)



(c)

**FIGURA 3-** Ocorrência de semente verde (%), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico e temperatura amena, de acordo com o posicionamento na planta (a), com os estádios de desenvolvimento (b) e com as condições de disponibilidade hídrica do solo (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 4-** Variação da ocorrência dos índices de semente verde (%), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico, de acordo com os estádios de desenvolvimento e a posição na planta, em condições de temperatura amena. UFLA, Lavras, MG, 2006.

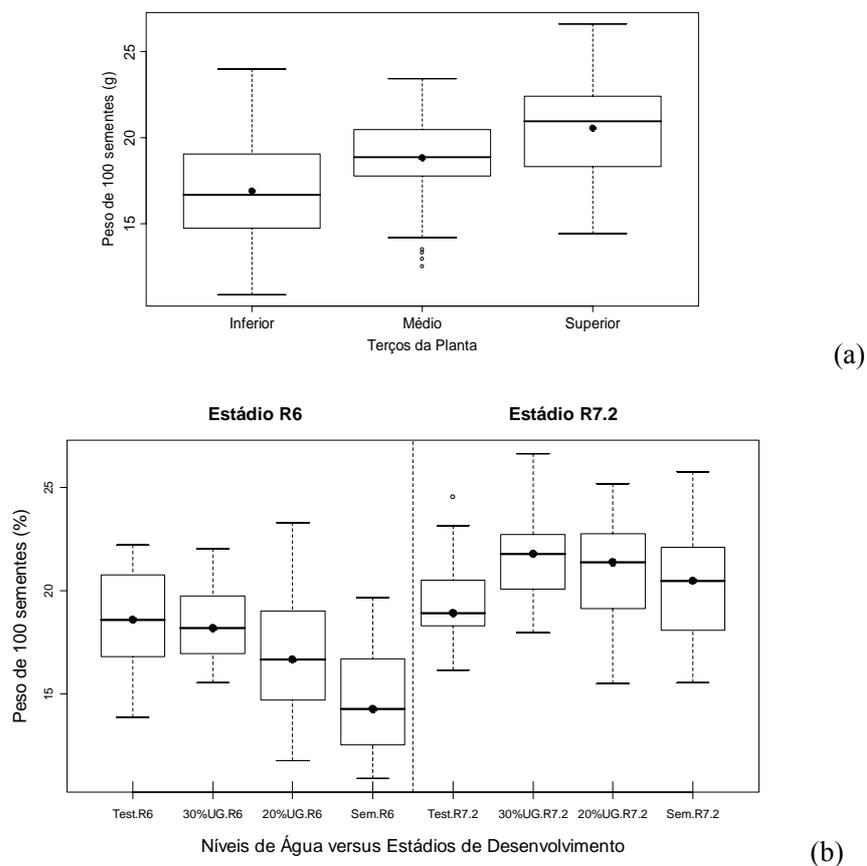
### 3.2 Peso de 100 sementes

#### a) Temperatura elevada

Pela Figura 5, podem-se observar os resultados do peso de 100 sementes por terços das plantas de soja, após indução das condições de estresse hídrico e de temperaturas elevadas, de acordo com o seu posicionamento na planta (a) e com a interação estádios de desenvolvimento versus condições de disponibilidade hídrica do solo (b). Foi constatado aumento significativo no peso de 100 sementes da base da planta ao terço superior (Tabela 3A), com valores médios de 16,9 g (inferior), 18,9 g (médio) e 20,6 g (superior).

Ainda de acordo com a Tabela 3A, analisando a interação, os resultados obtidos apresentados na Figura 5 (b), revelam que as sementes submetidas aos estresses, no estágio R<sub>6</sub>, período crítico de acúmulo de reservas na semente de soja, apresentaram menor peso de sementes, diferindo estatisticamente quando comparadas àquelas do estágio R<sub>7.2</sub>. Esse fato é coincidente com os resultados

encontrados para porcentagem de sementes verdes (Figura 1b), ou seja, em tratamentos nos quais foram observados elevados índices de sementes verdes, foram também encontrados menores pesos de 100 sementes.



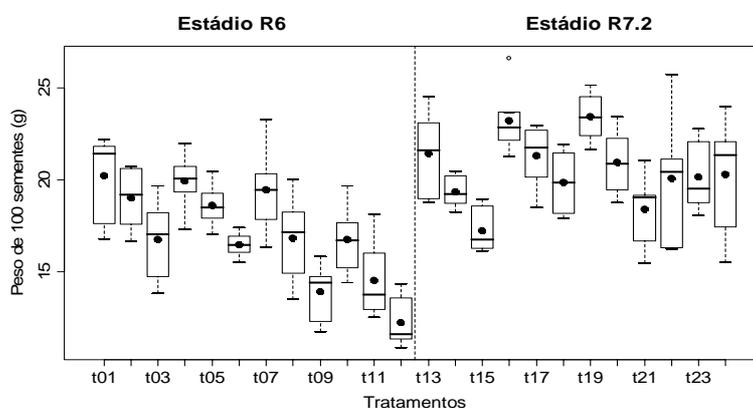
**FIGURA 5-** Peso de 100 sementes (g), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico e temperatura elevada, de acordo com o seu posicionamento na planta (a) e com a interação estádios de desenvolvimento versus condições de disponibilidade hídrica do solo (b). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Egli (1998) ressalta que o peso final das sementes depende da taxa e do período de acúmulo de matéria seca, sendo que esse último exerce maior influência sobre a produção final. Em leguminosas, o acúmulo de reservas nas sementes, segundo Marcos Filho (2005), depende muito dos assimilados durante a frutificação, tornando a produção de sementes extremamente sensível a fatores do ambiente que possam provocar a redução da atividade fotossintética.

Ainda, de acordo com a Figura 5 (b), observa-se que, em função de estresse hídrico e de temperaturas elevadas, os maiores valores para peso de sementes, no estágio R<sub>6</sub>, foram obtidos nos tratamentos testemunha, seguidos de 30% de Ug, considerado deficiência moderada. Esse resultado está de acordo com a constatação feita por Ouattar et al. (1987), de que deficiências moderadas de água provocam menor taxa de fotossíntese, que pode ser compensada pela redução do número de sementes e não pelo seu peso. Como esperado, houve redução significativa no peso de sementes à medida que se intensificou a condição de estresse hídrico.

Marcos Filho (2005) cita que a deficiência hídrica, geralmente, promove a aceleração do processo de acúmulo de reservas e sua complementação prematura e anormal dá origem a sementes menos densas e com desempenho comprometido, principalmente quando a seca é acompanhada de temperaturas elevadas. Observações semelhantes foram relatadas por França Neto & Krzyzanowski (1990) e França Neto et al. (1993), que ressaltaram que a deficiência hídrica, durante o período de transferência de matéria seca, provoca redução acentuada no rendimento em virtude da formação de sementes menores, mais leves e, dependendo da cultivar, enrugadas e deformadas. Por outro lado, os maiores pesos de sementes foram observados no estágio R<sub>7,2</sub>, estágio no qual a planta não se mostra muito sensível à deficiência hídrica, uma vez que, segundo Dornbos & McDonald (1986), o período crítico de acúmulo de reservas pelas sementes de soja ocorre entre os estádios R<sub>5</sub> e R<sub>7</sub>.

As variações dos valores de peso de 100 sementes, em todos os tratamentos analisados (Quadro 1), são apresentadas na Figura 6. Verifica-se que os maiores valores foram observados no estágio de desenvolvimento R<sub>7,2</sub>, tratamentos 13 a 24, não havendo muita variação em função do estresse hídrico, com valores médios de 19,4 g (testemunha), 21,4 g (30% Ug), 20,9 g (20% Ug) e 20,0 g (corte total de irrigação). No entanto, observou-se tendência linear decrescente, ao longo da planta, do terço superior ao inferior. Em relação ao estágio R<sub>6</sub>, nos tratamentos 01 a 12, foram constatados menores valores para peso de sementes nas condições de 20% de Ug (tratamentos 07, 08 e 09) e corte total de irrigação (tratamentos 10, 11 e 12). Os resultados entre testemunha (01, 02 e 03) e 30% de Ug (04, 05 e 06) foram similares. Nesse estágio de desenvolvimento, vale ressaltar que as reduções dos valores de peso de 100 sementes ocorrem à medida que o estresse hídrico torna-se mais intenso, com valores médios de 18,7 g (testemunha), 18,4 g (30% Ug), 16,7 g (20% Ug) e 14,5 g (corte total de irrigação).



**FIGURA 6-** Variação dos valores de peso de 100 sementes (g), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico, de acordo com os estádios de desenvolvimento e a posição na planta, em condições de temperatura elevada. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para Marcos Filho (2005), o período de transferência de matéria seca da planta para as sementes é uma etapa crítica do processo de desenvolvimento. Os efeitos nocivos de temperaturas elevadas se acentuam quando associados à deficiência hídrica. Isso foi comprovado pelos resultados demonstrados por Dornbos & Mullen (1991), segundo os quais o estresse térmico provocou redução da produção em vários dos seus componentes, inclusive o tamanho das sementes. O estresse no início do período de formação das sementes afetou, principalmente, o número de sementes formadas e, no final, o seu peso.

Sinnecker (2002) trabalhando com soja, em três temperaturas, verificou que temperaturas mais elevadas, acima de 40°C, causaram a inativação de enzimas, inclusive a clorofilase, que é mais resistente termicamente.

#### **b) Temperatura amena**

Os resultados do peso de 100 sementes, em função dos terços da planta (a), dos estádios de desenvolvimento (b) e das condições de disponibilidade hídrica do solo (c), após a indução do estresse hídrico e sob temperatura amena, são apresentados na Figura 7. Foi observado o mesmo comportamento das sementes quando comparadas com aquelas submetidas às temperaturas elevadas, no entanto, com resultados maiores, apresentando diferenças significativas entre os terços da planta, com valores médios de 18,7 g (inferior), 20,3 g (médio) e 22,2 g (superior), indicando que temperaturas amenas associadas a estresses hídricos, causam pequenas reduções no peso das sementes (Figura 7a).

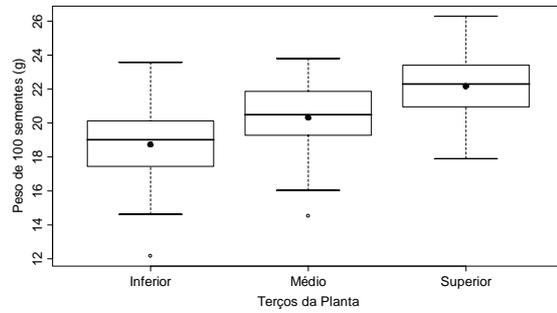
Pequenas reduções também foram observadas nas sementes submetidas aos estresses, em função dos estádios de desenvolvimento (Figura 7b), com diferença significativa entre os valores médios de 19,6 g, em R<sub>6</sub>, e 21,2 g, em R<sub>7.2</sub>. Em soja, as sementes atingem o máximo tamanho no estádio R<sub>6</sub> (Ritchie et al., 1994). Assim, o período de manutenção desses níveis elevados de matéria seca depende diretamente da influência do ambiente, pois condições menos

favoráveis de umidade relativa, temperatura e a ação de insetos e microrganismos, geralmente, contribuem para a aceleração do processo respiratório e a conseqüente oxidação de substâncias de reservas, com redução do peso das sementes (Marcos Filho, 2005).

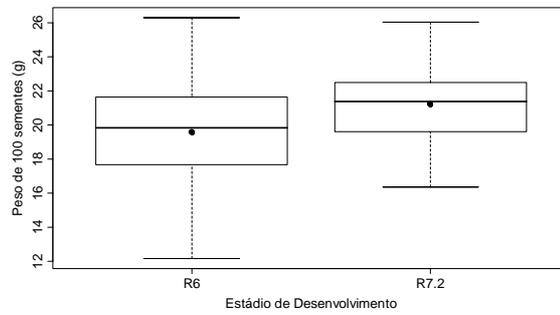
Pela análise das condições de disponibilidade hídrica do solo (Figura 8c), verifica-se que os resultados variaram pouco em relação às sementes da testemunha. A deficiência hídrica afeta o metabolismo e prejudica o crescimento das plantas. Segundo Bradford (1994), há redução da área foliar e da taxa fotossintética, acarretando menor suprimento de assimilados e redução do desenvolvimento das sementes. No entanto, constatou-se que estresse hídrico intenso (20% de UG e corte total de irrigação), quando associado com temperaturas amenas, não causam reduções significativas no peso de sementes.

Os resultados de peso de 100 sementes, em todos os tratamentos analisados (Quadro 1), são apresentados na Figura 8. Comparando-se os resultados entre os estádios de desenvolvimento  $R_6$  (tratamentos 01 a 12) e  $R_{7.2}$  (tratamentos 13 a 24), ficou evidenciado que houve pequena variação no peso de sementes, o que sugere relatar que temperaturas amenas, durante a fase de maturação, favorecem a produção de sementes de qualidade superior, concordando com os resultados obtidos por Costa et al. (1994).

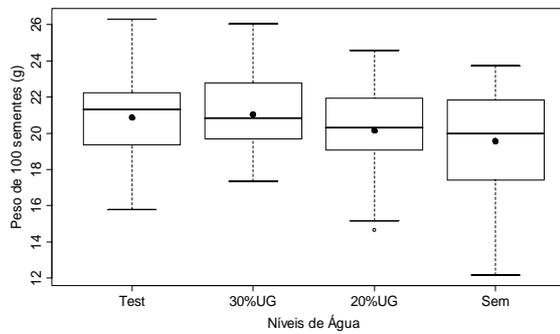
Observa-se a tendência linear decrescente, ao longo da planta, do terço superior ao inferior, coerente com os valores encontrados para peso de 100 sementes, em função de temperaturas elevadas. A principal responsabilidade pelo acúmulo de matéria seca nas sementes deve ser atribuída à fotossíntese e à captação de nutrientes disponíveis no solo. Os fotossintatos são transportados para a semente via floema, através de gradiente osmótico. Portanto, o gradiente de pressão da fonte para o dreno, a semente, ou seja, no sentido de baixo para cima na planta, dirige o fluxo de massa do conteúdo do floema para as sementes.



(a)



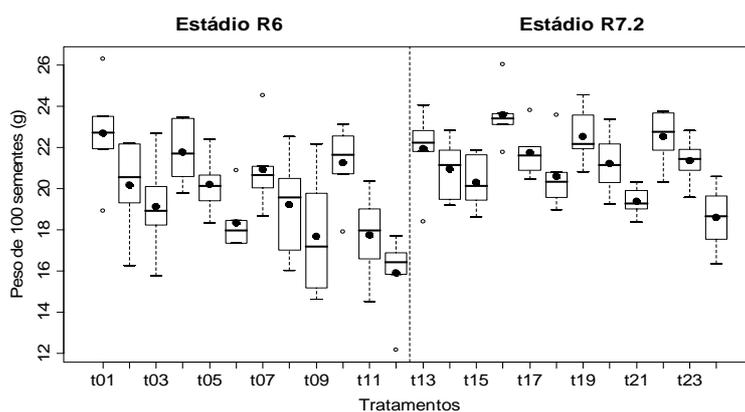
(b)



(c)

**FIGURA 7-** Peso de 100 sementes (g), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico e temperatura amena, de acordo com o seu posicionamento na planta (a), com os estádios de desenvolvimento (b) e com as condições de disponibilidade hídrica do solo (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Vagens localizadas em nós inferiores da planta de soja são produzidas anteriormente às localizadas nos apicais. Da mesma forma, as sementes situadas na base de uma planta podem receber assimilados de folhas mais sombreadas que, provavelmente, apresentam menores taxas de fotossíntese (Marcos Filho, 2005). Conseqüentemente, menores taxas fotossintéticas acarretam menor acúmulo de matéria seca, culminando na formação de sementes menores e menos densas. Os tratamentos com 20% de Ug (07, 08 e 09) e os com corte total de irrigação (10, 11 e 12), no estágio de desenvolvimento R<sub>6</sub>, propiciaram os menores valores para peso de 100 sementes.



**FIGURA 8-** Variação dos valores de peso de 100 sementes (g), em plantas de soja da cv. CD 206, em função de estresse hídrico, de acordo com os estádios de desenvolvimento e a posição na planta, em condições de temperatura amena. UFLA, Lavras, MG, 2006.

### 3.3 Análise de variância dos dados

Os resumos das análises de variância dos dados referentes às avaliações realizadas após o agrupamento das partes das plantas, por unidade experimental, encontram-se na Tabela 4A. A interação, temperatura e estágio de

desenvolvimento da planta, foi significativa para todas as variáveis analisadas, bem como, para a interação temperatura e níveis de água, com exceção da variável peso de 100 sementes. Já para a interação estágio e níveis de água, não houve diferenças significativas para viabilidade e deterioração por umidade, avaliadas pelo teste de tetrazólio. A interação tripla foi significativa somente para condutividade elétrica e vigor, pelo teste de tetrazólio.

Para a verificação das pressuposições de normalidade e homocedasticidade dos resíduos, foram construídos gráficos das variáveis respostas germinação, vigor, viabilidade, dano de umidade (TZ 6-8), condutividade elétrica e peso de 100 sementes (Figuras 1A), sendo que, na análise visual, não houve indícios para violação dessas pressuposições.

Foram realizados também os testes de Shapiro-Wilk e de Levene. Concluiu-se que não foram rejeitadas as hipóteses de nulidade para os testes, ou seja, os resíduos seguem uma distribuição normal e as variâncias são consideradas homogêneas.

### **3.4 Teste de germinação**

Pelos dados contidos na Tabela 1, verifica-se que a menor porcentagem de germinação foi observada nas sementes do estágio R<sub>6</sub>, submetidas ao estresse térmico de temperatura elevada, o que demonstra que a germinação tende a aumentar com o desenvolvimento das sementes. Por outro lado, no estágio R<sub>7,2</sub>, em temperaturas amenas, não foi constatado o mesmo comportamento. Nesse estágio de desenvolvimento, no qual as sementes encontram-se próximas à maturidade fisiológica, não houve diferença entre os regimes de temperaturas. A maturidade fisiológica constitui ponto de referência para caracterizar o encerramento do processo de desenvolvimento da semente (Marcos Filho, 2005). Dessa maneira, pode-se observar que, nessa fase, a planta de soja se mostra

menos sensível ao efeito do estresse, fato constatado pelos estudos desenvolvidos por Dornbos & McDonald (1986).

Em relação aos efeitos do estresse hídrico, as maiores porcentagens de germinação foram observadas em sementes com suprimento de água (testemunha), com 30% de Ug e com 20% de Ug, no estágio R<sub>6</sub>, e menores valores quando as plantas foram submetidas ao corte total de irrigação (Tabela 2). O estresse hídrico durante o enchimento das sementes acelera a senescência de folhas e encurta o período de maturação das sementes em soja. As sementes sob estresse hídrico da planta podem não completar a mesma seqüência de desenvolvimento, como em plantas não estressadas e sua composição pode ser afetada na semente madura (Egli, 1998).

**TABELA 1-** Valores médios de germinação (%), de sementes de soja da cv. CD 206, obtidos nos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>, submetidas a temperaturas elevada e amena. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Temperaturas	Estádios de desenvolvimento	
	R <sub>6</sub>	R <sub>7,2</sub>
<b>Elevada</b>	92,1 bA	96,1 aA
<b>Amena</b>	98,3 aA	94,5 aB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Já para o estágio R<sub>7,2</sub>, as sementes submetidas aos diferentes níveis de água apresentaram resultados estatisticamente iguais. A transferência de assimilados e o acúmulo de matéria seca em sementes de soja e de outras leguminosas são intensificados a partir do momento em que as vagens atingem o máximo comprimento. Esses resultados estão em conformidade com os estudos desenvolvidos por Dornbos & McDonald (1986), que relataram que o período

crítico de acúmulo de reservas pelas sementes de soja ocorre entre os estádios R<sub>5</sub> e R<sub>7</sub>, segundo a classificação de Fehr & Caviness (1977). Portanto, nessa última fase, a planta não se mostra muito sensível a períodos de deficiência hídrica, prejudiciais à produção e à qualidade das sementes.

**TABELA 2-** Valores médios de germinação (%), de sementes de soja da cv. CD 206, obtidos nos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>, após submissão a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Níveis de água	Estádios de desenvolvimento	
	R <sub>6</sub>	R <sub>7,2</sub>
<b>Testemunha</b>	97,0 aA	94,8 aA
<b>30% UG</b>	98,3 aA	93,8 aB
<b>20% UG</b>	95,3 aA	96,3 aA
<b>Sem água</b>	90,3 bB	96,2 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Nas condições de estresses de temperatura em diferentes condições de disponibilidade hídrica, nos tratamentos testemunha e 30% de Ug não foram observadas diferenças significativas, com relação à porcentagem de germinação, nos dois regimes de temperatura (Tabela 3). Já, nas condições de 20% de Ug e sem água, ou seja, corte total de irrigação, as sementes submetidas à temperatura elevada apresentaram menores porcentagens de germinação em relação àquelas submetidas à temperatura amena, concordando com Marcos Filho (2005). Este autor ressalta que a elevação de temperatura, até atingir valores superiores a 30°C, durante o período de transferência de matéria seca da planta para as sementes, pode causar prejuízos severos à produção e à qualidade das sementes. Esses prejuízos se relacionam à redução da taxa fotossintética, geralmente

significativa no período de formação das sementes. Resultados semelhantes foram também relatados por Spears et al. (1997), trabalhando em condições ambientais controladas e em campo, que verificaram que o aumento da temperatura de 27°C para 33°C provocou redução da germinação das sementes. Os autores constataram que a intensidade desses efeitos foi variável entre as cultivares estudadas.

Verificou-se, ainda, que sob temperaturas elevadas, não foi observada diferença significativa nos valores de germinação, para as condições de disponibilidade hídrica.

**TABELA 3-** Valores médios de germinação (%) de sementes de soja da cv. CD 206, obtidos nas temperaturas elevada e amena, após submissão a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras – MG, 2006.

Níveis de água	Temperaturas	
	Elevada	Amena
<b>Testemunha</b>	95,8 aA	96,0 bA
<b>30% UG</b>	96,5 aA	95,8 bA
<b>20% UG</b>	93,5 aB	98,2 aA
<b>Sem água</b>	90,5 aB	95,9 bA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3.5 Teste de tetrazólio

#### 3.5.1 Tetrazólio - Vigor

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados para o vigor das sementes, pelo teste de tetrazólio, obtidas nas temperaturas elevada e amena e submetidas a diferentes níveis de suprimento de água, dentro dos estádios de

desenvolvimento. Houve efeito significativo para os regimes de temperatura, destacando-se a superioridade do vigor das sementes submetidas à temperatura amena, em todas as condições de disponibilidade hídrica e nos dois estádios de desenvolvimento. No estágio R<sub>6</sub>, o maior vigor foi apresentado pelas sementes da testemunha, decrescendo à medida que o estresse hídrico foi mais intenso. Cabe destacar que, para o estágio de desenvolvimento R<sub>7,2</sub>, não houve diferenças estatísticas entre as condições de estresse hídrico nas duas temperaturas analisadas. Nesse mesmo estágio, com relação aos regimes de temperatura, foi observada diferença somente para temperatura elevada e corte total de irrigação. Esses resultados estão de acordo com os estudos relatados por Dornbos & McDonald (1986). Menor vigor de sementes foi observado sob temperatura elevada, no estágio R<sub>6</sub> e nas condições de 30% de Ug, 20% de Ug e sem irrigação.

### **3.5.2 Tetrazólio – Viabilidade**

Pelas Tabelas 5 e 6, podem-se observar os resultados de viabilidade, pelo teste de tetrazólio, para as interações temperatura x estágio de desenvolvimento e temperatura x disponibilidade hídrica. Os resultados foram semelhantes aos observados para porcentagem de germinação e de vigor, na qual a menor viabilidade das sementes foi constatada no regime de temperatura elevada, no estágio R<sub>6</sub> (Tabela 5) e nos estresses hídricos de 30% e de 20% de Ug e sem irrigação (Tabela 6). Ainda pela Tabela 6, verifica-se que, quando a disponibilidade hídrica do solo era de 20% de Ug e corte total de irrigação, a viabilidade das sementes foi estatisticamente diferente em relação aos estresses de temperatura. Por outro lado, nas condições de suprimento adequado de água (testemunha) e de 30% de Ug, o comportamento das sementes foi semelhante, tanto sob temperatura elevada quanto amena.

**TABELA 4-** Porcentagem média de vigor, pelo teste de tetrazólio, de sementes de soja da cv. CD 206, produzidas sob temperaturas elevada e amena e submetidas a diferentes níveis de suprimento de água, dentro dos estádios de desenvolvimento. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tratamentos	Temperaturas	
	Elevada	Amena
<b>R<sub>6</sub> – Testemunha</b>	91,3 aA	96,0 aA
<b>R<sub>6</sub> – 30% UG</b>	83,3 bB	95,3 aA
<b>R<sub>6</sub> – 20% UG</b>	81,0 bB	93,3 aA
<b>R<sub>6</sub> – Sem água</b>	54,7 cB	90,7 aA
<b>R<sub>7,2</sub> - Testemunha</b>	88,7 aA	90,0 aA
<b>R<sub>7,2</sub> – 30% UG</b>	84,0 aA	85,3 aA
<b>R<sub>7,2</sub> – 20% UG</b>	88,0 aA	86,7 aA
<b>R<sub>7,2</sub> – Sem água</b>	83,3 aB	90,0 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, comparadas dentro de cada estágio, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os efeitos dos estresses ambientais, principalmente os causados pela elevação da temperatura, podem causar prejuízos severos à qualidade das sementes. Nesse sentido, Spears et al. (1997), trabalhando com sementes de soja, verificaram que o aumento da temperatura de 27°C (dia) e 22°C (noite), para 33°C e 28°C, respectivamente, provocou redução do vigor das sementes.

**TABELA 5-** Resultados médios de viabilidade (%), pelo teste de tetrazólio, de sementes de soja da cv. CD 206, a partir dos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>, submetidas às temperaturas elevada e amena. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Estádios de desenvolvimento	Temperaturas	
	Elevada	Amena
R <sub>6</sub>	92,8 aB	98,5 aA
R <sub>7,2</sub>	95,8 aA	95,7 bA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

**TABELA 6-** Resultados médios de viabilidade (%), pelo teste de tetrazólio, de sementes de soja da cv. CD 206, submetidas às temperaturas elevada e amena e a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Níveis de água	Temperaturas	
	Elevada	Amena
Testemunha	98,0 aA	97,7 aA
30% UG	95,0 bA	96,3 aA
20% UG	94,7 bB	97,7 aA
Sem água	89,7 cB	96,7 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3.5.3 Tetrazólio – Deterioração por umidade

Pode-se verificar, pela Tabela 7, que as sementes no estágio R<sub>7.2</sub> não foram influenciadas pelos regimes de temperatura, quando avaliadas pela deterioração causada pela umidade detectada pelo teste de tetrazólio. No entanto, foi constatado problema sério de deterioração por umidade quando as sementes foram submetidas ao estresse de temperatura elevada no estágio R<sub>6</sub>, confirmando os resultados encontrados nos testes de germinação (Tabela 1) e de viabilidade (Tabela 5). Em resultados obtidos por Costa et al. (2001), foi verificado que a incidência de sementes verdes tem relação direta com os índices de deterioração por umidade, sendo que, dependendo da região afetada, seguramente ocorrerá redução da germinação e do vigor de lotes de sementes.

Na condição de estresse hídrico e temperatura amena, foram observadas pequenas porcentagens de deterioração por umidade (Tabela 8), cujos resultados, segundo França Neto et al. (1998), não seriam considerados problemas. Todavia, sob temperaturas elevadas, o dano por umidade aumentou à medida que o estresse hídrico foi mais intenso, causando redução acentuada na viabilidade das sementes, relatado na Tabela 6.

**TABELA 7-** Resultados médios (%) de deterioração por umidade (TZ 6-8) em sementes de soja da cv. CD 206, a partir dos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7.2</sub>, submetidas às temperaturas elevada e amena. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Estádios de desenvolvimento	Temperaturas	
	Elevada	Amena
R <sub>6</sub>	7,2 bB	1,5 aA
R <sub>7.2</sub>	4,2 aA	4,3 bA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

**TABELA 8-** Resultados médios (%) de deterioração por umidade (TZ 6-8) em sementes de soja da cv. CD 206, submetidas às temperaturas elevada e amena e a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Níveis de água	Temperaturas	
	Elevada	Amena
<b>Testemunha</b>	2,0 aA	2,3 aA
<b>30% UG</b>	5,0 bA	3,7 aA
<b>20% UG</b>	5,3 bB	2,3 aA
<b>Sem água</b>	10,3 cB	3,3 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A taxa de deterioração é influenciada pela condição ambiental como também por fatores biológicos (Ghosh & Nandi, 1986). As conseqüências mais drásticas advindas de condições climáticas adversas são a aceleração do processo de deterioração e a perda de viabilidade das sementes. As variações ambientais causam a desestruturação da membrana, alterações em lipídeos e proteínas, assim como perdas de ribossomos, redução da capacidade respiratória (Woodstock et al., 1985), afetando a germinação e, conseqüentemente, a perda em qualidade das sementes.

### 3.6 Condutividade elétrica

Pelos resultados da Tabela 9, constata-se a superioridade das sementes submetidas à temperatura amena em relação à elevada, em todas as condições de disponibilidade hídrica e nos dois estádios de desenvolvimento, assim como foi relatado para o vigor das sementes (Tabela 4). Para o estágio de

desenvolvimento R<sub>7,2</sub>, melhores resultados de condutividade elétrica foram observados para temperatura amena e na condição de suprimento adequado de água (testemunha). Associando-se esses valores com aqueles obtidos no teste de tetrazólio (vigor), verifica-se que valores entre 58 a 62  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  foram relacionados com alto vigor e, acima de 62  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , com tendência para lotes de médio vigor. Esses resultados estão próximos aos obtidos por Vieira et al. (1991), que avaliaram o efeito do estresse hídrico na germinação e no vigor de sementes de soja. Os autores encontraram valores de condutividade elétrica de 48 a 52  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  para lotes de soja com alto vigor.

Em condições de campo, para sementes de soja, Paiva Agüero (1995) verificou que se pode obter alta emergência com condutividade elétrica de até 110  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , desde que as condições sejam adequadas à germinação e à emergência das mesmas. No entanto, sob pequenas limitações para a germinação, a condutividade não pode ser superior a 90  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Já Vieira (1994) relata que os padrões a serem considerados para lotes de sementes de soja de alto vigor devem ter condutividade de até 70-80  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , embora o autor afirme que são valores com forte tendência a apresentarem médio vigor.

Analisando-se os resultados para o estágio R<sub>6</sub>, constatou-se que não houve diferenças estatísticas significativas entre a testemunha, 30% de Ug e 20% de Ug para temperatura elevada, porém, essas sementes apresentaram vigor inferior quando comparadas com as sementes nas mesmas condições, mas submetidas à temperatura amena. Sementes de baixa qualidade têm estrutura de membrana desorganizada, o que permite a difusão de íons para o meio externo, que são detectados pelo monitoramento de eletrólitos presentes na solução de embebição (Hampton et al., 1992). Esse fato foi também ressaltado em estudo realizado por Salisbury & Ross (1994), que afirmam que, quando as células não estão vivas e metabolizando, suas membranas são muito mais permeáveis aos solutos. Se uma célula morre por estresse térmico ou hídrico, ou se seu

metabolismo é inibido pelos mesmos fatores de estresse, muitos dos solutos da célula difundem-se para o exterior. Este extravasamento de eletrólitos permite inferir sobre o vigor de sementes que, em estágios avançados, lixiviam solutos do interior da célula pelo transporte passivo (difusão livre) a favor de um gradiente de energia.

**TABELA 9-** Valores médios de condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de sementes de soja da cv. CD 206, produzidas sob temperaturas elevada e amena e submetidas a diferentes níveis de suprimento de água, dentro dos estádios de desenvolvimento. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tratamentos	Temperaturas	
	Elevada	Amena
<b>R<sub>6</sub> - Testemunha</b>	74,7 aB	59,3 aA
<b>R<sub>6</sub> – 30% UG</b>	73,0 aB	56,0 aA
<b>R<sub>6</sub> – 20% UG</b>	74,7 aB	60,7 aA
<b>R<sub>6</sub> – Sem água</b>	122,3 bB	61,3 aA
<b>R<sub>7,2</sub> – Testemunha</b>	66,3 aB	58,3 aA
<b>R<sub>7,2</sub> – 30% UG</b>	71,7 bA	67,3 bA
<b>R<sub>7,2</sub> – 20% UG</b>	72,3 bA	70,0 bA
<b>R<sub>7,2</sub> – Sem água</b>	77,3 bA	72,0 bA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, comparadas dentro de cada estágio, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na maioria das espécies, a organização das membranas é máxima na maturidade fisiológica (Abdul-Baki, 1980), quando as sementes estão com um máximo conteúdo de água. Entretanto, a partir deste momento, as células

perdem sua organização estrutural em níveis variáveis, tornando-se metabolicamente menos ativas em sementes secas. Assim, à medida que as sementes perdem água, seja naturalmente ou no processo de secagem artificial, ocorre desorganização das membranas celulares, com as camadas lipídicas exibindo a configuração hexagonal. Os fosfolipídios e as proteínas que compõem a membrana contribuem tanto com a estrutura quanto com a regulação da entrada (difusão) e saída de solutos do conteúdo citoplasmático. Qualquer mudança que venha a ocorrer nas proteínas ou fosfolipídios pode alterar a permeabilidade das membranas e, conseqüentemente, facilitar a saída de água e solutos de seu interior (Simon, 1974).

Injúrias de membranas são mediadas por ataque oxidativo, que promove de-esterificação fosfolipídica e ou peroxidação de lipídios. Prejuízos na respiração podem agir como uma fonte importante de oxigênio ativado. Severos ataques oxidativos podem resultar em perda de organização da membrana, com conseqüente perda de compartimentalização celular. Assim, deduz-se que, tolerância à dessecação depende de produção reduzida de radicais livres e também de acúmulo de removedores desses radicais (Leprince et al., 1993).

A tolerância à dessecação parece ser mediada por sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes celulares incluindo membranas, proteínas e citoplasma. Três importantes sistemas têm sido caracterizados: a acumulação de açúcares não reduzidos que estabilizam membranas e proteínas em condições de sementes secas (Leprince et al., 1993); a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres, durante a dessecação (Leprince et al., 1990) e, finalmente, as proteínas LEA protetoras que são induzidas por ABA (Lane, 1991).

As sementes que apresentaram o pior desempenho de vigor, avaliado pelo teste de condutividade elétrica (Tabela 9), ou seja, com os maiores índices de deterioração, foram às submetidas aos estresses de temperatura elevada, com

corde total de irrigação e no estágio de desenvolvimento R<sub>6</sub>, sugerindo que, nas mesmas, não houve tempo hábil para formação dos mecanismos de tolerância à dessecação.

### **3.7 Peso de 100 sementes**

Os resultados de peso de 100 sementes de soja, em função dos regimes de temperatura e dos estádios de desenvolvimento são apresentados na Tabela 10. Verifica-se que, menor peso de sementes foi observado em sementes submetidas ao estresse de temperatura elevada, no estágio R<sub>6</sub>, e diferiram estatisticamente daquelas submetidas à temperatura amena. Comparando-se os resultados entre estádios de desenvolvimento, observa-se que, no estágio R<sub>7,2</sub>, as sementes apresentaram resultados superiores estatisticamente, embora semelhantes em relação ao estresse térmico. Segundo Ritchie et al. (1994), as sementes de soja atingem o máximo tamanho no estágio R<sub>6</sub>, no entanto, a manutenção desses níveis elevados de matéria seca dependerá diretamente das condições do ambiente.

A influência do ambiente sobre o desenvolvimento da semente é traduzida, principalmente, por variações no tamanho, peso, potencial fisiológico e sanidade. Portanto, são importantes os conhecimentos sobre os efeitos da disponibilidade de água, da temperatura e da luz. Desse modo, em estudos desenvolvidos por Spears et al. (1997), trabalhando em condições ambientais controladas e em campo, foi relatado que o aumento da temperatura diurna de 27°C para 33°C e noturna de 22°C para 28°C, provocou reduções do tamanho e da produção das sementes.

**TABELA 10-** Valores médios de peso de 100 sementes (g) de soja da cv. CD 206, submetidas às temperaturas elevada e amena, a partir dos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Estádios de desenvolvimento</b>	<b>Temperaturas</b>	
	<b>Elevada</b>	<b>Amena</b>
<b>R<sub>6</sub></b>	17,2 bB	19,4 bA
<b>R<sub>7,2</sub></b>	20,5 aA	21,1 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O processo de desenvolvimento da semente é encerrado na maturidade fisiológica (Marcos Filho, 2005). Assim, ficou evidenciado, pelos resultados obtidos no estágio R<sub>7,2</sub>, que as plantas de soja se mostram menos sensíveis ao efeito de estresse nessa fase.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados de peso de 100 sementes de soja, quando submetidas a diferentes condições de disponibilidade hídrica, a partir dos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>. Observa-se que as sementes com suprimento adequado de água (testemunha), nos dois estádios de desenvolvimento, apresentaram resultados estatisticamente iguais entre si. Os maiores resultados de peso de 100 sementes foram observados nas sementes obtidas no estágio R<sub>7,2</sub>, após submissão às condições de deficiência hídrica, não diferindo da testemunha, confirmando os resultados encontrados para peso de sementes avaliados nos terços da planta (Figura 5b). No estágio R<sub>6</sub>, as sementes submetidas à condição de 30% de Ug não diferiram estatisticamente da testemunha, provavelmente, por ser considerada deficiência moderada, pois, segundo relatou Ouattar et al. (1987), essa deficiência é compensada pela planta com redução do número de sementes e não pelo seu peso.

**TABELA 11-** Valores médios de peso de 100 sementes (g) de soja da cv. CD 206, obtidos nos estádios de desenvolvimento R<sub>6</sub> e R<sub>7,2</sub>, após submissão a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Níveis de água	Estádios de desenvolvimento	
	R <sub>6</sub>	R <sub>7,2</sub>
<b>Testemunha</b>	19,6 aA	20,3 aA
<b>30% UG</b>	19,3 aB	21,5 aA
<b>20% UG</b>	18,0 bB	21,0 aA
<b>Sem água</b>	16,2 cB	20,4 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os menores valores de peso das sementes foram encontrados à medida que as condições de estresse hídrico tornaram-se mais intensas, com diferenças estatísticas significativas entre si. Esses resultados podem ser explicados por relatos, encontrados na literatura, relativos ao processo de acúmulo e transferência de matéria seca com deficiência hídrica, que provocam a formação de sementes menores, mais leves e com desempenho comprometido (França Neto & Krzyzanowski, 1990; França Neto et al. (1993); Marcos Filho, 2005).

#### 4 CONCLUSÕES

A imposição de estresses de elevada temperatura e corte total de irrigação, no estádio de desenvolvimento R<sub>6</sub>, propiciam acentuada ocorrência de sementes verdes, com reduções do potencial fisiológico e do peso de 100 sementes.

Estresse hídrico intenso (20% de UG e corte total de irrigação) em R<sub>7,2</sub>, quando associado com temperaturas amenas, não resulta na ocorrência de índices significativos de semente verde.

Não existem variações de ocorrência de semente verde nas diferentes partes da planta, no que se refere a sua posição nos terços inferior, médio e superior.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigour. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 6, p. 756-71, Dec. 1980.

BRADFORD, K. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 1, p. 1-11, 1994.

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

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 102-107, 2001.

COSTA, N. P.; PEREIRA, L. A. G.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C. Zoneamento ecológico do estado do Paraná para produção de sementes de cultivares precoces de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 12-19, 1994.

DORNBOS, D. L.; McDONALD, M. B. Mass and composition of developing soybean seeds at five reproductive growth stages. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 3, p. 624-630, May/June 1986.

DORNBOS, D. L.; MULLEN, R. E. Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination and seedling growth rate. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 35, n. 2, p. 373-383, Apr. 1991.

EGLI, D. B. **Seed biology and the yield of grain crops**. New York: CABI International, 1998. 178 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional De Pesquisa De Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Programas e resumos**. . . São Carlos, SP: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Sementes enrugadas: novo problema na soja**. Londrina: EMBRAPA/CNPSO, 1990. 4 p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 46).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; WEST, S.H.; MIRANDA, L.C. Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during seed filling. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.21, n.1, p.107-116, 1993.

FRANÇA NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M. de, COSTA, O.; BRUMATTI, P. S. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da, HENNING, A. A.; SANCHES, D. P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 38).

GHOSH, J.; NANDI, B. Deteriorative abilities of some common storage fungi of wheat. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 14, n. 1, p. 141-49, 1986.

HAMPTON, J. G.; JOHNSTONE, K. A.; EUA-UMPON, V. Bulk conductivity test variables for mungbean, soybean and French bean seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 20, n. 3, p. 677-686, 1992.

LANE, B.G. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. **FASEB Journal**, Bethesda, v.5, p.2893-2901, 1991.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v.116, n.4, p.573-580, 1990.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; McKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, 1993.

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

McDONALD, Jr.; M. B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Lansing, v. 64, p. 109-139, 1975.

OUATTAR, S.; JONES, R. J.; CROOKSTON, R. K. Effect of water deficit during grain filling on the pattern of maize kernel growth and development. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 4, p. 726-730, July/Aug. 1987.

PAIVA AGUERO, J. A. **Correlação de condutividade elétrica e outros testes de vigor com emergência de plântulas de soja em campo**. 1995. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de SãoPaulo, Jaboticabal.

R. Development Core Team (2005). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 2005.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, C. E.; BENSON, G. O. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1994. 20 p. (Special Report, 53).

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiología vegetal**. 4. ed. México: Grupo Editorial Iberoamérica, 1994. 759 p.

SIMON, E. W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytologist**, London, v. 73, n. 2, p. 377-420, 1974.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja**. 2002. 103 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPEARS, J. F.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Temperature during seed filling and soybean seed germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 2, p. 233-244, 1997.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Eds.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 4. 1-4. 26.

VIEIRA, R. D.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Effect of drought stress on soybean seed germination and vigor. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v. 15, n. 1, p. 12-21, 1991.

WOODSTOCK, L. W.; FURMAN, K.; LEFFLER, H. R. Relationship between weathering deterioration and germination, respiratory metabolism, and mineral leaching from cotton seeds. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 3, p. 459-466, May/June 1985.

## CAPÍTULO 3

### RETENÇÃO DE CLOROFILAS EM SEMENTE DE GENÓTIPOS DE SOJA PRODUZIDOS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE

#### RESUMO

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Retenção de clorofilas em semente de genótipos de soja produzidos em condições de estresse**. Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).

Plantas de soja submetidas a estresses ambientais, como deficiência hídrica, principalmente se associados com elevadas temperaturas, durante a fase final de maturação e pré-colheita das sementes, podem ocasionar a produção de semente verde, com redução expressiva na sua qualidade. Para verificar o comportamento de genótipos de soja considerados tolerantes e suscetíveis à produção de semente verde sob condições de estresse e avaliar essa ocorrência e seus efeitos sobre a retenção de clorofila e a atividade da enzima clorofilase em sementes de soja, foram avaliados quatro genótipos de soja. Sementes das cultivares BRS 133, CD 206, MG/BR 46 (Conquista) e BRS 251 (Robusta) foram produzidas em casa de vegetação até o estágio de desenvolvimento R<sub>5.5</sub>. A partir do estágio R<sub>6</sub>, as plantas foram transferidas para fitotrons, para a indução de estresse térmico, de 28°C a 36°C associado a estresse hídrico. A quantidade de água nos vasos foi controlada nos seguintes níveis: testemunha, 10% de umidade gravimétrica e corte total de irrigação. As sementes foram colhidas em R<sub>9</sub>, avaliando-se o percentual de sementes verdes e o peso de 100 sementes nos terços superior, médio e inferior de cada planta. Foram também determinados os teores de clorofila *a*, *b* e total e a atividade da enzima clorofilase. Existe variação de resposta à retenção de clorofilas em sementes de cultivares de soja produzidas em condições de estresse hídrico e térmico. As cultivares Conquista e Robusta são suscetíveis e a 'BRS 133' é menos suscetível às condições de estresse que causam o esverdeamento. As cultivares BRS 133 e CD 206 apresentam menor índice de semente verde, menor retenção de clorofilas *a*, *b* e total e maior atividade da enzima clorofilase, em relação às cultivares Conquista e Robusta, sob condição de estresse. Plantas de soja submetidas às condições de estresse hídrico e térmico produzem altos índices de sementes verdes, menores e mais leves, com elevado teor de clorofilas e baixa atividade de clorofilase. O conteúdo de clorofilas *a*, *b* e total, em sementes verdes de soja é inversamente proporcional à atividade da enzima clorofilase.

## ABSTRACT

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Chlorophyll retention in seeds of soybean genotypes produced under stressful environmental conditions.** Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Thesis – Doctorate in Crop Science).

Soybean plants grown under water stress associated with high temperatures during seed maturation and pre-harvest may produce green seed with expressive reduction in seed quality. The objectives of this study were to evaluate the response of different soybean cultivars grown under these types of stresses with regards to their susceptibility to the production of green seed, and to determine the levels of chlorophyll retention and the activity of the enzyme chlorophyllase in the produced seeds. Seeds of four soybean cultivars [BRS 133, CD 206, MG/BR 46 (Conquista) e BRSMG 251 (Robusta)] were grown under greenhouse conditions until the developmental stage R<sub>5.5</sub>. At R<sub>6</sub> plants were transferred to phytotrons under temperature stress, varying from 28°C to 36°C, associated with water stress. The amount of water used in the pots was controlled at the following levels: control (normal water supply); 10% of gravimetric moisture; and without water. Seeds were harvested at R<sub>9</sub> when the percentage of green seed and weight of 100 seed at the upper, medium and lower thirds of each plant were determined. The contents of *a*, *b* and total chlorophylls and the activity of the enzyme chlorophyllase were also determined. The expression of green seed production under these unfavorable environmental conditions varies among cultivars: Conquista and Robusta were considered more susceptible to the production of green seeds under these stressful conditions as compared to 'BRS 133' and 'CD 206'. These cultivars produced lower levels of green seeds, lower retention of chlorophylls and higher activity of chlorophyllase when compared with Robusta and Conquista. Soybean plants submitted to water and temperature stresses produce high levels of green seed which are small and light and have high contents of chlorophylls and low chlorophyllase activity. The contents of *a*, *b* and total chlorophylls in green seeds was inversely proportional to the activity of the enzyme chlorophyllase.

## 1 INTRODUÇÃO

A dificuldade de se produzir sementes de soja de boa qualidade tem aumentado pelas condições climáticas desfavoráveis no período de maturação e pré-colheita.

Estresses ambientais, principalmente os causados pelas altas temperaturas, durante o período de maturação da soja, podem causar prejuízos severos à produção e à qualidade das sementes. Nessa fase, ocorrem a translocação muito rápida das reservas e as menores taxas de fotossíntese, impedindo a degradação completa da clorofila que provoca a formação de sementes verdes e de baixa qualidade (Marcos Filho, 2005).

Para a maioria das espécies, a quantidade de clorofila nas sementes diminui durante o processo de maturação, pela ação das enzimas clorofilase e magnésio-chelatase, que degradam a clorofila, resultando na perda da coloração esverdeada das sementes.

A degradação da clorofila é iniciada na senescência, por fatores endógenos e pode ser influenciada também por fatores externos, tais como estresse hídrico, redução de luz, mudanças de temperatura ou por fatores internos, tais como aumento de permeabilidade da membrana e mudança de pH. Esses fatores interferem no processo normal, levando a acelerar ou a retardar a degradação da clorofila. Os níveis de clorofila presentes nas sementes parecem ser afetados igualmente pelo genótipo e pelas condições climáticas, principalmente pela temperatura no período de maturação das sementes, já que, nas mesmas condições de produção, tem ocorrido resposta diferencial de cultivares em relação à retenção de clorofila, no final do período de maturação.

Apesar da importância da transformação da clorofila em seus derivados, durante o amadurecimento da soja, pouco se conhece sobre o mecanismo de degradação do pigmento nessa semente, durante o processo de maturação.

Aparentemente, trata-se de um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a mecanismo químico não-enzimático, que resulta em aumento de feofitinas e outros derivados fitilados (Heaton & Marangoni, 1996; Mangos & Berger, 1997; Suzuki et al., 1999).

Existem poucos estudos sobre os processos e mecanismos responsáveis pela degradação fisiológica da clorofila como processo bioquímico de pós-colheita ou de senescência, bem como as causas e efeitos da retenção de clorofila nas sementes de soja, envolvendo estudos das alterações isoenzimáticas. Sementes com coloração intensa de verde ou mesmo esverdeadas, geralmente, apresentam elevados índices de deterioração, que podem levar à redução da germinação, do vigor e da viabilidade de lotes de soja.

Dessa maneira, teve-se como objetivo, nesta pesquisa, verificar o comportamento de genótipos de soja em relação a sua tolerância ou suscetibilidade à produção de semente verde sob condições de estresse e avaliar essa ocorrência no que se refere à retenção de clorofila e à atividade da enzima clorofilase em sementes de soja.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Localização do experimento**

Sementes de soja das cultivares de ciclo semiprecoce BRS 133 e CD 206 e de ciclo tardio MG/BR 46 (Conquista) e BRS 251 (Robusta) foram produzidas em casa de vegetação na Embrapa Soja, em Londrina, PR. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no período de setembro de 2005 a fevereiro de 2006.

### **2.2 Obtenção dos tratamentos**

A indução de condições de estresse térmico e hídrico foi realizada durante a fase de maturação da soja no estádio R<sub>6</sub>, vagens com granação de 100% e folhas verdes (Ritchie et al., 1994). Para o tratamento testemunha, não foram impostas as condições de estresses, sendo as sementes produzidas em casa de vegetação.

Para a indução de estresse térmico, foram utilizadas câmaras de crescimento (fitotrons), com temperaturas elevadas (28°C das 17:00 h às 8:00 h; 32°C das 8:00 h às 10:00 h; 36°C das 10:00 h às 14:00 h; e 32°C das 14:00 h às 17:00 h). O fotoperíodo utilizado foi de 12,5 h, das 07:00 h às 19:30 h.

O estresse hídrico foi realizado sob três condições de disponibilidade hídrica do solo. A quantidade de água nos vasos foi controlada nos seguintes níveis: testemunha, com suprimento adequado de água (cerca de 1,0 L de água suprida diariamente às plantas em cada vaso); 10% de umidade gravimétrica (Ug) e sem água (corte total de irrigação). A umidade gravimétrica foi calculada pela relação entre a massa de água presente numa amostra de terra e a massa seca da mesma amostra (Embrapa, 1997).

Diariamente, às 14:00 h, cada vaso foi pesado e os teores de água do

solo ajustados. Foram coletadas 10 subamostras da mistura terra/areia para verificar a umidade da terra, avaliado pelo método de estufa a 105°C. Com base no peso seco médio da terra, calculou-se a quantidade de água que deveria ser adicionada por vaso, para atingir o nível de 10% de Ug. Esse valor foi mantido por meio de pesagem diária dos vasos, excluindo-se os pesos médios das plantas e o peso do vaso.

As sementes foram colhidas em R<sub>9</sub>, ponto de maturação de colheita (Ritchie et al., 1994), avaliando-se as plantas uma a uma, computando-se o percentual de sementes verdes e o peso de 100 sementes nos terços superior, médio e inferior de cada planta. Após essas avaliações, as sementes provenientes dos terços superior, médio e inferior das plantas foram agrupadas para as determinações dos teores de clorofila *a*, *b* e total e da atividade da enzima clorofilase. Os tratamentos estão relacionados no Quadro 1.

### **2.3 Obtenção das amostras para determinações**

Trinta e seis sementes de cada subamostra, formada pelas quatro cultivares, foram moídas utilizando nitrogênio líquido mais uma alíquota de polyvinyl pyrrolidone (PVP), pesadas, embaladas em recipientes de plástico preto e mantidas em deep freezer a -86°C, até o momento da manipulação.

### **2.4 Determinação dos teores de clorofilas**

Foi utilizado o método de Arnon (1949), adaptado conforme descrito a seguir. Na extração das clorofilas foram utilizadas amostras armazenadas, conforme descrito no item 2.3, pesadas 2,5 g de sementes moídas, as quais foram maceradas com 4 mL de acetona 80%, em sala escura, utilizando-se luz verde. O extrato foi filtrado em lã de vidro e colocado em frasco âmbar; o macerado foi lavado até completar 15 mL de extrato, mantido em banho de gelo até a leitura

da absorvância em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645 nm e 663 nm.

**QUADRO 1-** Descrição dos tratamentos estudados, relativos às cultivares, aos estresses hídricos e aos terços da planta de soja. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tratamento	Cultivar	Níveis de água (AG)	Terços da planta
t 01	BRS 133	sem água	Inferior
t 02	BRS 133	sem água	Médio
t 03	BRS 133	sem água	Superior
t 04	BRS 133	10% Ug	Inferior
t 05	BRS 133	10% Ug	Médio
t 06	BRS 133	10% Ug	Superior
t 07	BRS 133	testemunha	Inferior
t 08	BRS 133	testemunha	Médio
t 09	BRS 133	testemunha	Superior
t 10	Robusta	sem água	Inferior
t 11	Robusta	sem água	Médio
t 12	Robusta	sem água	Superior
t 13	Robusta	10% Ug	Inferior
t 14	Robusta	10% Ug	médio
t 15	Robusta	10% Ug	superior
t 16	Robusta	testemunha	inferior
t 17	Robusta	testemunha	médio
t 18	Robusta	testemunha	superior
t 19	Conquista	sem água	inferior
t 20	Conquista	sem água	médio
t 21	Conquista	sem água	superior
t 22	Conquista	10% Ug	inferior
t 23	Conquista	10% Ug	médio
t 24	Conquista	10% Ug	superior
t 25	Conquista	testemunha	inferior
t 26	Conquista	testemunha	médio
t 27	Conquista	testemunha	superior
t 28	CD 206	sem água	inferior
t 29	CD 206	sem água	médio
t 30	CD 206	sem água	superior
t 31	CD 206	10% Ug	inferior
t 32	CD 206	10% Ug	médio
t 33	CD 206	10% Ug	superior
t 34	CD 206	testemunha	inferior

t 35	CD 206	testemunha	médio
t 36	CD 206	testemunha	superior

O cálculo do conteúdo de clorofila em  $\text{mg.g}^{-1}$  foi realizado conforme as equações:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = [(12,7.A_{663}) - (2,69.A_{645})] \times \text{FC}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = [(22,9.A_{645}) - (4,68.A_{663})] \times \text{FC}$$

$$\text{Clorofila total (mg.g}^{-1}\text{)} = [(20,2.A_{645}) + (8,02 . A_{663})] \times \text{FC}$$

em que: A = absorvância no comprimento de onda subscrito;

$$\text{FC} = \text{fator de correção} = 15 \text{ mL} / 2,5 \text{ g} = 6$$

## 2.5 Atividade de clorofilase

### 2.5.1 Obtenção do pó cetônico

Das amostras armazenadas, conforme descrito no item 2.3, foi pesado 1 g de sementes moídas, que foi homogeneizado em almofariz de porcelana com 2 mL de acetona p.a., na temperatura de 4°C. O sobrenadante, contendo acetona e pigmentos, foi filtrado em papel de filtro Qualy (gramatura 80  $\text{g/m}^2$ ) sob vácuo e o material sólido retido no almofariz foi lavado duas vezes com 2 mL de acetona, para a remoção do excesso de pigmentos. O pó cetônico retido no almofariz foi secado à temperatura ambiente, pesado e armazenado em geladeira (Sabater & Rodriguez, 1978).

### 2.5.2 Preparo do substrato para clorofilase

Folíolos de soja de cada cultivar foram colhidas no terceiro trifólio, lavadas em água destilada e secadas em papel toalha. A nervura central foi retirada com bisturi, pesando-se 2 g de peso fresco de folhas, por cultivar, as quais foram maceradas com 5 mL de acetona p.a., na temperatura de 4°C, filtradas em papel de filtro Qualy sob vácuo. O macerado foi lavado até completar 15 mL de substrato, sendo, então, armazenado a 4°C por três dias. A

homogeneização das amostras foi realizada dentro de capela com exaustão, estando as luzes do laboratório apagadas, cortinas fechadas e as vidrarias contendo os substratos foram envoltas com papel alumínio. Após esse período, os carotenóides precipitados durante o armazenamento foram removidos por filtração em papel de filtro Qualy. Os filtrados obtidos foram utilizados como substrato para a enzima clorofilase.

### **2.5.3 Determinação da atividade enzimática**

A atividade de clorofilase foi expressa em termos de unidade enzimática (UE)/g de pó cetônico (PC), pela diferença entre os cálculos da atividade enzimática no tempo 24 horas e da atividade enzimática no tempo 0 hora, baseada na quebra do substrato a clorofilídeo em 24 horas.

A atividade no tempo 0 hora foi realizada com a pesagem de 5 mg de pó cetônico de cada amostra, misturados com 0,8 mL de solução de clorofila, 0,4 mL de solução de citrato de sódio (concentrações finais: acetona = 60%; citrato = 0,04 M) e 1 mL de NaCl 2% (peso/volume) para bloquear a atividade da enzima. O volume final foi levado a 25 mL com acetona 80%, efetuando-se a leitura em espectrofotômetro de UV visível (UV 1601 PC – Shimadzu), na escala de 400 nm a 700 nm. O cálculo da atividade enzimática foi realizado pela diferença entre as leituras dos maiores valores (pico do espectro) dos tratamentos e a leitura da testemunha.

Para a avaliação da atividade enzimática no tempo 24 horas, 5 mg de pó cetônico de cada amostra foram misturados com 0,8 mL de solução de clorofila, 0,4 mL de solução de citrato de sódio (concentrações finais: acetona = 60%; citrato = 0,04 M) e incubados a 30°C no escuro por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur e o material sólido retido no tubo de ensaio foi lavado com mais 1 mL de acetona para remoção completa dos pigmentos. Aos sobrenadantes reunidos foi adicionado 1 mL de NaCl 2%

(peso/volume), para bloquear a atividade da enzima, e o volume foi levado a 25 mL com acetona 80%. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro de UV visível (UV 1601 PC – Shimadzu), na escala de 400 nm a 700 nm. O cálculo da atividade enzimática foi realizado pela diferença entre as leituras dos tratamentos e a testemunha.

## **2.6 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições, em esquema fatorial 4 x 3 x 3 (quatro cultivares, três níveis de água e três terços da planta), para as variáveis porcentagem de sementes verdes e peso de 100 sementes, sendo realizada, inicialmente, uma análise exploratória dos dados, por meio da construção de Box-plots. Foi realizada análise de variância com o fatorial reduzido 4 x 2 x 3 (quatro cultivares, dois níveis de água e três terços da planta), para a variável porcentagem de sementes verdes (Tabela 5A) e fatorial completo para a variável peso de 100 sementes (Tabela 6A).

Para as demais variáveis, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 4 x 3 (quatro cultivares e três níveis de água). Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (Tabela 7A). Na verificação das pressuposições de normalidade e homocedasticidade dos resíduos foram construídos gráficos para as variáveis respostas (Figura 2A). Para todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho foram utilizados os softwares estatísticos R<sup>®</sup> v2.1.1 (R, 2005) e o SISVAR<sup>®</sup> v4.3 (Ferreira, 2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

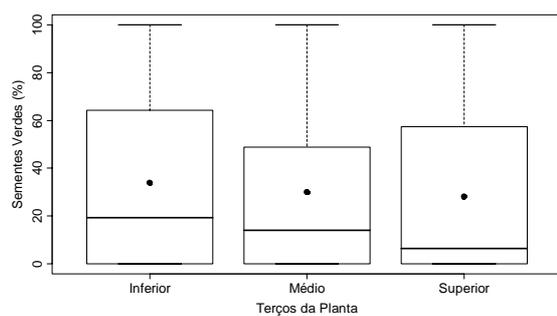
#### 3.1 Porcentagem de sementes verdes

Verifica-se que, apesar de haver uma tendência de maior concentração de semente verde no terço inferior da planta (Figura 1a), essas variações foram de apenas 5,7%, uma vez que, a ocorrência média (representada pelo ponto no interior dos Box plots) foi de 33,9% (inferior), 30,0% (médio) e 28,2%, no terço superior.

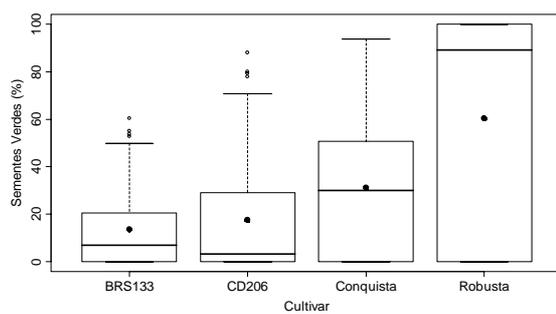
Pelos resultados obtidos, em função das diferentes cultivares, Figura 1 (b), menores índices de semente verde foram observados nas cultivares BRS 133 e CD 206, quando comparados com os das demais cultivares. Para a cultivar MG/BR 46 (Conquista), foi observada maior suscetibilidade para essa característica, com ocorrência de 31,1% e nas sementes provenientes da cultivar BRS 251 (Robusta), foram constatados elevados índices de esverdeamento, com média de 60%. Os altos índices de sementes verdes na cultivar Robusta demonstram a suscetibilidade da cultivar, no entanto, devem ser considerados alguns aspectos, como a dificuldade de padronização dos estádios de desenvolvimento, para as diferentes cultivares e o menor tamanho de semente da cultivar Robusta, que poderiam contribuir para uma classificação do estágio  $R_6$  prematura e, conseqüentemente, maior efeito do estresse. Diversos autores citam as dificuldades para o estabelecimento de identificações precisas entre os estádios de desenvolvimento das sementes e a desuniformidade de maturação entre plantas (Blackman et al., 1992; Crookston & Hill, 1978; Marcos Filho, 2005).

Por meio de relatos encontrados na literatura relativos aos níveis de clorofila presentes nas sementes, no final do período de maturação, observou-se

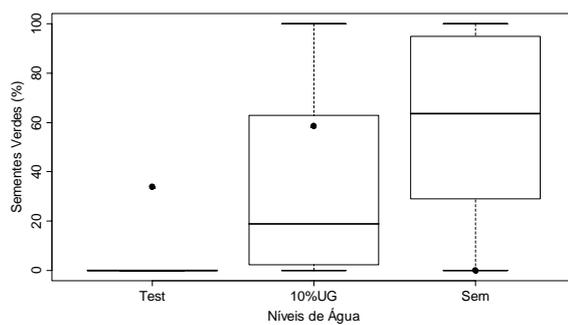
que esses níveis são afetados igualmente pelo genótipo e pelas condições climáticas, principalmente a temperatura (Ward, 1990; McGregor, 1991).



(a)



(b)



(c)

**FIGURA 1-** Ocorrência de semente verde (%) em plantas de soja, em função de estresse hídrico e temperatura elevada, de acordo com o seu posicionamento na planta (a), em diferentes cultivares (b) e com

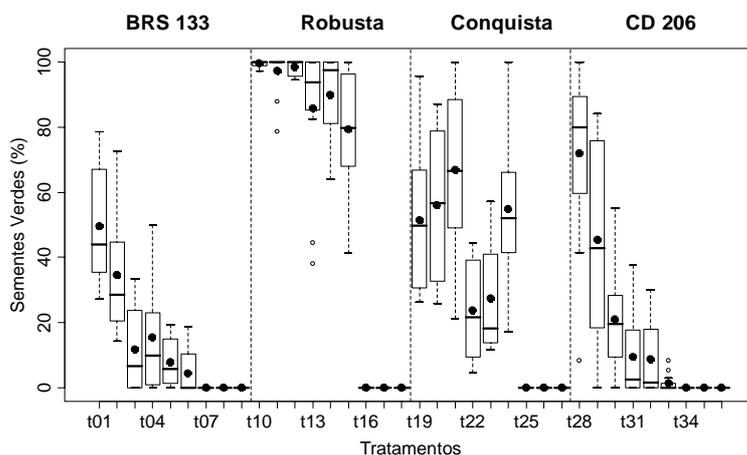
as condições de disponibilidade hídrica do solo (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Trabalho desenvolvido por Costa et al. (2001), nos estados de Goiás e de Minas Gerais, relataram que a ocorrência de sementes verdes encontradas em lotes com maturação normal poderá estar associada a condições climáticas adversas ou à própria constituição genética das cultivares. Nesse sentido, França Neto et al. (2005) em estudo realizado no Mato Grosso, constataram que algumas cultivares apresentam maior suscetibilidade à produção de semente verde, quando submetidas ao mesmo nível de estresse. Verificaram que a cultivar FMT Arara Azul é uma das cultivares mais sensíveis, naquele estado.

Os valores encontrados para a porcentagem de sementes verdes em função dos estresses hídricos são apresentados na Figura 1(c). Verifica-se que, no tratamento com suprimento adequado de água (testemunha), não houve ocorrência de semente verde. Por outro lado, em plantas submetidas aos estresses de 10% de Ug e sem água, ou seja, corte total de irrigação, foram observadas, em média, 33,5% e 58,6% de semente verde, respectivamente. TeKrony et al. (1980) citam que as condições climáticas são problemáticas para a qualidade das sementes em muitas culturas e, em geral, altas temperaturas e umidade são os fatores ambientais que mais contribuem para os danos às sementes ocasionados pelo clima.

Pela Figura 2, podem-se observar as variações da ocorrência dos índices de semente verde em plantas de soja, após indução das condições de temperaturas elevadas e estresse hídrico, em todos os tratamentos analisados (Quadro 1). Observa-se que, com o suprimento adequado de água, tratamentos (07, 08, 09), (16, 17, 18), (25, 26, 27) e (34, 35, 36) relativos às cultivares BRS 133, Robusta, Conquista e CD 206, respectivamente, não houve incidência de esverdeamento. Com o estresse de 10% de Ug, na cultivar CD 206 houve menor incidência de semente verde (tratamentos 31, 32 e 33), nos terços inferior

(9,4%), médio (8,8%) e superior (1,4%), seguida da cultivar BRS 133 (tratamentos 04, 05 e 06), nos terços inferior (15,4%), médio (7,8%) e superior (4,6%), consideradas tolerantes ao problema. Do mesmo modo, na mesma condição de deficiência, para a cultivar Conquista foi observada 23,7% (terço inferior), 27,4% (terço médio), 54,7% (terço superior) e, para 'Robusta', tratamentos (13, 14 e 15), foram constatados 74,9%, 83,2% e 79,2% nos terços da planta, respectivamente, sendo consideradas suscetíveis à produção de semente verde.



**FIGURA 2-** Variação da ocorrência dos índices de semente verde (%) em plantas de soja, em função de estresse hídrico e temperatura elevada, de acordo com o seu posicionamento na planta e em diferentes cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Na condição mais estressante, quando houve corte total de irrigação, cabe destacar o comportamento diferencial entre os genótipos, tratamentos (01, 02, 03), (10, 11, 12), (19, 20, 21) e (28, 29, 30) referentes às cultivares BRS 133,

Robusta, Conquista e CD 206, com ocorrências médias de 32,0%, 98,3%, 58,1% e 46,1%, respectivamente.

Os dados referentes às análises de variância da variável porcentagem de sementes verdes, realizadas com o fatorial reduzido, encontram-se na Tabela 1. A interação tripla, cultivares, níveis de água e terços da planta, foi significativa. Na condição de 10% de Ug, não houve diferença estatística significativa entre os terços da planta, exceto para a cv. Conquista. As cultivares, BRS 133 e CD 206 não diferiram entre si, em relação aos terços da planta. Por outro lado, a cv. Conquista apresentou diferença significativa das demais cultivares, quanto aos terços médio e superior da planta. A cv. Robusta apresentou os maiores índices de sementes verdes, em todos os terços da planta, quando comparada com ‘BRS 133’ e ‘CD 206’, que apresentaram as menores ocorrências e ‘Conquista’, as incidências intermediárias.

**TABELA 1-** Valores médios de porcentagem de sementes verdes em quatro cultivares de soja, em função de estresse hídrico e de acordo com o posicionamento na planta. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tratamentos	Cultivares			
	BRS 133	CD 206	Conquista	Robusta
10% Ug - inferior	15,4 aA	9,5 aA	23,7 aA	85,8 aB
10% Ug - médio	7,8 aA	8,8 aA	27,4 aB	89,7 aC
10% Ug - superior	4,5 aA	1,4 aA	54,7 bB	79,2 aC
Sem - inferior	49,6 cA	71,9 cB	51,3 aA	99,4 aC
Sem - médio	34,7 bA	45,4 bB	56,0 aB	97,2 aC
Sem - superior	11,7 aA	21,1 aA	66,8 aB	98,3 aC

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, comparadas dentro de cada nível de água, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Ainda pela Tabela 1, verifica-se que, quando houve corte total de irrigação, as cultivares BRS 133 e CD 206 apresentaram diferenças significativas, entre os terços da planta, com maiores incidências nos terços médio e inferior. Essa diferença estatística, entre os terços, não foi observada nas cultivares Conquista e Robusta. Entre cultivares, foi constatada menor porcentagem de sementes verdes na ‘BRS 133’, diferindo das demais, com exceções da cv. CD 206, no terço superior e da ‘Conquista’, no terço inferior da planta. As maiores incidências foram observadas na ‘Robusta’, seguida da cultivar Conquista.

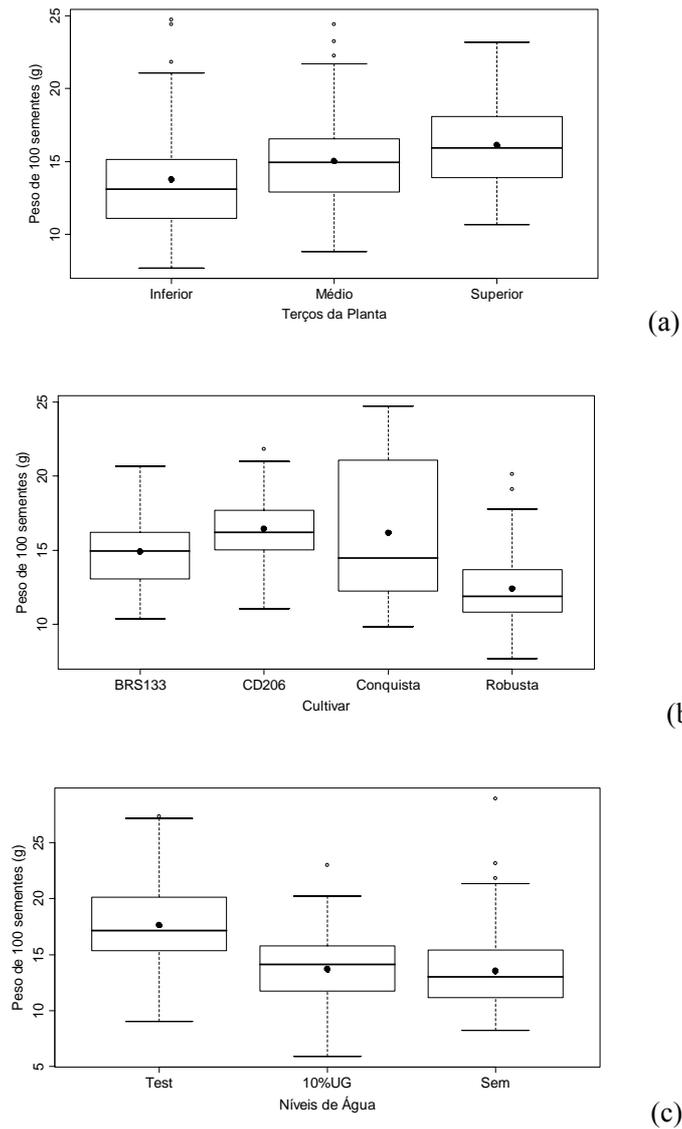
### **3.2 Peso de 100 sementes**

Pela Figura 3, podem-se observar os resultados do peso de 100 sementes nos terços das plantas de soja, após indução das condições de estresse hídrico e de temperaturas elevadas, de acordo com o posicionamento na planta (a), em diferentes cultivares (b) e com as condições de disponibilidade hídrica do solo (c). Com relação aos resultados por terço da planta (Figura 3a), foi constatado um aumento significativo no peso de 100 sementes da base da planta ao terço superior, com valores médios de 13,8 g (inferior), 15,0 g (médio) e 16,1 g (superior), confirmando os resultados encontrados para porcentagem de semente verde, em que maiores incidências de esverdeamento (Figura 1) ocasionam menores pesos de sementes. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por França Neto et al. (2005), que verificaram maior concentração de semente verde em seu terço inferior em relação ao terço superior da planta.

Comparando-se os resultados de peso de sementes entre cultivares submetidas a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico, apresentados na Figura 3 (b), observa-se o comportamento diferencial entre as mesmas, em que maiores valores de peso de sementes foram observados em sementes provenientes das cultivares CD 206 e Conquista, seguidas pela 'BRS 133' e 'Robusta', cujo resultado médio foi de 12,4 g. Evidências geradas de pesquisas com diferentes espécies têm permitido concluir que a taxa de desenvolvimento de sementes é controlada geneticamente, variando de acordo com a espécie e cultivar. Além disso, segundo Egli (1998), o peso final das sementes depende da taxa e do período de acúmulo de matéria seca, sendo que o número final de sementes e a taxa exercem menor influência sobre a produção final que o período de transferência de matéria seca. Mudanças no suprimento de assimilados podem ser explicadas por muitos dos efeitos ambientais, em que diferenças genéticas são, provavelmente, reguladas pela semente.

Os resultados de peso de 100 sementes após a indução de temperaturas elevadas e estresse hídrico são apresentados na Figura 3 (c). Verifica-se que as plantas submetidas às deficiências hídricas de 10% de Ug e com corte total de irrigação originaram sementes menores, com pesos médios de 13,8 g e 13,5 g, respectivamente, quando comparadas com as da testemunha, com valores médios de 17,6 g. Esses resultados estão de acordo com citações da literatura nas quais deficiências hídricas promovem a aceleração do processo de acúmulo de reservas, dando origem a sementes menos densas e com desempenho comprometido (Marcos Filho, 2005); quando essas deficiências ocorrem durante o período de transferência de matéria seca, provocam redução acentuada no rendimento, em virtude da formação de sementes menores, mais leves e, dependendo da cultivar, enrugadas e deformadas (França Neto & Krzyzanowski, 1990). Além disso, Dornbos & McDonald (1986) ressaltam que o período crítico de acúmulo de reservas pelas sementes de soja ocorre entre os estádios R<sub>5</sub> e R<sub>7</sub>.

Portanto, vale destacar que, em R<sub>6</sub>, estágio no qual foi iniciado o estresse, a planta ainda se mostra muito sensível a períodos de deficiência hídrica.



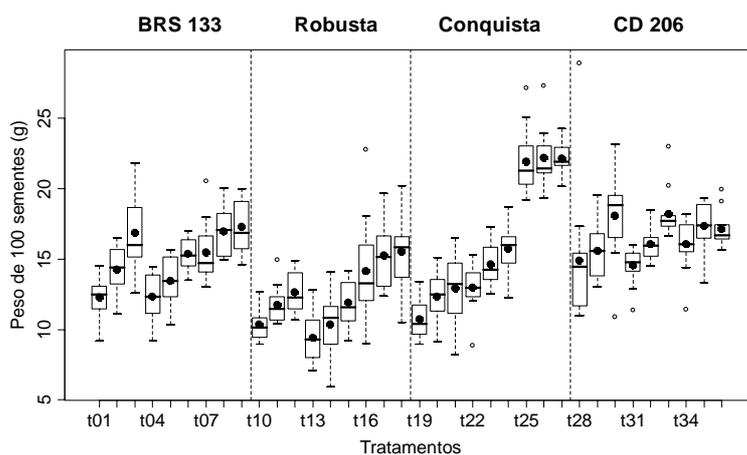
**FIGURA 3-** Peso de 100 sementes (g) de soja, em função de estresses hídrico e de temperatura elevada, de acordo com o seu posicionamento na

planta (a), em diferentes cultivares (b) e com as condições de disponibilidade hídrica do solo (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O estresse hídrico, durante o enchimento das sementes, acelera a senescência de folhas e encurta o período de maturação das sementes em soja. As sementes sob estresse hídrico podem não completar a mesma seqüência de desenvolvimento, como as plantas não estressadas e a composição relatada desde o estágio de desenvolvimento pode ser afetada na semente madura (Egli, 1998).

As variações dos valores de peso de 100 sementes, em todos os tratamentos analisados (Quadro 1), são apresentadas na Figura 4. Verifica-se que os maiores valores foram observados nos tratamentos com suprimento adequado de água, para as cultivares BRS 133 (tratamentos 07, 08, 09), com média de 16,6 g; Robusta (tratamentos 16, 17, 18), média de 15,0 g; Conquista (tratamentos 25, 26, 27), média de 22,1 g e CD 206 (tratamentos 34, 35, 36), com média de 16,8 g. Por outro lado, nas sementes submetidas ao corte total de irrigação, foram observadas menores densidades nas sementes, com médias de 14,4 g (BRS 133), 11,6 g (Robusta), 12,0 g (Conquista) e 16,2 g, para 'CD 206'. Com base nesses resultados apresentados, pode-se inferir que as cultivares BRS 133 e CD 206 podem ser consideradas menos suscetíveis ao problema de semente verde e as cultivares Conquista e Robusta, mais sensíveis ao problema.

Os dados referentes às análises de variância para a variável peso de 100 sementes, realizadas com o fatorial completo, encontram-se nas Tabela 2 e 3. As interações, níveis de água x terços da planta e cultivares x níveis de água, foram significativas. Observa-se que, o peso de 100 sementes decresceu significativamente, em função do estresse hídrico e em todos os terços da planta (Tabela 2). No tratamento testemunha, o menor peso de sementes foi observado no terço inferior da planta. Nas condições de 10% de Ug e sem água, os maiores valores foram constatados no terço superior, seguidos do terço médio e inferior.



**FIGURA 4-** Variação dos valores de peso de 100 sementes (g) de diferentes cultivares de soja, em função de estresses hídrico e de temperatura elevada, de acordo com o seu posicionamento na planta. UFLA, Lavras, MG, 2006.

**TABELA 2-** Valores médios de peso de 100 sementes (g) de soja, obtidos nos terços da planta, após submissão a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Níveis de água	Terços da planta		
	Inferior	Médio	Superior
Testemunha	16,9 aB	17,9 aA	18,0 aA
10% Ug	12,3 bC	13,6 bB	15,3 bA
Sem água	12,1 bC	13,5 bB	15,1 bA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de peso de 100 sementes, da interação cultivares e níveis de água. Todas as cultivares apresentaram os maiores pesos de 100 sementes no tratamento testemunha. Houve diferenças significativas entre os níveis de água para todas as cultivares, após submissão aos estresses hídricos, exceto para 'CD 206'. Entre cultivares, maior peso de sementes foi observado na cv. CD 206, seguidas das cultivares BRS 133 e Conquista. Os menores pesos foram constatados na cv. Robusta, em todas as condições de disponibilidade hídrica.

**TABELA 3-** Valores médios de peso de 100 sementes (g), em quatro cultivares de soja, após submissão a diferentes níveis de suprimento de água. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Níveis de água	Cultivares			
	BRS 133	CD 206	Conquista	Robusta
Testemunha	16,6 aB	16,8 aB	22,1 aA	15,0 aC
10% Ug	13,7 bB	16,3 aA	14,4 bB	10,5 cC
Sem água	14,4 bB	16,2 aA	12,0 cC	11,6 bC

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3.3 Teores de clorofilas

O resumo da análise de variância dos dados obtidos nos testes para avaliar o efeito entre cultivares e as condições de estresse hídrico, sobre os

teores de clorofila em sementes de soja, encontra-se na Tabela 7A. Os fatores, cultivares e condições de disponibilidade hídrica apresentaram diferenças altamente significativas ( $P < 0,01$ ), em todas as análises realizadas. A interação entre os dois fatores foi altamente significativa ( $P < 0,01$ ) para teor de clorofila *a* e não significativa para teores de clorofila *b*, total e atividade de clorofilase.

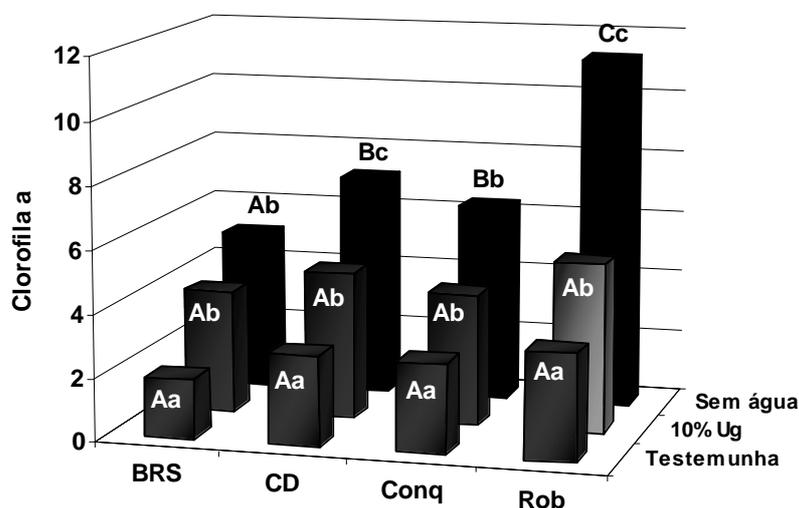
### **3.3.1 Clorofilas *a*, *b* e total**

Os resultados dos teores de clorofila *a*, *b* e total estão representados nas Figuras 5 a 9. Verifica-se que, nos tratamentos testemunha e 10% de Ug, não houve diferenças estatísticas para teor de clorofila *a* entre as cultivares avaliadas (Figura 5). No tratamento testemunha, em que as sementes não foram submetidas ao estresse, ocorreu a degradação da clorofila. No entanto, na condição de 10% de Ug, os teores de clorofila *a* foram maiores quando comparados com a testemunha, para todas as cultivares. Em condições mais estressantes, sem água, o menor conteúdo de clorofila *a* foi observado na cultivar BRS 133, que diferiu estatisticamente das demais, seguidas pelas cultivares CD 206 e Conquista, que foram iguais entre si, e a maior retenção de clorofila foi constatada na cultivar Robusta.

Os resultados dessa pesquisa vêm confirmar o que foi citado por vários autores, ou seja, que a degradação da clorofila é afetada igualmente pelo genótipo e pelas condições climáticas, como Ward (1990) e McGregor (1991), trabalhando com canola e Costa et al. (2001) e França Neto et al. (2005), trabalhando com soja. Outros trabalhos citam a influência do genótipo (Stangarlin, 1999 e Stangarlin et al. 2000, trabalhando com feijão) e a dependência das condições ambientais e da temperatura de secagem (Heaton & Marangoni, 1996; Sinnecker, 2002; Takamiya et al., 2000).

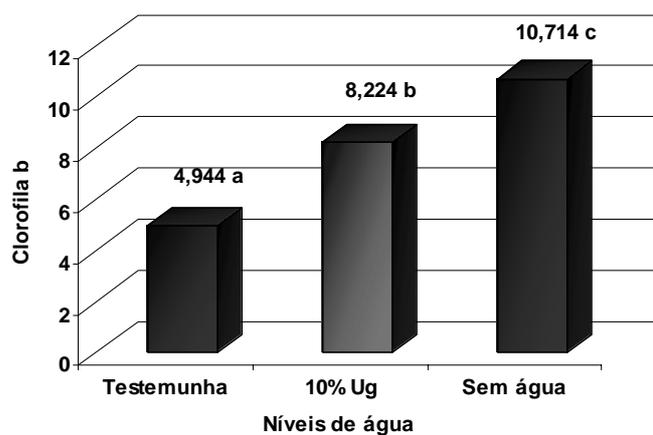
A degradação da clorofila é iniciada na senescência, por fatores endógenos e pode ser influenciada também por fatores externos, tais como

estresse hídrico. Em sementes de soja submetidas às condições de 10% de Ug e corte total de irrigação houve elevados teores de clorofila *b*, quando comparadas com aquelas produzidas com suprimento adequado de água (Figura 6). Esses resultados estão de acordo com a constatação feita por Takamiya et al. (2000), que relataram que os fatores externos, tais como estresse hídrico e mudanças de temperatura, interferem no processo normal, levando a acelerar ou retardar a degradação da clorofila.

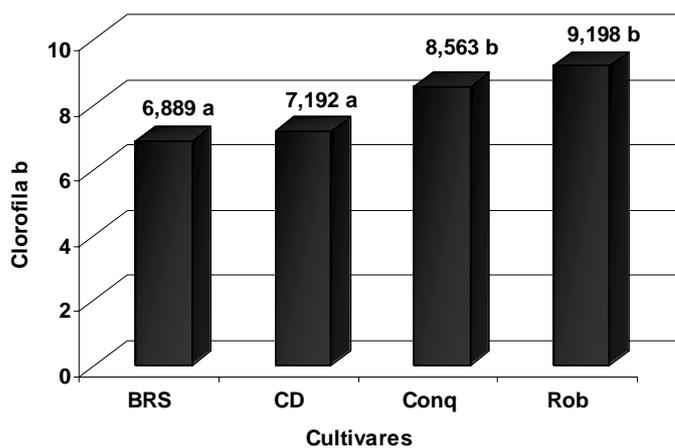


**FIGURA 5-** Teores de clorofila *a* ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) em sementes de soja das cultivares BRS 133 (BRS), CD 206 (CD), Conquista (Conq) e Robusta (Rob), submetidas aos estresses hídricos. Letras maiúsculas comparam cultivares e minúsculas, condições de estresse hídrico. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Pela Figura 7, observa-se que as sementes das cultivares BRS 133 e CD 206 apresentaram menores teores de clorofila *b*, após indução de temperaturas elevadas e estresse hídrico. Segundo Sinnecker (2002), a soja colhida em estágio de maturação prematuro ( $R_6$ ) contém um elevado teor de clorofila.



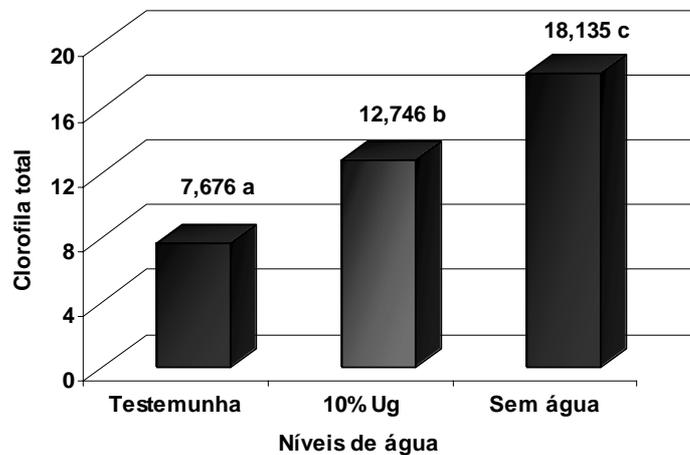
**FIGURA 6-** Teores de clorofila *b* (mg.g<sup>-1</sup>) em sementes de soja submetidas aos estresses hídricos. UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 7-** Teores de clorofila *b* ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) em sementes de soja das cultivares BRS 133 (BRS), CD 206 (CD), Conquista (Conq) e Robusta (Rob). UFLA, Lavras, MG, 2006.

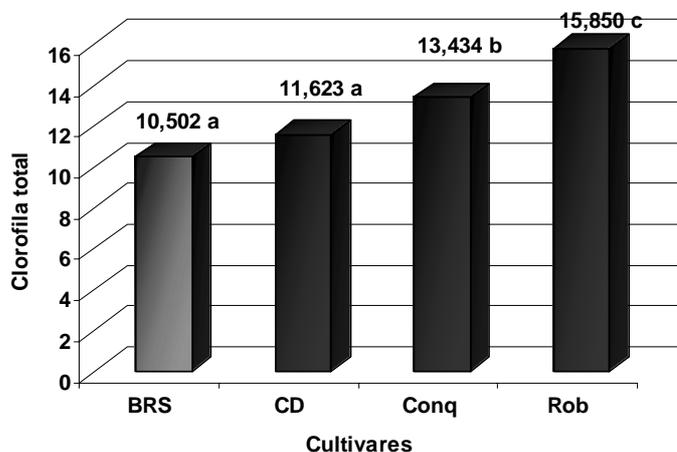
Em condições normais, sem estresses, a planta amadurece e ocorre a degradação da clorofila para resultar na coloração normal das sementes de soja. No entanto, sob condições de estresse, este mecanismo é alterado. Confirmando os resultados encontrados nos teores de clorofila *a* (Figura 5), foi observado também para a clorofila *b* (Figura 7) que as cultivares Conquista e Robusta são mais suscetíveis à produção de semente verde (Figura 2 e Tabela 1).

O teor de clorofila total (Figuras 8 e 9) expressa, de forma geral, os resultados observados com as clorofilas *a* e *b*. Elevados teores de clorofila total foram verificados nas sementes de soja submetidas às condições de 10% de Ug e corte total de irrigação, diferindo estatisticamente, quando comparadas com aquelas produzidas com suprimento adequado de água (Figura 8).



**FIGURA 8-** Teores de clorofila total (mg.g<sup>-1</sup>) em sementes de soja submetidas a três condições de disponibilidade hídrica. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Na Figura 9 são apresentados os resultados do teor de clorofila total entre as cultivares avaliadas, após os tratamentos analisados em esquema fatorial. As sementes provenientes das cultivares BRS 133 e CD 206 apresentaram os menores valores de clorofila total, não diferindo entre si, seguidas pela cultivar Conquista, que apresentou valores intermediários e pela cultivar Robusta, que apresentou a maior retenção de clorofila.

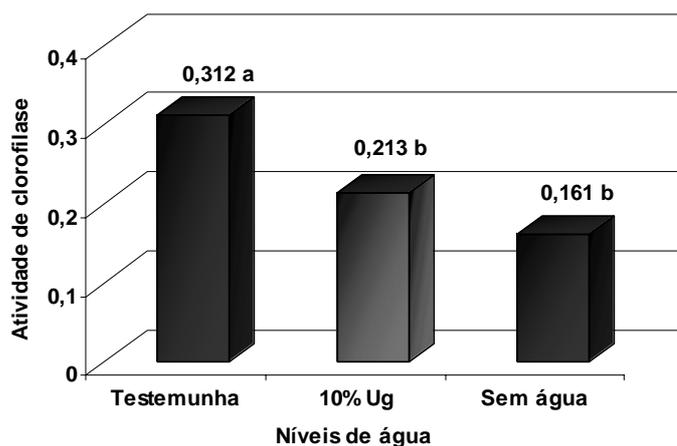


**FIGURA 9-** Teores de clorofila total ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) em sementes de soja das cultivares BRS 133 (BRS), CD 206 (CD), Conquista (Conq) e Robusta (Rob), após indução de estresses. UFLA, Lavras, MG, 2006.

### 3.4 Atividade de clorofilase

A atividade e a expressão da enzima clorofilase são apresentadas nas Figuras 10, para o fator estresse hídrico e na Figura 11, para cultivares. Verifica-se pela Figura 10, que a maior atividade enzimática foi observada na testemunha, como era de se esperar, uma vez que, nesse tratamento, foi constatado menor conteúdo de pigmentos, tanto para clorofila *a* quanto para clorofila *b*. Nas condições de 10% de Ug e corte total de irrigação, não houve diferença estatística para clorofilase, ambas apresentando menores atividades. Bohner (2005) comenta que, sob condições favoráveis, a planta amadurece e a enzima clorofilase degrada a clorofila presente nas sementes de soja. Durante os últimos estádios de maturação da semente, e em condições extremamente quentes e secas, esta atividade é influenciada. Acredita-se que, com a morte

prematura das plantas e, conseqüentemente, a maturação forçada das sementes, a atividade da enzima clorofilase cessa antes que toda a clorofila seja degradada.



**FIGURA 10-** Atividade de clorofilase (UE/g de pó cetônico) em sementes de soja submetidas a três condições de disponibilidade hídrica. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são comparáveis aos reportados por Stangarlin (1999) e por Stangarlin et al. (2000), que verificaram, com base no conteúdo de clorofilas e na atividade das enzimas clorofilase e rubisco, a interferência no sistema fotossintético de cultivares de feijoeiro infectadas por patógenos. Estes autores observaram maior atividade enzimática nas regiões infectadas com o patógeno, ou seja, regiões que apresentam menores teores de clorofila por unidade de área verde remanescente. Observaram relação inversa entre a concentração de clorofilas e a atividade de clorofilase, indicando que a redução no teor desses pigmentos verdes, provavelmente, ocorre em função da lise enzimática e não pela supressão da sua síntese.

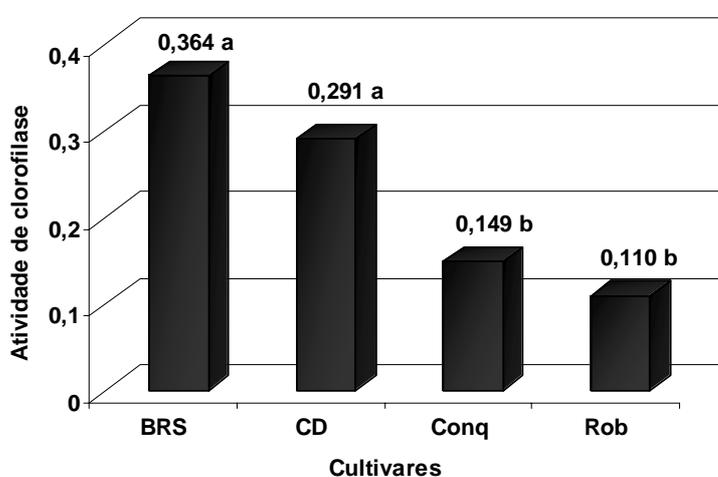
A atividade enzimática de clorofilase entre as cultivares de soja, após a indução de temperaturas elevadas e de deficiência hídrica, está representada na Figura 11. A maior atividade foi observada na cultivar BRS 133 e a menor na cultivar Robusta, que apresentaram menores e maiores conteúdos de pigmentos. Vale ressaltar, no entanto, o comportamento diferencial entre as cultivares CD 206 e Conquista, as quais apresentaram maior e menor atividade de clorofilase, e menor e maior conteúdo de clorofila *b* (Figura 7) e clorofila total (Figura 9). Por outro lado, esse comportamento não foi constatado em relação à clorofila *a* (Figura 5), uma vez que, não houve diferença estatística entre ambas. Isso pode ser atribuído aos relatos encontrados na literatura, relacionados à possibilidade de outras enzimas, além da clorofilase, estarem atuando sobre a clorofila. Enzimas, tais como a magnésio-chelatase e oxigenases, poderiam atuar diretamente na clorofila ou nos derivados desta (Heaton & Marangoni, 1996; Takamyia et al., 2000). Segundo os autores, a remoção do grupo fitol causa um drástico aumento da polaridade da molécula de clorofila que, por consequência, diminui a sua estabilidade na membrana tilacóide.

Em outra pesquisa, conduzida por Tewari & Tripathy (1998) em melão e trigo, foi constatado que o estresse de temperatura induz à diminuição na reação biosintética de clorofila, causada pela inativação das enzimas envolvidas no processo, principalmente a Mg-chelatase.

Os resultados obtidos por Sinnecker (2002), com soja, vêm fortalecer essa hipótese e citam, ainda, que a degradação da clorofila ocorre por múltiplas vias enzimáticas, simultaneamente, não se restringindo apenas à clorofilase. O autor, trabalhando com três temperaturas, verificou que temperaturas mais elevadas, acima de 40°C, a rápida perda de umidade causaram a desnaturação de todas as enzimas, inclusive a clorofilase, que é a mais resistente termicamente.

Como a clorofilase e a clorofila são encontradas nos tilacóides dos cloroplastos, o mecanismo pelo qual o contato entre enzima e substrato é

controlado permanece desconhecido. *In vitro*, a sua ativação necessita de temperaturas elevadas e, em meio aquoso e *in vivo* ela tem atividade latente nos cloroplastos, sob condições naturais (Johnson-Flanagan & Thiagarajah, 1990; Schoch & Brown, 1987; Takamyia et al., 2000).



**FIGURA 11-** Atividade de clorofilase (UE/g de pó cetônico) em sementes de quatro cultivares de soja, após indução de estresses. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Há poucos trabalhos na literatura sobre o mecanismo de degradação fisiológica da clorofila em sementes de soja, como um processo bioquímico de pós-colheita ou de senescência (Costa et al., 2001; França Neto et al., 2005; Sinnecker, 2002). Esses trabalhos enfocam os principais fatores que podem resultar na produção de semente verde, a influência dessa ocorrência sobre a qualidade fisiológica de lotes de sementes e a degradação da clorofila durante a maturação e a secagem. No entanto, como se pôde observar, diferentes comportamentos com relação ao conteúdo de clorofilas podem ser obtidos,

dependendo da cultivar em questão e essa retenção é afetada igualmente pelo genótipo e pelas condições climáticas adversas.

#### 4 CONCLUSÕES

Existe variação de resposta à retenção de clorofilas em sementes de cultivares de soja produzidas em condições de estresse hídrico e térmico. As cultivares MG/BR 46 (Conquista) e BRS 251 (Robusta) são suscetíveis e as cultivares BRS 133 e CD 206 são menos suscetíveis às condições de estresse que causam o esverdeamento.

A intensidade de ocorrência de semente verde é afetada tanto pelo genótipo como por condições climáticas desfavoráveis.

Plantas de soja submetidas a condições de estresse hídrico e térmico, com início em R<sub>6</sub>, produzem altos índices de sementes verdes, menores e mais leves, com elevado teor de clorofilas e baixa atividade de clorofilase.

O conteúdo de clorofilas *a*, *b* e total em sementes verdes de soja é inversamente proporcional à atividade da enzima clorofilase.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 24. n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 100, n. 1, p. 225-230, Sept. 1992.

BOHNER, H. **Green Soybeans**. Disponível em: <[http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct\\_1102a2.htm](http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct_1102a2.htm)> Acesso em: 12 jul. 2005.

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 102-107, 2001.

CROOKSTON, R. K.; HILL, D. S. A visual indicator of the physiological maturity of soybeans seed. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 5, p. 867-879, Sept./Oct. 1978.

DORNBOS, D. L.; McDONALD, M. B. Mass and composition of developing soybean seeds at five reproductive growth stages. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 3, p. 624-630, May/June 1986.

EGLI, D. B. **Seed biology and the yield of grain crops**. New York: CABI International, 1998. 178 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Sementes enrugadas: novo problema na soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPS, 1990. 4 p. (EMBRAPA-CNPS. Comunicado Técnico, 46).

FRANÇA NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M. de, COSTA, O.; BRUMATTI, P. S. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da, HENNING, A. A.; SANCHES, D. P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 38).

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 8-15, Jan. 1996.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; THIAGARAJAH, M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, cv. Westar) embryos under optimum conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 136, n. 2, p. 180-186, May 1990.

MANGOS, T. J.; BERGER, R. G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, New York, v. 204, n. 5, p. 345-350, 1997.

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

McGREGOR, D. I. Influence of environment and genotype on rapeseed/canola seed chlorophyll content. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 1, p. 107-116, 1991.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM (2005). **R**: a language and environment for statistical computing. **Viena**: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 2005.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, C. E.; BENSON, G. O. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1994. 20 p. (Special Report, 53).

SABATER, B.; RODRÍGUEZ, M. T. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 274-276, Mar. 1978.

SCHOCH, S.; BROWN, J. The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 126, n. 4/5, p. 483-494, Jan. 1987.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja**. 2002. 103 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

STANGARLIN, J. R. **Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), clorofilase, B-1,3 glucanase e quitanase e conteúdo de clorofila**

**em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculaatus* Ou *Phaeoisariopsis griseola*.** 1999. 119 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; LABATE, C. A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase,  $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 59-66, jan./mar. 2000.

SUZUKI, Y.; TANABE, K.; SHIOI, Y. Determination of chemical oxidation products of chlorophyll and porphyrin by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 839, n. 1/2, p. 85-91, Apr. 1999.

TAKAMYIA, K.; TSUCHIYA, T.; OHTA, H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? **Trends Plant Science**, London, v. 5, n. 10, p. 426-431, Oct. 2000.

TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; BALLE, J. The effect of the field production environment on soybean seed quality. In: HEBBLETHWAITE, P. D. (Ed.). **Seed Production**. London: Butterworths, 1980. p. 403-425.

TEWARI, A. K.; TRIPATHY, B. C. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in Cucumber and Wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 3, p. 851-858, July 1998.

WARD, K. **The effect of genotype, environment and agronomic practices on the chlorophyll level in harvested canola seed.** 1990. 127 p. Thesis (PhD) – University of Manitoba, Winnipeg.

## **CAPÍTULO 4**

### **NÍVEL MÁXIMO DE TOLERÂNCIA DE SEMENTES ESVERDEADAS EM LOTES DE SEMENTES DE SOJA APÓS ARMAZENAMENTO**

#### **RESUMO**

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Nível máximo de tolerância de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja após armazenamento**. Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).

Ocorrência de sementes de soja esverdeadas, devido à maturação forçada de plantas ou sua morte prematura, causada por seca ou por doenças de raiz ou foliares, tem sido freqüente em diversas regiões brasileiras. A qualidade fisiológica de lotes com sementes verdes pode ser afetada tanto em relação ao

seu potencial de germinação quanto ao seu vigor, a ponto de inviabilizar sua comercialização. A determinação desse ponto que estabelece o nível máximo tolerado de sementes verdes nos lotes é informação de extrema importância para os produtores de sementes. O objetivo do experimento foi determinar o nível máximo tolerado de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja, que não comprometa a sua qualidade para fins comerciais. Foram utilizadas sementes de soja das cultivares CD 206, produzidas em Ubitatã, PR e de 'FMT Tucunaré', produzidas em Alto Garças, MT. Sementes esverdeadas foram mescladas com sementes amarelas nos seguintes percentuais: 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% e 100%. A qualidade das sementes foi avaliada pelos testes de germinação, envelhecimento acelerado, tetrazólio e condutividade elétrica. Foram também determinados os teores de clorofila *a*, *b* e total nas sementes. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com três repetições, em esquema fatorial (duas cultivares x 12 níveis de sementes verdes). A qualidade das sementes foi afetada negativamente e os teores de clorofilas se elevaram com o aumento dos percentuais de sementes esverdeadas. Índices de até 3% de sementes esverdeadas, em lotes de sementes de soja, não propiciaram reduções na germinação, na viabilidade e no vigor, pelo envelhecimento acelerado, nas duas cultivares em estudo. A partir de 6% de sementes esverdeadas, a sua qualidade apresenta reduções significativas. Níveis superiores a 9% de sementes esverdeadas comprometem a qualidade de lotes de sementes de soja para fins comerciais, por seus efeitos significativos na redução do potencial fisiológico.

#### ABSTRACT

PÁDUA, Gilda Pizzolante de. **Maximum tolerated level of green seed in soybean seed lots after storage**. Lavras: UFLA, 2006. 160p. (Thesis – Doctorate in Crop Science).

The occurrence of green soybean seed due to forced maturation or premature death of plants caused by drought or foliar and/or root diseases has been common in several Brazilian production areas. Physiological quality of seed lots with green seed may have their germination and vigor potentials affected, resulting in their discard for the grain industry. The objective of this experiment was to determine the maximum tolerated level of green seed in soybean seed lots, which is information of major importance for seed producers in the decision making of selling or not these lots. Soybean seed of the cultivars CD 206,

produced in Ubirata, Parana, and 'FMT Tucunare,' produced in Alto Garças, Mato Grosso, were used in the study. Green seed and yellow seed of both cultivars were mixed in the following proportions: 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% and 100%. Seed quality was evaluated by the germination, accelerated aging, tetrazolium and electrical conductivity tests. The contents of *a*, *b* and total chlorophyll in the seed were also determined. A complete block design in factorial (two cultivars x 12 levels of green seed) was used. Seed quality was negatively affected and contents of chlorophyll incremented with the increase of the percentage of green seed. Seed germination, viability and vigor, measured by the accelerated aging test, were not reduced with levels of up to 3% green seed, for both cultivars. Levels above 6% of green seed significantly reduce the quality of the seed. Seed lots with 9% or more green seed have their quality significantly reduced to the point their commercialization is not advised.

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de sementes verdes ou esverdeadas em lotes de sementes de soja é um problema que vem ocorrendo em países tropicais, como o Brasil, em que as condições climáticas são caracterizadas por elevadas temperaturas associadas a grandes variações nos índices pluviométricos, principalmente no final do período de maturação das sementes.

A ocorrência de sementes verdes é resultado de condições climáticas desfavoráveis (extremamente quentes e secos, durante os últimos estádios de maturação da semente), e ou de procedimentos de colheita prematura que

interferem no processo de degradação da clorofila, que causa o desaparecimento da cor verde. Acredita-se que, com a morte prematura das plantas e, conseqüentemente, a maturação forçada das sementes, a atividade da enzima clorofilase cessa antes que toda a clorofila seja degradada (Bohner, 2005).

Considerando a importância do desaparecimento da clorofila como medida de controle no amadurecimento de sementes oleaginosas, o conhecimento relativo ao mecanismo de degradação desse pigmento, durante o processo de maturação e armazenamento, é escasso. Esses níveis de pigmentação podem ser fortemente afetados, tanto pelo estágio de desenvolvimento como pelas condições climáticas que podem interferir no processo de maturação das sementes.

A ocorrência de sementes com coloração intensa verde-escuro, principalmente envolvendo a área do eixo embrionário (sementes verdes), foi relatada por Costa et al., (2001), com grande frequência em regiões produtoras brasileiras nas últimas safras. Sementes de soja com essas características, geralmente, apresentam elevados índices de deterioração causada por umidade, que podem levar à redução da germinação e do vigor, com reflexos na comercialização dos lotes. Esses reflexos nem sempre são observados quando a semeadura é efetuada imediatamente após a colheita, no entanto, após o armazenamento, em condições não controladas, o efeito da incidência de sementes verdes é agravado. Dessa maneira, a presença de sementes verdes resulta em menor valor comercial e em prejuízos quando o objetivo é a comercialização.

A determinação do ponto que estabelece o nível máximo tolerado de sementes verdes nos lotes é informação de extrema importância para os produtores de sementes de soja, pois direciona a tomada de decisões sobre a colheita, o beneficiamento e a comercialização.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi determinar o nível máximo tolerado de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja, que não comprometa a sua qualidade para fins comerciais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização das sementes**

Foram utilizadas sementes de soja das cultivares CD 206, produzidas em Ubitatã, PR e de FMT Tucunaré, produzidas em Alto Garças, MT. As sementes ficaram armazenadas em câmaras a 20°C e 60% UR por, aproximadamente, cinco meses, antes das avaliações. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Sementes da Embrapa Soja e do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

A ocorrência de sementes esverdeadas na cultivar CD 206 foi consequência de deficiência hídrica durante a fase final de maturação das sementes. Na cultivar FMT Tucunaré, a ocorrência dessas sementes foi em virtude de chuvas excessivas que resultaram na ocorrência de fusariose nas raízes das plantas, resultando em morte antecipada das mesmas e conseqüente maturação forçada. Observou-se, ainda, que as sementes esverdeadas na cultivar CD 206 apresentavam tonalidade mais intensa de verde em relação às de FMT Tucunaré. No presente trabalho, as sementes, cuja coloração verde está confinada ao tegumento, foram denominadas de sementes esverdeadas e, aquelas, onde a coloração se apresenta por toda a semente, foram consideradas como sementes verdes.

## **2.2 Obtenção dos tratamentos**

As sementes verdes e esverdeadas foram separadas e posteriormente mescladas com sementes amarelas do mesmo lote, das cultivares CD 206 e FMT Tucunaré, para a obtenção dos seguintes percentuais: 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% e 100%.

Após a obtenção dos tratamentos, as sementes foram avaliadas por meio dos testes de germinação, de envelhecimento acelerado, de tetrazólio e de condutividade elétrica. Foram realizadas determinações dos teores de clorofila *a*, *b* e total nas sementes.

## **2.3 Teste de germinação**

O teste de germinação foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes por unidade experimental, semeadas em substrato de papel na forma de rolo, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco. Os rolos foram mantidos em germinador previamente regulado à temperatura constante de 25°C. As avaliações foram feitas aos cinco e oito dias

após a instalação do teste, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e os resultados expressos em porcentagem.

#### **2.4 Teste de envelhecimento acelerado**

Foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes por unidade experimental, colocadas sobre tela de alumínio, distribuídas em camada única, em caixas plásticas contendo, no fundo, 40 mL de água destilada. As caixas plásticas foram tampadas e mantidas em uma incubadora com jaqueta d'água regulada à temperatura constante de 41°C, durante 48 horas (Marcos Filho, 1999). Decorrido o período de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), efetuando-se uma única avaliação aos cinco dias, computando-se a porcentagem de plântulas normais.

#### **2.5 Teste de tetrazólio**

Duas subamostras de 50 sementes por unidade experimental foram acondicionadas em substrato de papel umedecido, com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso, durante 16 horas, a 25°C. Posteriormente, as sementes foram colocadas em solução com concentração de 0,075% de 2,3,5-trifenil-cloreto-de-tetrazólio, no escuro, em estufa, com temperatura de 40°C, por 2,5 horas. Após esse período, as sementes foram lavadas em água corrente e analisadas individualmente, verificando-se a porcentagem de vigor, de viabilidade e de danos, conforme metodologia descrita por França Neto et al. (1998).

#### **2.6 Teste de condutividade elétrica**

O teste de condutividade elétrica foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes da fração sementes puras, pesadas com precisão de 0,01g,

colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água desionizada e mantidas em incubadora à temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. No mesmo ambiente, foi deixado um copo contendo somente 75 mL de água desionizada (Vieira & Krzyzanowski, 1999). Após esse período, foi efetuada a leitura de condutividade elétrica das soluções, utilizando-se um condutivímetro marca Digimed modelo CD 21A. Os resultados foram obtidos calculando-se a condutividade elétrica observada para cada repetição, dividida pelo peso das sementes, sendo expressos em  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

## 2.7 Determinação dos teores de clorofilas

Para a realização destas análises, foi utilizado o método de Arnon (1949), adaptado conforme descrito a seguir. Vinte sementes de cada subamostra por tratamento foram moídas utilizando nitrogênio líquido mais uma alíquota de polyvinyl pyrrolidone (PVP), pesadas, embaladas em recipiente de plástico preto e mantidas em deep freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$ , até o momento da manipulação. Para extração das clorofilas, foram utilizadas 3 g de sementes moídas, as quais foram maceradas com 5 mL de acetona 80%, em sala escura utilizando-se luz verde. O extrato foi filtrado em lã de vidro e colocado em frasco âmbar; o macerado foi lavado até completar 15 mL de extrato, mantido em banho de gelo até a leitura da absorbância em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645 nm e 663 nm. O cálculo do conteúdo de clorofila em  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  foi realizado conforme as equações:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = [(12,7 \cdot A_{663}) - (2,69 \cdot A_{645})] \times \text{FC}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = [(22,9 \cdot A_{645}) - (4,68 \cdot A_{663})] \times \text{FC}$$

$$\text{Clorofila total (mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} = [(20,2 \cdot A_{645}) + (8,02 \cdot A_{663})] \times \text{FC}$$

em que: A = absorbância no comprimento de onda subscrito;

$$\text{FC} = \text{fator de correção} = 15 \text{ mL} / 3 \text{ g} = 5$$

## **2.8 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições, em esquema fatorial 12 x 2 (doze níveis de sementes verdes e duas cultivares), para todas as variáveis analisadas.

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância. Para algumas variáveis, foi necessário utilizar transformações angulares ou logarítmicas. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Foram feitas análises de regressão para cada cultivar, avaliando-se os efeitos dos percentuais de sementes verdes sobre os parâmetros de qualidade estudados.

Na verificação das pressuposições de normalidade e homocedasticidade dos resíduos, foram construídos gráficos das variáveis respostas dano mecânico, dano por umidade, vigor, viabilidade, germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total (Figura 3A).

Para todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho, foram utilizados os softwares estatísticos R<sup>®</sup> v2.1.1 (R, 2005) e o SISVAR<sup>®</sup> v4.3 (Ferreira, 2000).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Análise de variância dos dados**

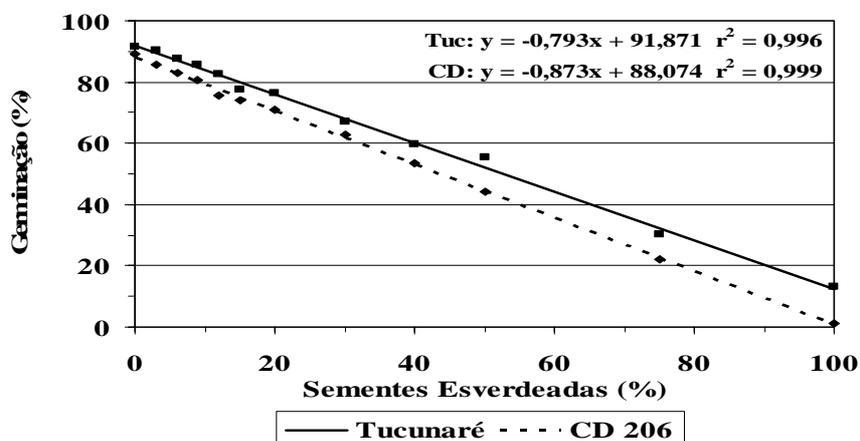
Os resumos das análises de variância dos dados obtidos nos testes para avaliar a influência do nível tolerado de sementes esverdeadas, em lotes de sementes de soja, encontram-se nas Tabelas 8A e 9A. Na interação entre os fatores, porcentagem de sementes esverdeadas e cultivares houve diferenças significativas para os testes de germinação, de envelhecimento acelerado, de tetrazólio (viabilidade e deterioração por umidade) e clorofila *a*. A interação

entre os dois fatores não foi significativa para os testes de condutividade elétrica, de tetrazólio (vigor e dano mecânico) e para os teores de clorofila *b* e total.

### **3.2 Testes de germinação, de tetrazólio e de envelhecimento acelerado**

De acordo com a Figura 1, foram verificados efeitos significativos de ordem linear para a germinação nas duas cultivares analisadas, em função do porcentual de sementes verdes. Observa-se que a germinação decresce gradativamente à medida que se aumenta o índice de sementes verdes. Foi constatado, pela análise de variância, que índices de até 3% de sementes verdes, em lotes de sementes de soja, não diferiram da testemunha e não apresentaram reduções na germinação, na viabilidade pelo tetrazólio (1-5) e no vigor pelo envelhecimento acelerado, nas duas cultivares em estudo (Tabela 1). Para as cultivares CD 206 e FMT Tucunaré foram observados valores de germinação de 81% e de 86%, respectivamente, com incidência de 9% de sementes verdes. A partir desse nível, ou seja, níveis superiores a 9% de sementes verdes em lotes de sementes, a qualidade do lote para fins comerciais, pode ficar comprometida por seus efeitos significativos na redução da germinação, do vigor e da viabilidade das sementes.

Para todos os parâmetros avaliados, a qualidade das sementes de ‘CD 206’ foi sempre inferior à de ‘Tucunaré’. Em trabalho semelhante conduzido por Medina et al. (1997), também foi constatado que a incidência de 20% de sementes verdes, encontradas em lotes de sementes de soja, das cultivares IAC-15, IAC-17, IAC-Foscarin-31 e FT Cometa, afetou significativamente a germinação das sementes das cultivares estudadas.



**FIGURA 1-** Germinação de sementes de soja das cultivares CD 206 (CD) e FMT Tucunará (Tuc), em função do percentual de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Costa et al. (2001), trabalhando com quatro níveis de sementes verdes em soja, enfatizaram que, sendo o padrão de comercialização de sementes fiscalizadas de 80%, a ocorrência de mais de 10% de sementes verdes encontradas em lotes, compromete severamente a germinação, envolvendo descartes dos lotes, impossibilitando sua comercialização e acarretando sérios prejuízos de caráter econômico aos produtores de sementes de soja.

**TABELA 1 -** Efeito de níveis de sementes verdes (SV) na germinação, no vigor (env. acelerado), na viabilidade e no índice de deterioração por umidade detectados pelo teste de tetrazólio, em sementes de soja das cultivares CD 206 (CD) e FMT Tucunará (Tuc). UFLA, Lavras, MG, 2006.

SV (%)	Germinação (%)		Env. acelerado (%)		TZ (1-5) Viabilidade		TZ (6-8) Det. Umidade	
	CD	Tuc	CD	Tuc	CD	Tuc	CD	Tuc

<b>0</b>	89 aA	91 aA	85 aA	84 aA	89 aA	92 aA	0 aA	6 aB
<b>3</b>	86 aB	90 aA	82 aA	82 aA	86 aA	89 aA	3 aA	9 aB
<b>6</b>	83 bB	88 bA	79 bA	81 aA	84 bB	88 aA	8 bA	10 aA
<b>9</b>	81 bB	86 bA	76 cA	77 bA	81 cA	83 bA	11 cA	15 bA
<b>12</b>	74 cB	83 cA	73 cA	75 bA	76 dB	82 bA	13 cA	16 bA
<b>15</b>	76 cA	78 dA	68 dA	70 cA	70 dB	80 bA	19 dA	19 cA
<b>20</b>	71 cB	76 dA	65 eA	65 dA	70 eB	75 cA	21 dA	23 cA
<b>30</b>	63 dA	67 eA	55 fB	63 dA	63 eA	65 dA	33 eA	34 dA
<b>40</b>	53 eB	60 fA	45 gB	55 eA	54 fB	63 dA	41 fA	37 dA
<b>50</b>	44 fB	56 fA	33hB	46 fA	47 gB	53 eA	51 gB	46 eA
<b>75</b>	22 gB	30 gA	17 iB	33 gA	27 hB	32 fA	71 hA	68 fA
<b>100</b>	1 hB	13 hA	0 jB	12 hA	5 iB	20 gA	94 iB	80 gA
CV(%)	3,95		3,31		3,91		8,39	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

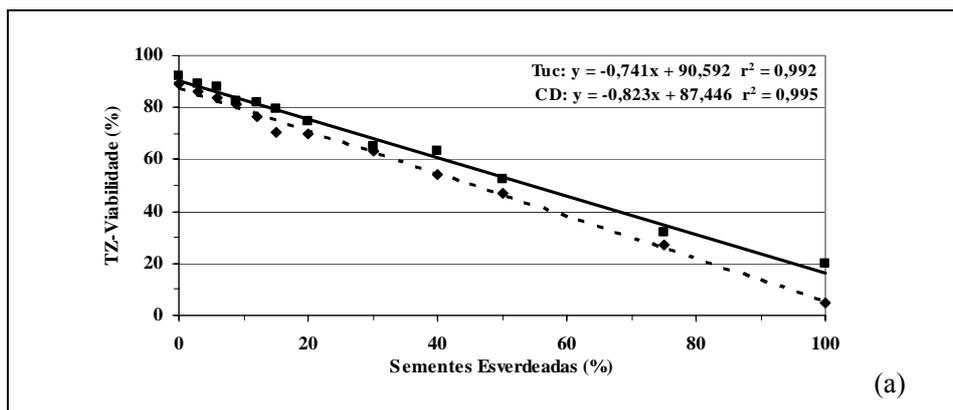
Pelas Figuras 2 (a) e 2 (b), observa-se que a viabilidade e o vigor pelo tetrazólio ajustaram-se a modelos lineares. Os maiores valores de viabilidade (Figura 2 e Tabela 1) foram obtidos nas sementes que apresentaram níveis de até 9% de sementes verdes. Nesse nível, nas cultivares CD 206 e FMT Tucunaré foram observados valores de 81% e 83% de viabilidade, respectivamente. Constatou-se que índices superiores a 9% de sementes verdes proporcionaram decréscimos acentuados na viabilidade, indicando que sementes esverdeadas, em sua maioria, ou estão mortas ou produzem plântulas anormais.

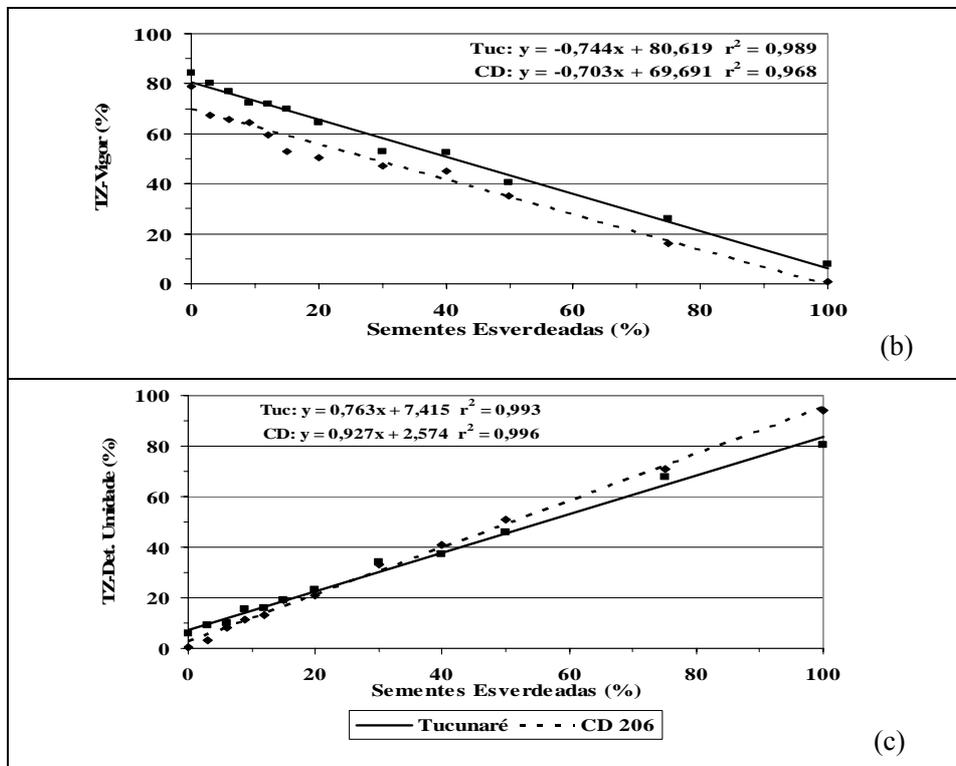
O vigor, detectado pelo teste de tetrazólio (Figura 2 b), foi afetado negativamente com o aumento dos percentuais de semente esverdeada, apresentando máximo vigor (82%) na testemunha e redução para 68% no nível de 9% de sementes verdes (Tabela 2). No estudo desenvolvido por Costa et al.

(2001) foi demonstrado que, a partir de níveis de 10% de sementes verdes encontrados em lotes de sementes de soja, poderá ocorrer redução do vigor, da viabilidade e da germinação. Os autores ressaltaram, ainda, que a concentração do esverdeamento em áreas próximas à radícula, à plúmula e ao hipocótilo promove danos mais drásticos às sementes, acarretando elevados índices de deterioração e baixo vigor.

Os resultados do índice de deterioração causada por umidade (nível 6-8), detectado pelo teste de tetrazólio (Figura 2 c), ajustou-se aos modelos lineares para as duas cultivares. Verificou-se que, para as sementes da testemunha e as com 3% de sementes verdes, em ambas as cultivares, não houve deterioração causada por umidade (Tabela 1). Foi constatado problema sério de deterioração por umidade (TZ 6-8) a partir da ocorrência de 6% de sementes verdes; esse problema tornou-se mais sério com a incidência de índices superiores a 9% de sementes verdes, nos lotes das duas cultivares em estudo.

Esses resultados são coerentes com os observados por Costa et al. (2001), que utilizaram quatro cultivares de soja e quatro níveis de sementes verdes. Os autores observaram que porcentuais de sementes verdes superiores a 10%, geralmente, poderão levar a problemas na qualidade fisiológica.





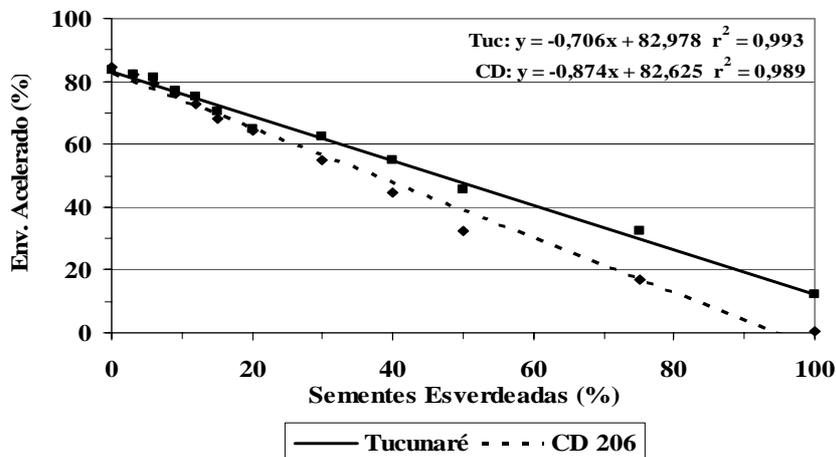
**FIGURA 2-** Viabilidade (a), vigor (b) e deterioração por umidade, nível 6-8 (c), determinados pelo teste de tetrazólio em sementes de soja, das cultivares CD 206 (CD) e FMT Tucunaré (Tuc), em função do percentual de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Verificaram também que a incidência de sementes verdes tem relação direta com os índices de deterioração por umidade, e que, à medida que ocorrem acréscimos dos níveis de sementes verdes em lotes de elevado padrão fisiológico, normalmente, observa-se redução acentuada da germinação, do vigor e da viabilidade das sementes. Resultados similares foram também obtidos por Medina et al. (1997) e por Pupim et al. (2005), que detectaram que a presença de sementes verdes afetou de modo expressivo a qualidade das sementes de soja. Zorato et al. (2003), trabalhando com a cultivar MG/BR 46 (Conquista), com 11,8% e 37,4% de sementes esverdeadas, verificaram menor germinação, menor

vigor (envelhecimento acelerado e condutividade elétrica), maior taxa de deterioração (tetrazólio) e menor peso de mil sementes.

Com relação aos danos mecânicos, detectados pelo teste de tetrazólio (Tabela 2), os mesmos não afetaram o desempenho das sementes em nenhum dos níveis percentuais de sementes verdes. Resultado semelhante foi observado por Costa et al. (2001), indicando que a ocorrência de sementes verdes encontradas em lotes de sementes poderá estar associada a condições climáticas adversas no final do processo de maturação das sementes.

Os dados referentes ao envelhecimento acelerado (Figura 3) ajustaram-se a modelos lineares. A qualidade das sementes, avaliada pelo teste de envelhecimento acelerado, foi reduzida com o aumento dos índices de sementes verdes. Os valores máximos estimados para 'CD 206' (85%) e para 'FMT Tucunaré' (84%) foram obtidos na testemunha e decresceram para 76% e 77%, respectivamente, quando as sementes apresentaram ocorrência de 9% de sementes verdes e, a partir da incidência de 15%, as reduções foram mais drásticas (Tabela 1).



**FIGURA 3-** Germinação de sementes de soja, das cultivares CD 206 (CD) e FMT Tucunaré (Tuc), submetidas ao teste de envelhecimento acelerado, em função do percentual de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

### 3.3 Teste de condutividade elétrica

Os resultados obtidos da condutividade elétrica (Figura 4) ajustaram-se a modelos lineares. Ficou evidente, pelo teste, que sementes verdes e esverdeadas, por apresentarem maiores índices de lixiviação de solutos, apresentam seus sistemas de membranas celulares desorganizados, consequência da maturação forçada e da morte prematura das plantas. A desestruturação e a perda da integridade do sistema de membranas celulares promovem alterações do metabolismo e nas exudações de eletrólitos entre as células e o meio exterior, com reflexos diretos sobre a qualidade fisiológica das sementes. Segundo França Neto et al. (2005), condições climáticas adversas, como intenso veranico durante as fases de maturação na cultura da soja, resultam na maturação forçada das sementes, acarretando baixos rendimentos e ocorrência de sementes

esverdeadas, o que resultará em acentuada redução das suas qualidades, além de severa redução na produtividade da lavoura.

A condutividade elétrica nas sementes da testemunha foi da ordem de  $81 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , enquanto que, nos níveis de 3%, 6% e 9% de ocorrência de sementes verdes, os valores de condutividade foram 87, 100 e  $104 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 2).

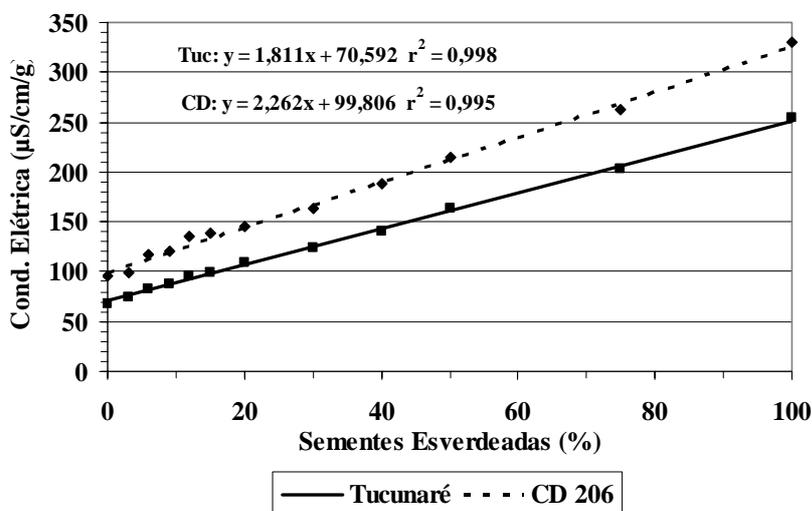
**TABELA 2** - Efeito de níveis de sementes verdes no vigor, no índice de dano mecânico, detectados pelo teste de tetrazólio, na condutividade elétrica em sementes de soja das cultivares CD 206 e FMT Tucunaré. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Sementes verdes (%)</b>	<b>Tetrazólio – Vigor (%)</b>	<b>Tetrazólio – Dano mecânico (%)</b>	<b>Condutividade elétrica (<math>\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>
<b>0</b>	82 a	5,7 a	81,3 a
<b>3</b>	74 b	5,8 a	87,0 b
<b>6</b>	71 b	5,7 a	99,8 c
<b>9</b>	68 c	5,2 a	104,3 d
<b>12</b>	66 c	6,7 a	110,5 e
<b>15</b>	60 d	6,8 a	118,5 f
<b>20</b>	59 d	6,0 a	127,7 g
<b>30</b>	50 e	4,7 a	143,5 g
<b>40</b>	49 e	4,5 a	164,7 h
<b>50</b>	38 f	5,2 a	188,8 h
<b>75</b>	21 g	4,5 a	233,0 i
<b>100</b>	4 h	5,7 a	291,8 j
C.V. (%)	6,99	29,54	1,22

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

Para sementes de soja, Paiva Agüero (1995) verificou que, sob pequenas limitações para a germinação, a condutividade não pode ser superior a  $90 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Por outro lado, Vieira (1994) relata que os padrões a serem considerados para lotes de sementes de soja de alto vigor devem ter condutividade até  $70\text{-}80 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , embora o autor afirme que são valores com forte tendência a apresentarem médio vigor.

Desse modo, lotes com incidências a partir de 6% de sementes verdes apresentam deterioração mais acentuada e, conseqüentemente, reduções na germinação, na viabilidade e no vigor das sementes. Em lentilha, Mills et al. (1999) observaram que mudanças no pH, na condutividade elétrica e na germinação estavam relacionadas a alterações na cor das sementes de lentilha, podendo ser usados como método para avaliar sua qualidade.



**FIGURA 4-** Condutividade elétrica em sementes de soja das cultivares CD 206 (CD) e FMT Tucunaré (Tuc), em função do percentual de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

### 3.4 Teores de clorofilas *a*, *b* e total

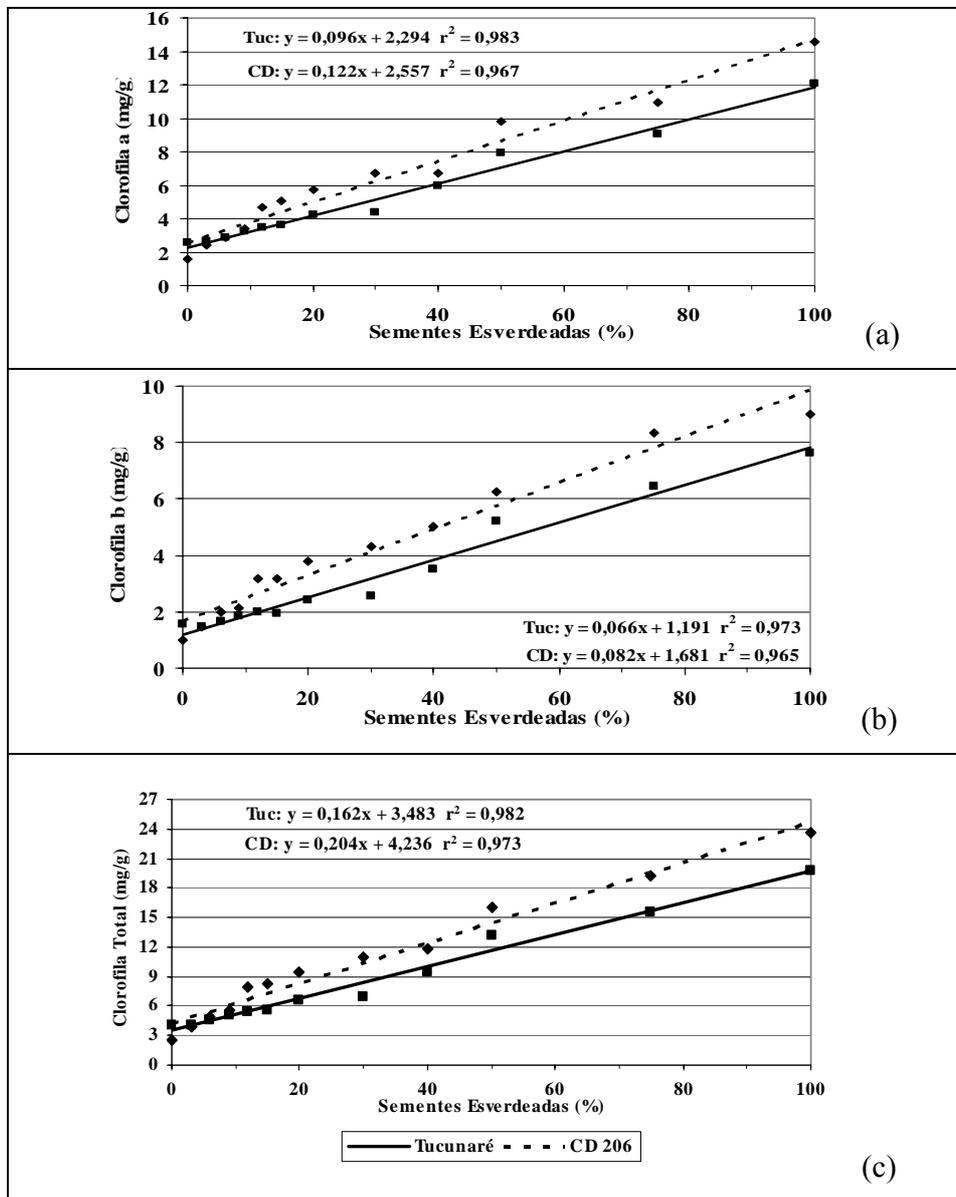
As respostas ao percentual de sementes verdes sobre os teores de clorofilas *a*, *b* e total ajustaram-se aos modelos lineares, para as duas cultivares CD 206 e FMT Tucunaré (Figura 5).

Os teores de clorofila *a* e total aumentaram com elevação do percentual de sementes verdes, apresentando valores mais acentuados a partir de 9% de ocorrência dessas sementes (Tabela 3).

Menores valores de clorofila *b* representados na Figura 5 (b), foram observados quando comparados com os de clorofila *a* (Tabela 3). De maneira similar, o conteúdo de clorofila *b* aumenta à medida que se elevam os percentuais de sementes verdes. Na ausência de sementes verdes (testemunha) e na incidência de 3%, não houve diferença significativa para o teor de clorofila *b*.

A presença de sementes verdes é resultado de condições climáticas desfavoráveis, principalmente sob clima extremamente quente e seco, durante os últimos estádios de maturação da semente, quando o processo de degradação da clorofila, que causa o desaparecimento da cor verde, é influenciado. Acredita-se que, com a morte prematura das plantas e, conseqüentemente, a maturação forçada das sementes, a atividade da enzima clorofilase cessa antes que toda a clorofila seja degradada (Bohner, 2005). Os níveis de clorofila presentes na semente são afetados igualmente pelo genótipo e pelas condições climáticas, principalmente a temperatura, no período de maturação da semente (McGregor, 1991).

Segundo Schwartz & Lorenzo (1990), a proporção de clorofila *a:b* normalmente encontrada na natureza é de, aproximadamente, 3:1 em folhas verdes. Em sementes de canola, Johnson-Flanagan & Thiagarajah (1990) encontraram uma proporção de 2,5:1, podendo haver uma diminuição da relação clorofila *a:b* de até 2:1, com o amadurecimento dos grãos de canola. Os autores relataram, ainda, que a clorofila *a* é menos estável do que a clorofila *b*.



**FIGURA 5-** Clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) e clorofila total (c) em sementes de soja das cultivares CD 206 (CD) e FMT Tucunaré (Tuc), em função do percentual de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

**TABELA 3** - Efeito de níveis de sementes verdes sobre os teores de clorofilas *a*, *b* e total em sementes de soja das cultivares CD 206 e FMT Tucunaré. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Sementes verdes (%)	Teor de clorofilas (mg.g <sup>-1</sup> )		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total
0	2,317 a	1,408 a	3,727 a
3	2,827 b	1,627 a	4,453 b
6	3,188 b	2,015 b	5,202 b
9	3,692 c	2,198 b	5,887 c
12	4,511 c	2,870 c	7,376 c
15	4,833 c	2,855 c	7,685 c
20	5,498 c	3,448 c	8,946 c
30	6,150 c	3,798 c	9,946 c
40	7,058 d	4,730 d	11,785 d
50	9,852 d	6,356 d	16,200 d
75	11,082 d	8,218 d	19,295 d
100	14,823 d	9,265 d	24,080 d
C.V. (%)	17,69	15,30	16,89

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

Sinnecker (2002), trabalhando com sementes de soja, verificou também que a clorofila *a* teve uma degradação mais acentuada do que a clorofila *b*, com redução no teor em 92% entre o início da maturação (R<sub>6</sub>) e a maturação completa, enquanto que para a clorofila *b* a redução foi de 70% nesse mesmo período. Em sementes de soja, na maturação fisiológica, esse autor observou uma relação de 1,8:1. Os resultados obtidos quanto à relação clorofila *a*:*b* desta pesquisa, em sementes de soja colhidas na maturação de colheita, foi de 1,6:1,

valores próximos daqueles descritos por Sinnecker (2002), em estudos realizados durante a maturação de sementes de soja.

Na Figura 5 (c) são apresentados os resultados do teor de clorofila total nas duas cultivares avaliadas, para os diferentes percentuais de sementes verdes. O teor de clorofila total expressa os resultados observados para as clorofilas *a* e *b*. Semelhantemente ao que ocorreu com as clorofilas *a* e *b*, verificou-se que os teores de clorofila nas duas cultivares em estudo aumentaram proporcionalmente aos percentuais de sementes esverdeadas.

De modo geral, foi ressaltado, nesta pesquisa, que o aparecimento de sementes verde e esverdeada, em lotes de sementes de soja, resultará em acentuada redução de suas qualidades e, como consequência, um desempenho comprometido para fins comerciais.

#### **4 CONCLUSÕES**

O aumento da incidência de sementes esverdeadas em lotes de soja afeta negativamente a sua qualidade e aumenta os teores de clorofilas das sementes.

Índices de até 3% de sementes esverdeadas, em lotes de sementes de soja, não causaram reduções na germinação, na viabilidade e no vigor, pelo envelhecimento acelerado, nas duas cultivares em estudo.

Níveis superiores a 9% de sementes esverdeadas comprometem a qualidade de lotes de sementes de soja para fins comerciais, por seus efeitos significativos na redução do potencial fisiológico.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 24. n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.

BOHNER, H. **Green Soybeans**. Disponível em: <[http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct\\_1102a2.htm](http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct_1102a2.htm)> Acesso em: 12 jul. 2005.

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

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; PEREIRA, J. E.; MESQUITA, C. M.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 102-107, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M. de, COSTA, O.; BRUMATTI, P. S. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da, HENNING, A. A.; SANCHES, D. P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 38).

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; THIAGARAJAH, M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, cv. Westar) embryos under optimum conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 136, n. 2, p. 180-186, May 1990.

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

MEDINA, P. F.; LAGO, A. A.; RAZERA, L. F.; MAEDA, J. A. Composição física e qualidade de lotes de sementes de soja com incidência de sementes esverdeadas. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 7, n. 1/2, p. 36, 1997. Edição dos Resumos do X Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu, 1997.

McGREGOR, D. I. Influence of environment and genotype on rapeseed/canola seed chlorophyll content. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 1, p. 107-116, 1991.

MILLS, J.T.; WOODS, S.M.; WATTS, B.M.; LAMARI, L.; WHITE, N.D.G. Comparison of techniques to measure seed color and its relationship to other quality parameters in stored lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v.27, p.1015-1021, 1999.

PAIVA AGUERO, J. A. **Correlação de condutividade elétrica e outros testes de vigor com emergência de plântulas de soja em campo**. 1995. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

PUPIM, T. L.; CARVALHO, M. L. M.; PÁDUA, G. P.; NERY, M. C.; FRANÇA NETO, J. B. Ocorrência de sementes verdes e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 15, n. 1/2/3, p. 238, 2005. Edição dos Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu, 2005.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM (2005). **R: a language and environment for statistical computing**. **Vienna: R Foundation for Statistical Computing**. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 2005.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophylls in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja**. 2002. 103 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Eds.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.).

**Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 4. 1-4. 26.

ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA NETO, J. B.  
Sementes de soja que retém clorofila e qualidade fisiológica. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 295, 2003. Edição dos Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Sementes, Gramado, 2003.

## **ANEXOS**

## ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1A</b> Análise de variância (em fatorial reduzido 2x3) dos dados obtidos nas sementes de soja, cultivar CD 206, submetidas a condições de 20% de Ug e corte total de irrigação, temperaturas elevadas, no estádio R <sub>6</sub> , em função de seu posicionamento na planta, para a variável porcentagem de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	144
<b>TABELA 2A</b> Análise de variância (em fatorial completo 4x2x3) dos dados obtidos nas sementes de soja, cultivar CD 206, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas elevadas, de acordo com o seu posicionamento na planta e com os estádios de desenvolvimento, para a variável peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	145
<b>TABELA 3A</b> Análise de variância (em fatorial completo 4x2x3) dos dados obtidos nas sementes de soja, cultivar CD 206, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas amenas, de acordo com o seu posicionamento na planta e com os estádios de desenvolvimento, para a variável peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	146

	<b>Página</b>
<b>TABELA 4A</b>	
Resultados da análise de variância das variáveis germinação, condutividade elétrica, vigor (TZ), viabilidade, dano por umidade (TZ DU 6-8) e peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	147
<b>FIGURA 1A</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (a, c, e) e normalidade dos resíduos (b, d, f) das variáveis respostas germinação (a, b), vigor (c, d) e viabilidade (e, f). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	148
<b>FIGURA 1A Continuação</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (g, i, k) e normalidade dos resíduos (h, j, l) das variáveis respostas dano por umidade – TZ 6-8 (g, h), condutividade elétrica (i, j) e peso de 100 sementes (k, l). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	149

	<b>Página</b>
<b>TABELA 5A</b> Análise de variância (em fatorial reduzido 4x2x3) dos dados obtidos nas sementes de quatro cultivares de soja, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas elevadas, e de acordo com o seu posicionamento na planta, para a variável porcentagem de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	150
<b>TABELA 6A</b> Análise de variância (em fatorial 4x3x3) dos dados obtidos nas sementes de quatro cultivares de soja, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas elevadas, e de acordo com o seu posicionamento na planta, para a variável peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	151
<b>TABELA 7A</b> Resultados da análise de variância das variáveis clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total e atividade de clorofilase (AVC). UFLA, Lavras, MG, 2006	152

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 2A</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (a, c, e) e normalidade dos resíduos (b, d, f) das variáveis respostas clorofila <i>a</i> (a, b), clorofila <i>b</i> (c, d) e clorofila total (e, f). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	153
<b>FIGURA 2A Continuação</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (g) e normalidade dos resíduos (h) da variável resposta atividade de clorofilase (g, h). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	154
<b>TABELA 8A</b>	
Resultados da análise de variância das variáveis dano mecânico (TZ 6-8), dano por umidade (TZ 6-8), vigor (TZ 1-3), viabilidade (TZ 1-5) e germinação. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	155
<b>TABELA 9A</b>	
Resultados da análise de variância das variáveis envelhecimento acelerado, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total e condutividade elétrica, UFLA, Lavras – MG, 2006.....	156

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 3A</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (a, c, e) e normalidade dos resíduos (b, d, f) das variáveis respostas dano mecânico – TZ 6-8 (a, b), dano por umidade – TZ 6-8 (c, d) e vigor (e, f). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	157
<b>FIGURA 3A Continuação</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (g, i, k) e normalidade dos resíduos (h, j, l) das variáveis respostas viabilidade (g, h), germinação (i, j) e envelhecimento acelerado (k, l). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	158
<b>FIGURA 3A Continuação</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (m, o, q) e normalidade dos resíduos (n, p, r) das variáveis respostas condutividade elétrica (m, n), clorofila <i>a</i> (o, p) e clorofila <i>b</i> (q, r). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	159
<b>FIGURA 3A Continuação</b>	
Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (s) e normalidade dos resíduos (t) da variável resposta clorofila total (s, t). UFLA, Lavras, MG, 2006.....	160

**TABELA 1A-** Análise de variância (em fatorial reduzido 2x3) dos dados obtidos nas sementes de soja, cultivar CD 206, submetidas a condições de 20% de Ug e corte total de irrigação, temperaturas elevadas, no estádio R<sub>6</sub>, em função de seu posicionamento na planta, para a variável porcentagem de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Água</b>	1	48847	48847	191,828	1,43 <sup>e-14</sup> **
<b>Terço</b>	2	754	377	1,481	0,2435 ns
<b>Água:Terço</b>	2	130	65	0,256	0,7759 ns
<b>Erro</b>	30	7639	255	-	-
<b>C.V. (%)</b>			17,68		

\*\* Teste F Significativo a 1% de probabilidade.

ns Não significativo.

**TABELA 2A-** Análise de variância (em fatorial completo 4x2x3) dos dados obtidos nas sementes de soja, cultivar CD 206, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas elevadas, de acordo com o seu posicionamento na planta e com os estádios de desenvolvimento, para a variável peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt;Fc</b>
<b>Estádio (E)</b>	1	419,72	419,72	108,953	2,2 <sup>e-16</sup> **
<b>Água (A)</b>	3	123,33	41,11	10,671	2,86 <sup>e-6</sup> **
<b>Terço (T)</b>	2	321,94	160,97	41,785	1,69 <sup>e-14</sup> **
<b>Estádio:água</b>	3	118,72	39,57	10,272	4,53 <sup>e-6</sup> **
<b>Estádio:terço</b>	2	8,90	4,45	1,155	0,319 ns
<b>Água:terço</b>	6	30,13	5,02	1,304	0,261 ns
<b>E : A : T</b>	6	27,42	4,57	1,186	0,318 ns
<b>Erro</b>	120	462,27	3,85	-	-
<b>C.V. (%)</b>			10,45		

\*\* Teste F Significativo a 1% de probabilidade.

ns Não significativo.

**TABELA 3A-** Análise de variância (em fatorial completo 4x2x3) dos dados obtidos nas sementes de soja, cultivar CD 206, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas amenas, de acordo com o seu posicionamento na planta e com os estádios de desenvolvimento, para a variável peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt;Fc</b>
<b>Estádio (E)</b>	1	96,54	96,54	31,080	1,55 <sup>e-07</sup> **
<b>Água (A)</b>	3	49,57	16,52	5,319	0,00178*
<b>Terço (T)</b>	2	280,67	140,34	45,181	2,36 <sup>e-15</sup> **
<b>Estádio:água</b>	3	21,21	7,07	2,276	0,083 ns
<b>Estádio:terço</b>	2	7,99	3,99	1,286	0,280 ns
<b>Água:terço</b>	6	14,85	2,47	0,797	0,574 ns
<b>E : A : T</b>	6	7,93	1,32	0,425	0,861 ns
<b>Erro</b>	120	372,73	3,11	-	-
<b>C.V. (%)</b>			8,64		

\*\* Teste F Significativo a 1% de probabilidade.

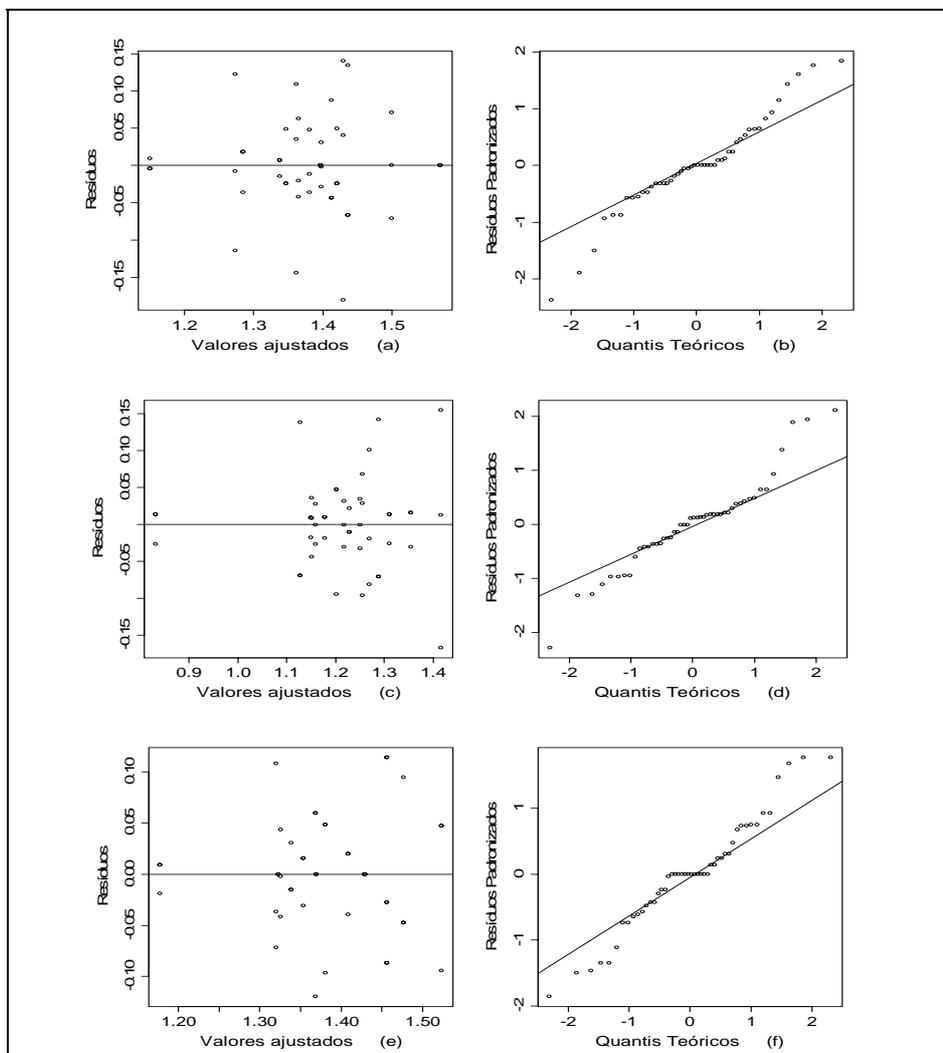
\* Significativo a 5% de probabilidade.

ns Não significativo.

**TABELA 4A-** Resultados da análise de variância das variáveis germinação, condutividade elétrica, vigor (TZ), viabilidade, dano por umidade (TZ DU 6-8) e peso de 100 sementes. UFLA. Lavras, MG, 2006.

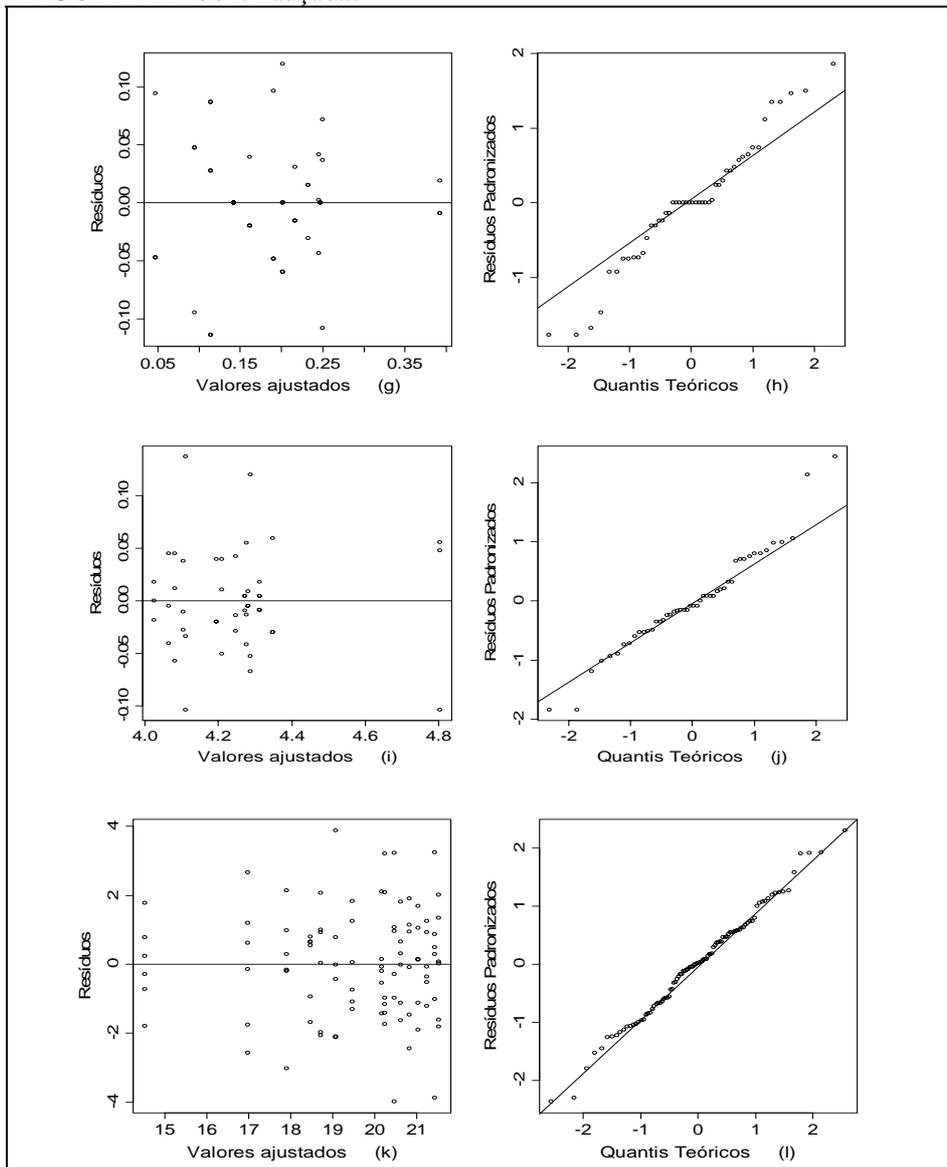
Fontes de Variação (p-valor)	Resultados	Germinação	C.E.	Vigor (TZ)	Viabilidade	TZ DU	Peso
Temperatura (T)	0,0042	<0,0000*	<0,0001*	0,0003*	0,0003*	0,0003*	0,0004*
E stádio (E)	0,2447	0,2648	0,2719	0,1513	0,1513	0,1513	<0,0001*
Água (AG)	0,0904	<0,0001*	<0,0001*	0,0016*	0,0016*	0,0016*	<0,0001*
T:E	0,0003*	<0,0001*	<0,0001*	0,0004*	0,0004*	0,0004*	0,0177*
T:AG	0,0203*	<0,0001*	0,0001*	0,0310*	0,0310*	0,0310*	0,6944
E:AG	0,0031*	<0,0001*	<0,0001*	0,1760	0,1760	0,17606	0,0042*
T:E:AG	0,0659	<0,0001*	0,0033*	0,2777	0,2777	0,2778	0,5594
Transformação	Angular	Logarítmica	Angular	Angular	Angular	Angular	Nenhuma
R <sup>2</sup> (%)	68,6960	93,5076	88,8230	69,3320	69,3320	69,3320	58,7100
C.V (%)	5,5311	1,32387	4,6351	34,209	34,209	34,209	8,6150
Shapiro-Wilk (p-valor)	0,04696	0,0825	0,2548	0,1328	0,1328	0,1328	0,8462
Levene (p-valor)	0,54060	0,7958	0,9513	0,8234	0,8234	0,8234	0,9185

\* Significativo a 5% de probabilidade.



**FIGURA 1A-** Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (a, c, e, g, i, k) e normalidade dos resíduos (b, d, f, h, j, l) das variáveis-respostas germinação (a,b), vigor (c,d), viabilidade (e,f), dano por umidade – TZ 6-8 (g,h), condutividade elétrica (i,j) e peso de 100 sementes (k,l). UFLA, Lavras, MG, 2006.

FIGURA 1A- Continuação...



**TABELA 5A-** Análise de variância (em fatorial reduzido 4x2x3) dos dados obtidos nas sementes de quatro cultivares de soja, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas elevadas, e de acordo com o seu posicionamento na planta, para a variável porcentagem de sementes verdes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt;Fc</b>
<b>Água (A)</b>	1	43660,125	43660,125	144,567	0,0000 **
<b>Terço (T)</b>	2	3577,694	1788,847	5,923	0,0030 *
<b>Cultivar (C)</b>	3	223816,250	74605,417	247,033	0,0000 **
<b>A : T</b>	2	4783,083	2391,542	7,919	0,0005 **
<b>A : C</b>	3	6430,847	2143,616	7,098	0,0001 **
<b>T : C</b>	6	21737,250	3622,875	11,996	0,0000 **
<b>A : T : C</b>	6	4556,361	759,394	2,515	0,0220 *
<b>Erro</b>	264	79729,500	302,006	-	-
<b>C.V. (%)</b>			37,53		

\*\* Teste F Significativo a 1% de probabilidade.

\* Significativo a 5% de probabilidade.

**TABELA 6A-** Análise de variância (em fatorial 4x3x3) dos dados obtidos nas sementes de quatro cultivares de soja, submetidas a diferentes condições de estresse hídrico, temperaturas elevadas, e de acordo com o seu posicionamento na planta, para a variável peso de 100 sementes. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt;Fc</b>
<b>Água (A)</b>	2	1513,902	756,951	176,038	0,0000 **
<b>Terço (T)</b>	2	414,562	207,281	48,206	0,0000 **
<b>Cultivar (C)</b>	3	1125,905	375,302	87,281	0,0000 **
<b>A : T</b>	4	66,315	16,579	3,856	0,0044 *
<b>A : C</b>	6	1044,321	174,054	40,478	0,0000 **
<b>T : C</b>	6	24,561	4,094	0,952	0,4576 ns
<b>A : T : C</b>	12	22,543	1,879	0,437	0,9482 ns
<b>Erro</b>	396	1702,772	4,300	-	-
<b>C.V. (%)</b>			13,85		

\*\* Teste F Significativo a 1% de probabilidade.

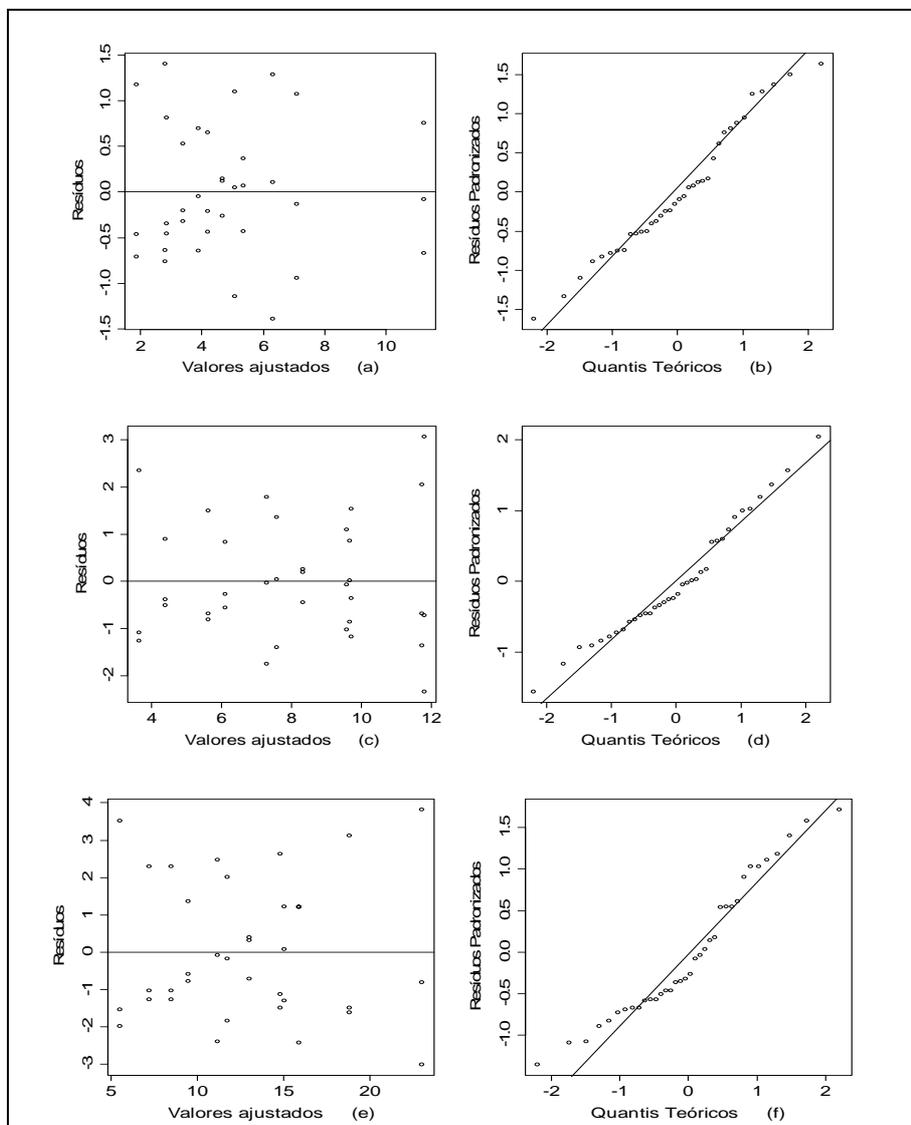
\* Significativo a 5% de probabilidade.

ns Não significativo.

**TABELA 7A-** Resultados da análise de variância das variáveis clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e atividade de cloroflase (AVC). UFLA. Lavras, MG, 2006.

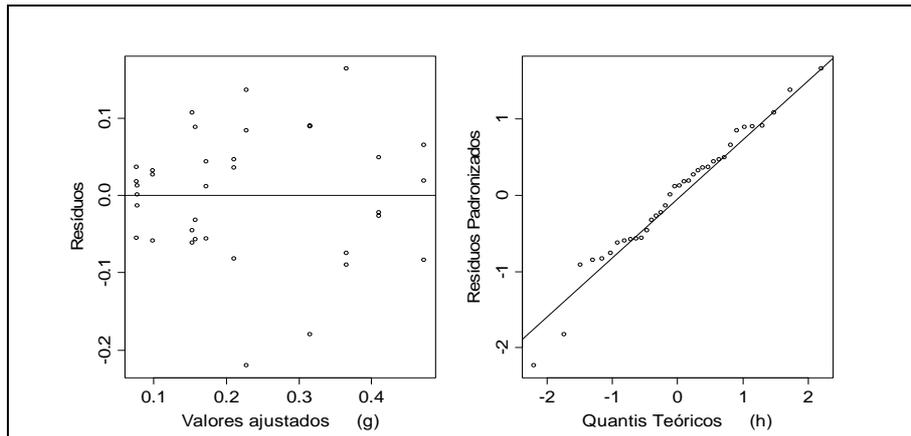
Resultados	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	AVC
Cultivar	<0,0001*	0,0080	<0,0001*	<0,0001*
Níveis de Água	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0034*
Cult:Níveis	<0,0001*	0,9828	0,5044	0,4216
<b>Fontes de Variação (p-valor)</b>				
R <sup>2</sup> (%)	92,10	81,42	87,49	71,54
C.V (%)	17,51	18,81	17,31	43,15
Shapiro-Wilk (p-valor)	0,3783	0,2822	0,0470	0,5324
Levene (p-valor)	0,9436	0,9231	0,9926	0,9479

\* Significativo a 5% de probabilidade.



**FIGURA 2A-** Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (a, c, e, g) e normalidade dos resíduos (b, d, f, h) das variáveis respostas clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e atividade de clorofilase. UFLA, Lavras, MG, 2006.

**FIGURA 2A-** Continuação...



**TABELA 8A-** Resultados da análise de variância das variáveis dano mecânico (TZ 6-8), dano por umidade (TZ 6-8), vigor (TZ 1-3), viabilidade (TZ 1-5) e germinação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Resultados	Dano mecânico	Umidade	Vigor	Viabilidade	Germinação
Cultivar (C)	<0,0001*	0,8902	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
Porcentagem (P)	0,2389	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
C : P	0,3528	<0,0001*	<0,077	0,0017 *	0,017 *
<b>Fontes de Variação (p-valor)</b>					
Transformação	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
R <sup>2</sup> (%)	83,07	99,33	98,17	99,21	99,31
C.V (%)	29,54	8,39	6,98	3,91	3,95
Shapiro-Wilk (p-valor)	0,7148	0,1436	0,6540	0,6081	0,2347
Levene (p-valor)	0,9408	0,8650	0,9804	0,9438	0,9434

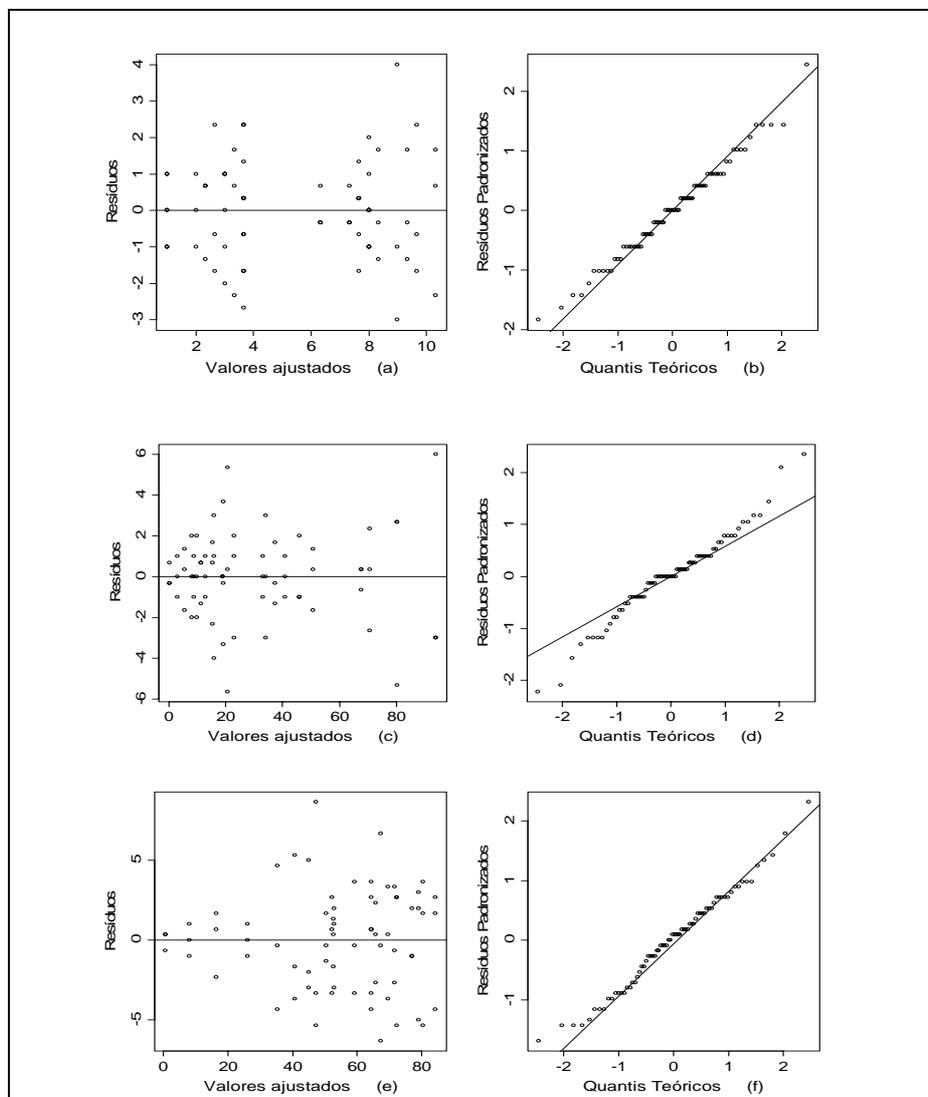
\* Significativo a 5% de probabilidade.

**TABELA 9A-** Resultados da análise de variância de variância das variáveis envelhecimento acelerado (EA), clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e condutividade elétrica (CE). UFLA, Lavras, MG, 2006.

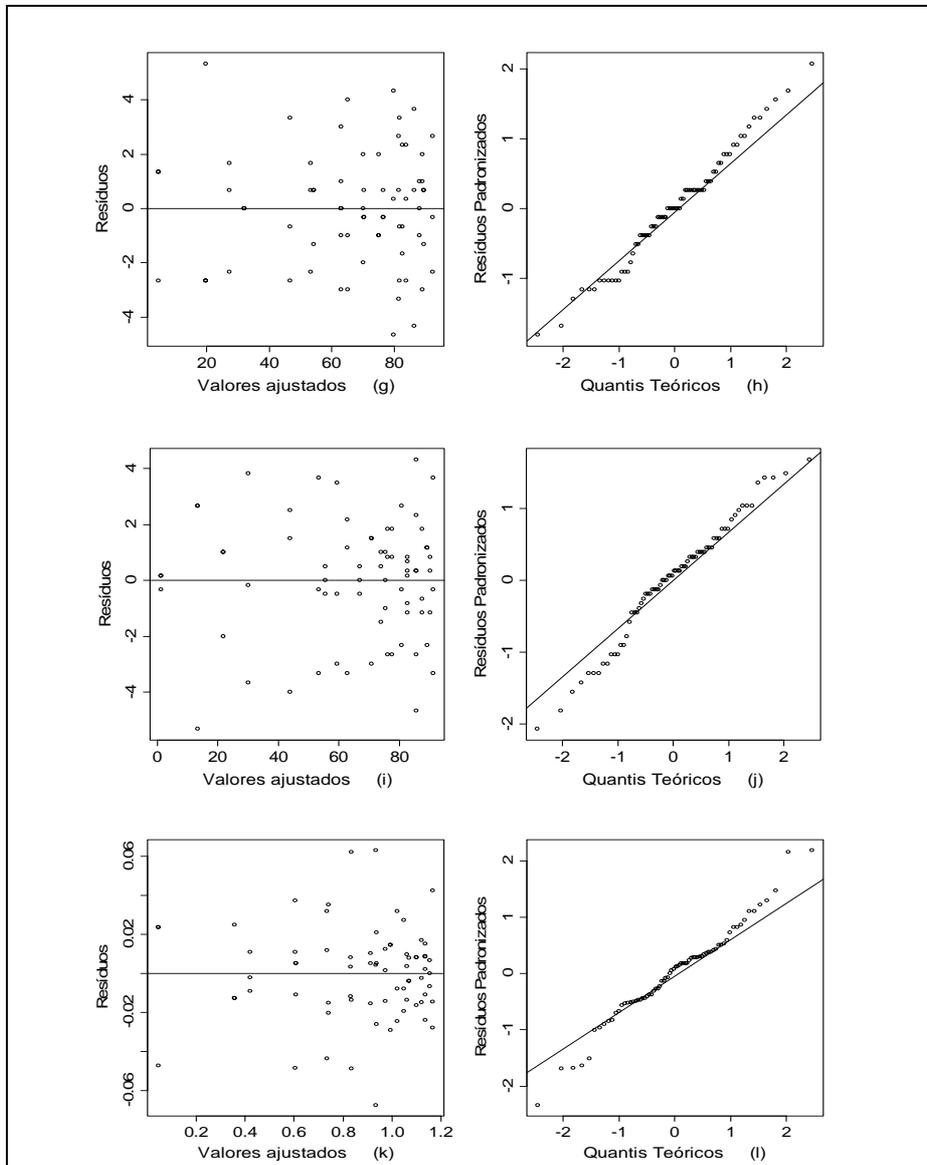
Resultados	EA	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	CE
Cultivar	<0,0001*	<0,0001*	0,3166	0,0680	<0,0001*
Porcentagem	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
Cult:Porc	<0,0001*	0,0170*	0,2072	0,05195	0,8723
<b>Fontes de Variação (p-valor)</b>					
Transformação	Angular	IRQ**	IRQ**	IRQ**	Logarítmica
R <sup>2</sup> (%)	99,30	89,07	84,83	87,89	98,59
C.V (%)	3,30	12,53	13,84	12,56	1,22
Shapiro-Wilk (p-valor)	0,6081	0,9687	0,2504	0,1366	0,2025
Levene (p-valor)	0,9438	0,9710	0,9985	0,9998	0,8726

\* Significativo a 5% de probabilidade.

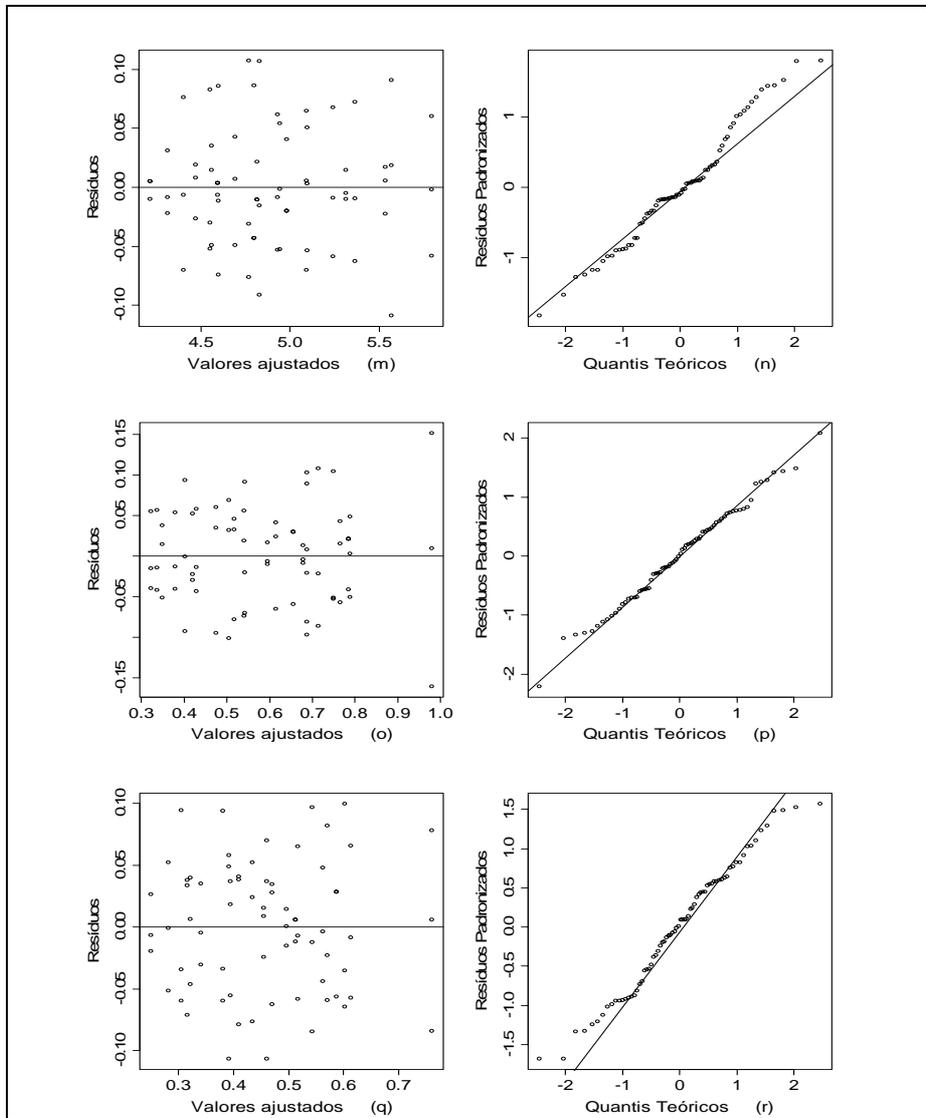
\*\*IRQ – Inverso da raiz quadrada



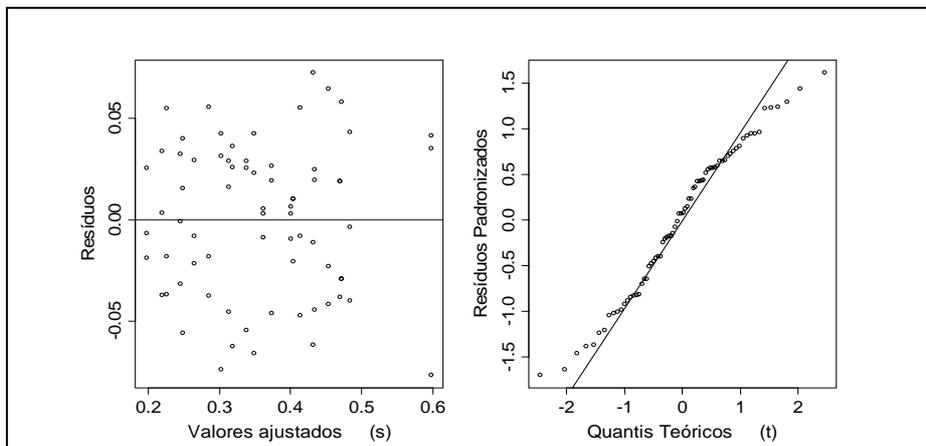
**FIGURA 3A-** Gráficos para verificação das suposições de homocedasticidade (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s) e normalidade dos resíduos (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t) das variáveis dano mecânico, dano por umidade, vigor, viabilidade, germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 3A-** Continuação...



**FIGURA 3A-** Continuação...



**FIGURA 3A-** Continuação...