

**ESTUDO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA,
BIOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURAL,
DURANTE O DESENVOLVIMENTO E A
SECAGEM DE SEMENTES DE SOJA**

PAULO DE ALBUQUERQUE SILVA

2006

PAULO DE ALBUQUERQUE SILVA

**ESTUDO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA,
BIOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURAL, DURANTE
O DESENVOLVIMENTO E A SECAGEM DE
SEMENTES 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”.

Orientador

Prof. Dr. João Almir Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

Silva, Paulo de Albuquerque

Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural, durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja / Paulo de Albuquerque Silva. –

Lavras: UFLA, 2006.

55 p. : il.

Orientador: João Almir Oliveira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Tolerância à dessecação. 2. Ultra estrutura. 3. Enzimas. 4. Proteínas termotolerantes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.3421

PAULO DE ALBUQUERQUE SILVA

**ESTUDO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
ULTRA-ESTRUTURAL, DURANTE O DESENVOLVIMENTO E A
SECAGEM DE SEMENTES 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 obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA, em 10 de outubro de 2006

Dr. Antônio Rodrigues Vieira

EPAMIG

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Dra. Solange Carvalho Barrios Roveri José

Pesquisadora CNPq

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Pesquisador CAPES

Prof. Dr. João Almir Oliveira

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2006

A minha mãe, Maria Nazaré (*In memoriam*),

OFEREÇO

A minha querida Kênia,
Aos meus irmãos, Ângela, Iara, Sandra, Givago,
Eliane e Jerônimo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

A minha mãe, pela certeza de sua presença em tudo que acontece em minha vida.

Aos meus irmãos, Ângela, Iara, Sandra, Givago, Eliane e Jerônimo, por compreenderem a distancia e pelos incentivos.

A minha querida Kênia, pela companhia, carinho, compreensão e ajuda na condução desse trabalho.

Ao Professor João Almir, pela amizade, confiança, ensinamentos e orientação.

Aos Professores do LAS, Laene, Édila, Renato e aos pesquisadores Antônio e Sttela, pelos ensinamentos e demonstração do que é trabalho em equipe.

Ao Pesquisador Edivaldo Aparecido Amaral da Silva, pelas correções na tese e revisão dos Abstracts.

À Elza, Dalva, Elenir e Andréa pela amizade e ajuda.

Aos meus grandes amigos, Lucrécio, Zezinho, Renata, André, Patrícia e Flávia, pela companhia.

Aos amigos de república, Tobias, Gustavo, João e Rooveth, pelo convívio harmonioso.

A turma do LAS, doutorandos, mestrandos, bolsistas e estagiários, pela convivência e ajuda na condução deste trabalho.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela oportunidade de crescimento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
ARTIGO 1: Qualidade fisiológica e síntese de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento e secagem de sementes de soja	1
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 MATERIAL E MÉTODOS	7
Teste de germinação	8
Teste de emergência em condições controladas	8
Teste de frio	9
Teste de condutividade elétrica	9
Análise de proteínas resistentes ao calor	10
Delineamento experimental e análise estatística	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4 CONCLUSÕES	13
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
ARTIGO 2: Estudo de alguns sistemas enzimáticos durante o desenvolvimento e secagem de sementes de soja	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
Teste de germinação	25
Teste de condutividade elétrica	26

Análise de enzimas.....	26
Delineamento experimental e análise estatística.....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4 CONCLUSÕES	32
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ARTIGO 3: Análise ultra-estrutural e fisiológica durante o desenvolvimento e secagem de sementes de soja	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	37
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAL E METODOS.....	39
Teste de Germinação.....	40
Teste de Emergência em condições controladas.....	41
Teste de frio.....	41
Teste de condutividade elétrica.....	41
Microscopia eletrônica de varredura.....	41
Delineamento experimental e análise estatística.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4 CONCLUSÕES.....	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

SILVA, P.de A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a secagem de semente de soja.** Ufla, 2006. 56p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)¹

Durante o desenvolvimento e secagem, vários mecanismos de proteção atuam na manutenção da qualidade fisiológica de sementes. Estudos de tolerância à dessecação vem sendo objeto de estudo para o entendimento dos eventos associados com a maturação de sementes ortodoxas, como a soja. Dentre os diversos mecanismos atuantes na tolerância a dessecação, a atividade de proteínas resistentes ao calor, associada com açúcares não redutores e sistemas enzimáticos neutralizadores de radicais livres têm recebido uma atenção especial no meio científico. A manutenção da integridade de membranas celulares talvez seja a principal função destes mecanismos, sendo o seu estudo indicativo da efetividade da proteção promovida por estes. Nesse trabalho foi estudada a qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e secagem de sementes de soja. Avaliou-se a qualidade fisiológica por meio de testes de germinação, emergência em condições controladas, teste de frio e condutividade elétrica. Para as avaliações bioquímicas estudou-se a atividade de proteínas resistentes ao calor, álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). As avaliações de ultra-estrutura foram feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Concluiu-se que A síntese de proteínas resistentes ao calor é induzida pela diminuição no conteúdo de água das sementes, seja naturalmente ou artificialmente, a partir de 60% de umidade. A síntese de proteínas resistentes ao calor está diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes

¹ Comitê Orientador: João Almir Oliveira – UFLA (Orientador), Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA e Stella Dellizete Veiga Franco da Rosa – EMBRAPA.

de soja. A SOD é ativa durante o desenvolvimento e a secagem de soja. A catalase só é efetiva após o ponto de maturidade fisiológica em sementes de soja. A atividade da MDH é constante durante a secagem de sementes de soja, porém, a atividade da ADH é intensificada. A semente de soja torna-se tolerante à dessecação quando possui em torno de 30% de teor de água. A secagem em sementes de soja com teor de água acima de 30%, provoca danos de membrana que diminuem a qualidade fisiológica das sementes. Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau de umidade. Os maiores valores de vigor em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 40% de grau de umidade no campo.

ABSTRACT

SILVA, P.de A. **Physiological, biochemical and ultra structural studies during the development and drying of soybean seeds.** 2006. 56p. (Thesis – Doctorate in Plant Science)²

During the development and drying, several protection mechanisms act on the maintenance of the physiological quality of the seeds. Studies on desiccation tolerance allow the understanding of the events associated with the maturation of orthodox seeds, such as soybean. Among the mechanism involved on desiccation tolerance, the activity of heat-resistant proteins associated with non-reducing sugars and enzymatic systems that neutralize free radicals have received a special attention. Thus, this work studied the physiological, biochemical and ultra-structural changes during soybean seed development and drying. Physiological quality was evaluated by means of germination tests, emergence under controlled conditions, cold test and electrical conductivity. For the biochemical studies the activity of heat-resistant proteins, the enzymes alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were evaluated. The ultra structural study was performed by means of scanning electron microscopy (SEM). The results showed that synthesis of heat-resistant proteins was induced by the decreasing water content of the seeds naturally or artificially starting from 60% of moisture content. The heat-resistant protein synthesis was directly related to the physiological quality of soybean seeds. Soybean seeds become tolerant to desiccation when the seeds possess around 30% of moisture content. The results showed that SOD was active during development and drying of soybean

² Guidance Committee: João Almir Oliveira – UFLA (Adviser), Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA and Stella Dellizete Veiga Franco da Rosa – EMBRAPA.

seeds. The activity of MDH was constant during seed drying, whereas the activity of ADH was higher. Catalase was only effective after physiological maturity of soybean seeds. Drying of seeds with moisture content above 30%, caused reduction of cellular volume, disorganization of the cell walls and decrease in physiological quality of the seeds. Higher values of germination were observed in seeds with 30% of moisture content in the field, whereas higher values of vigor were observed in seeds with 40% of moisture content in the field.

Tolerância à dessecação em sementes de soja

QUALIDADE FISIOLÓGICA E SÍNTESE DE PROTEÍNAS RESISTENTES AO CALOR DURANTE O DESENVOLVIMENTO E A SECAGEM DE SEMENTES DE SOJA

Preparado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Sementes

RESUMO

As sementes ortodoxas, como a da soja, desenvolvem vários mecanismos de proteção que permitem a diminuição no seu teor de água, sem que haja grandes perdas na sua qualidade fisiológica. As proteínas resistentes ao calor vêm sendo utilizadas como sinal do desenvolvimento de tolerância à dessecação em várias espécies, já que essas diminuem os danos provocados por perda de água. Neste trabalho foi estudado o desenvolvimento da tolerância à dessecação de sementes de soja na fase final de seu desenvolvimento. Para isso, foram colhidas sementes em diferentes estádios de desenvolvimento, que foram submetidas a diferentes tratamentos de secagem. Depois de serem submetidas aos tratamentos, as sementes foram avaliadas quanto a sua qualidade fisiológica por meio dos testes de germinação, de frio, de emergência em condições controladas e de condutividade elétrica. Para o estudo de tolerância à dessecação estudou-se a síntese de proteínas resistentes ao calor por meio de eletroforese, durante o desenvolvimento e a secagem artificial das sementes. Concluiu-se que a síntese de proteínas resistentes ao calor é induzida pela diminuição no conteúdo de água das sementes, seja naturalmente ou artificialmente, a partir de 60% de umidade. A síntese de proteínas resistentes ao calor está diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes de soja. Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau

de umidade no campo e os maiores valores de vigor em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 40% de grau de umidade no campo.

Termos para indexação: Germinação, eletroforese, tolerância à dessecação.

Desiccation tolerance in soybean seeds

PHYSIOLOGICAL QUALITY AND HEAT-RESISTANT PROTEINS SYNTHESIS DURING DEVELOPMENT AND DRYING OF SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT

Orthodox seeds, such as soybean, develop a number of protection mechanisms which allow decrease in their water content without occurring large losses in their physiological quality. The heat-resistant proteins have been used as a signal for development of desiccation tolerance in several species, since these proteins decrease the damages caused by water loss. In this work, was studied the development of desiccation-tolerance of soybean seeds in the late stage of development. Therefore, seeds at different developmental stages were collected and were submitted to different drying treatments. After that, the seeds were evaluated regarding their physiological quality by means of germination, cold test, emergence under controlled conditions and electric conductivity. Synthesis of heat-resistant proteins was studied by means of electrophoresis during development and artificial drying of seeds. The results showed that synthesis of heat-resistant proteins was induced when the water contents of seeds decreased naturally or artificially, from 60% of water content. The synthesis of heat-resistant proteins is directly related with the physiological quality of soybean seeds. The seeds with 30% of moisture content showed higher germination percentage, whereas higher values of vigor was observed when seeds had 40% of moisture content

Index terms: Germination, electrophoresis, desiccation-tolerance,

1 INTRODUÇÃO

A soja, nos últimos 10 anos, tornou-se a maior geradora de divisas do agronegócio brasileiro, ocupando uma área de 21,24 milhões de hectares e com produção, em 2005/2006, de, aproximadamente, 51 milhões de toneladas de grãos. Novas aplicações, como a produção de biodiesel e H-bio, são sinais claros da necessidade presente do aumento da produção desse grão. Todo complexo agroindustrial da soja movimenta, no Brasil, mais 30 bilhões de dólares (IBGE, 2006).

A produção brasileira de sementes de soja, na safra 2005/2006, foi de, aproximadamente, 1 milhão de toneladas. A demanda por sementes de qualidade deve sofrer um incremento nos próximos anos, já que será necessária uma grande expansão da área plantada para suprir a demanda de empresas do setor energético, como a Petrobrás.

O estudo da ativação de mecanismos de tolerância à dessecação tem sido usado como ferramenta para o conhecimento do desenvolvimento da semente, seja para a antecipação da colheita, como já é feito no milho, ou a aplicação de dessecantes, como é proposto para a soja.

Durante o desenvolvimento, as sementes passam pela fase de histodiferenciação, em que há um aumento na massa fresca e na deposição de reserva, acompanhado por um rápido aumento na massa seca durante a maturação. O acúmulo de massa seca cessa e o de massa fresca diminui, a partir do ponto de maturidade fisiológica. Após a histodiferenciação e antes da secagem na maturação, as sementes adquirem a habilidade para germinar e tolerar a dessecação. Em sementes em desenvolvimento, a concentração de ABA diminui próximo ao final do desenvolvimento, enquanto a tolerância à dessecação é aumentada (Pammanter et al., 1994)

Em soja, as fases de desenvolvimento são divididas em estágio vegetativo (V1, V2... Vn) e estágio reprodutivo (R1, R2, R3,..., R8) (Fehr &

Caviness, 1979). No estágio reprodutivo, o R7 marca o ponto de maturidade fisiológica, que é caracterizado pelo máximo acúmulo de matéria seca na semente, com teor de água variando de 50% a 60% (Howell et al., 1959). Nesse estágio a semente se desliga da planta-mãe. Cessando o aporte de nutrientes, inicia-se um processo lento de perda de água, até atingir o estágio R8, com cerca de 13% de água. Na transição do estágio R7 ao R8, o metabolismo de mecanismos de tolerância à dessecação é intensificado e a semente passa a tolerar altas temperaturas de secagem (Oliver & Bewley, 1997)

A grande dificuldade em trabalhos comparativos de taxas de secagem é o conceito de conteúdo crítico de água, abaixo do qual a viabilidade é perdida. Na maioria das espécies estudadas o tempo gasto para a perda de água, bem como a temperatura de secagem são ignorados e estes são, provavelmente, os fatores mais importantes para o desenvolvimento de mecanismos de tolerância à dessecação (Pammenter & Berjak, 1999)

A taxa de secagem influencia a resposta à desidratação de sementes ortodoxas em desenvolvimento e tecidos vegetativos. Em ambos os casos, a secagem lenta promove uma melhor tolerância à desidratação, presumivelmente, devido ao tempo suficiente, que é concedido para a indução e a operação dos mecanismos de proteção. Oliver & Bewley (1997) sugeriram que a secagem rápida impede os processos de recuperação e é necessário mais tempo para os reparos na reidratação. Com o objetivo de estudar os danos causados por secagem, armazenamento ou mesmo estudo do desenvolvimento de sementes, muitos pesquisadores vêm utilizando técnicas moleculares, a fim de obter entendimento sobre atividades enzimáticas e protéicas na proteção da semente.

A eletroforese é uma técnica bastante difundida nos estudos bioquímicos, devido a sua simplicidade, rapidez e alto valor informativo. Segundo Alfenas et al. (1998), esta técnica baseia-se na separação de macromoléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas, formas e pesos

moleculares, por meio da migração em um meio suporte e tampões adequados, sob a influência de um campo elétrico. Dentre as moléculas estudadas por esta técnica, destacam-se as proteínas tolerantes ao calor, como as LEAs, por apresentarem papel importante na tolerância à dessecação em sementes ortodoxas.

Segundo Kermode (1997), a regulação da expressão dos genes LEA, provavelmente, envolve componentes de outras vias de tradução de sinais, além do ABA. Proteínas LEA são tipicamente acumuladas durante as fases finais da embriogênese ou em resposta a desidratação, baixa temperatura, salinidade ou tratamento exógeno de ABA, indicando a sua função na desidratação celular. São distribuídas amplamente entre as mono e dicotiledôneas e muitas e diferentes formas moleculares foram isoladas.

Proteínas LEA são caracterizadas por uma composição parcial de aminoácido altamente hidrofílica solúvel em água e por sua elevada estabilidade a altas temperaturas. Foi proposto que estas proteínas possuem papel de proteção das estruturas citoplasmáticas durante a desidratação. Elas foram divididas em grupos com base em suas propriedades bioquímicas e nas semelhanças de função (Ingram & Bartels 1996). As proteínas LEA do grupo 2, também chamadas dehidrinas, são as mais estudadas, sendo encontradas associadas com algumas moléculas. Devido a sua natureza anfipática, estas inibem a desnaturação de um grande número de macromoléculas e estabilizam estruturas intracelulares sob estresse hídrico severo. De acordo com Walters et al. (1997), essas proteínas podem ainda associarem-se com açúcares, tamponando a perda de água durante a secagem na maturação.

A habilidade ou a falta de algum fator para expressar LEAs ou proteínas semelhantes a dehidrinas por si só não pode ser tomadas como indicativos de que a semente de uma espécie em particular possa ou não resistir à desidratação. Ou seja, a tolerância à dessecação é o resultado de uma interação de mais de um

mecanismo ou processo, embora a variável expressão das dehidrinas em sementes recalcitrantes possa estimar alguma extensão da variável grau de tolerância a dessecação, exibida sob um grau de circunstâncias particulares (Pammenter & Berjak, 1999).

Dessa forma, no presente trabalho, foi estudada a presença de proteínas resistentes ao calor como mecanismo de tolerância à dessecação, bem como a qualidade fisiológica de sementes de soja durante seu desenvolvimento e secagem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) e na área experimental do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG.

O experimento de campo foi conduzido na safra 2005/2006. Após análise de solo, foram feitas correções de fertilidade e pH, segundo recomendações da Embrapa para Minas Gerais. **Solo e adubação:** o tipo de solo predominante era Latossolo Vermelho Escuro. As características químicas e físicas foram determinadas pelo Laboratório de Análise de Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. Com base nos resultados obtidos, foram feitas correções de fertilidade e pH para uma produtividade estimada de 2500 kg/ha. **Cultivar:** foi utilizada a Cultivar MG/BR 46 (Conquista) recomendada para o estado de Minas Gerais. **Instalação e condução do experimento:** em solo preparado de maneira convencional, as parcelas foram instaladas com espaçamento de 0.45 m entre linha e 15 plantas por metro linear. Cada parcela constituía-se de 20 linhas de 10 metros totalizando 9 m², sendo as 18 linhas centrais de cada parcela consideradas úteis. Controles de plantas invasoras, de pragas e doenças foram feitas sempre que necessários. **Colheita de sementes:** o desenvolvimento de

mecanismos de tolerância à dessecação foi avaliado, utilizando-se sementes em diferentes estágios fenológicos. Utilizou-se a escala de Caviness (Fehr & Caviness, 1979) como critério para colheita e caracterização das vagens colhidas, sendo a primeira colheita feita quando as sementes estavam no estágio R6, que caracteriza-se por vagens com sementes verdes, porém, totalmente formadas. A partir do R6, foram feitas colheitas a cada cinco dias, até que estas atingissem cerca de 12% de conteúdo de água no campo. As vagens colhidas foram debulhadas manualmente e as sementes levadas a secadores de pequena escala, construídos de acordo com Navratil & Burris (1982). Foram utilizadas temperaturas constantes de 35°C e 45°C, até que as sementes atingissem 12% de grau de umidade e uma alternada iniciando com 35°C, até que as sementes alcançassem um conteúdo médio de água de 20%, quando, então, a temperatura foi elevada para 45°C, até as sementes alcançarem conteúdo de água em torno de 12%. No momento da colheita e após as sementes atingirem 20% e 12% de grau de umidade, foram retiradas amostras de sementes para serem avaliadas quanto ao conteúdo de água, qualidade fisiológica e desenvolvimento de tolerância à dessecação por meio da avaliação de proteínas resistentes ao calor.

Determinação do grau de umidade: o grau de umidade inicial foi mensurado utilizando-se o método da estufa a 130°C, por 2 horas, com duas repetições para cada avaliação, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Teste de germinação: foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, por tratamento, em rolos de papel tipo “Germitest” à temperatura de 25°C. A quantidade de água adicionada foi de 2,5 vezes o peso do papel, visando umedecimento adequado e uniformização do teste. As contagens foram feitas no 4º e 7º dias após a semeadura.

Teste de emergência em condições controladas: a semeadura foi realizada em bandejas plásticas contendo, como substrato, solo + areia, na proporção 1:2. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Após a semeadura,

as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal, à temperatura de 25°C, em regime alternado de luz e escuro (12 horas). Foi considerada a porcentagem de plântulas normais aos 14 dias. **Condutividade elétrica:** foi utilizada a quantificação em massa, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos plásticos descartáveis com 75mL de água deionizada. Após 24 horas de embebição à temperatura de 25°C, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro com resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$, de acordo com o método descrito por Krzyzanowski et al. (1999). **Teste de frio:** foram utilizadas caixas plásticas com uma mistura de areia e terra (2:1), com quatro repetições de 50 sementes cada. Uma quantidade de 4.000g da mistura areia e solo, juntamente com adição da quantidade de água calculada para 70% da capacidade de retenção, foi colocada em cada caixa. Em seguida, essas caixas foram colocadas em câmara previamente regulada a 10°C, onde permaneceram por cinco dias. Após esse período, as caixas foram transferidas para uma câmara de germinação à temperatura de 25°C por sete dias para a emergência das plântulas. A avaliação foi realizada considerando somente as plântulas normais emergidas (Krzyzanowski et al., 1999). **Análises de proteínas resistentes ao calor:** foram utilizadas duas repetições de 11 eixos embrionários de sementes colhidas em cada período. Os eixos embrionários foram moídos em cadinho (sob gelo), adicionando-se tampão de extração descrito por Alfenas (1998), na proporção de 10 partes de tampão para 1 de amostra. As amostras foram centrifugadas a 16.000xg por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado e incubado em banho-maria a 85°C, por 10 minutos. Em seguida repetiu-se a centrifugação como descrito anteriormente, recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se à corrida eletroforética descrita por Alfenas (1998). A coloração dos géis foi feita utilizando-se solução de Coomassie Blue 0,05% por 12 horas e solução de ácido cítrico para descoloração. **Delineamento**

experimental e análise estatística: utilizou-se delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições arranjados em esquema fatorial (6x3x3), em que foram avaliadas 6 épocas de colheitas (65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 22% de teor de água nas sementes), 3 temperaturas de secagem (35, 45 e 35/45 °C), três tratamentos de secagem (sem secagem, secagem até 20% de teor de água, secagem até 12% teor de água). Para as variáveis germinação, emergência em condições controladas, condutividade elétrica e teste de frio foram realizados estudos de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância, observou-se diferença significativa para a interação estágio de desenvolvimento e tratamento de secagem, para todas as variáveis analisadas, não sendo observada diferença significativa entre as temperaturas de secagem (Tabela 1).

A germinação foi crescente, durante os três tratamentos de secagem de secagem, na medida que a umidade de colheita das sementes foi diminuindo. Os mecanismos responsáveis pela tolerância à dessecação parecem não estar presentes ou ativos nas sementes com 65% de teor de água, levando-as a perder totalmente sua viabilidade após secagem. As bandas de proteínas LEA neste estágio são, em sua maioria, ausentes (Figura 2 A), comparando-se com o padrão de bandas no estágio tolerante à dessecação, que foi a partir de 30% de umidade (Figura 2 E). Green et al., citados por Marcos Filho (1979), relataram prejuízos na germinação e vigor de sementes de soja colhidas precocemente.

A partir de 60% de grau umidade, já pôde ser observado o surgimento de bandas no final da secagem (Figura 2 B), fato que poderia explicar a manutenção da germinação de uma pequena porcentagem de sementes, ainda que insipiente (Figura 1). O surgimento destas bandas mostra que a secagem também induz à síntese desta proteína. A indução do surgimento de LEA durante a secagem

também foi observada por Herter & Burris (1989) e Faria (2003), em sementes de milho com alto conteúdo de água. Veiga (2005) observou o surgimento de novas bandas quando as sementes de soja com 50% de grau de umidade foram submetidas à secagem.

Com 50 % de grau de umidade, foi possível submeter as sementes a uma secagem até 20% de teor de água, sem causar prejuízo para a germinação (Figura 1). Segundo Kermode et al. (1989), o sinal indicativo da mudança de estágio de desenvolvimento para germinação é a redução no teor de água nas sementes. Nesse estágio e nos estádios posteriores, foi observada uma nova banda robusta de proteína resistente ao calor (Figura 2 C) e, ao contrario das bandas observadas nos estádios nos quais as sementes possuíam 65% e 60% de grau de umidade (Figura 2 A e B), estas são presentes antes da secagem, o que permitiu inferir a indução desta proteína antes da maturação da semente. Blackman et al. (1995), estudando o desenvolvimento de tolerância à dessecação em soja e Faria et al. (2004), em milho, encontraram resultados semelhantes, concluindo que as LEAs são induzidas pelo desenvolvimento e, artificialmente, por secagem.

A indução da germinação pela secagem foi efetivamente promovida quando as sementes apresentavam em torno de 40% de grau de umidade (Figura 1), suportando, a partir de então, secagem até 12% de teor de água. Nesse estágio, o valor médio de germinação das sementes submetidas à secagem tornou-se superior ao das sementes sem secagem. O padrão das bandas (Figura 2 D) após a secagem tornou-se semelhante ao padrão encontrado em sementes nos estádios finais de desenvolvimento (Figura 2 E e F), demonstrando, assim, que este mecanismo de proteção já se encontrava totalmente ativo. Sun & Leopold (1993), trabalhando com a cultivar Chippewa 64, consideram que os eixos embrionários de sementes de soja atingem o ponto de maturidade aos 48

dias após o florescimento, quando estes possuem em torno de 38% de grau de umidade.

Com 30% de teor de água, a proteção promovida pela proteína resistente ao calor já estava presente antes mesmo da secagem (Figura 2 E). Foram observados, nesse estágio, os maiores valores de germinação e vigor (Figura 1) quando comparados aos observados em sementes nos estádios anteriores. Zanakis et al. (1994) testando três cultivares de soja, obteve resultados semelhantes, porém, os autores relataram que estas possuíam menor longevidade do que sementes colhidas com 15% de teor de água.

O comportamento das curvas das equações de regressão para o teste de emergência em condições controladas e teste de frio foi semelhante aos da germinação (Figura 1). Observou-se, porém, que, nas sementes sem secagem, o estresse causado nos testes induziram a ativação de genes ligados à germinação, fazendo com que os valores de emergência em condições controladas e no teste de frio aumentassem significativamente, quando comparados com o teste de germinação. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Veiga (2005).

De acordo com Howell et al. (1959), as sementes de soja atingem seu ponto de maturidade fisiológica quando possuem entre 50% a 60% de umidade, valores que diferem do encontrado nesta pesquisa que foi de, aproximadamente, 40% de teor de água (Figura 1). Porém, por não possuir os mecanismos de proteção totalmente desenvolvido nesse estágio, a secagem provocou decréscimo no vigor das sementes. O vigor das sementes foi crescente nos três tratamentos de secagem e, assim como no teste de germinação, os valores de maior vigor foram alcançados em sementes secadas quando apresentavam em torno de 30% de teor de água, não diferindo das sementes com 20% (Figura 1).

Por meio das curvas das equações de regressão para o teste de condutividade elétrica, foi observado o efeito danoso da secagem, quando as

sementes possuíam alto teor de água (Figura 1). A secagem provocou um aumento significativo nos valores de condutividade, podendo este estar relacionado com danos de membrana celular. Segundo Pammenter & Berjak (1999), o dano mecânico associado com a redução do volume celular durante o processo de secagem é o mais importante dano em tecidos muito hidratados. Com o avanço do processo de maturação ocorre a organização estrutural dos sistemas de membranas, diminuindo substancialmente os valores de condutividade. Quando as sementes atingiram teor de água de 30%, os danos de secagem já não foram observados, podendo essa ausência ser relacionada com o desenvolvimento dos mecanismos de tolerância à dessecação como a LEA (Figura 2 E). Comportamento semelhante foi observado em milho (Faria et al., 2004; Powell, 1986) e soja (Veiga, 2005).

Segundo Bray (1993) e Dure(1993) as LEAs podem ligar íons e água, minimizando os danos de secagem. Blackman et al. (1991) verificaram que, à medida que proteínas LEA se acumulavam nas sementes de soja, menores eram os valores de lixiviação de solutos após secagem.

4 CONCLUSÕES

A síntese de proteínas resistentes ao calor é induzida pela diminuição no conteúdo de água das sementes, seja naturalmente ou artificialmente, a partir de 60% de umidade.

A síntese de proteínas resistentes ao calor está diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes de soja.

Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau de umidade no campo.

Os maiores valores de vigor em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 40% de grau de umidade no campo.

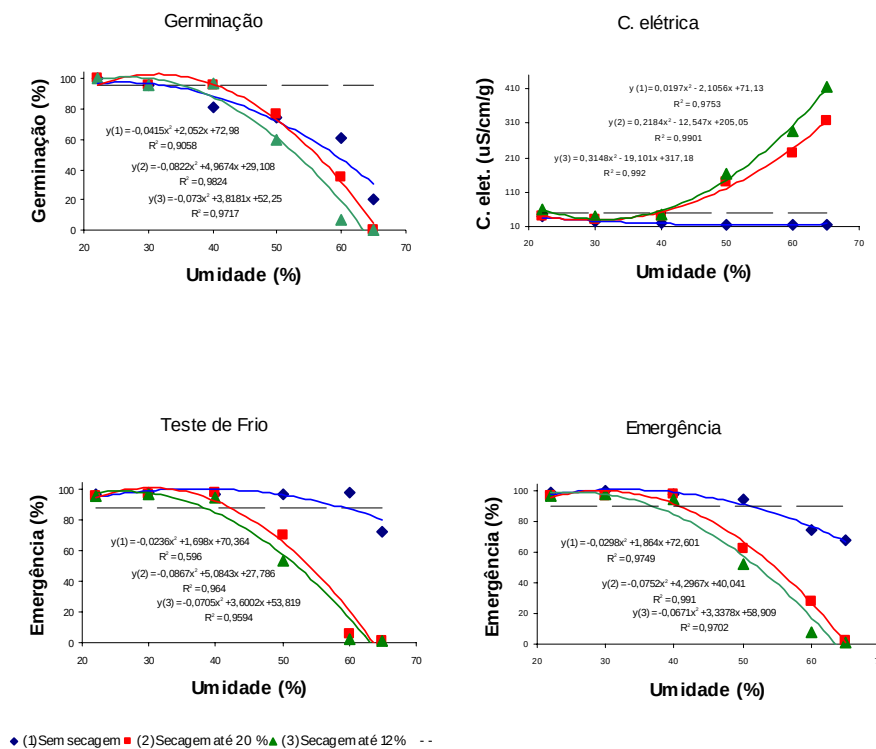


FIGURA 1. Representação gráfica das equações de regressão para os resultados dos testes de germinação (%), emergência em condições controladas (%), condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) e teste de frio (%), em função da secagem de sementes de soja cultivar MG/BR 46 (Conquista) colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento. A linha tracejada representa os valores médios de sementes de soja colhidas convencionalmente no campo, com teor de água de 12%. UFLA, Lavras, MG, 2006.

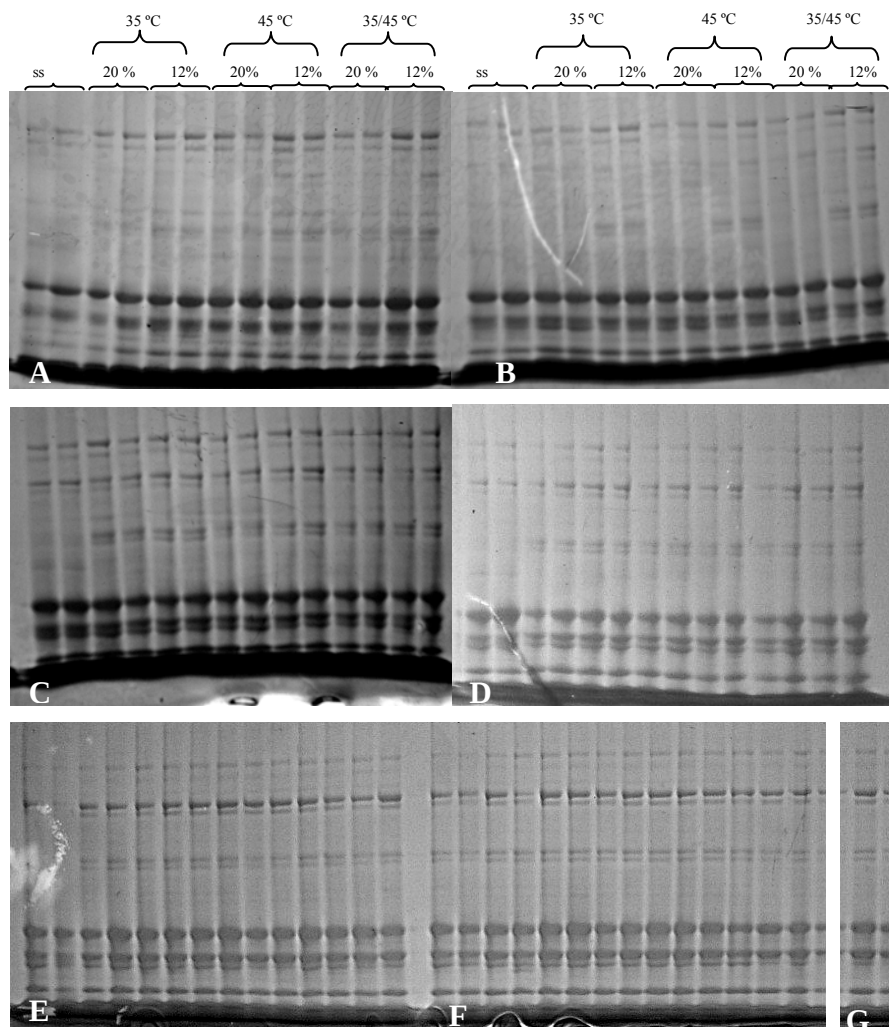


FIGURA 2. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de soja MG/BR 46 (Conquista) colhidas com diferentes teores de água (A- 65%; B-60%; C-50%; D- 40%, E- 30%; F- 20% e G- 12%(sc)), submetidas a três temperaturas de secagem (35°C, 45°C e 35-45°C) e avaliadas em três momentos (sem secagem - ss, secagem até 20% de umidade e secagem até 12% de umidade). UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 1. Resumo da análise de variância dos resultados das avaliações para qualidade fisiológica de sementes de soja cultivar BR46 (Conquista) colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, submetidas a diferentes temperaturas e tratamentos de secagem. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de Variação	G. L.	Quadrados médios			
		Germinação	Emergência	Teste de Frio	C. elétrica
Estádios (A)	5	51151,34**	39195,71**	37931,51**	289271,2824**
Tratamento de secagem (B)	2	2404,75**	18750,5**	28163,98**	416939,6713**
Temperatura de secagem (C.)	2	72,91 ns	16,56 ns	9,06 ns	1133,5046 ns
A X B	10	2066,46**	3963,34**	6994,09**	84191,0824**
A X C	10	119,55 ns	34,58 ns	52,34 ns	424,5824 ns
B X C	4	20,99 ns	13,09 ns	13,59 ns	874,8796 ns
AXBXC	20	40,79 ns	18,05 ns	5,93 ns	427,674 ns
Bloco	3	320,35 ns	178,97 ns	86,76 ns	861,7207 ns
Resíduo	159	48,52	27,87	40,93	7681137
C V (%)		10,46	7,51	9,06	22,58

** significativo, a 1% de probabilidade

ns não houve diferença significativa entre os tratamentos

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seed: the role of stress protein. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, n. 4, p.630-638, Apr. 1995.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n.3, p. 868-874, July 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de semente**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 1992. 365 p.

BRAY, E. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.

DURE, L. III. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 3, p.363-369, Mar. 1993.

FARIA, M. A. V. R. **Maturação de sementes de milho**: aspectos físicos bioquímicos e fisiológicos. 2003. 129 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FARIA, M. A. V. R.; VON PINHO, R. G.; VON PINHO, E. V. R.; GUIMARÃES, R. M.; FREITAS, F. E. O. Germinabilidade e tolerância a dessecação e sementes de milho e diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 276-289, 2004.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybeans development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p.

HERTER, U.; BURRIS, J. S. Changes in moisture, temperature and quality during high-temperature drying. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.69, n.3, p. 749-761, July 1989.

HOWELL, R. W.; COLLINS, F. I.; SEDGEWICK, V. E. Respiration of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v. 51, n. 11, p. 677-679, Nov. 1959.

INGRAM, I.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n. 1, p.75-95, Mar. 1997.

KERMODE, A. R.; BEWLWY, J. D. Development seeds of *Ricinus communis* L. when detached and maintained in a atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 3, p. 702-707, 1989.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

MARCOS FILHO, J. **Qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L) Merrel)**. 1979. 180 p. Tese (Livro Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 159-161, Jan./Feb. 1982.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 171-213, 1997.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Mar. 1999.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; SMITH, M. T.; ROSS, G. Why do stored, hydrated recalcitrant seeds die ? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 187-191, Mar. 1994.

POWELL, A. A. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v. 10, n. 2, p. 81-100, 1986.

SUN, W. Q. A.; LEOPOLD, A. C. Acquisition of desiccation tolerance in soybeans. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, n. 3, p. 403-409, Mar. 1993.

VEIGA, A. D. **Tolerância de sementes de soja à dessecação**. Lavras: UFLA, 2005. 36 p. Monografia (Graduação em Agronomia).

WALTERS, C.; RIED, J. L. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, n. 2, p.125-134, June 1997.

ZANAKIS, G. N.; ELLIS, R. H.; SUMMERFIELD, R. J. Seed quality in relation to seed development and maturation in three genotypes of soybean ((*Glycine max* (L.) Merrill)). **Experimental Agriculture**, Londres, v. 30, n. 2, p. 139-156, Apr. 1994.

Estudo de algumas enzimas durante o desenvolvimento e secagem de sementes de soja

Preparado de acordo com as normas da Revista Ciência e Agrotecnologia

RESUMO

Durante o desenvolvimento e secagem, várias enzimas atuam na manutenção da qualidade fisiológica de sementes. Dentre essas se destacam as que estão envolvidas nos processos respiratórios, como a malato desidrogenase (MDH) e a álcool desidrogenase (ADH) e as removedoras de radicais livres, como a superóxido desmutase (SOD) e a catalase (CAT), que são capazes de realizar a desintoxicação de O_2^- e H_2O_2 . Neste trabalho foi estudada a atividade de enzimas envolvidas na respiração e enzimas protetoras, durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja. Para isso, foram colhidas sementes em diferentes estádios de desenvolvimento, que foram submetidas a diferentes temperaturas e tratamentos de secagem. Foram feitas avaliações quanto à qualidade fisiológica das sementes, por meio dos testes de germinação e de condutividade elétrica. As enzimas SOD, CAT, MDH e ADH foram estudadas por meio de eletroforese. Concluiu-se que a SOD é ativa durante o desenvolvimento e a secagem de soja. A catalase só é efetiva após o ponto de maturidade fisiológica em sementes de soja. A atividade da MDH é constante durante a secagem, porém, a atividade da ADH é intensificada. Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau de umidade. A secagem, em sementes com menos de 40% de grau de umidade, não provoca aumento nos valores de condutividade elétrica.

Termos para indexação: superóxido dismutase, catalase, malato desidrogenase, álcool desidrogenase

Study of enzymes during development and drying of soybean seeds

ABSTRACT

During the development and drying, several enzymes act on the maintenance of the physiological quality of seeds. Among the enzymes there are those involved with the respiratory mechanisms, such as malate dehydrogenase (MDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) and scavengers of free radicals such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), which are capable of performing the detoxification of O₂⁻ and H₂O₂. In this work, the enzyme activity during development and drying of soybean seeds were studied. Therefore, soybean seeds at different developmental stages were collected and submitted to different temperatures and methods of drying. Evaluations of the physiological quality of seeds were performed by means of germination and electric conductivity tests. The enzymes SOD, CAT, MDH and ADH were that SOD is active during development and drying of soybean seeds. The activity of MDH was constant during seed drying, whereas the activity of ADH was higher. Catalase is only effective after physiological maturity in soybean seeds. Higher values of germination were observed when seeds reached 30% of moisture content. Drying of seeds with 40% of moisture content did not show increase in values of conductivity.

Index terms: superoxide dismutase, catalase, malate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase.

1 INTRODUÇÃO

A soja, nos últimos 10 anos, tornou-se a maior geradora de divisas do agronegócio brasileiro. A cultura ocupa uma área de 21,24 milhões de hectares, com produção em 2005/2006 de, aproximadamente, 51 milhões de toneladas de grãos. A demanda por semente, na safra 2005/2006, foi de cerca de um milhão de toneladas. Todo o complexo agroindustrial da soja movimenta, no Brasil, mais de 30 bilhões de dólares (IBGE, 2006).

Além do desafio de produzir sementes de qualidade para atender à demanda crescente, as unidades de beneficiamento ainda têm que solucionar o problema de concentração de produção e operação das usinas. A utilização de dessecantes para a antecipação de colheita é uma técnica que tem sido adotada por diversos produtores, porém, o estágio do desenvolvimento para aplicação, não está claro, sendo observadas recomendações divergentes.

Durante o desenvolvimento, as sementes passam pela fase de histodiferenciação, e que há um aumento na massa fresca e deposição de reserva, acompanhados por um rápido aumento na massa seca durante a maturação. O acúmulo de massa seca cessa e o de massa fresca diminui, quando as sementes atingem o ponto de maturidade fisiológica. Após a histodiferenciação e antes da secagem na maturação, as sementes adquirem a habilidade para germinar e tolerar a dessecação. Em sementes em desenvolvimento, a concentração de ABA diminui próximo ao final do desenvolvimento, enquanto a tolerância à dessecação é aumentada (Pammanter et al., 1994).

Em soja as fases de desenvolvimento são divididas em estágio vegetativo (V1, V2... Vn) e estágio reprodutivo (R1, R2, R3,..., R8) (Fehr & Caviness, 1979). No estágio reprodutivo, o R7 marca o ponto de maturidade fisiológica, que é caracterizado pelo máximo acúmulo de matéria seca na semente e com teor de água variando de 50% a 60% (Howell et al., 1959). Na transição do estágio R7 ao R8, o metabolismo de mecanismos de tolerância à

dessecação é intensificado e a semente passa a tolerar altas temperaturas de secagem (Oliver & Bewley, 1997).

A secagem lenta promove melhor tolerância à desidratação, presumivelmente, devido ao tempo suficiente que é concedido para a indução e a operação dos mecanismos de proteção. Oliver & Bewley (1997) sugeriram que a secagem rápida impede os processos de recuperação e é necessário mais tempo para os reparos na reidratação. Para o estudo de mecanismos de proteção em sementes, várias técnicas têm sido utilizadas, destacando-se estudos eletroforéticos de isoenzimas e proteínas e quantificação de açúcares por meio de HPLC.

A eletroforese é uma técnica bastante difundida nos estudos bioquímicos, devido a sua simplicidade, rapidez e alto valor informativo. Segundo Alfenas et al. (1998), esta técnica baseia-se na separação de macromoléculas ionizadas de acordo com suas cargas elétricas, formas e pesos moleculares, por meio da migração em um meio suporte e tampões adequados, sob a influência de um campo elétrico.

Dentre as proteínas, as enzimas desempenham um importante papel no processo de deterioração de sementes e sua atividade pode ser indicativa da perda de qualidade (Brandão Junior, 1996). Em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir o vigor, o que pode ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição das sementes (Lin, 1988; Marcos Filho et al., 1990).

Por meio da atividade enzimática, também podem-se avaliar as transformações degenerativas nas sementes. A alta atividade da enzima álcool desidrogenase indica aumento na respiração anaeróbica, em função do acréscimo no grau de hidratação das sementes e da deficiência no aporte de oxigênio (Bock, 1999). O aumento na atividade celular ocorre às expensas das substâncias de reserva das sementes, que são transformadas em energia para a manutenção

dos tecidos vivos das sementes e de novos compostos para o reparo de estruturas danificadas pela deterioração (Bewley & Black, 1994). A enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e outros compartimentos celulares, geralmente é de natureza constitutiva (Spinola et al., 2000).

Outro grupo de enzimas atua como mecanismos antioxidantes, protegendo as células contra a ação de diversas formas de oxigênios ativos. As enzimas capazes de realizar a desintoxicação de O_2^- e H_2O_2 são a superóxido desmutase (SOD) e a catalase. As primeiras são um grupo de enzimas encontradas no citoplasma celular e na matriz mitocondrial, que catalizam a reação de desmutação de radicais superóxidos livres (O_2^-) para oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de oxigênio formado é decomposto pela catalase, cujas subunidades são formadas no citoplasma, sendo a síntese completada no peroxissomo (MacDonald, 1999).

Neste trabalho foram estudadas a qualidade fisiológica e a atividade de enzimas atuantes na respiração e nos mecanismos de proteção durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) e na área experimental do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG na safra 2005/2006. Após análise de solo, seguiram-se as recomendações da Embrapa para Minas Gerais, para correções de fertilidade e pH. A área de cultivo possui predominância de solo do tipo Latossolo Vermelho Escuro. As características químicas e físicas foram determinadas pelo Laboratório de Análise de Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras.

Instalação e condução do experimento: foi utilizada a Cultivar MG/BR 46 (Conquista), recomendada para o estado de Minas Gerais. Em solo preparado de maneira convencional, as parcelas foram instaladas com espaçamento de 0,45 m entre linha e 15 plantas por metro linear. Cada parcela constou de 20 linhas de 10 metros, totalizando 9 m², sendo as 18 linhas centrais de cada parcela consideradas úteis. Foram feitos controles de invasoras, assim como de pragas e doenças, sempre que necessário. A colheita de sementes foi realizada em diferentes estádios fenológicos para a avaliação da atividade das enzimas envolvidas na respiração e nos mecanismos de proteção e da qualidade fisiológica durante a secagem. Utilizou-se a escala de Caviness (Fehr & Caviness, 1979) como critério para a caracterização da primeira colheita, que foi realizada quando as sementes estavam no estágio R6, que se caracteriza por vagens com sementes verdes, porém, totalmente formadas. A partir do R6, quando as sementes tinham aproximadamente 65% de teor de água, foram feitas colheitas semanais quando as sementes possuíam 60%, 50%, 40%, 30%, 22% e 12% de grau de umidade. As vagens colhidas foram debulhadas manualmente e as sementes levadas a secadores de pequena escala, construídos de acordo com Navratil & Burris (1982). Foram utilizadas duas temperaturas de secagem, uma de 35°C e outra de 45°C, até um conteúdo final de água das sementes em torno de 12%. No momento da colheita e após atingirem 20% e 12% de teor de água, foram retiradas amostras de sementes para serem avaliadas quanto à qualidade fisiológica e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH). **Determinação do grau de umidade:** o grau de umidade inicial foi mensurado utilizando-se o método da estufa a 130°C por 2 horas, utilizando-se duas repetições para cada avaliação, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem. **Teste de germinação:** foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento, semeadas em rolos

de papel tipo “Germitest” à temperatura de 25°C. A quantidade de água adicionada foi de 2,5 vezes o peso do papel, visando umedecimento adequado e uniformização do teste. As contagens de plântulas normais foram feitas no 4º e 7º dias após a semeadura. **Condutividade elétrica:** foi utilizada a quantificação em massa com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos plásticos descartáveis com 75mL de água deionizada. Após 24 horas de embebição à temperatura de 25°C, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro, com resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$, de acordo com o método descrito por Krzyzanowski et al. (1999). **Análise de isoenzimas:** duas amostras de sementes de cada tratamento foram masseradas em moinho com refrigeração constante de 4°C. Retiraram-se subamostras de 100mg, nas quais foi adicionado o tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8) na quantidade de 2,5 vezes o peso de cada amostra e 0,1% de β -mercaptoetanol. O material foi colocado em geladeira overnight e, depois, centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Foram aplicados 50 μL do sobrenadante no gel e promovida a corrida eletroforética por quatro horas, a 150 V. Os géis foram revelados para enzimas álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), segundo Alfenas (1998). **Delineamento experimental e análise estatística:** utilizou-se delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições arranjados em esquema fatorial (6x3x3), e que foram avaliadas 6 épocas de colheitas (65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 22% de teor de água nas sementes), 3 temperaturas de secagem (35, 45 e 35/45°C), três tratamentos de secagem (sem secagem, secagem até 20% de teor de água e secagem até 12% teor de água). Para as variáveis germinação e condutividade elétrica foram realizados estudos de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância observou-se diferença significativa para a interação estágio de desenvolvimento e tratamento de secagem, para todas as variáveis analisadas, não sendo observada diferença significativa entre as temperaturas de secagem.

Nos zimogramas para as enzimas ADH e MDH (Figura 1) foi possível observar uma maior atividade respiratória aeróbica quando as sementes possuíam em torno de 65% de teor de água, com a secagem induzindo um aumento na atividade da MDH. Nesse mesmo estágio, a atividade da ADH foi baixa quando comparada à observada em sementes colhidas nos demais estádios. Essa alta atividade respiratória pode estar relacionada com o metabolismo de desenvolvimento da semente, já que o ponto de maturidade fisiológica de sementes de soja, segundo Howell et al. (1959) está entre 50% e 60% de teor de água. Outra hipótese está relacionada à alta atividade respiratória em tecidos lesionados, já que a secagem neste estágio ocasionou os maiores valores de condutividade e os menores de germinação (Figura 2). Taiz & Zaiger (2004) relataram que a atividade respiratória em tecidos vegetais é mais intensa em órgãos de reserva em desenvolvimento, devido à necessidade do maior suprimento energético.

Nos demais estádios, a atividade aeróbica foi reduzida e tornou-se constante, não havendo variações significativas durante a secagem natural no campo ou artificial. Farrant et al. (1997) observaram um declínio na atividade respiratória em sementes de *Phaseolus vulgaris*, associado à dediferenciação da mitocôndria durante o processo de maturação, e uma diminuição nos conteúdos de substratos respiratórios, diminuindo, assim, a geração descontrolada de radicais livres durante a secagem. A secagem artificial nestes estádios provocou um aumento na atividade da ADH.

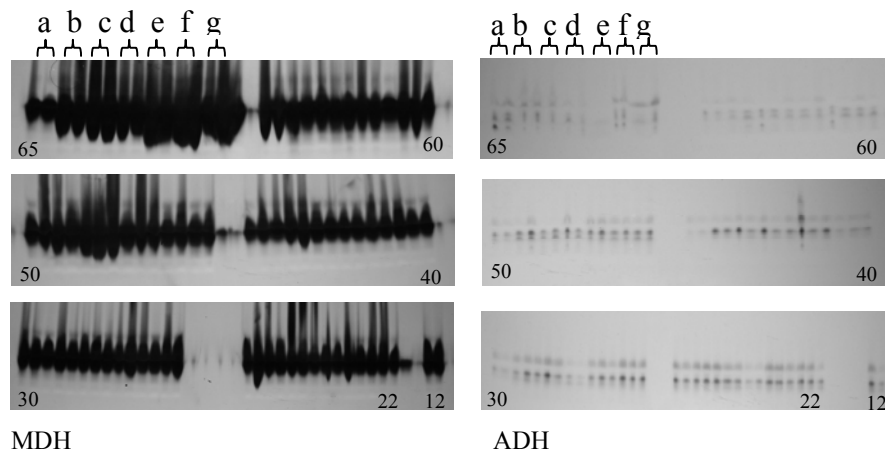


FIGURA 1. Padrões eletroforéticos das enzimas malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH) em sementes de soja colhidas em diferentes estádios de maturação (65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% e 12% de teor de água) e submetidas a diferentes tratamentos de secagem (a- Sem secagem, b- 20% de teor de água a 35°C, c- 12% de teor de água a 35°C, d- 20% de teor de água a 35/45°C, e- 12% de teor de água a 35/45°C, f- 20% de teor de água a 45°C, g- 12% de teor de água a 45°C) UFLA, Lavras, MG, 2006.

Relacionando-se os valores de condutividade elétrica (Figura 2) e a atividade de ADH (Figura 1), observa-se que, quando as sementes atingiram cerca de 50% de teor de água, a atividade dessa enzima aumentou com a secagem, coincidindo com o aumento significativo dos valores de condutividade elétrica, também após a secagem. Quando as sementes atingiram 22% de grau de umidade, não foram observadas diferenças nos padrões da atividade da ADH, porém, para o teste de condutividade após 40% de grau de umidade já não foi possível detectar estes danos por secagem.

A desestruturação de membranas sempre foi considerada como o primeiro evento degenerativo de sementes, porém, atualmente, é aceita a idéia de que danos moleculares e bioquímicos ocorram antes dos danos de membrana,

sendo as avaliações de atividade enzimáticas mais sensíveis que o teste de condutividade elétrica.

Segundo Brandão Junior et al. (2002), a via fermentativa é fundamental para a manutenção e a viabilidade de sementes de café colhidas precocemente e submetidas à secagem. Já Taiz & Zaiger (2004) afirmam que mais importante que o fornecimento energético por meio da atividade respiratória exercida pela ADH é a sua capacidade de converter o acetaldeído tóxico em etanol. Hrazdina et al. (1992) relatam que a presença de acetaldeído causa danos celulares que induzem à respiração fermentativa que por sua vez produz mais acetaldeído. Assim a atividade da ADH em tecidos sadios é a de estabilizar esta reação em cadeia.

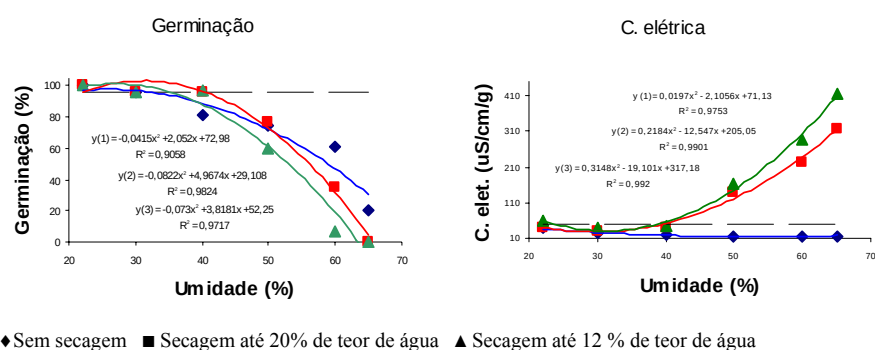


FIGURA 2. Representação gráfica das equações de regressão para os resultados dos testes de germinação (%) e condutividade elétrica ($\mu\text{mhos/cm/g}$) em função da secagem de sementes de soja cultivar MG/BR 46 (Conquista) colhida em diferentes estádios de desenvolvimento. A linha tracejada representa os valores médios em sementes colhidas no campo com teor de água de 12%. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Analizando-se os zimogramas da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 3), observa-se que a atividade foi intensa durante todos os estádios de

maturação avaliados. Senaratna et al. (1986), trabalhando com eixos embrionários de soja, afirmaram que a SOD é o mais notável exemplo de neutralizador de radicais livres (“escavenges”), pois é efetiva ao menor sinal de dano. Já Rosa et al. (2005) trabalhando com tolerância de sementes de milho a altas temperaturas de secagem, não observaram diferença na atividade da SOD, durante as diferentes temperaturas utilizadas.

No zimograma para catalase (Figura 3), observa-se a ausência de atividade nos estádios iniciais avaliados. Essa falta de mecanismo removedor de radicais livres pode ser mais uma causa da baixa qualidade fisiológica das sementes submetidas à secagem nesses estádios de desenvolvimento (Figura 2). Rosa et al. (2005) encontraram resultados semelhantes em sementes de milho submetidas à alta temperatura de secagem e pré-condicionamento à baixa temperatura. Segundo Taiz & Zaiger (2004), apesar de sua grande efetividade na neutralização do oxigênio reativo ($O_2^{\cdot-}$), a SOD produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico. Assim, sua atividade isoladamente é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres, conjuntamente com catalase, peroxidase e carotenóides, entre outros.

A atividade da catalase tornou-se efetiva quando as sementes atingiram um teor de água em torno de 50%, coincidindo com o momento no qual as sementes toleram secagem até 20% sem perder sua viabilidade inicial (Figura 2). O pico máximo de atividade foi observado quando as sementes atingiram 40% de umidade, estágio em que foi observada a indução de germinação pela secagem. Sementes com conteúdos intermediários de água são potencialmente mais susceptíveis a danos oxidativos mediados por radicais livres (Gaff, (1989); Vertucci & Farrant (1995)). Esses autores consideram que, neste conteúdo de água, o metabolismo é desordenado e a secagem na maturação, conjuntamente com os mecanismos removedores de radicais livres é estratégia biologicamente

bem sucedida, permitindo a passagem da semente por esses conteúdos de água sem que haja efeitos deletérios significativos.

A partir de 30% de grau de umidade a atividade foi decrescente o que pode estar relacionado com menor dano ocasionado por secagem nestes estádios, já que foram constatados os menores valores de condutividade e maiores valores de germinação. Leprince et al. (1990) observaram atividade crescente da catalase ao longo do processo de aquisição de tolerância à alta temperatura de secagem.

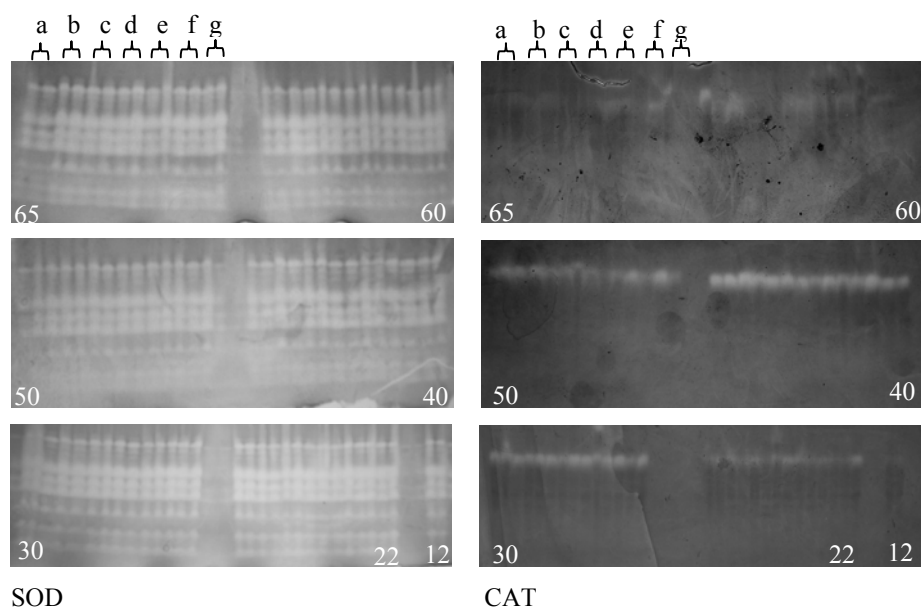


Figura 3. Padrões enzimáticos da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em sementes de soja colhidas em diferentes estádios de maturação (65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% e 12% de teor de água) e submetida a diferentes tratamentos de secagem (a-Sem secagem, b-20% de teor de água a 35°C, c-12% de teor de água a 35°C, d-20% de teor de água a 35/45°C, e-12% de teor de água a 35/45°C, f-20% de teor de água a 45°C, g-12% de teor de água a 45°C).

Em geral, o melhor comportamento fisiológico e bioquímico ocorreu quando as sementes alcançaram em torno de 30% de teor de água, com maiores

valores de germinação, menores valores de condutividade e enzimas envolvidas na respiração e proteção contra radicais livres atuando organizadamente.

4 CONCLUSÕES

A SOD é ativa durante o desenvolvimento e a secagem de sementes soja.

A catalase só é efetiva após o ponto de maturidade fisiológica em sementes de soja.

A atividade da MDH é constante durante a secagem de sementes de soja, porém, a atividade da ADH é intensificada.

Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau de umidade.

A secagem em sementes com menos de 40% de grau de umidade não provoca aumento nos valores de condutividade elétrica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seed: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p

BOCK, F. L. **Resposta a nível molecular do envelhecimento artificial, natural e pré-condicionamento de sementes de soja**. 1999. 27 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BRANDÃO JUNIOR, D. S.; VIEIRA, M. G. G. C.; HILHORST, H. W. M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673-678, 2002.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de semente de milho**. 1996. 110 p. (Dissertação Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 1992. 365 p.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 135-144, June 1997.

FERH, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: State University, Cooperative extension Service, 1979. 12 p.

GAFF, D. F. Responses of desiccation tolerant “resurrection” plants to water stress. In: KREBS, K. H.; RICHTER, H.; HINCHLEY, T. M. **Strutural and functional responses to environmental stresses: water shortages**. 1989. p. 264-311.

HRAZDINA, G.; JENSEN, R. A. Spacial organization of enzymes in plant metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 241-267, 1992.

HOWELL, R. W.; COLLINS, F. I.; SEDGEWICK, V. E. Respiration of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v. 51, n. 11, p. 677-679, nov. 1959.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. The role of free radicals and radical precessing systems in loss of deseccation tolerance in germinating maize (*Zea Mays* L.). **New Phytologist**, London, v. 116, n. 4, p. 573-580, Dec. 1990.

LIN, S. S. efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica de sementes de milho (*Zea mais* L) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, v. 10, n. 1, p.59-67, 1988.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. da; NOVENBRE, A. D. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Estudo comparativo de métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 12, p. 1805-1815, dez. 1990.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 159-161, Jan./Feb. 1982.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 171-213, 1997.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Mar. 1999.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; SMITH, M. T.; ROSS, G. Why do stored, hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 187-191, June 1994.

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

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A. C. **Membranes, metabolism and dry organisms**. London, 1986. p. 85-101.

SPINOLA, M. C. M.; CICERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Cummings, 2004. 565 p.

VERTUCCI, C. W.; FARARNT, J. M. Aquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

Danos de secagem em sementes de soja.

ANALISE FISIOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DURANTE O DESENVOLVIMENTO E A SECAGEM DE SEMENTES DE SOJA

Preparado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Sementes

RESUMO

Durante o desenvolvimento e a secagem, vários mecanismos de proteção atuam na manutenção da qualidade fisiológica de sementes. Alguns desses mecanismos mantêm a integridade de membrana celulares, o que é fundamental para o perfeito funcionamento do metabolismo celular. O estudo de ultra-estrutura além de permitir a visualização dos danos causados pela secagem na ausência de mecanismos de proteção, permite, ainda, a observação do início da efetividade destes mecanismos. Neste trabalho, foram estudados os danos durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja, por meio de microscopia eletrônica de varredura e testes fisiológicos. Para isso, foram colhidas sementes em diferentes estádios de desenvolvimento, que foram submetidas a diferentes temperaturas e tratamentos de secagem. Foram feitas avaliações quanto à qualidade fisiológica das sementes por meio dos testes de germinação, teste de frio, teste de emergência em condições controladas e condutividade elétrica. Os danos de membrana foram observados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se microscópio LEO Evo40. Concluiu-se que as sementes de soja tornam-se tolerantes a dessecação quando possuem em torno de 30% de teor de água. A secagem em sementes de soja com teor de água acima de 30% provoca danos de membrana que diminuem a qualidade fisiológica das sementes. Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau de umidade no

campo e os maiores valores de vigor em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 40% de grau de umidade no campo.

Termos para indexação: MEV, tolerância à dessecação, testes fisiológicos.

Drying damages of soybean seeds

ULTRA-STRUCTURAL AND PHYSIOLOGICAL ANALYSIS DURING THE DEVELOPMENT AND DRYING OF SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT

During the development and drying, a number of protection mechanisms act on the maintenance of physiological quality of seeds. Some of these mechanisms maintain the integrity of cells, which is fundamental to the perfect functioning of cell metabolism. The study of the ultra-structure enables visualization of damages caused by drying in the absence of protection mechanisms. In this work, occurrence of damages during the development and drying of soybean seeds were studied by means of Scanning Electron Microscopy (SEM). In addition, seeds were also evaluated regarding the physiological quality. Thus, seeds in different developmental stages were collected and submitted different drying temperatures and treatments. Evaluations were done concerning the physiological quality of seeds by means of the germination test, cold test, emergence test under controlled conditions and electrical conductivity. The damages were viewed by means of scanning electron microscopy utilizing the LEO Evo40 Microscope. The results showed that the soybean seeds become desiccation tolerant when they possess around 30% of water content. Drying of seeds with moisture content above 30%, caused reduction of cellular volume, disorganization of the cell walls and decrease in physiological quality of the seeds. Higher values of germination were observed in seeds with 30% of moisture content in the field, whereas higher values of vigor were observed in seeds with 40% of moisture content in the field.

Index Terms: SEM, desiccation tolerance, physiological tests.

1 INTRODUÇÃO

A soja, nos últimos 10 anos, tornou-se a maior geradora de divisas do agronegócio brasileiro. A cultura ocupa uma área de 21,24 milhões de hectares com produção em 2005/2006 de, aproximadamente, 51 milhões de toneladas de grãos. A demanda por semente na safra 2005/2006 foi de, aproximadamente, um milhão de toneladas. Todo complexo agroindustrial da soja movimenta, no Brasil, mais de 30 bilhões de dólares (IBGE, 2006).

Além do desafio de produzir sementes de qualidade para atender a demanda crescente, as unidades de beneficiamento ainda têm que solucionar o problema de concentração de produção e operação das usinas. A utilização de dessecantes para a antecipação de colheita é uma técnica que tem sido adotada por diversos produtores, porém, o estágio do desenvolvimento para aplicação não está claro, sendo observadas recomendações divergentes.

Durante o desenvolvimento, as sementes passam pela fase de histodiferenciação, em que um aumento na massa fresca e na deposição de reserva, acompanhado por um rápido aumento na massa seca durante a maturação. O acúmulo de massa seca cessa e o de massa fresca diminui, quando as sementes atingem o ponto de maturidade fisiológica. Após a histodiferenciação e antes da secagem na maturação, as sementes adquirem a habilidade para germinar e tolerar a dessecação. Em sementes em desenvolvimento, a concentração de ABA diminui próximo ao final do desenvolvimento, enquanto a tolerância à dessecação é aumentada (Oliver & Bewley, 1997).

Em soja, as fases de desenvolvimento são divididas em estágio vegetativo (V1, V2... Vn) e estágio reprodutivo (R1, R2, R3,..., R8) (Fehr & Caviness, 1977). No estágio reprodutivo, o R7 marca o ponto de maturidade fisiológica, que é caracterizado pelo máximo acúmulo de matéria seca na semente e com teor de água variando de 50% a 60% (Howell et al., 1959). Na

transição do estágio R7 ao R8, o metabolismo de mecanismos de tolerância à dessecação é intensificado e a semente passa a tolerar altas temperaturas de secagem (Oliver & Bewley, 1997).

A secagem lenta promove melhor tolerância à desidratação, presumivelmente devido ao tempo suficiente que é concedido para a indução e a operação dos mecanismos de proteção. Oliver & Bewley (1997) sugeriram que a secagem rápida impede os processos de recuperação e é necessário mais tempo para os reparos na reidratação.

Estudos de ultra-estrutura conduzidos durante os últimos anos contribuíram para a compreensão das diferentes respostas à desidratação apresentadas por sementes recalcitrantes e ortodoxas. Membranas das organelas celulares, o citoesqueleto e o núcleo esquelético são essenciais para o perfeito funcionamento da célula e danos a essas estruturas durante a desidratação podem levar à perda de viabilidade (Berjak & Pammanter, 2000).

Neste trabalho foram estudados os danos celulares por meio de testes fisiológicos e microscopia eletrônica de varredura (MEV) durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram conduzidas no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) e o experimento de campo, na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, MG. Após análise de solo, seguiram-se as recomendações da Embrapa para Minas Gerais para as correções de fertilidade e pH. A área de cultivo possui predominância de solo do tipo Latossolo Vermelho Escuro. **Instalação e condução do experimento:** foi utilizada a cultivar MG/BR 46 (Conquista), recomendada para o estado de Minas Gerais. Em solo preparado de maneira

convencional, as parcelas foram instaladas com espaçamento de 0,45 m entre linha e 15 plantas por metro linear. Cada parcela constou de 20 linhas de 10 metros, totalizando 9m², sendo as 18 linhas centrais de cada parcela consideradas úteis. Foram feitos controles de invasoras, assim como de pragas e doenças sempre que necessário. A colheita de sementes foi realizada em diferentes estádios fenológicos para a avaliação da qualidade fisiológica e ultra-estrutural durante a secagem. Utilizou-se a escala de Caviness (Fehr & Caviness, 1979) como critério para a caracterização da primeira colheita, feita quando as sementes estavam no estágio R6, que se caracteriza por vagens com sementes verdes, porém, totalmente formadas. A partir do R6, quando as sementes tinham, aproximadamente, 65% de teor de água, foram feitas colheitas semanais quando as sementes possuíam 60%, 50%, 40%, 30%, 22% e 12% de grau de umidade. As vagens colhidas foram debulhadas manualmente e as sementes levadas a secadores de pequena escala, construídos de acordo com Navratil e Burris (1982). Os secadores foram regulados para as temperaturas constantes de 35°C e 45°C, até atingir 13% de grau de umidade e temperaturas alternadas, iniciando com 35°C até um conteúdo médio de água das sementes de 20%, quando, então, a temperatura foi elevada para 45°C, até conteúdo de água em torno de 12%. No momento da colheita e após atingirem 20% e 12% de teor de água, foram retiradas amostras de sementes para serem avaliadas quanto à qualidade fisiológica e incidência de danos de membrana por meio de microscopia eletrônica de varredura. **Determinação do grau de umidade:** o grau de umidade inicial foi mensurado utilizando-se o método da estufa a 130°C por 2 horas, utilizando-se duas repetições para cada avaliação, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem. **Teste de germinação:** foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento, semeadas em rolos de papel tipo “Germitest” à temperatura de 25°C. A quantidade de água adicionada foi de 2,5 vezes o peso

do papel, visando a umedecimento adequado e a uniformização do teste. As contagens de plantas normais foram feitas no 4º e 7º dias após a semeadura.

Teste de emergência em condições controladas: a semeadura foi realizada em bandejas plásticas contendo como substrato solo + areia, na proporção 1:2. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal à temperatura de 25°C, em regime alternado de luz e escuro (12 horas). Foi considerada a porcentagem de plântulas normais aos 14 dias. **Teste de frio:** foram utilizadas caixas plásticas com uma mistura de areia e terra (2:1), com quatro repetições de 50 sementes cada. Uma quantidade de 4.000g da mistura areia e solo juntamente com adição da quantidade de água calculada para 70% da capacidade de campo, foi colocada em cada caixa. Em seguida estas caixas foram colocadas em câmara previamente regulada a 10 °C, onde na qual permaneceram durante cinco dias. Após esse período, as caixas foram transferidas para uma câmara de germinação com temperatura de 25°C, por sete dias para a emergência das plântulas. A avaliação foi realizada considerando somente as plântulas normais emergidas (Krzyzanowski et al., 1999).

Condutividade elétrica: foi utilizada a quantificação em massa, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos plásticos descartáveis com 75mL de água deionizada. Após 24 horas de embebição à temperatura de 25°C, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro com resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$, de acordo com o método descrito por Krzyzanowski et al. (1999). **Microscopia eletrônica de varredura:** os eixos embrionários foram extraídos e imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificada), pH 7,2, por 24 horas. Em seguida foram lavadas em tampão cacodilato por três vezes, durante 10 minutos. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Após esse período, foram

feitas lavagens com água destilada e desidratação em gradiente de acetona a 25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes. As amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico, onde foi eliminado todo o resíduo de acetona, para posterior montagem em stubs sob fita de carbono e revestimento com ouro. A visualização das amostras foi feita em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo40. **Delineamento experimental e análise estatística:** utilizou-se delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, arranjados em esquema fatorial (6x3x3), em que foram utilizadas épocas de colheitas (65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 22 % de teor de água das sementes), 3 temperaturas de secagem (35, 45 e 35/45°C), 3 tratamentos de secagem (sem secagem, secagem até 20% de teor água e secagem até 12% de teor água). Para as variáveis germinação, emergência em condições controladas, condutividade elétrica e teste de frio, foram realizados estudos de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância observou-se diferença significativa para a interação estágio de desenvolvimento e tratamento de secagem, para todas as variáveis analisadas, não sendo observada diferença significativa entre temperaturas de secagem.

Na medida que o teor de água de colheita das sementes foi diminuindo, a germinação foi aumentando para os três tratamentos de secagem, porém nas sementes com 65% e 60% de teor de água (Figura 1) os mecanismos responsáveis pela tolerância à dessecação parecem não estar presentes ou ativos, levando a semente a perder drasticamente sua viabilidade após secagem. Observou-se acentuada redução de volume celular que pode ter ocasionado a ruptura de plasmodemata nos três sistemas de tecidos fundamentais (dérmico, fundamental e vascular) (Figura 2 e 3), fazendo com que o conteúdo citoplasmático seja lixiviado refletindo nos altos valores de condutividade

elétrica (Figura 1). Segundo Taiz & Zaiger (2004), a maioria das células vegetais é interconectada por plasmodesmas que formam um *continuum* citoplasmático e estes são responsáveis por transporte de solutos. Pammenter & Berjak (1999) relataram que o dano mecânico associado com a redução do volume celular durante o processo de secagem é o mais importante dano em tecidos muito hidratados. Green et al. citados por Marcos Filho (1979), relataram prejuízos na germinação e no vigor de sementes de soja colhidas precocemente. Faria (2006) trabalhando com armazenamento de sementes de *Inga vera*, observou, por meio de microscopia eletrônica de varredura, uma retração celular relacionada com a baixa qualidade fisiológica. A diminuição do volume celular em sementes com alta umidade e em estágio de desenvolvimento poderia estar relacionada com o conteúdo de água “livre” e adsorvida, que é superior à água de constituição, quando comparado a sementes desenvolvidas. Segundo Carvalho & Nakagawa (2000) e Marcos Filho (2005) a água livre e adsorvida possui forças de atração muito frágeis, sendo facilmente eliminadas da semente durante a secagem.

Com 50% de grau de umidade, foi possível submeter às sementes a uma secagem até 20% de teor de água sem causar prejuízo para a germinação (Figura 7). Segundo Marcos Filho (2005), o prejuízo causado à configuração de membranas durante a secagem prematura é minimizada quando são mantidos teores de água em torno de 25%. Segundo Kermode et al. (1989), o sinal indicativo da mudança de estágio de desenvolvimento para germinação é a redução no teor de água nas sementes. Nesse estágio, observou-se uma diminuição na profundidade do dano causado pela secagem (Figura 4), sendo este mais intenso nos tecidos mais externos (dérmico e fundamental), podendo ter sido causado pela maior exposição destes tecidos à temperatura de secagem.

A indução da germinação pela secagem foi efetivamente promovida quando o teor de água das sementes estava em torno de 40% (Figura 1), suportando, a partir de então, secagem até 12% de teor de água. Nesse estágio, o

valor médio de germinação das sementes submetidas à secagem tornou-se superior ao das sementes sem secagem. As células mantiveram-se túrgidas com danos mínimos por secagem (Figura 5), sendo estes observados principalmente nas células mais externas do córtex e epiderme. A menor incidência de danos condicionou menores valores de condutividade elétrica. Sun & Leopold (1993), trabalhando com a cultivar Chippewa 64, consideraram que os eixos embrionários de sementes de soja atingem o ponto de maturidade aos 48 dias após o florescimento, quando estes possuem em torno de 38% de grau de umidade.

Com 30% e 22% de teor de água, foram observados os maiores valores de germinação e vigor (Figura 1) comparados aos observados em sementes nos estádios anteriores. Zanakis et al. (1994) testando três cultivares de soja, obtiveram resultados semelhantes, porém, os autores relataram que estas possuíam menor longevidade do que sementes colhidas com 15% de teor de água. A partir desse estágio, as células mantiveram-se túrgidas após a secagem, com aspecto semelhante ao das sementes secas naturalmente em campo (Figura 6 e 7). Os valores de condutividade elétrica (Figura 1) nesses estádios não variaram com a secagem, relacionando-se diretamente com a diminuição dos danos de membrana observados nas imagens.

Os resultados obtidos para o teste de emergência em condições controladas e teste de frio foram semelhantes aos da germinação (Figura 1). Observou-se, porém, que, nas sementes sem secagem, o estresse causado nos testes induziu a ativação de genes ligados à germinação, fazendo com que os valores de emergência em condições controladas e no teste de frio aumentassem significativamente quando comparados com o teste de germinação, resultados que corroboram os resultados obtidos por Veiga (2005).

De acordo com Howell et al. (1959), as sementes de soja atingem seu ponto de maturidade fisiológica quando possuem entre 50% a 60% de umidade,

diferente do encontrado nesta pesquisa, que foi de, aproximadamente, 40% de teor de água, como pôde ser observado nos testes fisiológicos (Figura 1) e imagens de ultra-estruturas, porém, por não possuir os mecanismos de proteção totalmente desenvolvidos neste estágio, a secagem provocou decréscimo nos valores de vigor das sementes. O vigor das sementes foi crescente nos três tratamentos de secagem, na medida que a umidade de colheita diminuía e, assim, como no teste de germinação, os valores de maior vigor foram alcançados em sementes secadas quando apresentavam em torno de 30% de teor de água, não diferindo das sementes com 20% (Figura 1).

4 CONCLUSÕES

As sementes de soja tornam-se tolerantes à dessecação quando possuem em torno de 30% de teor de água.

A secagem em sementes de soja com teor de água acima de 30%, provoca danos de membrana que diminuem a qualidade fisiológica das sementes.

Os maiores valores de germinação em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 30% de grau de umidade no campo.

Os maiores valores de vigor em sementes de soja são alcançados quando estas atingem cerca de 40% de grau de umidade no campo.

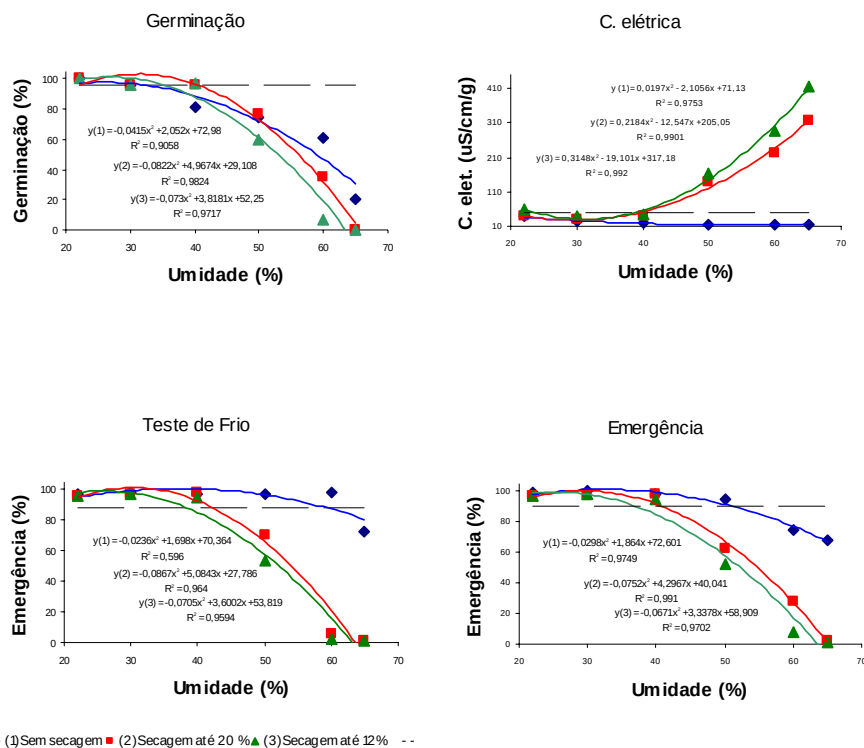


FIGURA 1. Representação gráfica das equações de regressão para os resultados dos testes de germinação (%), emergência em condições controladas (%), condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) e teste de frio (%) em função da secagem de sementes de soja cultivar MG/BR 46 (Conquista) colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento. A linha tracejada representa os valores médios de sementes soja colhidas convencionalmente no campo com teor de água de 12%. UFLA, Lavras – MG, 2006.

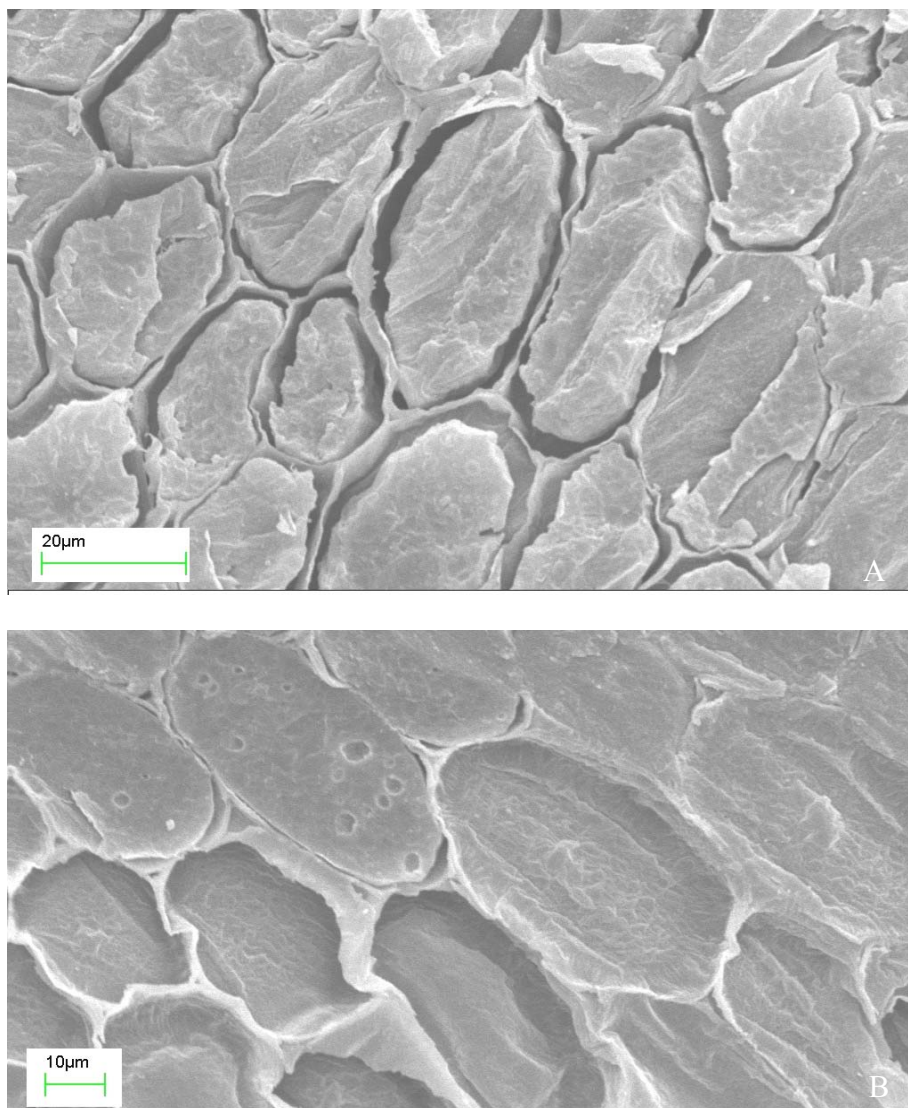


FIGURA 2. Imagens obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrando danos causados por secagem em eixos embrionários de sementes de soja colhidas com 65% de grau de umidade. A imagem A representa eixos embrionários de sementes submetidas à secagem artificial e B sementes secas naturalmente. Aumento médio 1500 X. UFLA, Lavras-MG, 2006.

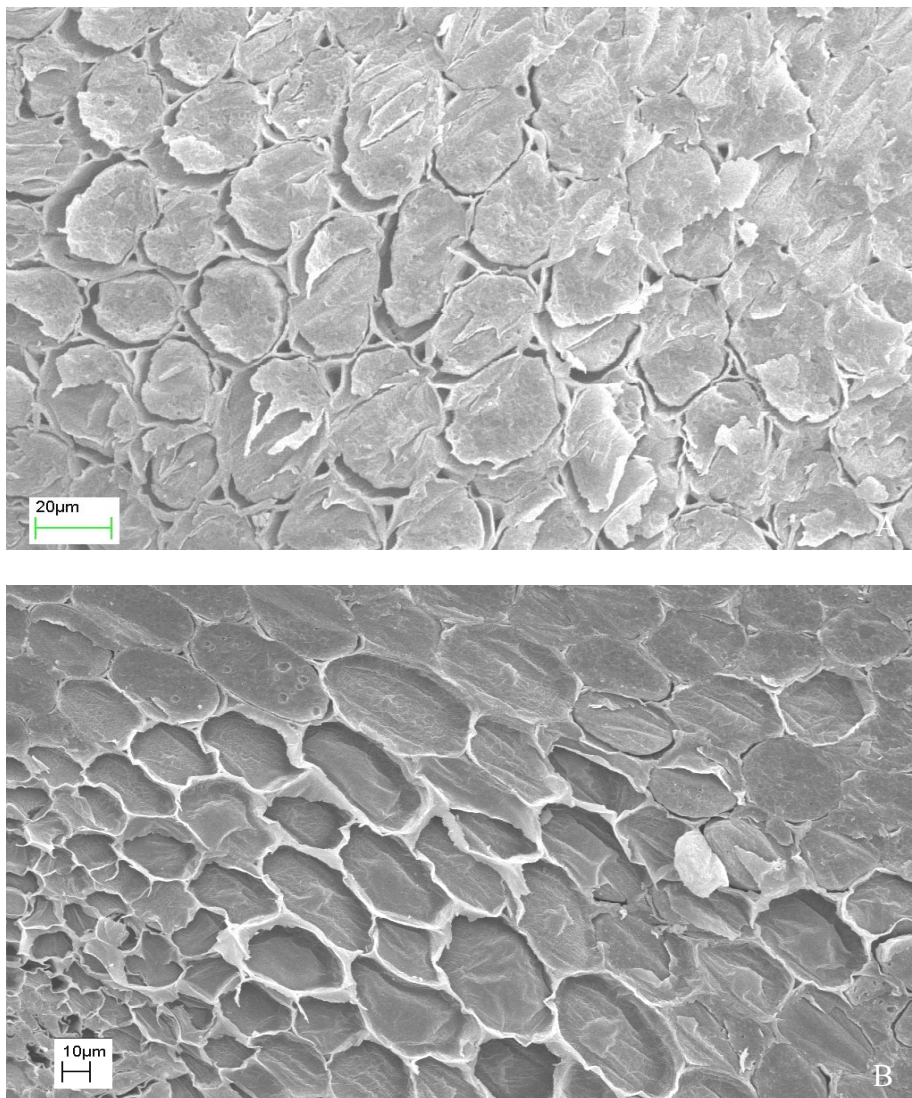


FIGURA 3. Imagens obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrando danos causados por secagem em eixos embrionários de sementes de soja colhidas com 60% de grau de umidade. A imagem A representa eixos embrionários de sementes submetidas à secagem artificial e B sementes secas naturalmente. Aumento médio 1250 X. UFLA, Lavras, MG, 2006.

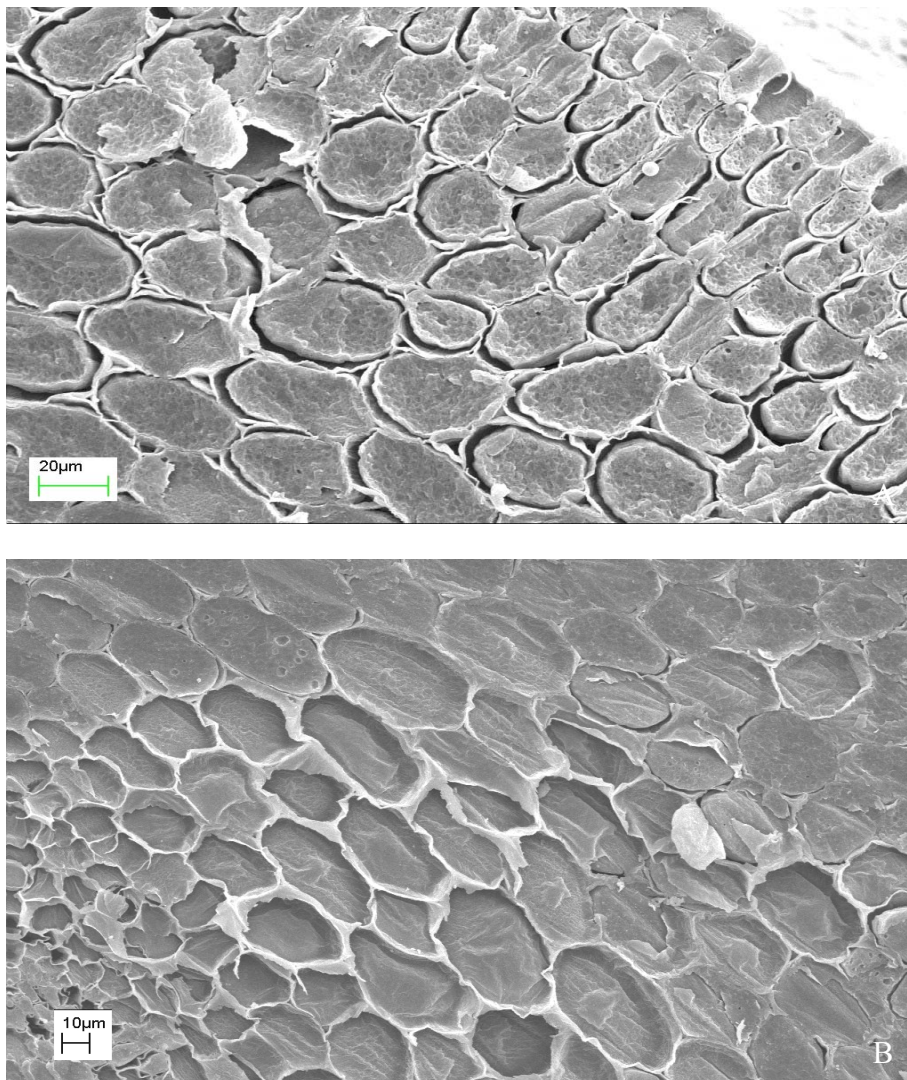


FIGURA 4. Imagens obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrando danos causados por secagem em eixos embrionários de sementes de soja colhidas com 50% de grau de umidade. A imagem A representa eixos embrionários de sementes submetidas à secagem artificial e B sementes secas naturalmente. Aumento médio 1250 X. UFLA, Lavras, MG, 2006.

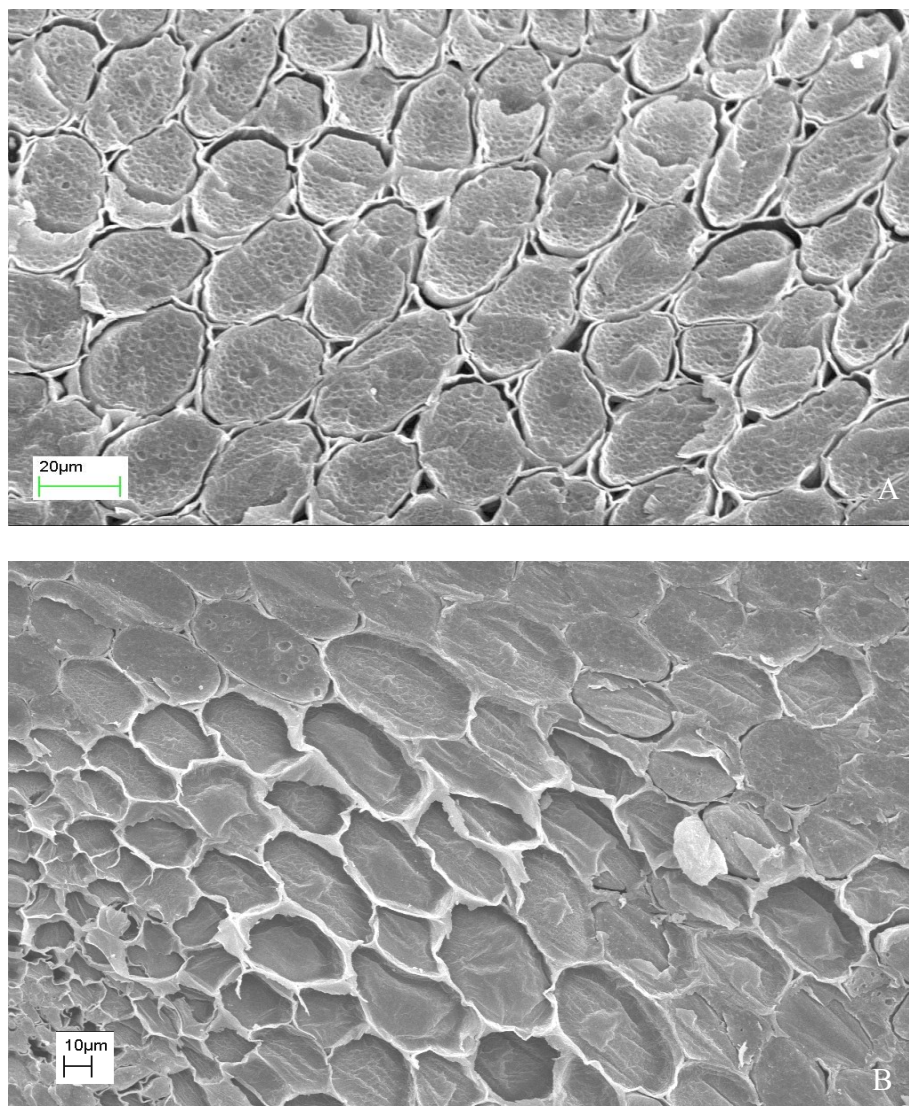


FIGURA 5. Imagens obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrando danos causados por secagem em eixos embrionários de sementes de soja colhidas com 40% de grau de umidade. A imagem A representa eixos embrionários de sementes submetidas à secagem artificial e B sementes secas naturalmente. Aumento médio 1250 X. UFLA, Lavras, MG, 2006.

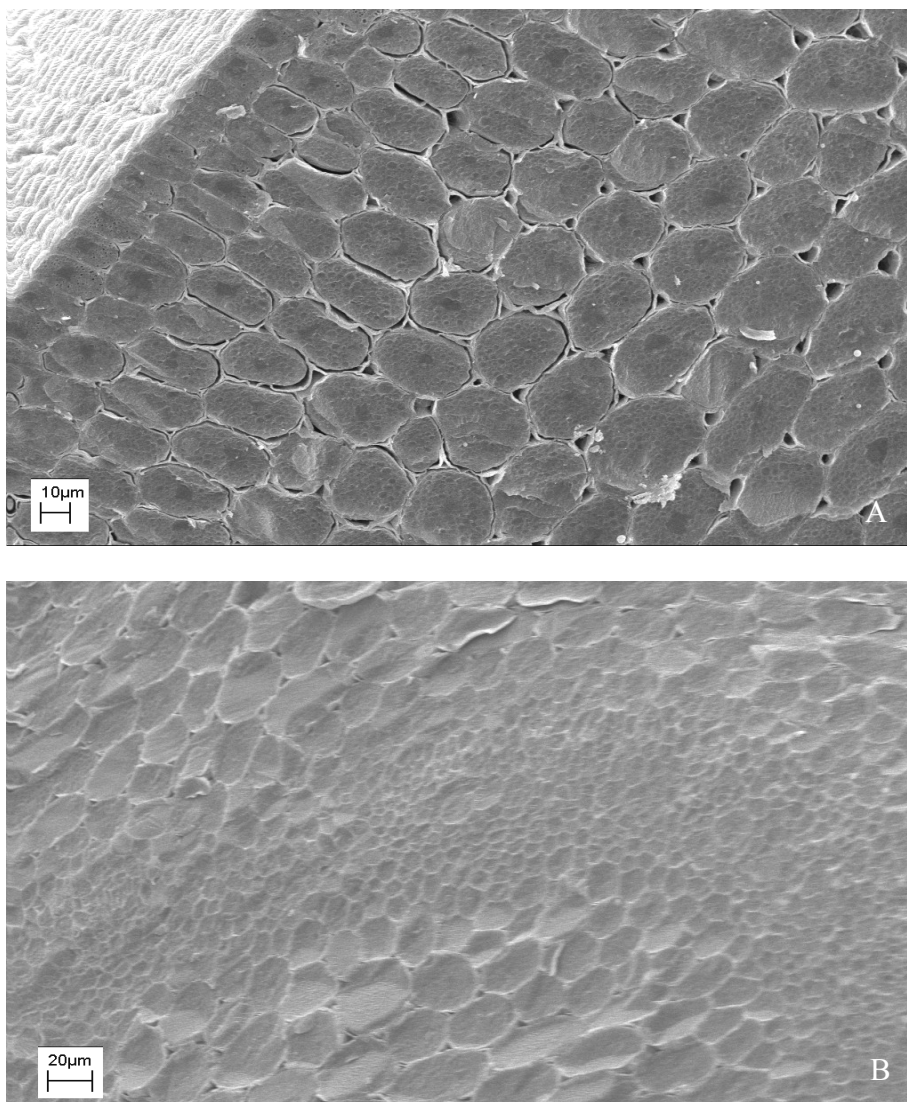


FIGURA 6. Imagens obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrando danos causados por secagem em eixos embrionários de sementes de soja colhidas com 30% de grau de umidade. A imagem A representa eixos embrionários de sementes submetidas à secagem artificial e B sementes secas naturalmente. Aumento médio 1150 X. UFLA, Lavras, MG, 2006.

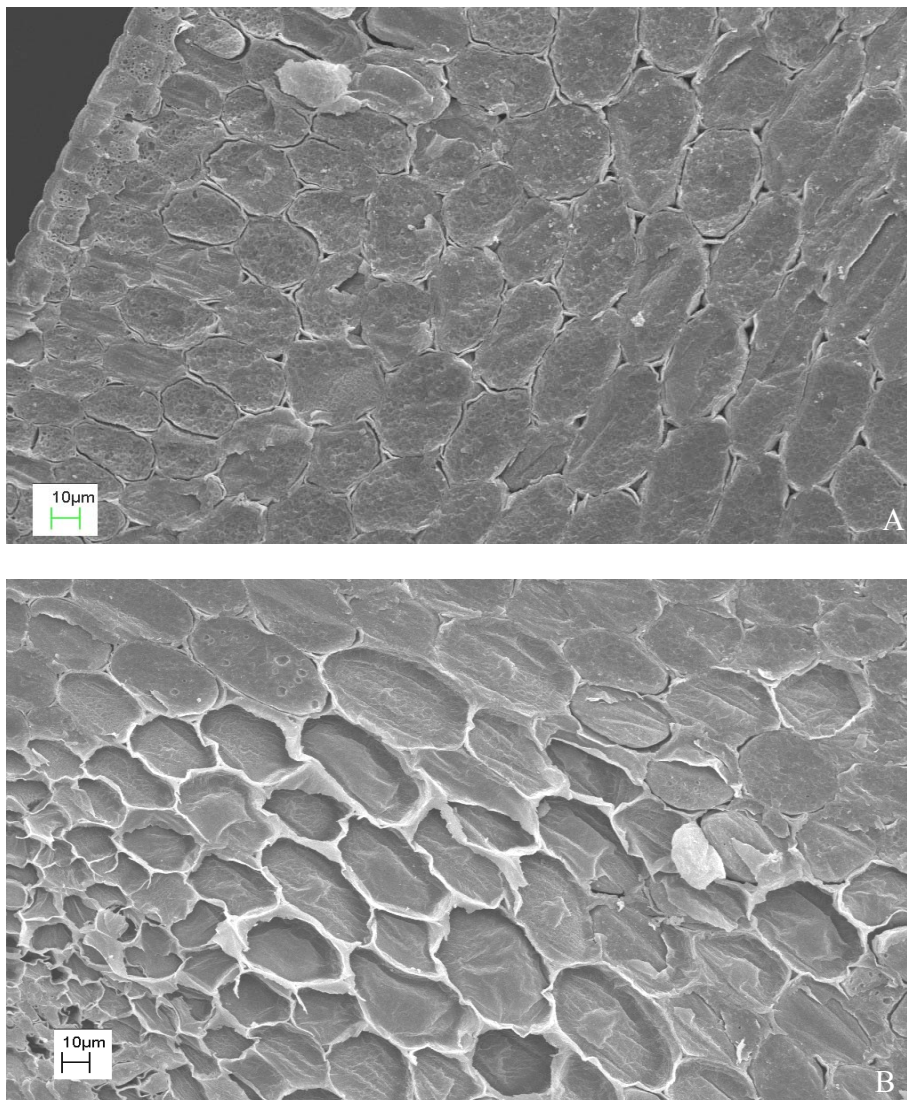


FIGURA 7. Imagens obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrando danos causados por secagem em eixos embrionários de sementes de soja colhidas com 20% de grau de umidade. A imagem A representa eixos embrionários de sementes submetidas à secagem artificial e B sementes secas naturalmente. Aumento médio 1250 X. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 1992. 365 p.

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

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 135 p. Tese (Doutorado) - Wageningen Universiteit, Wageningen.

FERH, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: State University, Cooperative extension Service, 1979. 12 p.

HOWELL, R. W.; COLLINS, F. I.; SEDGEWICK, V. E. Respiration of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v. 51, n. 11, p. 677-679, Nov. 1959.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. Development seeds of *Ricinus communis* L. when detached and maintained in a atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant physiology**, Rockville, v. 90, n. 3, p. 702-707, 1989.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

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

MARCOS FILHO, J. **Qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrel)**. 1979. 180 p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 159-161, Jan./Feb. 1982.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 171-213, 1997.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Mar. 1999.

SUN, W. Q. A.; LEOPOLD, A. C. Acquisition of desiccation tolerance in soybeans. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, n. 3, p. 403-409, Mar. 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Cummings, 2004. 565 p.

VEIGA, A. D. **Tolerância de sementes de soja à dessecação**. Lavras: UFLA, 2005. 36 p. Monografia (Graduação em Agronomia).

ZANAKIS, G. N.; ELLIS, R. H.; SUMMERFIELD, R. J. Seed quality in relation to seed development in three genotypes of soybean (*Glycine max*). **Experimental Agriculture**, Londres, v. 30, n. 2, p. 139-156, Apr. 1994.