

DANIEL TEIXEIRA PINHEIRO

**DETERIORAÇÃO POR UMIDADE NA PRÉ-COLHEITA DE SEMENTES DE SOJA:
ALTERAÇÕES FÍSICAS, FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

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

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

Coorientadores: Felipe Lopes da Silva
Laércio Junio da Silva

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P654d
2019 Pinheiro, Daniel Teixeira, 1988-
Deterioração por umidade na pré-colheita de sementes de soja :
alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas / Daniel Teixeira Pinheiro.
- Viçosa, MG, 2019.
92 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Glycine max*. 2. Germinação. 3. Soja - Fisiologia. I.
Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia. Doutorado em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

DANIEL TEIXEIRA PINHEIRO

**DETERIORAÇÃO POR UMIDADE NA PRÉ-COLHEITA DE SEMENTES DE SOJA:
ALTERAÇÕES FÍSICAS, FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

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

APROVADA: 06 de agosto de 2019.



Daniel Teixeira Pinheiro

Autor



Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Ao Deus eterno (Jesus Cristo), minha fonte de vida e auxílio diário.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela formação, oportunidade e por ter sido minha casa durante 12 anos desde a graduação.

À professora, pesquisadora e orientadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pelos ensinamentos, confiança, apoio e principalmente amizade, concedidos nos últimos anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

Aos meus coorientadores Laércio Junio da Silva e Felipe Lopes da Silva. Aos professores Luiz Antônio dos Santos Dias (DFT/UFV), Rafael Macedo de Oliveira e Eduardo Euclides de Lima e Borges (DEF/UFV) pela parceria, amizade, auxílio e ensinamentos essenciais para a construção desta tese.

Ao professor Fernando Luiz Finger (DFT/UFV) por disponibilizar a estrutura necessária para as análises bioquímicas.

Aos técnicos de laboratório José Custódio, Wander Pereira, José Mauricio, Geraldo e José Mauro pela constante disponibilidade.

Aos meus grandes amigos Paulo César Hilst, Manuel Zavala León e André Dantas de Medeiros pela enorme ajuda na condução dos experimentos e análises.

A todos os demais amigos e estagiários do Grupo de Estudos em Sementes (GSEm) pela ajuda e excelente convivência durante estes anos.

À minha esposa Fernanda Vieira Leite, pelo amor e companheirismo dos últimos oito anos.

Aos meus pais Antônio e Maria Rita, irmã Karoline, cunhado Gustavo e sobrinhos Felipe e Pedro pelo amor, amizade e incentivo.

Aos meus sogros Domingos e Leonêza e cunhado Rodrigo, pelo constante apoio.

A todos os demais amigos e familiares, que contribuíram na minha caminhada.

Muito obrigado!

RESUMO

PINHEIRO, Daniel Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Deterioração por umidade na pré-colheita de sementes de soja: alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientadores: Felipe Lopes da Silva e Laércio Junio da Silva.

A soja é uma das culturas mais importantes do agronegócio mundial e cresce a demanda de sementes de alta qualidade. A deterioração por umidade é um dos fatores que mais afeta a qualidade das sementes e a avaliação deste fator com base em aspectos fisiológicos, bioquímicos e físicos pode ajudar a elucidar estes processos. O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas em sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase pré-colheita. Seis cultivares de soja (BMX APOLO, BMX 6563, NS 5959, NA 5909, BMX POTÊNCIA e TMG 1175) foram produzidas em casa de vegetação e submetidas à deterioração por umidade por meio de um sistema de precipitação, aplicando-se 0; 60 (30+30); 120 (60+60) e 180 (90+90) mm de precipitação quando as plantas atingiram o estágio R8. Após a colheita, as sementes foram avaliadas quanto à germinação, vigor, estresse oxidativo, metabolismo proteico e teste de raios X. A deterioração causou reduções de até 30 pontos percentuais na germinação, além de reduções no vigor, atividade de enzimas antioxidativas e teor de proteínas, principalmente nos maiores níveis de precipitação. Observou-se também a deterioração por umidade na fase de pré-colheita ocasionou acúmulos significativos de peróxido de hidrogênio, malonaldeído e atividade da protease, caracterizando de maneira geral, o estresse oxidativo. Com exceção dos danos por umidade que foram altamente correlacionados com a qualidade fisiológica, a densidade foi pouco alterada pela deterioração. Em geral, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA foram mais suscetíveis e NA 5909 e TMG 1175 mais tolerantes à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.

Palavras-chave: Germinação. *Glycine max*. Potencial fisiológico. Vigor.

ABSTRACT

PINHEIRO, Daniel Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Deterioration by humidity in preharvest of soybean seeds: physical, physiological and biochemical changes.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisers: Felipe Lopes da Silva and Laércio Junio da Silva.

Soybean is one of the most important agribusiness crops in the world and the demand for high-quality seeds is growing up. Deterioration by humidity is one of the factors that most affect seed quality and the evaluation of this factor based on physiological, biochemical and physical aspects can help to elucidate these processes. The aim of this work was to evaluate the physiological, biochemical and physical alterations of soybean seeds submitted to deterioration by humidity in pre harvest stage. Six soybean cultivars (BMX APOLO, BMX 6563, NS 5959, NA 5909, BMX POTÊNCIA and TMG 1175) were grown in a greenhouse and subjected to moisture deterioration through a precipitation system, applying 0; 60 (30 + 30); 120 (60 + 60) and 180 (90 + 90) mm of precipitation when the plants reached the R8 stage. After harvest, the seeds were evaluated for germination, vigor, oxidative stress, protein metabolism and X-ray test. The deterioration caused reductions up to 30 percentage points in germination, in addition to reductions in vigor, antioxidant enzyme activity and protein content, especially at the highest levels of precipitation. The deterioration in the preharvest phase also caused significant accumulation of hydrogen peroxide, malonaldehyde and protease activity, characterizing the oxidative stress. Except for moisture damage that was highly correlated with physiological quality, density was little changed by deterioration. In general, the cultivars BMX 6563 and BMX POTÊNCIA were more susceptible and NA 5909 and TMG 1175 more tolerant to deterioration by humidity in pre harvest phase.

Keywords: Germination. *Glycine max.* Physiological potential. Vigor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

- Figura 1 Ilustrações do experimento em casa de vegetação. Semeadura (A), manutenção de duas plantas por vaso (B), distribuição dos vasos nas bancadas em diferentes fases do desenvolvimento (C, D e E), plantas no estágio R8 (F). Fotos: Daniel T. Pinheiro.....26
- Figura 2 Microaspersores Agrojet NA1 utilizados no sistema de precipitação simulada (A e B). Fotos: Daniel T. Pinheiro.....27
- Figura 3 Sistema de precipitação instalado sob as bancadas. Reservatório, tubulação e microsaspersores (A); bomba (B). Fotos: Daniel T. Pinheiro.....28
- Figura 4 Vagens de soja úmidas no estágio R8 após a aplicação das precipitações simuladas. Fotos: Daniel T. Pinheiro.....29
- Figura 5 Dados diários de temperatura (A) e umidade relativa do ar (B) da casa de vegetação durante o período de aplicação dos tratamentos.....29
- Figura 6 Padrão de plântulas normais adotado no teste de germinação. Plântulas bem desenvolvidas, com raízes secundárias e boa relação parte aérea/raiz. Fotos: Daniel T. Pinheiro.....31
- Figura 7 Padrão de plântulas anormais adotado no teste de germinação. Hipocótilo e sistema radicular pouco desenvolvidos (A e E). Ausência de raiz e hipocótilo atrofiado (B). Geotropismo negativo do sistema radicular e raízes pouco desenvolvidas (C e G). Sistema radicular pouco desenvolvido (D e F). Fotos: Daniel T. Pinheiro.....31
- Figura 8 Grau de umidade de sementes e vagens de soja, cultivares BMX 6563 (A e B), BMX APOLO (C e D) e BMX POTÊNCIA (E e F) submetidas a diferentes níveis de precipitação.....36
- Figura 9 Grau de umidade de sementes e vagens de soja, cultivares NA 5909 (A e B), NS 5959 (C e D) e TMG 1175 (E e F); submetidas a diferentes níveis de precipitação.....37

Figura 10 Enrugamento do tegumento de sementes de soja causado pela umidade. Sementes do tratamento controle (A e B) e sementes submetidas à deterioração por umidade (C e D). Fotos: Daniel T. Pinheiro.....	40
Figura 11 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	41
Figura 12 Atividade da catalase (CAT) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade...	42
Figura 13 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	43
Figura 14 Atividade da peroxidase (POX) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	44
Figura 15 Acúmulo de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	45
Figura 16 Acúmulo de malonaldeído (MDA) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	47

Figura 17 Teor de proteínas em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúsculas entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.49

Figura 18 Atividade da protease em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade...50

Figura 19 Análise de componentes principais (PCA) obtida pela combinação linear das variáveis fisiológicas (germinação e vigor) e análises bioquímicas em seis cultivares de soja, submetidas à diferentes níveis de precipitação. Diagrama de ordenação (A) e círculo de correlação (B). PC1 – Componente principal 1; PC2 – Componente principal 2; G - Germinação; EC – condutividade elétrica; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; APX – ascorbato peroxidase; POX – peroxidase; PEROXIDE – Peróxido de hidrogênio (H₂O₂); MDA – malonaldeído; PROT – Proteínas; PROASE – Protease.....52

Capítulo II

Figura 20 Emergência de plântulas de soja em casa de vegetação. A) Plântulas recém-emergidas B) Plântulas mais desenvolvidas. Setas: padrão de plântulas normais adotado. Fotos: Daniel Teixeira Pinheiro.....69

Figura 21 Imagens de raios X em escala de cinza de sementes de soja com ausência (A) e presença (B) de dano por umidade. Seta: Enrugamento do tegumento caracterizando o dano por umidade.....71

Figura 22 Viabilidade (A) e danos por umidade (B) avaliados pelo teste de tetrazólio em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúsculas entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....75

Figura 23 Correlação de Pearson obtida entre a viabilidade, danos por umidade e e viabilidade das sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. ^{ns},*: não significativo e significativo a 5% pelo teste t (p < 0,05), respectivamente.....76

Figura 24 Intensidade da deterioração avaliada por meio do teste de tetrazólio. Fotos: Paulo Hilst. Tratamento da imagem: Daniel Pinheiro.....77

Figura 25 Representação de diferentes níveis de dano por umidade em sementes de soja por meio de imagens de raios X em escala de cinza (A) e representação da densidade de tecido em escala de cores (B).....80

Figura 26 Análise de componentes principais (PCA) obtida pela combinação linear das variáveis fisiológicas (germinação e vigor), bioquímicas (proteínas e protease) e físicas (raios X) em seis cultivares de soja, submetidas a diferentes níveis de precipitação. Diagrama de ordenação (A) e círculo de correlação (B), PC1 – Componente principal 1; PC2 – Componente principal 2; REL. DENS. = Densidade Relativa; INT. DENS. = Densidade Integrada; MOIST.DAMAGE = Dano por umidade; SL = Comprimento de parte aérea; RL = Comprimento de raiz; TL = comprimento total; UI = Índice de uniformidade; CVI = Índice de vigor corrigido; FGC – Primeira contagem de germinação; AA – Envelhecimento acelerado; EMERG – Emergência; ESI – Índice de Velocidade de Emergência; TZ – Teste de tetrazólio.....83

Figura 27 Correlação de Pearson (r) entre todas as variáveis analisadas seis cultivares de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. REL. DENS. = Densidade Relativa; INT. DENS. = Densidade Integrada; MOIST.DAMAGE = Dano por umidade; SL = Comprimento de parte aérea; RL = Comprimento de raiz; TL = comprimento total; UI = Índice de uniformidade; CVI = Índice de vigor corrigido; FGC = Primeira contagem de germinação; AA = Envelhecimento acelerado; EMERG – Emergência; ESI – Índice de Velocidade de Emergência; TZ – Teste de tetrazólio. Quadrantes marcados com “X” representam correlação não significativa a 5% de probabilidade pelo teste t.....86

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1 Resultados da análise granulométrica e classificação textural do solo utilizado no experimento.....25
- Tabela 2 Valores para pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5. P - K - Fe - Zn -Mn - Cu - Extrator Mehlich-1 Ca^{2+} - Mg^{2+} - Al^{3+} - Extrator: KCl - 1 mol/L. H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0 SB = Soma de Bases Trocáveis. t - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva. T - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0. V: Índice de saturação de bases. m: Índice de saturação de alumínio. m - Índice de saturação por alumínio. MO (Mat. Orgânica) = C.Org x 1,724 -Walkley-Black. S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético.....25
- Tabela 3 Principais características das cultivares de soja de hábito de crescimento indeterminado utilizadas.....26
- Tabela 4 Germinação e condutividade elétrica de sementes de seis cultivares de soja, submetidas a diferentes níveis de precipitação.....38
- Tabela 5 Cargas dos vetores, autovalores e proporção de variação associada a cinco componentes principais (PC) da PCA de 10 variáveis associadas à qualidade fisiológica e estresse oxidativo em sementes de soja submetidas à diferentes níveis de precipitação.....54
- Tabela 6 Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), condutividade elétrica (CE), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PERÓXIDO), malonaldeído (MDA), proteínas (PROT) e protease (PROASE).....55

Capítulo II

- Tabela 7 Valores médios obtidos nos testes de primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) de seis cultivares de soja, submetidas a diferentes níveis de precipitação.....73

Tabela 8 Densidade relativa, densidade integrada e danos por umidade obtidas por meio do teste de raios X em sementes de seis cultivares de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação.....78

Tabela 9 Comprimento da parte aérea, raízes e total; índice de uniformidade (IU) e índice de vigor corrigido (IVC) obtidos através da análise computadorizada de imagens de plântulas..81

Tabela 10 Cargas dos vetores, autovalores e proporção de variação associada a cinco componentes principais (PC) da PCA de 13 variáveis associadas à qualidade fisiológica, análises bioquímicas e físicas em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação.....85

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
Capítulo I - Estresse oxidativo, metabolismo proteico e qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase pré-colheita	
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
Etapa I.....	24
Instalação e condução do experimento em casa de vegetação.....	24
Definição e aplicação dos tratamentos.....	27
Colheita.....	29
Etapa II – Análises de laboratório.....	30
Determinação do grau de umidade.....	30
Teste de germinação.....	30
Condutividade elétrica.....	31
Determinação da atividade de enzimas antioxidativas e proteínas.....	32
Determinação de proteínas totais.....	33
Atividade da protease.....	33
Quantificação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	34
Peroxidação de lipídeos.....	34
Delineamento experimental e análise estatística.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
Capítulo II - Vigor e alterações físicas de sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase de pré-colheita	
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
INTRODUÇÃO.....	67

MATERIAL E MÉTODOS	68
I. Avaliações fisiológicas	68
Primeira contagem de germinação	68
Envelhecimento acelerado.....	69
Emergência de plântulas.....	69
Teste de tetrazólio	69
Análise computadorizada de imagens de plântulas (ImageJ®).....	70
II. Avaliações físicas	70
Teste de raios X.....	70
Delineamento experimental e análise estatística.....	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma das mais importantes culturas agrícolas do mundo, com uma produção global que se aproxima de 350 milhões de toneladas (USDA, 2018). O Brasil é o segundo maior produtor de soja a nível mundial, com uma produção de aproximadamente 10 milhões de toneladas em uma área total de 33,7 milhões de hectares (BRASIL, 2017). Devido a essa importância, é fundamental a produção e a utilização de sementes de qualidade, que são a base para a obtenção de elevados níveis de produtividade (BEWLEY *et al.*, 2013; MARCOS FILHO, 2015; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

A máxima qualidade das sementes de soja no campo é alcançada na maturidade fisiológica quando as plantas atingem o estágio reprodutivo R7 (FEHR; CAVINESS, 1977). Todavia, em razão do elevado teor de água presente nas sementes neste estágio, estas devem ser colhidas em R8, quando 95% das vagens apresentam coloração típica de vagem madura e o grau de umidade das sementes está em torno de 14% (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016). Após a maturidade fisiológica, a permanência da cultura no campo pode favorecer o processo de deterioração devido a fatores intrínsecos das sementes, como o genótipo e a composição química ou ainda devido a fatores ambientais como insetos, microrganismos, e principalmente, altas temperaturas e umidade (VIEIRA *et al.*, 1982; FARHADI *et al.*, 2012; KOCSY, 2015; FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

Devido sua natureza higroscópica, a umidade é o fator mais favorece a deterioração das sementes, fazendo com que possam absorver ou perder água para o ambiente e causar variações no grau de umidade e afetar a qualidade das mesmas, principalmente após a maturidade fisiológica (SHELAR, 2008; MALIK, 2013; MARCOS FILHO, 2015). Neste sentido, condições de alta umidade relativa do ambiente podem contribuir para a deterioração de sementes no campo, principalmente em áreas de instabilidade de precipitação, acarretando perdas em níveis elevados aos produtores, além de dificultar a colheita nas áreas úmidas (PITOL, 2016).

Castro *et al.* (2016) avaliaram a deterioração de sementes de cinco cultivares de soja por meio da aplicação de precipitações simuladas (30 mm) no estágio R8 e observaram que os danos causados pela umidade na fase de pré-colheita foram baixos. Estes autores atribuíram estes resultados à baixa absorção de água pelas sementes somada à rápida perda de umidade pelas vagens. Desta forma, a aplicação de diferentes níveis de água de maneira gradual e o monitoramento da umidade de vagens e sementes, pode permitir melhor observação dos danos

causados pela deterioração. Estes danos são caracterizados pelo enrugamento e/ou rompimento da superfície do tegumento e geralmente estão relacionados à redução da germinação e do vigor de sementes de soja (FORTI *et al.*, 2013; FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

Neste contexto, a utilização de análises físicas relacionadas à germinação e vigor de sementes oferece vantagens que podem permitir o uso em altas escalas (ARAÚJO *et al.*, 2016). Uma das principais técnicas relacionadas a análises físicas utilizadas em sementes é a técnica de imagem por raios X, que tem sido utilizada com eficiência na avaliação de danos causados por insetos, modificações em reservas dentre outros (PUPIM *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2012; NIELSEN; DAMKJÆR; FEIDENHANS'L, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2018). Vale ressaltar que apesar de ser um teste não destrutível, rápido e simples (SEVERIANO *et al.*, 2018a), apresenta limitações como a subjetividade de interpretação, morosidade e necessidade de mão-de-obra qualificada. Neste contexto, o uso do software ImageJ[®] busca superar essas limitações e tem sido utilizado como ferramenta para análise semi-automatizada de imagens radiográficas de sementes de várias espécies (ABUD; CICERO; GOMES JUNIOR, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2018; NORONHA; DE MEDEIROS; PEREIRA, 2018). Em soja, Forti *et al.* (2013) observaram, por meio do teste de raios X, que as sementes com danos causados pela umidade apresentaram qualidade fisiológica inferior quando comparadas às sementes sem danos. Estes autores também concluíram que os testes de raios X podem ser usados com eficiência para analisar os efeitos da deterioração por umidade. Contudo, estudos que avaliam análises automatizadas como a densidade tecidual em sementes de soja submetidas à deterioração são escassos.

Outro fator importante a ser considerado é que, apesar de muitos estudos, os mecanismos responsáveis pela deterioração das sementes ainda não estão totalmente elucidados. A perda de qualidade de sementes deterioradas é desencadeada por várias reações que danificam biomoléculas por meio de reações bioquímicas. Neste contexto, a produção e acúmulo progressivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando em níveis acima dos basais e em desequilíbrio com os mecanismos antioxidativos, caracterizam o estresse oxidativo (FOYER; NOCTOR, 2005; KIBINZA *et al.*, 2011; MITTLER, 2017). Dentre os principais danos que a deterioração pode causar em sementes por meio do estresse oxidativo, estão a peroxidação e a degradação de lipídeos de membranas, oxidação de proteínas, danos a ácidos nucleicos, inibição enzimática e em níveis mais elevados, a morte celular (MITTLER, 2002; MISHRA; JHA; DUBEY, 2011; AHMAD *et al.*, 2012; MALIK, 2013; KUMAR *et al.*,

2015). Em sementes de ervilha, foi observada maior produção do radical ânion superóxido (O_2^-) devido ao aumento da temperatura e consequente redução do vigor das sementes (KRANNER *et al.*, 2010). De maneira semelhante, Wang *et al.* (2012) observaram aumento da produção de EROs, da peroxidação lipídica e atividade da enzima catalase em sementes de soja sob condições de alta temperatura e umidade. Desta forma, por ser caracterizado pelo desequilíbrio entre as EROs e os mecanismos antioxidativos, a avaliação do estresse oxidativo por meio da avaliação da atividade de enzimas antioxidativas e do conteúdo de peróxido de hidrogênio, sendo estas uma das principais EROs produzidas, é interessante na compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de deterioração por umidade.

De maneira geral, poucos estudos relacionam o potencial fisiológico, alterações bioquímicas (relacionadas ou não ao estresse oxidativo) e físicas em sementes de soja submetidas à deterioração por umidade. Além disso, por haver grande variabilidade genética entre as cultivares e genótipos de soja para as características qualidade de sementes e tolerância à deterioração, aprimorar estudos nessa linha de pesquisa é importante em função da diversidade de condições climáticas durante o processo de produção de sementes.

Por fim, é importante para as empresas de sementes e para os programas de melhoramento genético selecionar materiais tolerantes à deterioração, principalmente na fase de pré-colheita. Portanto, objetivou-se com o trabalho investigar as respostas fisiológicas, bioquímicas e físicas em sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, Hayna Fernandes; CICERO, Silvio Moure; GOMES JUNIOR, Francisco Guilhien. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy** v. 40, n. 1, p. 1–9 , 2018.

AHMAD, P. *et al.* Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY** v. 11, n. 11, p. 2694–2703 , 7 fev. 2012. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2012/7Feb/Ahmad et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2012/7Feb/Ahmad%20et%20al.htm)>.

ARAÚJO, Susana de Sousa *et al.* Physical Methods for Seed Invigoration: Advantages and Challenges in Seed Technology. **Frontiers in Plant Science** v. 7 , 12 maio 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00646/abstract>>.

BEWLEY, J.D., BRADFORD, K.J., HILLHORST, H.W.M, NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd. ed. New York: Springer Science + Business Media, 2013. 407 p. .

BRASIL. **Safra de grãos 2016/2017 deve chegar a 227,9 milhões de toneladas**. [S.l: s.n.], 2017.

CASTRO, Elisa de Melo *et al.* Physiological quality of soybean seeds produced under artificial rain in the pre-harvesting period. **Journal of Seed Science** v. 38, n. 1, p. 14–21 , 8 mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372016000100014&lng=en&tlng=en>.

DE NORONHA, Bruno Gomes; DE MEDEIROS, André Dantas; PEREIRA, Márcio Dias. *Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de moringa oleífera lam*. **Ciencia Florestal**. [S.l: s.n.] , abr. 2018

FARHADI, R. *et al.* The effect of artificial ageing on germination components and seedling growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds. **Journal of Agriculture and Food Technology** v. 2, n. 4, p. 69–72 , 2012.

FEHR, Walter R.; CAVINESS, Charles E. Stages of Soybean Development. **Special report** v. 80, n. March, p. 11 , 1977.1111111111.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany** v. 67, n. 3, p. 567–591 , 2016.1460-2431 (Electronic) 0022-0957 (Linking).

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, , v.28, p.1056–1071, 2005. **Plant Cell Environment** v. 28, p. 1056–1071 , 2005.

FRANÇA-NETO, J. B. *et al.* **Tecnologia da produção de semente de soja de alta**

qualidade. Londrina: EMBRAPA SOJA, 2016. 82 p. .

JEEVAN KUMAR, S. P. *et al.* Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany** v. 116, n. 4, p. 663–668 , set. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcv098>>.

KIBINZA, Serge *et al.* Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science** v. 181, n. 3, p. 309–315 , set. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016894521100166X>>.

KOCSY, GÁBOR. Die or survive? Redox changes as seed viability markers. **Plant, Cell & Environment** v. 38, n. 6, p. 1008–1010 , jun. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pce.12515>>.

KRANNER, Ilse *et al.* Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology** v. 167, n. 10, p. 805–811 , jul. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161710000945>>.

MALIK, C.P. Seed deterioration: a review. 2: 374-85. 2013. **International Journal of Life Science Botany and Pharmacy Research** v. 2, n. 3, p. 374–385 , 2013.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. [S.l.]: Ed. Abrates, 2015. 659 p. .

MEDEIROS, A D *et al.* Parameters based on X-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia** v. 42, n. 6, p. xxx–xxx , 2018.

MENEZES, Nilson Lemos De *et al.* Using X rays to evaluate fissures in rice seeds dried artificially. **Revista Brasileira de Sementes** v. 34, n. 1, p. 70–77 , 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222012000100009&lng=en&tlng=en>.

MISHRA, Shruti; JHA, A. B.; DUBEY, R. S. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma** v. 248, n. 3, p. 565–577 , 21 jul. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00709-010-0210-0>>.

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** v. 7, n. 9, p. 405–410 , 1 set. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138502023129>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

MITTLER, Ron. ROS Are Good. **Trends in Plant Science** v. 22, n. 1, p. 11–19 , jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138516301121>>.

NIELSEN, Mikkel Schou; DAMKJÆR, Kasper Borg; FEIDENHANS'L, Robert. Quantitative in-situ monitoring of germinating barley seeds using X-ray dark-field radiography. **Journal of Food Engineering** v. 198, p. 98–104 , 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877416304101>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

PITOL, C. Tolerância da soja à chuva pós-maturação. In: MELOTTO, A. M. *et al.* (Orgs.). . **SOJA: Tecnologia & Produção**. Curitiba: Midiografi, 2016. p. 190.

PUPIM, T. L. *et al.* Adequação do teste de raios x para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes** v. 30, n. 2, p. 28–32 , 2008.

SEVERIANO, Rogerio Luciano *et al.* X-ray test on passion fruit seeds submitted to different aryl removal methods. **Comunicata Scientiae** v. 9, n. 3, p. 356–362 , 4 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.comunicatascientiae.com.br/comunicata/article/view/2706>>.

SHABAN, Morad. Review on physiological aspects of seed deterioration. **international journal of agriculture and crop sciences IJACS** v. 11, n. 6, p. 627–631 , 2013. Disponível em: <www.ijagcs.com>.

SHELAR, V.R. Role of mechanical damage in deterioration of soybean seed quality during storage- a review. **Agricultural Review** v. 29, p. 177–184 , 2008.

USDA. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. [S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>.

VICTOR AUGUSTO FORTI *et al.* Weathering Damage in Soybean Seeds: Assessment, Seed Anatomy and Seed Physiological Potential. **Seed Technology** v. 2, n. 35, p. 213–224 , 2013.

VIEIRA, R.D. *et al.* Efeito do retardamento da colheita, sobre a qualidade de sementes de soja cv “UFV-2”. **Revista Brasileira de Sementes** v. 4, n. 2, p. 9–22 , 1982.

WANG, Liqun *et al.* Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics** v. 75, n. 7, p. 2109–2127 , abr. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391912000243>>.

RESUMO

PINHEIRO, Daniel Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Capítulo I. Estresse oxidativo, metabolismo proteico e potencial fisiológico de sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientadores: Felipe Lopes da Silva e Laércio Junio da Silva.

A deterioração por umidade acarreta em diversas alterações bioquímicas e é um dos principais fatores que afetam a qualidade das sementes de soja, sendo um problema frequente em áreas com excesso de precipitação. O objetivo do trabalho foi avaliar o estresse oxidativo, o metabolismo proteico e a qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase pré-colheita. Seis cultivares de soja (BMX APOLO, BMX 6563, NS 5959, NA 5909, BMX POTÊNCIA e TMG 1175) foram produzidas em casa de vegetação e submetidas à deterioração por umidade por meio de um sistema de precipitação, aplicando-se 0; 60 (30+30); 120 (60+60) e 180 (90+90) mm de precipitação quando as plantas atingiram o estágio R8. Após a colheita, as sementes foram avaliadas quanto ao grau de umidade, germinação, vigor, teor de proteínas, atividade da protease, atividade de enzimas antioxidativas (SOD, CAT, APX, POX), peróxido de hidrogênio e malonaldeído (MDA). O delineamento foi inteiramente casualizado e após a análise de variância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, além de análise multivariada. O intervalo de 72 h entre as aplicações permitiu oscilação da umidade das sementes, promovendo redução na germinação de até 30 pontos percentuais, além do vigor de todas as cultivares analisadas, principalmente nos maiores níveis de precipitação (120 e 180 mm). O teor de proteínas foi reduzido significativamente com a deterioração por umidade ao mesmo tempo em que houve aumento na atividade da protease. Houve redução na atividade das enzimas antioxidativas com a deterioração por umidade, principalmente CAT, APX e POX. O acúmulo do peróxido de hidrogênio e do MDA reforçaram a ocorrência do estresse oxidativo nas sementes, causando redução significativa na germinação e no vigor. De maneira geral, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA mais susceptíveis. Por outro lado, NA 5909 e TMG 1175 mais tolerantes à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.

Palavras-chave: Enzimas antioxidativas. Espécies reativas de oxigênio. Germinação. *Glycine max*. Proteínas. Vigor.

ABSTRACT

PINHEIRO, Daniel Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Chapter I. Oxidative stress, proteic metabolism and physiological potential of soybean seeds under deterioration by humidity in preharvest stage.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisers: Felipe Lopes da Silva and Laércio Junio da Silva.

Deterioration by humidity causes several biochemical changes and is one of the main factors that affect the quality of soybean seeds, being a frequent problem in areas with excessive precipitation. The aim of this work was to evaluate the oxidative stress, protein metabolism and physiological quality of soybean seeds subjected to deterioration by humidity in the pre harvest stage. Six soybean cultivars (BMX APOLO, BMX 6563, NS 5959, NA 5909, BMX POTÊNCIA and TMG 1175) were produced in a greenhouse and submitted to deterioration through a precipitation system, applying 0; 60 (30 + 30); 120 (60 + 60) and 180 (90 + 90) mm of precipitation when the plants reached the R8 stage. After harvest, seeds were evaluated for humidity, germination, vigor, protein content, protease activity, antioxidative enzymes (SOD, CAT, APX, POX), hydrogen peroxide and malondialdehyde. The design was a completely randomized and after analysis of variance the means were compared by Tukey test and multivariate analysis. The 72 h interval between applications allowed seed humidity oscillation, promoting reduction in germination of up to 30 percentage points, in addition to the vigor of all cultivars analyzed, especially at higher precipitation levels (120 and 180 mm). Protein content was significantly reduced with deterioration at the same time as protease activity increased. Antioxidant enzyme activity decreased with deterioration by humidity, mainly CAT, APX and POX. Hydrogen peroxide and MDA accumulation reinforced the occurrence of oxidative stress in the seeds, causing significant reduction in germination and vigor. In general, the most susceptible cultivars were BMX 6563 and BMX POTÊNCIA. On the other hand NA 5909 and TMG 1175 more tolerant to moisture deterioration in the pre harvest phase.

Keywords: Oxidative enzymes. Oxygen reactive species. Germination. *Glycine max*. Proteins. Vigor.

INTRODUÇÃO

A deterioração é um dos principais processos que afetam a qualidade de sementes, resultando na redução da germinação, do vigor e da viabilidade das mesmas (KHAN *et al.*, 2017). Apesar de considerado um processo natural, diversos fatores intrínsecos e do ambiente podem contribuir para a maior velocidade e intensidade da deterioração em sementes (FARHADI *et al.*, 2012; MALIK, 2013; SHABAN, 2013; FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

Devido suas características químicas e morfológicas, sementes de soja (*Glycine max* L.) são bastante sensíveis à ação de fatores do ambiente entre a maturidade fisiológica e a colheita. Neste período, as sementes estão sujeitas à exposição de ciclos alternados de condições úmidas e secas do ambiente, favorecendo a ocorrência de danos por umidade (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016). Desta forma, a deterioração por umidade em campo tem sido relatada como um dos mais relevantes fatores que levam à redução da qualidade das sementes de soja, sobretudo em regiões tropicais com níveis elevados de precipitação, causando perdas aos produtores e dificultando a colheita nas áreas úmidas (BHATIA *et al.*, 2010; FORTI *et al.*, 2013; PITOL, 2016; ZUFFO *et al.*, 2017).

As bases fisiológicas e bioquímicas do processo de deterioração de sementes vêm sendo bastante estudadas. Trata-se de um processo degenerativo provocado principalmente pela produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio do estresse oxidativo (KUMAR *et al.*, 2015). As EROs são subprodutos naturais do metabolismo formadas a partir da redução incompleta ou parcial do oxigênio, levando à formação de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e outras (ROYCHOUDHURY *et al.*, 2017; MITTLER, 2002; PARIDA; DAS, 2005; RAY; HUANG; TSUJI, 2012). De maneira geral, os principais danos causados pelo estresse oxidativo são a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, danos a ácidos nucleicos, inibição enzimática e morte celular (MITTLER, 2002; MISHRA; JHA; DUBEY, 2011; SHARMA *et al.*, 2012; ROYCHOUDHURY *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidativos, que por sua vez são regulados para neutralizar o excesso de EROs (DONÀ *et al.*, 2013; MITTLER, 2017; NOCTOR; REICHELDE; FOYER, 2018). Neste contexto, o sistema enzimático antioxidativo exerce extrema importância em situações de estresse oxidativo por meio da atuação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), além de outras

que desempenham papel crucial na neutralização das EROs (CHEN; ZHANG; SHEN, 2011; DAS; CHOUDHURY, 2014; SHARMA *et al.*, 2012). Cardoso *et al.* (2015) avaliaram parâmetros antioxidativos em sementes de soja submetidas à deterioração constatando alto nível de superóxidos, além da redução da atividade da SOD em sementes de baixa qualidade fisiológica. De maneira semelhante, Zuffo *et al.* (2017) observaram que o atraso na colheita ocasionou redução da germinação e vigor de sementes de soja, que por sua vez foi relacionada à menor atividade antioxidativa.

Durante a maturação das sementes, macromoléculas como carboidratos, lipídeos e proteínas são acumuladas para posteriormente serem utilizadas como fonte de energia para a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas (ERBAŞ *et al.*, 2016). Com a absorção de água pela semente, inicia-se o processo de germinação e a mobilização destas reservas, acompanhados do aumento nas taxas respiratórias. Desta forma, a deterioração está relacionada ao aumento excessivo das taxas respiratórias, que por sua vez contribui para maior degradação e menor mobilização destas reservas para o eixo embrionário por meio do estresse oxidativo (BEWLEY *et al.*, 2013; VERMA *et al.*, 2015; WOJTYLA *et al.*, 2016).

Dentre as principais reservas energéticas das sementes, as proteínas são consideradas essenciais para o crescimento do eixo embrionário e formação da plântula (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016; VERMA *et al.*, 2015). Em sementes de soja, foram identificadas 42 proteínas sensíveis ao processo de deterioração por temperatura e umidade, das quais 12 foram relacionadas principalmente ao metabolismo de aminoácidos e biossíntese de outras proteínas (WANG *et al.*, 2012). Foi observado também em sementes de soja, que proteínas relacionadas ao metabolismo primário foram degradadas e novas proteínas formadas, indicando ajustes do metabolismo proteico em repostas à deterioração (MIN *et al.*, 2017). A deterioração também afeta o metabolismo de sementes de trigo por meio de mudanças proteômicas importantes que contribuem para a redução da germinação de vigor (LV *et al.*, 2016). Já em sementes de colza, foi observada a expressão de 113 novas proteínas durante a germinação e desenvolvimento de plântulas (GU *et al.*, 2016).

Desta forma, os mecanismos de síntese e degradação proteica em células vegetais envolvem componentes complexos em diferentes níveis, como vias de transdução de sinais, regulação da transcrição, ciclo celular, mecanismos de defesa, homeostase celular, além de outros (KATO; SAKAMOTO, 2018; WANG *et al.*, 2012). Neste contexto, as proteases constituem um amplo grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas a nível celular (GONZÁLEZ-RÁBADE *et al.*, 2011) e, devido a essa ampla variação de classes e

constituição, estas enzimas estão envolvidas em vários estágios de desenvolvimento, como germinação, biogênese celular, senescência e morte celular programada (Palma et al., 2002). Em estudos recentes com sementes, as proteases são citadas como essenciais na mobilização de proteínas de armazenamento e outros processos celulares durante o processo germinativo (WANG *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2018; WILSON; TAN-WILSON, 2018; ÖZACAR et al., 2019;). Portanto, a avaliação do metabolismo proteico por meio do teor de proteínas e atividade de proteases pode auxiliar ainda mais na compreensão dos mecanismos envolvidos na redução da qualidade das sementes submetidas à deterioração por umidade.

Além dos fatores do ambiente, o genótipo pode influenciar na resposta das sementes de soja à deterioração. Bhatia *et al.* (2010) observaram diferenças genotípicas significativas nas respostas de sementes de soja submetidas ao processo de deterioração no campo. Huth *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da deterioração por umidade na peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidativas de sementes de soja e observaram diferentes níveis de suscetibilidade, dependendo da cultivar analisada. Castro *et al.* (2016) avaliaram a deterioração por umidade em sementes de cinco cultivares de soja por meio da aplicação de precipitação simulada (30 mm) no estágio R8 e observaram que os danos causados pela umidade na fase de pré-colheita foram baixos. Estes resultados foram atribuídos à baixa absorção de água pelas sementes somada à rápida perda de umidade pelas vagens. Contudo, estudos envolvendo a aplicação de maiores níveis de precipitação e de maneira gradual podem ser interessantes para elucidar melhor os efeitos da deterioração em campo na qualidade das sementes, principalmente buscando estabelecer relações entre o estresse oxidativo e componentes da qualidade fisiológica das sementes de diferentes genótipos.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica, o metabolismo proteico e a resposta oxidativa de sementes de diferentes cultivares de soja submetidas à deterioração por umidade na fase pré-colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil entre os anos de 2017 e 2018, em duas etapas.

Etapa I

Instalação e condução do experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos com capacidade de 3,5 dm³ contendo solo. As propriedades físicas e químicas do solo, obtidas após a análise de solo, encontram-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Resultados da análise granulométrica e classificação textural do solo utilizado no experimento.

Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classificação textural
kg.kg ⁻¹				
0,398	0,091	0,087	0,424	Argilo-arenosa

Tabela 2 - Valores para pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5. P - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich-1 Ca²⁺ - Mg²⁺ - Al³⁺ - Extrator: KCl - 1 mol/L. H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0 SB = Soma de Bases Trocáveis. t - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva. T - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0. V: Índice de saturação de bases. m: Índice de saturação de alumínio. m - Índice de saturação por alumínio. MO (Mat. Orgânica) = C.Org x 1,724 -Walkley-Black. S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético.

pH	P	K	Ca ⁺²	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	SB	t	T
(H ₂ O)	mg/dm ³			cmol _c /dm ³					
5,87	56,9	314	3,45	1,21	0	1,5	5,47	5,47	6,97
V	m	MO	P-Rem	S	B	Cu	Mn	Fe	Zn
%	dag/kg	mg/L	mg/dm ³						
78,5	0	3,06	34,6	90,4	0,47	2,71	181	52,8	4,44

Com base nas informações obtidas, foi realizada a calagem 20 dias antes do plantio com o uso de carbonato de cálcio (CaCO₃) e carbonato de magnésio (MgCO₃) na proporção 4:1, visando elevar a saturação por bases para 80%. A adubação de plantio consistiu na aplicação de 200; 350; 200; 40; 0,81; 1,33; 1,55; 3,66; 0,15 e 4,0 mg.dm⁻³ de N, P, K, S, B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn, respectivamente (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991).

Foram utilizadas seis cultivares de soja de hábito de crescimento indeterminado, com diferentes grupos de maturação (GM) e características produtivas importantes (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais características das cultivares de soja de hábito de crescimento indeterminado utilizadas.

Cultivar	Empresa	Grupo de maturação
BMX 6563	BrasMax	6,3
BMX APOLO	BrasMax	5,5
BMX POTÊNCIA	BrasMax	6,7
NA 5909	Nidera	6,2
NS 5959	Nidera	5,9
TMG 1175	TMG	7,5

A semeadura foi realizada em 20/10/2017, colocando-se seis sementes por vaso (Figura 1A). Foi realizado o desbaste no estágio V1 mantendo-se duas plantas mais vigorosas por vaso (Figura 1B). Os vasos foram distribuídos de maneira aleatória nas bancadas (Figura 1C, D e E), até as plantas atingirem o estágio R8 (Figura 1F).



Figura 1 - Ilustrações do experimento em casa de vegetação. Semeadura (A), manutenção de duas plantas por vaso (B), distribuição dos vasos nas bancadas em diferentes fases do desenvolvimento (C, D e E), plantas no estágio R8 (F). Fotos: Daniel T. Pinheiro.

A irrigação foi feita diariamente de acordo com a necessidade até o estágio R8, visando manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo (CC). Todos os demais tratamentos culturais foram realizados conforme recomendações de Sediya, Silva e Borém (2015).

Aos 30 e 45 dias após a sementeira, foi realizada a adubação de cobertura de maneira parcelada, com aplicação de 240 e 100 kg.ha⁻¹ de N e K, respectivamente.

Definição e aplicação dos tratamentos

Foi instalado um sistema de microaspersores modelo Agrojet NA1 (Figura 2) (microgotas de 40 microns, vazão de 7,14 L.h⁻¹, pressão de trabalho de 10-50 mca e precipitação horária de 3,5 mm) sobre duas bancadas vazias, visando a aplicação da precipitação simulada. O espaçamento entre os microaspersores foi de 0,5 m, totalizando 12 microaspersores por bancada.

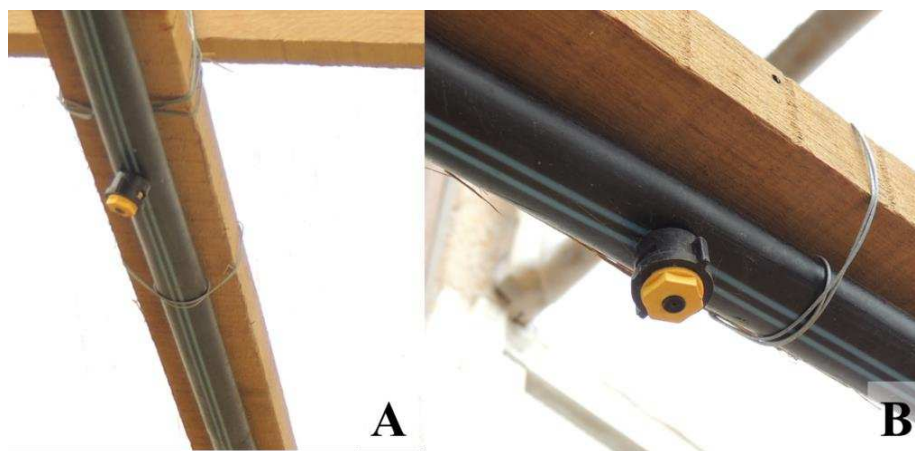


Figura 2 - Microaspersores Agrojet NA1 utilizados no sistema de precipitação simulada (A e B). Fotos: Daniel T. Pinheiro.

A água utilizada na aplicação das precipitações foi mantida em reservatório e o sistema (tubulação + microaspersores) (Figura 3A) foi alimentado com o auxílio de uma bomba modelo SOMAR SHP-35; 0,5 cv; pressão máxima de 35 mca, vazão caudal máxima de 2,1 m³.h⁻¹ e rotação de 3400 rpm (Figura 3B).



Figura 3 - Sistema de precipitação instalado sob as bancadas. Reservatório, tubulação e microsaspersores (A); bomba (B). Fotos: Daniel T. Pinheiro.

Foi realizado um teste preliminar consistindo no funcionamento do sistema durante 30 minutos e coleta da água em recipientes distribuídos aleatoriamente sobre as bancadas. Posteriormente, os volumes de água coletados nos recipientes foram medidos para cálculo do Coeficiente de Uniformidade de Christiansen (CUC) (MANTOVANI; BERNARDO; PALARETTI, 2009). O CUC calculado foi de 90,1%, estando na faixa 80 a 100%, considerada como excelente por estes autores. A partir destas definições, determinou-se que o tempo de 15 minutos de funcionamento do sistema permitia obter 20 mm de precipitação.

Para provocar o umedecimento das sementes e induzir a deterioração por umidade, foram definidos três níveis de precipitação a ser aplicados nas plantas, divididos em duas aplicações com intervalos de 72 horas entre elas: 60 mm (30+30); 120 mm (60+60) e 180 mm (90+90). Todos os tratamentos (níveis de precipitação) foram aplicados quando as plantas atingiram o estágio R8 (95% das vagens secas) (CASTRO *et al.*, 2016). Portanto, assim que as plantas atingiam R8, eram transferidas para as bancadas e submetidas aos tratamentos de precipitação (Figura 4). No tratamento controle (0 mm), não houve aplicação de precipitação simulada.



Figura 4 - Vagens de soja úmidas no estágio R8 após a aplicação das precipitações simuladas. Fotos: Daniel T. Pinheiro.

Durante o período de aplicação dos tratamentos, foram coletados dados diários de temperatura e umidade do ar do ambiente (Figura 5).

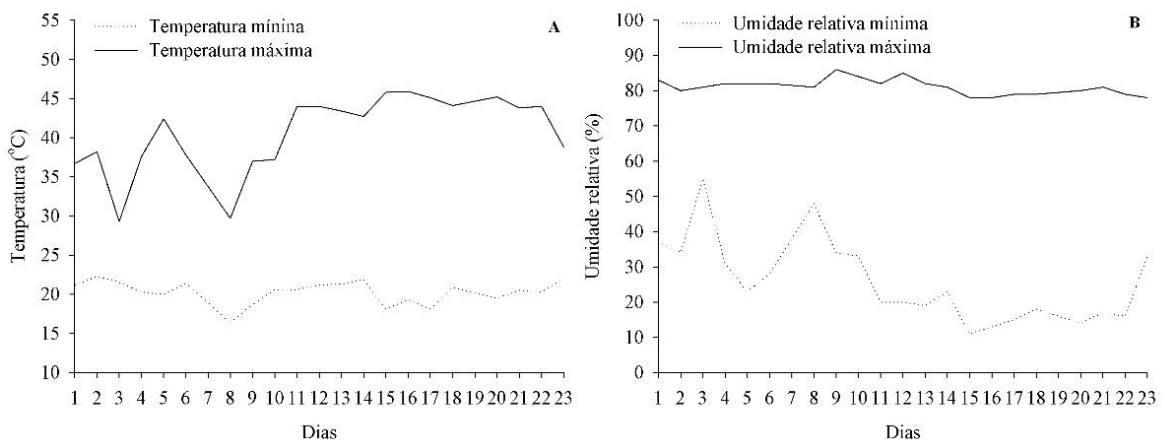


Figura 5 - Dados diários de temperatura (A) e umidade relativa do ar (B) da casa de vegetação durante o período de aplicação dos tratamentos.

Colheita

Com o objetivo de monitorar a absorção de água pelas vagens e sementes, foram feitas colheitas no estágio R8, 24 e 72 h após a aplicação das precipitações. O grau de umidade também foi avaliado no tratamento controle (0 mm).

Para todos os tratamentos, a colheita das vagens foi realizada 72 horas após a aplicação dos níveis de precipitação, exceto para o tratamento controle (0 mm), que foi colhido quando as sementes atingiram aproximadamente 15% de umidade no estágio R8. As vagens foram colhidas manualmente e separadas das sementes, as quais foram colocadas à sombra em ambiente de laboratório até atingirem o equilíbrio higroscópico.

As sementes de cada tratamento foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas às análises realizadas em laboratório.

Etapa II – Análises de laboratório

Determinação do grau de umidade

A avaliação da umidade de sementes e vagens foi realizada pelo método da estufa (105 ± 3 °C, 24 h). Foram utilizadas duas repetições de cada tratamento, conforme a metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Teste de germinação

Quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram distribuídas em rolos de papel toalha, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador a 25 °C e as avaliações efetuadas no oitavo dia após a montagem, de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais (Figuras 6 e 7).



Figura 6 - Padrão de plântulas normais adotado no teste de germinação. Plântulas bem desenvolvidas, com raízes secundárias e boa relação parte aérea/raiz. Fotos: Daniel T. Pinheiro.

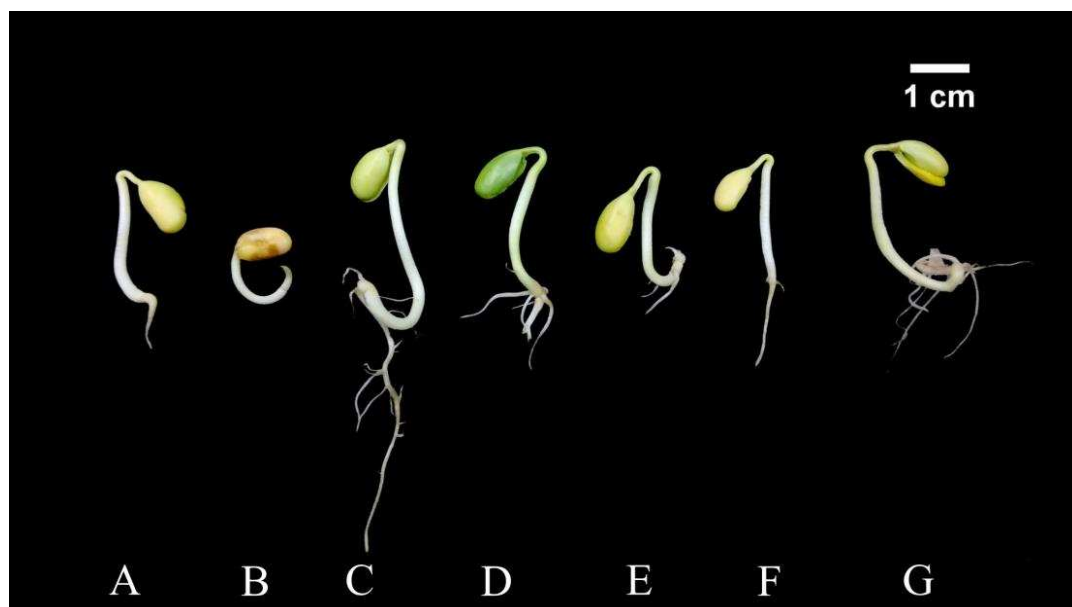


Figura 7 - Padrão de plântulas anormais adotado no teste de germinação. Hipocótilo e sistema radicular pouco desenvolvidos (A e E). Ausência de raiz e hipocótilo atrofiado (B). Geotropismo negativo do sistema radicular e raízes pouco desenvolvidas (C e G). Sistema radicular pouco desenvolvido (D e F). Fotos: Daniel T. Pinheiro.

Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi avaliada utilizando-se quatro repetições de 50 sementes, que foram pesadas e colocadas para embeber em copos de plástico contendo 75 mL de água deionizada, durante 24 horas, a 25 °C (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Em seguida, foi feita a leitura da condutividade em condutímetro com os resultados expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de semente.

Determinação da atividade de enzimas antioxidativas e proteínas

Para a análise da atividade das enzimas antioxidativas, as sementes foram embebidas em água durante 24 horas. Posteriormente, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C até o momento das avaliações. Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos por meio da maceração de 0,2 g de embriões (cotilédones e eixo embrionário por meio da retirada do tegumento) em nitrogênio líquido, seguida da adição de 2 mL de meio de extração, tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (0,1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) (1,0 mM) e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO *et al.*, 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 19.000 g por 15 min., a 4 °C.

Superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (DEL LONGO *et al.*, 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, em uma câmara de reação iluminada com uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. O valor da absorvância de um meio de reação igual ao anterior, mas mantido no escuro pelo mesmo período, serviu como branco e foi subtraído da leitura de cada amostra que recebeu iluminação (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). O resultado foi expresso em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (adaptado de Havir e McHale, 1987). O decréscimo na

absorbância a 240 nm a 25 °C foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Ascorbato peroxidase (APX): A atividade da ascorbato peroxidase foi obtida por meio da adição de 100 μL do extrato enzimático bruto em 2,90 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), ácido ascórbico 0,5 mM, EDTA 0,1 mM e H_2O_2 1,2 mM. Foi observado o decréscimo da absorbância a 290 nm durante o primeiro minuto, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (NAKANO; ASADA, 1981), e o resultado expresso em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

Peroxidase (POX): A atividade das POX foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,90 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM (adaptado de Kar e Mishra (1976)). A produção de purpurogalina foi medida por meio do incremento da absorbância a 420 nm a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE; MAEHLI, 1955) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas foi determinado com o mesmo extrato utilizado nas avaliações enzimáticas, com a utilização de albumina bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). Foram utilizados 10 μL do extrato enzimático adicionado a 1 mL do reagente de Bradford, seguido de agitação. Após 20 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 595 nm.

Atividade da protease

Foi avaliada por meio da metodologia adaptada de Pilon, Oliveira e Guedes (2006). As sementes foram embebidas em água durante 24 h e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi efetuada a maceração de 0,2 g de embriões (cotilédones e eixo embrionário) em 2 mL de tampão Tris-HCl (pH 6,8) seguida de centrifugação (14000 g) por 15 minutos. Posteriormente, 100 μL do extrato foram adicionados a 400 μL de BSA (2%) e 1500 μL de tampão Tris-HCl (pH 6,8). Os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e incubados em banho maria por 20 min a 37 °C. A reação foi então pausada por meio da adição

de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e realizada outra centrifugação (14000 g, 15 min.). O sobrenadante foi coletado e a absorvância realizada em espectrofotômetro a 280 nm.

A atividade foi calculada com base em curva de calibração ($y = 0.0011x + 0.0047$; $R^2 = 0,99$), constituída de tampão Tris-HCl (pH 6,8), BSA (2%), tirosina (2 mM) e TCA (10%), com as leituras a 280 nm. O branco foi obtido sem a adição de tirosina. Os resultados foram expressos em U de protease por mL, sendo U correspondente a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de tirosina por minuto.

Quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Amostras de 0,2 g de embriões (cotilédones e eixo embrionário) foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a 14.000 g, por 15 min, 4°C, e coleta do sobrenadante (KUO; KAO, 2003). Alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (GAY; GEBICKI, 2000) homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. A determinação da absorvância a 560 nm e a quantificação de H_2O_2 foi realizada com base em curva de calibração, com a utilização de concentrações de peróxido como padrão. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

Peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi determinada por meio do conteúdo de malonaldeído (MDA), seguindo a metodologia de Cakmak e Horst (1991). Utilizou-se 0,2 g de embriões (cotilédones e eixo embrionário por meio da retirada do tegumento) que foram macerados em ácido tricloroacético (TCA 0,1%, p/v). Depois da centrifugação (19.000 g, 15 min., 4 °C), 500 μL do sobrenadante foi coletado e adicionado a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 20%). No branco, em vez da amostra, foi adicionado 500 μL de TCA 0,1%. As amostras e o branco foram incubados por 30 min a 90 °C em banho-maria, com agitação. Após 30 minutos, a reação foi parada em gelo e efetuou-se outra centrifugação (19.000 g, 15 min., 4 °C). As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 532 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmol.g^{-1} de matéria fresca.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6x4, sendo 6 variedades de soja e 4 níveis de precipitação simulada (0; 60; 120 e 180 mm). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Depois de confirmar a distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Além disso, foi realizada uma análise multivariada de componentes principais (PCA) para todas as características avaliadas. Uma matriz “n x p” foi obtida, onde n corresponde ao número de tratamentos (n = 24) e “p” o número de variáveis analisadas (p = 10). Os autovalores e autovetores foram calculados a partir das matrizes de covariância e plotados em gráficos bidimensionais (diagrama de ordenação de categorias e círculo de correlações), geradas a partir do pacote Factoextra (Kassambara e Mundt 2016). A correlação de Pearson (r) foi calculada com os dados obtidos em todas as avaliações para todas as cultivares. O software estatístico R foi utilizado em todas as análises (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independente da cultivar analisada, observa-se aumento do grau de umidade tanto das sementes quanto das vagens 24 h após a aplicação das precipitações, seguido de redução com 72 h em relação ao controle (0 h). Verificou-se que 72 h após a aplicação de todos os tratamentos de precipitação, houve redução da umidade das vagens e das sementes (Figuras 8 e 9), o que era esperado em função da variação interna da umidade relativa (entre 20 e 90%) e de temperatura (entre 17 e 45 °C) na casa de vegetação (Figura 5). De maneira geral, a variação da umidade foi maior nas vagens, o que pode ser explicado pelo fato de estas estarem mais expostas a variações de umidade e temperatura do ambiente (Figuras 8 e 9).

As cultivares BMX APOLO (Figura 8C e D) e BMX POTÊNCIA (Figura 8E e F) apresentaram em geral, maior variação no grau de umidade de sementes e vagens. Na cultivar BMX APOLO, as sementes do atingiram 21% 24 h após aplicação de 60 mm, seguido de redução de 5 pontos percentuais (p.p.) após 72 h (Figura 8C). Na cultivar BMX POTÊNCIA, o maior nível de precipitação (180 mm) acarretou em aumento de 7 p.p. no período de 24 h, seguido de redução de 10 p.p com 72 h (Figura 8E).

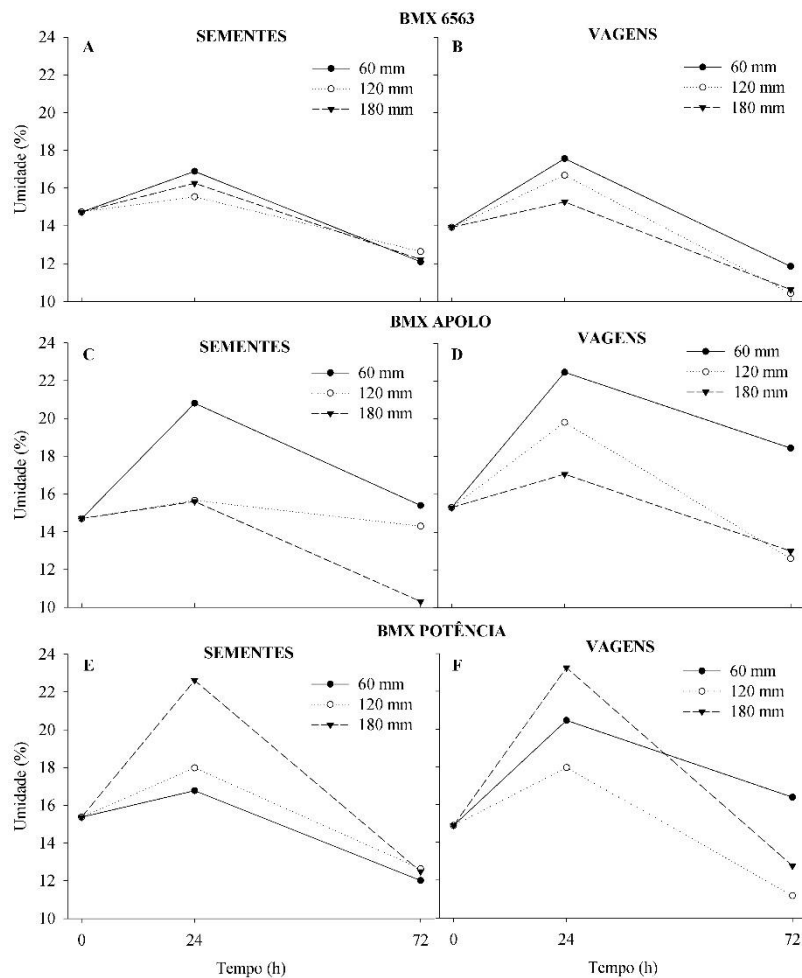


Figura 8 - Grau de umidade de sementes e vagens de soja, cultivares BMX 6563 (A e B), BMX APOLO (C e D) e BMX POTÊNCIA (E e F) submetidas a diferentes níveis de precipitação.

As cultivares NA 5909 (Figura 9A e B) e NS 5959 (Figura 9C e D) atingiram em torno de 17 e 18% de umidade das sementes, tendo maior variação na umidade das vagens, independente do nível de precipitação aplicado. Essas observações podem indicar maior proteção exercida pelas vagens dessas cultivares, devido a possíveis fatores como maior teor de lignina, menor abertura durante o processo de maturação, maior pilosidade e outros, que podem ter contribuído para a menor absorção de água pelas sementes destas cultivares.

No maior nível de precipitação (180 mm), a cultivar TMG 1175 apresentou oscilação de 5 p.p. na umidade de sementes e quase 10 p.p. nas vagens. No entanto, considerando os níveis de 60 e 120 mm, essa variação de somente 1 p.p. nas sementes e 2,5 p.p. nas vagens (Figura 9E e F).

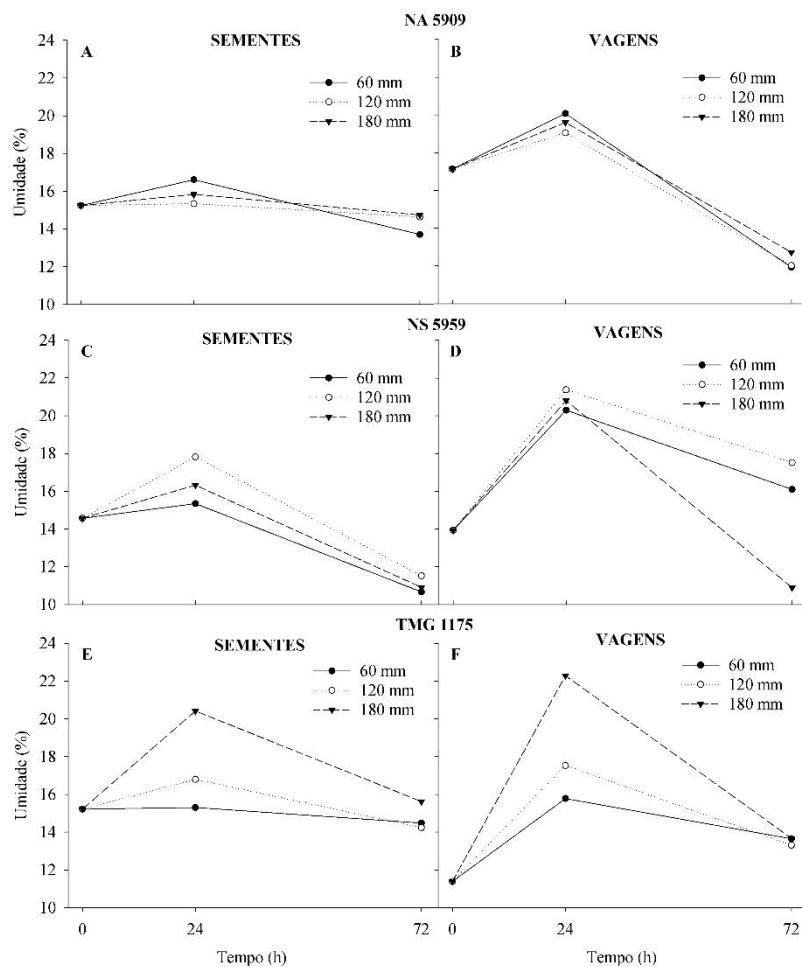


Figura 9 - Grau de umidade de sementes e vagens de soja, cultivares NA 5909 (A e B), NS 5959 (C e D) e TMG 1175 (E e F); submetidas a diferentes níveis de precipitação.

A oscilação do grau da umidade das sementes antes da colheita é considerada um dos principais fatores relacionados à deterioração em campo e que contribui significativamente para redução da germinação e do vigor (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016; MALIK, 2013). De maneira geral, a redução do potencial fisiológico das sementes está relacionada a maiores taxas respiratórias a partir da hidratação das sementes, que por sua vez contribuem para maior degradação de reservas energéticas e produção de EROs (BEWLEY *et al.*, 2013; WOJTYLA *et al.* 2016). Roberts e Ellis (1989) citam que a sensibilidade à variação no teor de água está diretamente relacionada à composição química das sementes. Desta forma, por serem ricas em proteínas e lipídeos, sementes de soja submetidas à deterioração estarão sujeitas principalmente a processos relacionados a estes compostos, como a degradação de proteínas e a peroxidação de lipídeos (MIN *et al.*, 2016, 2017; XIN *et al.*, 2014).

No tratamento controle (0 mm), não foi possível observar diferenças significativas da germinação entre as cultivares. No entanto, após a aplicação dos tratamentos de precipitação, houve reduções significativas na germinação de todas as cultivares analisadas. Essas reduções foram observadas principalmente nas cultivares BMX 6563, BMX APOLO e BMX POTÊNCIA, sendo de 15, 16 e 30 pontos percentuais comparando-se o controle (0 mm) com o maior nível de precipitação (180 mm), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Germinação e condutividade elétrica de sementes de seis cultivares de soja, submetidas a diferentes níveis de precipitação.

	BMX 6563	BMX APOLO	BMX POTÊNCIA	NA 5909	NS 5959	TMG 1175
Precipitação (mm)	Germinação (%)					
0	93 Aa	91 Aa	90 Aa	92 Aa	96 Aa	92 Aa
60	88 Abab	88 Aab	79 Bb	84 Bab	94 Aa	90 Aa
120	81 Bab	78 Bb	77 Bb	85 Bab	87 ABab	89 Aa
180	78 Bb	75 Bb	60 Cc	86 Ba	83 Bab	80 Bab
Média	85	83	77	86	90	88
CV(%)	6,13					
Precipitação (mm)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)					
0	57,65 Bd	73,09 Ba	62,31 Bc	66,73 Bb	63,56 Bbc	61,98 Ac
60	57,75 Bd	73,94 Ba	62,50 Bc	68,55 ABb	69,46 Ab	62,27 Ac
120	70,06 Ab 70,84	74,83 Ba	65,64 ABc	70,04 ABb	70,14 Ab	62,33 Ac
180	Abc	85,33 Aa	68,27 Ac	70,47 Bbc	68,44 Ac	62,63 Ac
Média	64,08	76,80	64,68	68,95	67,90	62,30
CV(%)	2,73					

Letras diferentes maiúsculas na coluna (entre níveis de precipitação) e minúsculas na linha (entre cultivares) diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação.

Por outro lado, as cultivares NS 5959, NA 5909 e TMG 1175 apresentaram reduções menos acentuadas na germinação, permanecendo acima do padrão mínimo para comercialização de sementes de soja, que é de 80% (ABRASEM, 2013), independente do nível de precipitação. De maneira geral, as cultivares BMX POTÊNCIA e TMG 1175 apresentaram comportamentos distintos, sendo que a primeira apresentou redução

significativa na germinação em todos os níveis de precipitação (60, 120 e 180 mm) e a segunda somente no nível mais alto (180 mm) (Tabela 4).

A redução da germinação por meio da deterioração em sementes de soja já foi relatada e relacionada, por exemplo, a fatores genéticos, ao armazenamento, ao atraso de colheita e à umidade (BHATIA *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2016; ZUFFO *et al.*, 2017; BASSO *et al.*, 2018;). Essas e outras condições podem favorecer o processo de deterioração e estão relacionadas ao teor de lignina do tegumento (CASTRO *et al.*, 2016; HUTH *et al.*, 2016), maior síntese de ácido abscísico (ABA) (YIN *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2018) e menor síntese e integridade de DNA e RNA, que por sua vez estão diretamente relacionados à anormalidade de plântulas (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010; FLEMING; RICHARDS; WALTERS, 2017; SAHU *et al.*, 2017b; BONIECKA *et al.*, 2019;). De maneira geral, pode-se considerar que o somatório destes e outros fatores irão alterar processos celulares importantes, tais como o metabolismo proteico e a produção de energia, que por sua vez reduzem a germinação e o vigor das sementes deterioradas (MIN *et al.*, 2016).

Em geral, a deterioração por umidade induzida pelas precipitações acarretou no aumento significativo da condutividade elétrica das sementes. Esse aumento nas cultivares BMX APOLO e BMX 6563, sendo de aproximadamente $13 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ comparando-se o maior nível de precipitação (180 mm) com o controle (0 mm). A cultivar TMG 1175 foi a única entre as cultivares analisadas onde não se observou diferenças significativas na condutividade elétrica, independente do nível de precipitação aplicado (Tabela 4).

O teste de condutividade elétrica é um indicador da integridade de membranas e conseqüentemente do extravasamento de íons, que por sua vez está diretamente relacionado ao declínio da germinação e vigor de várias espécies (CORBINEAU *et al.*, 2000; GARNCZARSKA; BEDNARSKI; JANCELEWICZ, 2009; SAHU *et al.*, 2017a). Quando submetidas à deterioração por umidade com ciclos subsequentes de absorção e secagem, sementes de soja apresentam enrugamento do tegumento na face oposta ao hilo, conforme ilustrado na Figura 10.

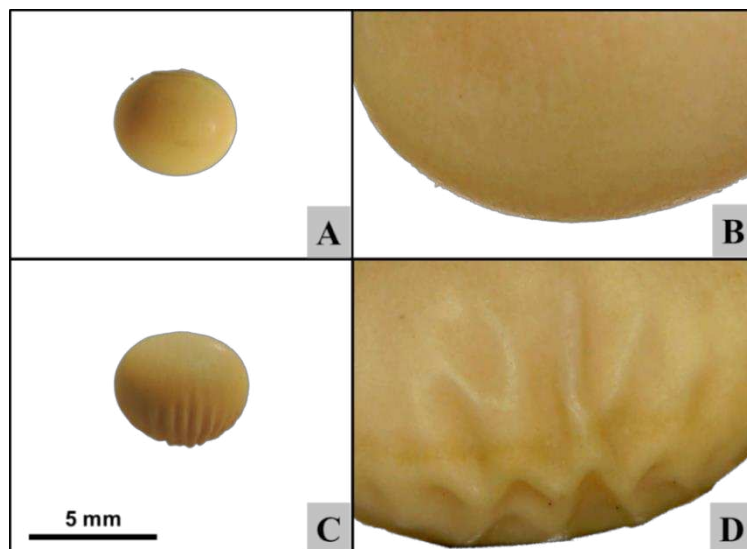


Figura 10 - Enrugamento do tegumento de sementes de soja causado pela umidade. Sementes do tratamento controle (A e B) e sementes submetidas à deterioração por umidade (C e D). Fotos: Daniel T. Pinheiro.

De acordo com França-Neto et al. (2016), a formação de rugas e/ou rompimento do tegumento pela umidade em sementes de soja se dá devido à ruptura de duas das três camadas parenquimáticas que constituem a estrutura tegumentar. Desta forma, a semente fica mais susceptível ao ataque de patógenos e a danos de membrana, conforme observado pela maior condutividade elétrica das sementes submetidas à deterioração (Tabela 4).

Em sementes de feijão mungo, Sharma *et al.* (2018) observaram que a lixiviação de íons aumentou significativamente nas sementes submetidas à deterioração controlada quando comparadas às sementes não deterioradas. Avaliando a deterioração em sementes de soja, Xin *et al.* (2014) observaram que o envelhecimento artificial das sementes ocasionou aumento na condutividade elétrica, o que por sua vez foi relacionado a disfunções nas estruturas das mitocôndrias aliadas ao estresse oxidativo, acarretando na perda de integridade das membranas e consequentemente no maior extravasamento de íons e redução do vigor.

Em relação à atividade das enzimas antioxidativas, observa-se que para a SOD, a deterioração por umidade causou reduções significativas na atividade desta enzima nas sementes das cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA. Nas demais cultivares (BMX APOLO, NA 5909, NS 5959 e TMG 1175), não houve diferença significativa na atividade desta enzima, independente do nível de precipitação aplicado (Figura 11).

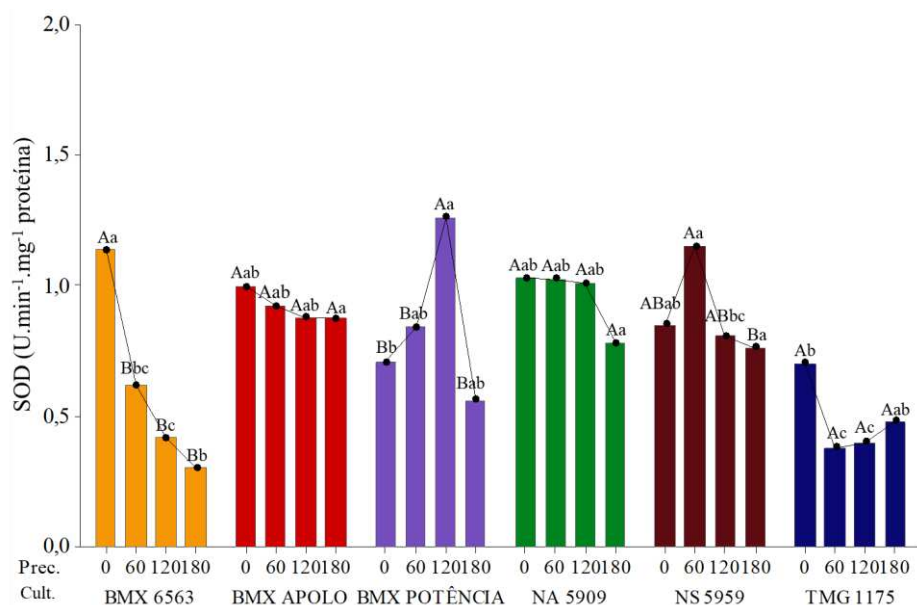


Figura 11 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As maiores reduções da atividade da SOD com a deterioração por umidade foram observadas nas cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA, corroborando os resultados de germinação e vigor, onde essas cultivares foram significativamente afetadas pela precipitação e, conseqüentemente, pela deterioração (Tabela 4).

As superóxido dismutases (SOD) são metaloenzimas que catalisam a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), constituindo a primeira linha de defesa contra as EROs, acumuladas principalmente em situações de estresse (GILL *et al.*, 2015). Neste contexto, a redução na atividade da SOD pode ter uma grande contribuição na deterioração de sementes, uma vez que o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ é associado positivamente com a perda da viabilidade, germinação e vigor de sementes (BAILLY, 2004; KIBINZA *et al.*, 2006; CHENG; SONG, 2008; SAHU *et al.*, 2017a).

Reduções na atividade da SOD por meio da deterioração já foram observadas em sementes de girassol (BAILLY *et al.*, 1996) e soja (XIN *et al.*, 2014), com estes efeitos atribuídos à perda de vigor. No entanto, Huth *et al.* (2016) avaliando a deterioração por umidade em sementes de soja, observaram que a atividade da SOD não diferiu significativamente em diferentes cultivares. Em relação às cultivares nas quais não foram observadas alterações na atividade da SOD, pode-se considerar o fato do $O_2^{\cdot-}$ ser uma

molécula instável, de meia vida curta (1 a 4 μ s), e que é rapidamente convertido em H_2O_2 por meio de enzimas ou espontaneamente (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2017).

Com exceção das cultivares BMX APOLO e NA 5909, as demais apresentaram reduções significativas na atividade da CAT com a deterioração por umidade (Figura 12).

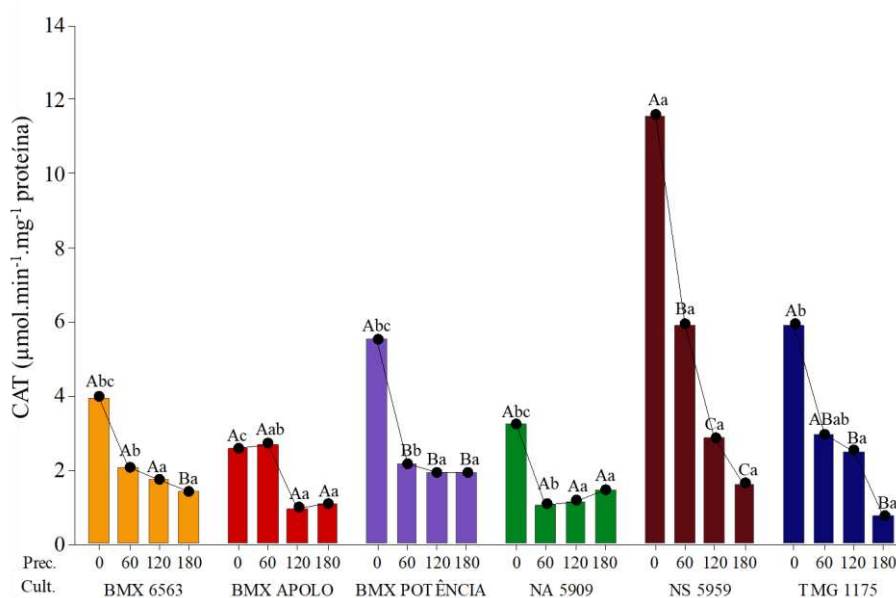


Figura 12 - Atividade da catalase (CAT) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A CAT converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , desempenhando papel fundamental nos sistemas de proteção e reparo durante a deterioração associada ao acúmulo de H_2O_2 (Kibinza et al., 2011). Desta forma, considerando que a deterioração por umidade ocasionou queda no vigor das sementes, espera-se que a atividade da CAT seja também reduzida (BAILLY, 2004).

De maneira semelhante, Sharma *et al.* (2018) observaram que a atividade da SOD e CAT diminuíram significativamente em sementes de feijão mungo submetidas à deterioração. Estes autores ainda citam que a atividade destas enzimas está diretamente relacionada à integridade das mitocôndrias durante o processo germinativo. Por outro lado, Yin *et al.* (2015) não observaram alterações nas atividades da SOD e CAT em sementes de colza submetidas ao envelhecimento artificial quando comparadas ao controle (sementes não envelhecidas), atribuindo outros fatores a estas respostas, como a atuação do ABA.

A atividade da APX apresentou reduções significativas em todas as cultivares analisadas, principalmente no maior nível de precipitação (180 mm). As reduções mais acentuadas foram observadas nas cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA, sendo de 15 e 11 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína, respectivamente, com relação ao controle (0 mm) (Figura 13).

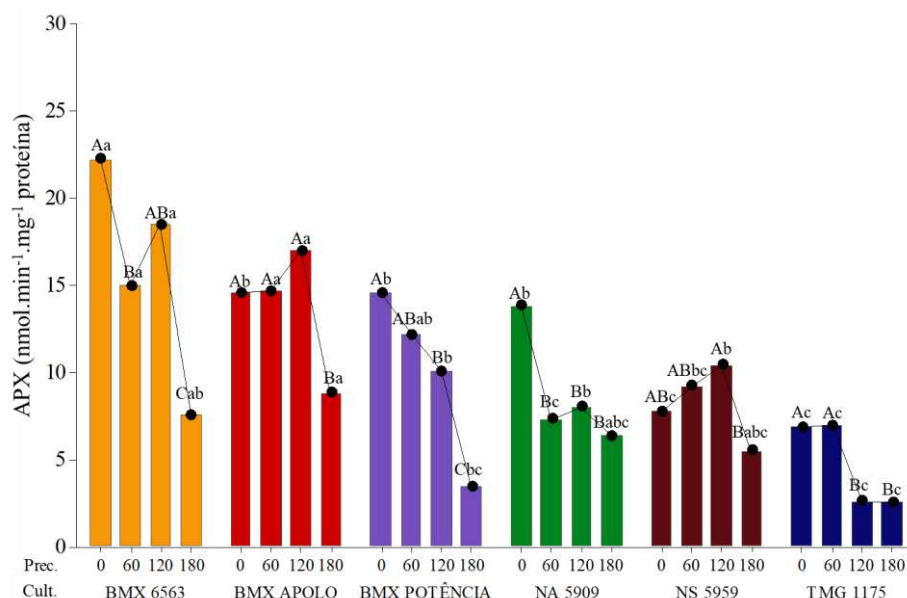


Figura 13 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A APX reduz o H₂O₂ em H₂O utilizando o ácido ascórbico como doador específico de elétrons. De Gara (2004) cita que o ascorbato envolvido na reação da APX, além de atuar na remoção do H₂O₂, atua como redutor na homeostase celular e tem papel chave em vias de sinalização redox. Desta forma, diferentes isoformas da APX estão presentes nas células, principalmente em paredes celulares, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e citosol (NAKANO; ASADA, 1981; ASADA, 1992; MITTLER, 2002; CAVERZAN *et al.*, 2012). Avaliando a atividade de APX mitocondriais, Xin *et al.* (2014) observaram reduções de até 77% em sementes de soja deterioradas por meio de envelhecimento artificial. No entanto, é importante ressaltar que neste estudo, foi avaliada a atividade em células do embrião como um todo, sem considerar organelas específicas.

Com exceção da TMG 1175, a POX teve sua atividade reduzida significativamente nas sementes de todas as cultivares, quando submetidas à deterioração, induzida pela aplicação de diferentes níveis de precipitação (Figura 14).

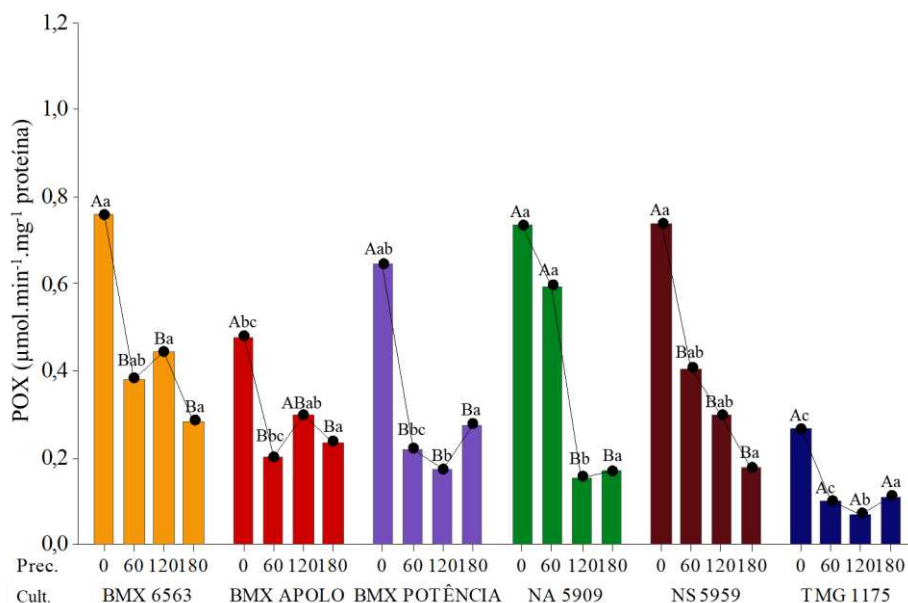


Figura 14 - Atividade da peroxidase (POX) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Reduções acentuadas na atividade da POX foram observadas principalmente nas cultivares BMX 6563, BMX POTÊNCIA e NS 5959, atingindo até $0,75 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína comparando-se o maior nível de precipitação (180 mm) com o controle (0 mm). Assim como a APX, a POX faz parte de um amplo grupo de enzimas peroxidases que atuam na neutralização do H_2O_2 e em diversos outros processos fisiológicos (DE GARA, 2004). Desta forma, é importante ressaltar que APX e POX não são as únicas peroxidases ativas nas células vegetais, uma vez que outras enzimas como glutatona redutase, peroxirredoxina e guaiacol peroxidase, atuam no processo antioxidativo de sementes (BAILLY *et al.*, 1996; AALEN, 1999; SETHY; GHOSH, 2013). De Gara (2004) cita que, por utilizarem o H_2O_2 como receptores de elétrons, os diferentes grupos de peroxidases competem pelo mesmo substrato e atuam em conjunto. Além disso, esse autor cita que a APX atua na oxidação de substratos não fisiológicos, como o pirogalol, utilizado na análise da POX. Neste contexto, a análise dos resultados com base em apenas uma ou poucas peroxidases deve ser acompanhada dessas considerações.

Em síntese, pode-se observar que a deterioração por umidade provocou redução da atividade das enzimas que atuam como peroxidases. Com relação às cultivares, observa-se que de maneira geral, BMX 6563 e BMX POTÊNCIA apresentaram as maiores reduções na atividade destas enzimas, sobretudo nos maiores níveis de precipitação. Por outro lado, NA

5909 e TMG 1175 foram em geral, as que apresentaram as menores reduções (Figuras 11, 12 e 13). De maneira geral, estes resultados corroboram os observados para germinação e vigor (Tabela 4).

A deterioração por umidade acarretou no acúmulo de H_2O_2 nas sementes da maioria das cultivares avaliadas. Em concordância com o observado nas enzimas antioxidativas, o acúmulo de H_2O_2 foi maior nas cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA, com incrementos de até 130 nmol.g^{-1} matéria fresca comparando-se o maior nível de precipitação (180 mm) com o controle (0 mm) (Figura 15).

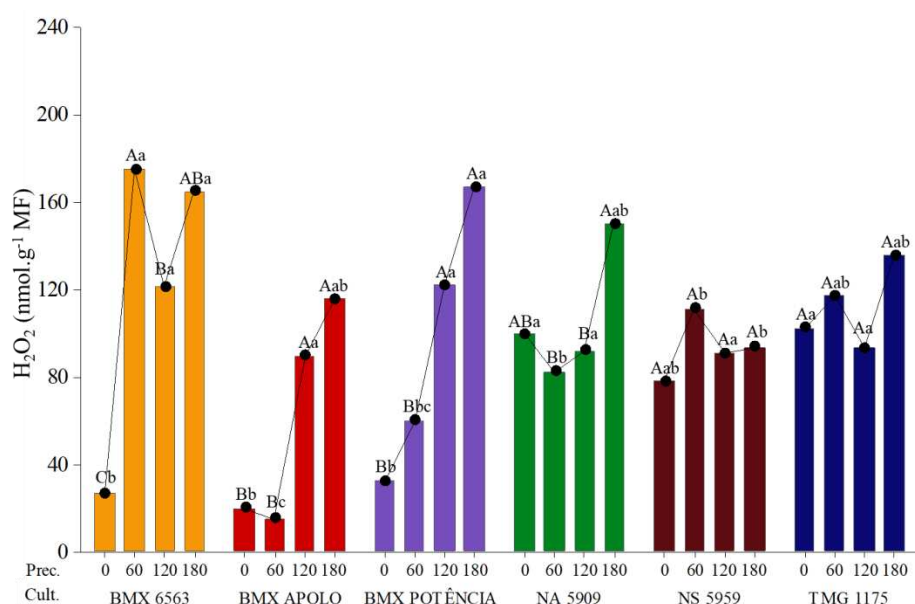


Figura 15 - Acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As cultivares NS 5959 e TMG 1175 foram as únicas em que não foi observado acúmulo significativo de H_2O_2 , independente do nível de precipitação (Figura 14), o que pode ser um fator importante para explicar maior vigor (Tabela 4) e a menor alteração na atividade das enzimas antioxidativas (Figuras 11, 12, 13 e 14), principalmente na TMG 1175.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre as EROs e o sistema antioxidativo, sendo um fator determinante na redução da germinação e do vigor das sementes (KIBINZA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; MIN *et al.*, 2017; Sahu *et al.*, 2017a). De maneira geral, o acúmulo de H_2O_2 (Figura 15) aliado à redução na atividade das enzimas antioxidativas (Figuras 11, 12, 13 e 14) neste estudo, evidenciam este desequilíbrio e ajudam

a compreender os resultados observados na germinação e no vigor das sementes (Tabela 4) (BHATIA *et al.*, 2010).

Em sementes de soja e outras oleaginosas submetidas à deterioração, o acúmulo de H₂O₂ tem sido considerado um dos principais fatores que resultam na perda da viabilidade e do vigor (BAILLY *et al.*, 1996; KIBINZA *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2013; MIN *et al.*, 2017). Dentre os principais efeitos deletérios que o excesso de H₂O₂ causa nas sementes, estão a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; CHMIELOWSKA-BAK *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2015).

De acordo com Bailly *et al.* (2008), o H₂O₂ é produzido nas sementes e tem suas funções (maléficas e/ou benéficas) desencadeadas a partir da hidratação e atividade respiratória das mesmas. Este aumento da atividade respiratória faz com que haja maior produção de ânion superóxido (O₂^{·-}), que por sua vez é instável e rapidamente convertido em H₂O₂ (WOJTYLA *et al.*, 2016). Já o H₂O₂ é uma espécie reativa de meia vida longa (> 1 ms) quando comparada ao O₂^{·-} (1-4 µs) e pode se difundir facilmente por membranas celulares atingindo alvos distantes do local de produção (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; MITTLER, 2017). Neste contexto, pode-se compreender que com a hidratação das sementes por meio das precipitações aplicadas, os efeitos deletérios do H₂O₂ foram expressos ainda na vagem e causaram redução do vigor das sementes, principalmente nas cultivares onde houve maior absorção de água pelas sementes, como BMX 6563 e BMX POTÊNCIA (Figuras 8 e 9).

É importante ressaltar que as EROs são predominantemente benéficas para as células, sendo que o estresse oxidativo é o resultado de uma ativação deliberada de uma via de morte celular programada. Além disso, quando em níveis basais, as EROs são necessárias para processos biológicos básicos, como a diferenciação e sinalização celular (MITTLER, 2017; NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018). Especificamente em relação ao H₂O₂, é citado que este exerce papéis fundamentais nas respostas a estresses bióticos e abióticos, uma vez que participa de processos como a sinalização celular (RHEE, 2006), quebra da dormência (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008), regulação hormonal (BARBA-ESPIN *et al.*, 2010), mobilização de reservas (VERMA *et al.*, 2015), manutenção do estado redox intracelular (Kumar *et al.*, 2015), menor acúmulo de radical hidroxila (NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018) e outras.

Reforçando estas informações, Kranner *et al.* (2010) avaliaram as características da produção de EROs na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de ervilha e

observaram aumento significativo de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 durante a embebição das sementes. Estes autores observaram ainda que durante a emissão e alongamento radicular, houve um segundo aumento significativo na produção de EROs, que foi correlacionado com aumento na atividade extracelular de peroxidases. Estes acúmulos significativos de EROs em momentos específicos indicam funções importantes que vão além dos danos causados pelo estresse, principalmente quando relacionados ao processo respiratório das sementes.

Em relação ao malonaldeído (MDA), observa-se que para as sementes de todas as cultivares, houve aumento significativo deste composto com a deterioração por umidade, em comparação ao controle (0 mm). Nas cultivares BMX POTÊNCIA e NS 5959 este aumento foi maior que 20 nmol.g^{-1} matéria fresca (Figura 16).

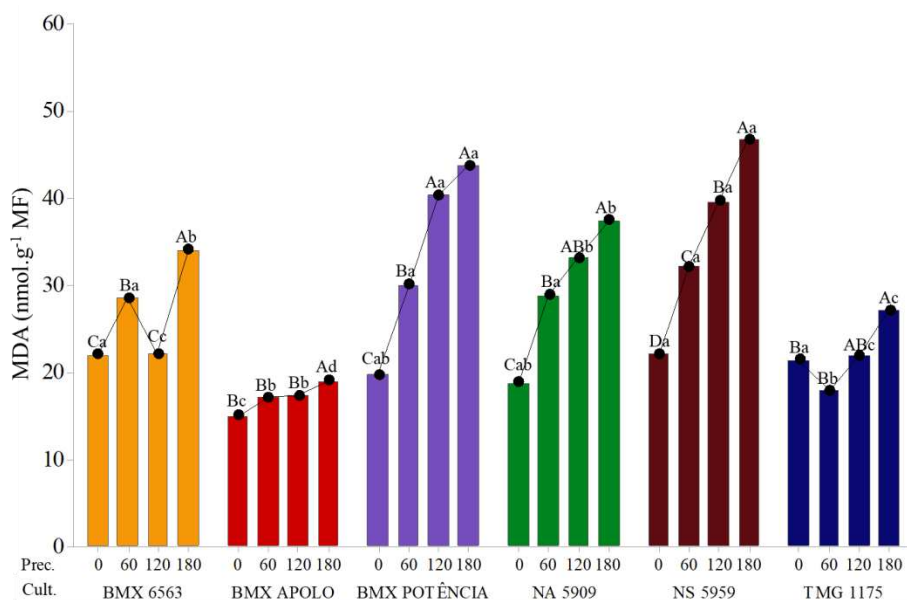


Figura 16 - Acúmulo de malonaldeído (MDA) em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De maneira geral, o acúmulo de MDA seguiu a mesma tendência da condutividade elétrica (Tabela 4) e do H_2O_2 (Figura 15), com aumentos significativos estimulados pela deterioração por umidade. Os acúmulos mais expressivos de MDA foram observados nas cultivares BMX 6563, BMX POTÊNCIA e NS 5959, principalmente no maior nível de precipitação aplicado (180 mm) (Figura 16).

O mecanismo de catabolismo lipídico é fortemente relacionado com o estresse oxidativo em sementes submetidas à deterioração (PARKHEY; NAITHANI;

KESHAVKANT, 2012; WOJTYLA *et al.* 2016). Min *et al.* (2017) confirmam essas informações, concluindo que os acúmulos de MDA e H₂O₂ em conjunto, foram considerados como principais fatores que resultaram na perda de viabilidade de sementes de soja submetidas à deterioração. Além disso, esses autores observaram estreita relação entre o acúmulo desses metabólitos e a produção de proteínas importantes no processo de deterioração das sementes. Por outro lado, em sementes de colza submetidas ao envelhecimento artificial, foi observado que o acúmulo de MDA foi acompanhado do aumento da condutividade elétrica, sem, no entanto, apresentar aumentos expressivos nas concentrações de EROs (YIN *et al.*, 2015). O processo de peroxidação lipídica necessita principalmente do oxigênio, sendo que este estará presente em qualquer semente durante o processo germinativo (BORISJUK; ROLLETSCHEK, 2009). Desta forma, a peroxidação lipídica pode ser estimulada por outros processos celulares, além do acúmulo de EROs.

Vale ressaltar ainda que o MDA, apesar de ser um dos principais produtos da peroxidação lipídica, não é o único. Avaliando a deterioração em sementes de ervilha, Veselova, Veselovsky e Obroucheva (2015) concluíram que a peroxidação lipídica foi causada principalmente pela hidrólise não enzimática de oligossacarídeos e sacarose. No entanto, de maneira semelhante ao observado neste trabalho, para sementes oleaginosas que acumulam baixos teores de carboidratos como soja, girassol e amendoim, o aumento nas concentrações de MDA é citado como de grande relevância em sementes submetidas à deterioração (SUNG; JENG, 1994; Bailly *et al.*, 1996; XIN *et al.*, 2014).

É interessante também reforçar o fato de que a cultivar BMX POTÊNCIA, uma das que apresentaram maior sensibilidade à deterioração por umidade, apresentou também alta variação na umidade das sementes durante a aplicação dos níveis de precipitação (Figura 8). As cultivares NA 5909 e TMG 1175, que de maneira geral, apresentaram maior resistência à deterioração por umidade, apresentaram menor oscilação na umidade das sementes somadas à maior oscilação na umidade das vagens (Figura 9). Desta forma, essa maior resistência poderia estar relacionada a uma maior proteção física das sementes exercida pelas vagens.

O teor de proteínas foi reduzido significativamente com o aumento da precipitação, com exceção das cultivares NS 5959 e TMG 1175. A cultivar BMX 6563 foi a que apresentou os menores teores de proteínas, independente do nível de precipitação aplicado. As cultivares BMX APOLO, BMX POTÊNCIA e NA 5909 apresentaram os maiores teores de proteínas no tratamento controle (0 mm), sendo que nas primeiras houve redução nos maiores níveis de

precipitação (120 e 180 mm) e na terceira a redução foi similar em relação ao controle, independente do nível de precipitação aplicado (Figura 17).

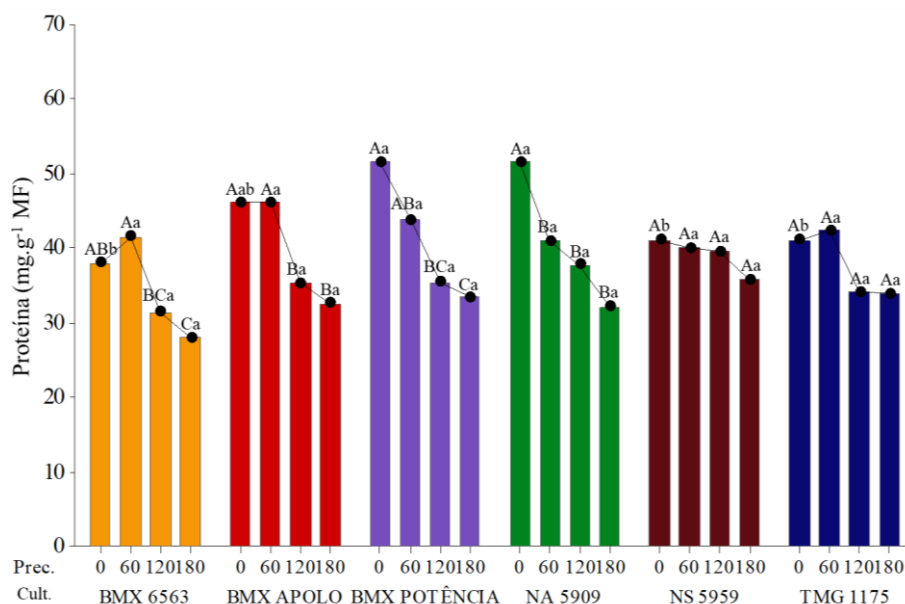


Figura 17 - Teor de proteínas em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúsculas entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A diminuição no teor de proteínas de armazenamento pode levar a um fornecimento ineficiente de energia para a germinação de sementes (LV et al., 2018). Além disso, a síntese proteica *de novo* é crucial para a germinação e a inibição deste processo pode ser um dos principais fatores que afetam não somente a germinação, mas também a longevidade das sementes expostas à deterioração (SANO *et al.*, 2012). A deterioração afeta diretamente proteínas importantes envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e glicólise, que são importantes vias que fornecem energia para o embrião durante a embebição (WANG *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018; LV *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo é outro fator importante relacionado à redução do teor de proteínas durante o processo de germinação em sementes submetidas à deterioração (KUBALA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; MIN *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2018). Como um produto do metabolismo aeróbico, as EROs são formadas primariamente em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, mas também em outros componentes celulares, como as proteínas (MITTLER, 2017). Desta forma, as reações de oxidação em proteínas induzem à fragmentação e ao aumento da sensibilidade à proteólise das mesmas (BERLETT; STADTMAN, 1997).

Avaliando sementes de soja submetidas à deterioração controlada, Min et al. (2017) observaram redução na atividade de enzimas antioxidativas, além do acúmulo de EROs e redução da germinação e da longevidade das sementes. Estes autores citam que a degradação de proteínas envolvidas no metabolismo primário e energético foi observada, indicando menor síntese de ATP e redução da germinação. Em sementes de feijão mungo (*Vigna radiata* L.) submetidas à deterioração, é citado que a redução da germinação e do vigor, menor teor de proteínas e a perda da integridade do RNA, estiveram relacionados ao maior estresse oxidativo (SHARMA *et al.*, 2018).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é considerado uma espécie reativa de meia vida longa capaz de oxidar proteínas e fazer com que estas percam sua conformação e sejam degradadas (MITTLER, 2017). No entanto, é importante destacar que o H₂O₂ também desempenha importante papel de sinalização relacionada à síntese de proteínas *de novo* durante o processo de deterioração de sementes (SAHU *et al.*, 2017a). Desta forma, é possível associar os resultados observados com o desequilíbrio do sistema antioxidativo, por meio da redução da atividade das enzimas antioxidativas (Figuras 11, 12, 13 e 14) e acúmulo de peróxido de hidrogênio nas sementes submetidas à deterioração por umidade, sobretudo nas cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA (Figura 15).

Independente do nível de precipitação aplicado e da cultivar analisada, a deterioração por umidade ocasionou aumento na atividade da protease (Figura 18).

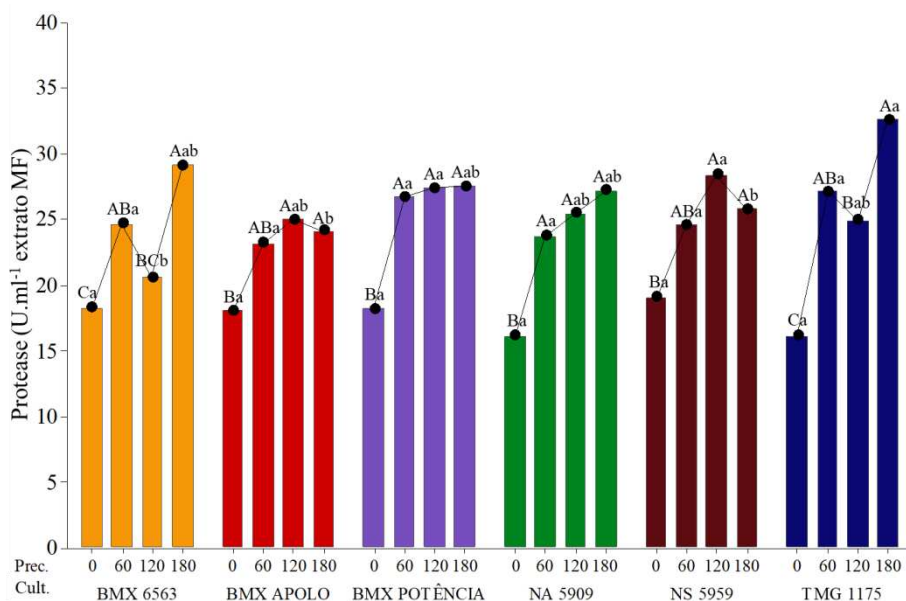


Figura 18 - Atividade da protease em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúscula entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De maneira geral, as proteases constituem um amplo grupo de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em vários processos celulares. Pode-se considerar que durante a germinação de sementes, as proteínas de armazenamento acumuladas durante a maturação são convertidas em peptídeos solúveis e aminoácidos livres pelas proteases e mobilizadas para o eixo embrionário (SHEN *et al.*, 2018). No entanto, a degradação de proteínas em células vegetais é um processo complexo que envolve múltiplas vias proteolíticas e mecanismos em diferentes compartimentos celulares (LU *et al.*, 2015; PALMA *et al.*, 2002). De maneira semelhante ao observado, o aumento na atividade da protease foi observado em sementes de *Moringa oleifera* submetidas à deterioração, sendo atribuído a diferentes processos metabólicos, como a degradação de peptídeos inibitórios (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

De acordo com Kato e Sakamoto (2018), a atividade das proteases está diretamente relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre os fatores que relacionam o metabolismo proteico e a deterioração das sementes por meio do estresse oxidativo, o processo de carbonilação consiste em uma série de modificações oxidativas na estrutura das proteínas que levam à perda da função destas, de maneira irreversível (NGUYEN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Dentre os mecanismos de carbonilação de proteínas, um dos principais é o ataque de EROs às cadeias laterais dos aminoácidos, que por sua vez são oxidados por aldeídos e/ou cetonas e tornam as proteínas mais suscetíveis à ação das proteases (REINHECKEL *et al.*, 1998; RAO; MØLLER, 2011; CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2014). Confirmando essas informações, Rajjou *et al.* (2008) observaram aumento expressivo na oxidação de proteínas em sementes de *Arabidopsis* submetidas à deterioração controlada, acarretando na perda de propriedades funcionais de diversas proteínas e aumentando a suscetibilidade destas à proteólise. De acordo com estes autores, esses resultados revelaram mecanismos que contribuíram diretamente para a redução do vigor das sementes, como as menores capacidades de conversão, mobilização de reservas, além da eficiência na desintoxicação nas sementes.

É importante ressaltar que o nível intracelular de proteínas reflete o equilíbrio entre as taxas de oxidação e de degradação proteica por meio das proteases (BERLETT; STADTMAN, 1997). Desta forma, um nível oxidativo elevado poderá acarretar não somente

na redução no teor das proteínas, mas também na atividade proteolítica das sementes, conforme observado por Min *et al.* (2017) em sementes de soja submetidas à deterioração.

Em síntese, é importante ressaltar que no presente trabalho foram quantificadas proteínas solúveis totais, sem distinção de classes, funções, peso molecular e outros atributos. No entanto, independente disso, pôde-se observar que a redução nos teores de proteínas (Figura 17) aliada à maior atividade da protease (Figura 18) e menor vigor (Tabela 4) das sementes de soja submetidas à deterioração por umidade, pode indicar um desequilíbrio do metabolismo proteico por meio do estresse oxidativo, que por sua vez é caracterizado pelo desequilíbrio entre o sistema enzimático antioxidativo (Figuras 11, 12, 13 e 14) e o acúmulo de H₂O₂ (Figura 15).

A partir da análise de componentes principais (PCA), pode-se observar que os componentes 1 (PC1) e 2 (PC2) explicaram respectivamente 44,7 e 15,2 % da variabilidade total dos dados, totalizando 59,9% (Figura 19A).

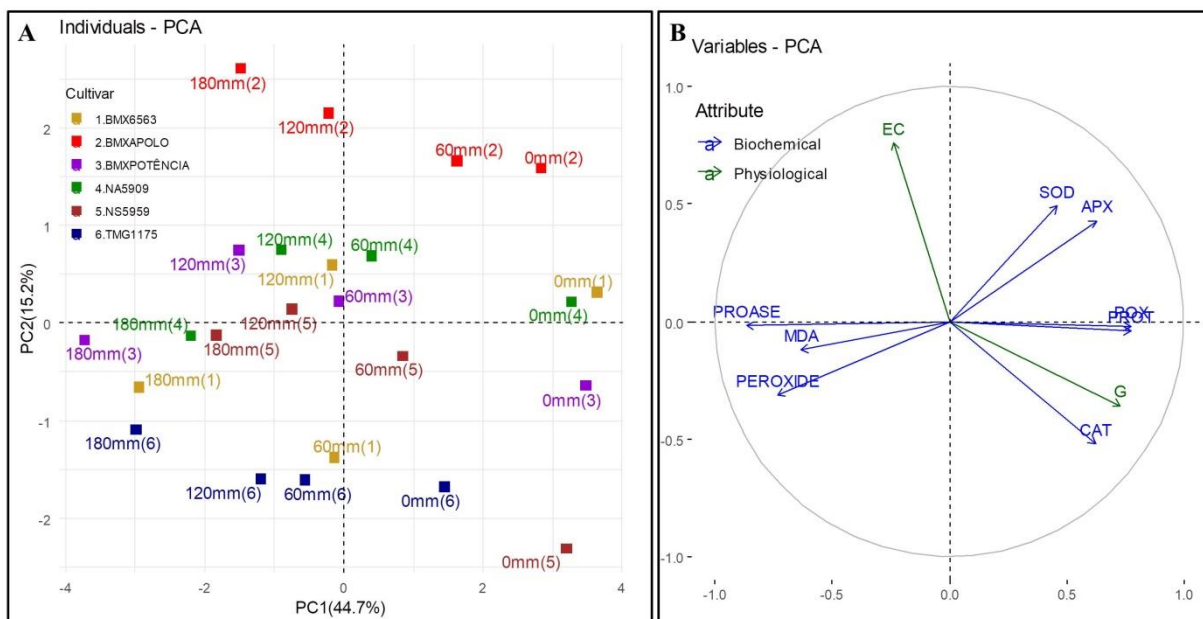


Figura 19 - Análise de componentes principais (PCA) obtida pela combinação linear das variáveis fisiológicas (germinação e vigor) e análises bioquímicas em seis cultivares de soja, submetidas à diferentes níveis de precipitação. Diagrama de ordenação (A) e círculo de correlação (B). PC1 – Componente principal 1; PC2 – Componente principal 2; G - Germinação; EC – condutividade elétrica; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; APX – ascorbato peroxidase; POX – peroxidase; PEROXIDE – Peróxido de hidrogênio (H₂O₂); MDA – malonaldeído; PROT – Proteínas; PROASE – Protease.

De acordo com Medeiros *et al.* (2018), a análise de componentes principais (PCA) pode ser utilizada na interpretação de variáveis relacionadas à qualidade de sementes. Confirmando essa informação, pode-se observar por meio do digrama de ordenação (Figura 19A), que para todas as cultivares, houve tendência de agrupamento dos tratamentos controle (0 mm) e do menor nível de precipitação (60 mm) no lado direito do diagrama, onde se concentraram também as variáveis germinação, proteínas e atividade das enzimas antioxidativas no círculo de correlação (Figura 19B). Por outro lado, o agrupamento dos tratamentos de 120 e 180 mm no lado esquerdo do diagrama de ordenação (Figura 19A) correspondeu à localização das variáveis de condutividade elétrica, protease, MDA e H₂O₂ no círculo de correlação (Figura 19B).

Estes resultados confirmam os observados anteriormente por meio dos testes de médias, onde se observou que a deterioração por umidade, sobretudo nos maiores níveis de precipitação (120 e 180 mm), contribuiu para a redução da germinação, do vigor, do teor de proteínas e da atividade de enzimas antioxidativas, ao mesmo tempo em que favoreceu o aumento da condutividade elétrica, atividade da protease e acúmulo de H₂O₂ e MDA. Considerando os vetores de germinação e primeira contagem no círculo de correlação (Figura 17B), observa-se que se encontram próximos aos vetores das enzimas antioxidativas e opostos aos vetores H₂O₂ e MDA, indicando correlação negativa entre estes parâmetros.

Com relação às cultivares, observa-se que os agrupamentos de BMX APOLO, NS 5959, NA 5909 e TMG 1175 foram mais centralizados no eixo PC1, além de próximos dos vetores de germinação, primeira contagem e enzimas antioxidativas e distantes dos vetores do H₂O₂ e MDA. Por outro lado, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA tiveram agrupamento mais disperso no diagrama de correlação, além de próximos dos vetores H₂O₂ e MDA e distantes das variáveis de qualidade fisiológica (Figura 19A). De maneira geral, essas observações reforçam os resultados das análises fisiológicas e bioquímicas, indicando maior susceptibilidade das cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA à deterioração pré-colheita por umidade.

A análise de PCA revelou que os cinco primeiros componentes foram responsáveis por 85,76% da variação total de todas as variáveis (Tabela 5).

Tabela 5 - Cargas dos vetores, autovalores e proporção de variação associada a cinco componentes principais (PC) da PCA de 10 variáveis associadas à qualidade fisiológica e estresse oxidativo em sementes de soja submetidas à diferentes níveis de precipitação.

Variáveis	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
G	0,73	-0,36	-0,04	-0,25	0,01
CE	-0,24	0,76	-0,11	-0,22	0,51
SOD	0,46	0,49	0,67	-0,12	-0,03
CAT	0,62	-0,52	0,20	-0,10	0,43
APX	0,63	0,43	-0,14	0,48	-0,25
POX	0,77	-0,02	0,18	0,46	0,21
PEROXIDE	-0,73	-0,31	0,01	0,36	0,21
MDA	-0,63	-0,12	0,69	0,11	-0,08
PROT	0,77	-0,04	0,06	-0,26	-0,30
PROASE	-0,87	-0,02	0,09	-0,14	-0,23
Autovalor	4,47	1,52	1,04	0,81	0,74
Variância (%)	44,68	15,18	10,38	8,12	7,39
Variância acumulada	44,68	59,86	70,24	78,37	85,76

G – Germinação; CE – Condutividade elétrica; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; APX – ascorbato peroxidase; POX – peroxidase; PERÓXIDO – Peróxido de hidrogênio (H₂O₂); MDA – malonaldeído; PROT – proteínas; PROASE - protease.

De acordo com o componente principal 1 (PC1), as variáveis germinação, POX e proteínas tiveram maiores contribuições na variabilidade total dos dados. A maioria das variáveis foi mais fortemente relacionadas ao PC1, com exceção da condutividade elétrica e SOD, que foram mais relacionadas pelo componente 2 (PC2). Os componentes PC3, PC4 e PC5 em geral, tiveram contribuições menores na variabilidade total dos dados (Tabela 5). Desta forma, observa-se que a PCA contribuiu para explicar e confirmar os resultados previamente observados neste trabalho.

De maneira geral, as análises de correlação simples de Pearson mostraram correlações positivas e significativas entre a germinação e primeira contagem com as enzimas CAT e POX, além de negativas com o H₂O₂ e MDA, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), condutividade elétrica (CE), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (PERÓXIDO), malonaldeído (MDA), proteínas (PROT) e protease (PROASE).

	G	CE	SOD	CAT	APX	POX	PERÓXIDO	MDA	PROT	PROASE
G		-0,35 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,59*	0,26 ^{ns}	0,42*	-0,45*	-0,44*	0,52*	-0,55*
CE			0,17 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	0,12 ^{ns}
SOD				0,15 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,24 ^{ns}	-0,46*	0,02 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,32 ^{ns}
CAT					0,05 ^{ns}	0,53*	-0,29 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	0,40 ^{ns}	-0,54*
APX						0,55*	-0,47*	-0,45*	0,35 ^{ns}	-0,52*
POX							-0,38 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	0,48*	-0,72*
PERÓXIDO								0,49*	-0,61*	0,53*
MDA									-0,44*	0,58*
PROT										-0,58*
PROASE										

^{ns} não significativo, * significativo a 5% de probabilidade pelo teste t, respectivamente.

Estes resultados confirmam que umidade obtida pela aplicação de diferentes níveis de precipitação, provocando deterioração, causou redução do vigor das sementes de soja em função do estresse oxidativo e o desequilíbrio entre os compostos produzidos e os mecanismos enzimáticos antioxidativos.

CONCLUSÕES

As precipitações aplicadas nas plantas de soja no estádio em R8, sobretudo nos maiores níveis (120 e 180 mm), induzem a deterioração por umidade, ocasionando na redução da germinação e do vigor das sementes, aumento na atividade da protease, além do acúmulo de peróxido de hidrogênio e de MDA e redução no teor de proteínas e atividade de enzimas antioxidativas. Em geral, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA foram mais susceptíveis e NA 5909 e TMG 1175 mais tolerantes à deterioração por umidade nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALEN, R. B. Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. **Seed Science Research**, v. 9, n. 04, p. 285–295, 22 abr. 1999.

ABRASEM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **PADRÕES PARA A PRODUÇÃO E A COMERCIALIZAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA (Glycine max L.)**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2012/10/Instrução-Normativa-nº-45-de-17-de-Setembro-de-2013-Padrões-de-Identidade-e-Qualidade-Prod-e-Comerc-de-Sementes-Grandes-Culturas-República-DOU-20.09.13.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2019.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247–1257, 1 dez. 1995.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 1, p. 235–241, 1992.

BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 104–110, maio 1996.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93–107, 1 maio 2004.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 806–814, out. 2008.

BARBA-ESPIN, G. et al. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 6, p. 981–994, 20 jan. 2010.

BASSO, D. P. et al. Late seed maturation improves the preservation of seedling emergence during storage in soybean. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 2, p. 185–192, jun. 2018.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1 nov. 1971.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 15 ago. 1997.

BEWLEY, J.D., BRADFORD, K.J., HILLHORST, H.W.M, NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd. ed. New York: Springer Science + Business Media, 2013.

BHATIA, V. S. et al. Field Deterioration of Soybean Seed: Role of Oxidative Stresses and Antioxidant Defense Mechanism. **Journal of Plant Biology**, v. 32, n. 2, p. 179–190, 2010.

BONIECKA, J. et al. Potential biochemical, genetic and molecular markers of deterioration advancement in seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. 2019, p. 478–490, abr. 2019.

BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H. The oxygen status of the developing seed. **New Phytologist**, v. 182, n. 1, p. 17–30, abr. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Protein carbonylation: Proteomics, specificity and relevance to aging. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 1, p. 21–48, jan. 2014.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, n. 3, p. 463–468, 1 nov. 1991.

CARDOSO, J. et al. Oxidative Stress Parameters, Related Trace Elements Levels and Proteomics in Soybean Seeds in Order to Get a Better Assessment of Their Quality. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2022–2028, 2015.

CASTRO, E. DE M. et al. Physiological quality of soybean seeds produced under artificial rain in the pre-harvesting period. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 1, p. 14–21, 8 mar. 2016.

CAVERZAN, A. et al. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1011–1019, 2012.

CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764–775, 1 jan. 1955.

CHEN, Q.; ZHANG, M.; SHEN, S. Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 2, p. 273–278, 17 mar. 2011.

CHEN, X. et al. Comparative physiology and proteomics of two wheat genotypes differing in seed storage tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 130, n. 2018, p. 455–463, set. 2018.

CHENG, H.-Y.; SONG, S.-Q. Possible Involvement of Reactive Oxygen Species Scavenging Enzymes in Desiccation Sensitivity of *Antiaris toxicaria* Seeds and Axes. **Journal of**

Integrative Plant Biology, v. 50, n. 12, p. 1549–1556, dez. 2008.

CHMIELOWSKA-BAK, JAGNA IZBIANSKA, KAROLINA AND DECKERT, J. Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 2015, p. 1–5, 2 jun. 2015.

CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, jun. 2017.

CORBINEAU, F. et al. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, v. 10, n. 03, p. 329–339, 22 set. 2000.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. 53, p. 1–13, 2 dez. 2014.

DE GARA, L. **Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants** *Phytochemistry Reviews*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FB%3APHYT.0000047795.82713.99.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2019.

DE OLIVEIRA, D. F. A. et al. The deterioration of *Moringa oleifera* Lam. seeds in the course of storage involves reserve degradation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 12, p. 269, 10 dez. 2017.

DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 7, p. 1023–1028, 1 out. 1993.

DONÀ, M. et al. DNA profiling, telomere analysis and antioxidant properties as tools for monitoring ex situ seed longevity. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 987–998, maio 2013.

DONG, K. et al. Proteomic Analysis Reveals Key Proteins and Phosphoproteins upon Seed Germination of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 2015, p. 1017, 18 nov. 2015.

ERBAŞ, S. et al. Mobilization of seed reserves during germination and early seedling growth of two sunflower cultivars. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, n. 2016, p. 217–222, 2016.

FARHADI, R. et al. The effect of artificial ageing on germination components and seedling growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds. **Journal of Agriculture and Food Technology**, v. 2, n. 4, p. 69–72, 2012.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591,

2016.

FLEMING, M. B.; RICHARDS, C. M.; WALTERS, C. Decline in RNA integrity of dry-stored soybean seeds correlates with loss of germination potential. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 9, p. 2219–2230, 1 abr. 2017.

FORTI, V. A. et al. Weathering damage in soybean seeds: assessment, seed anatomy and seed physiological potential. **Seed Technology**, v. 35, n. 2, p. 213–224, 2013.

FRANÇA-NETO, J. DE B. et al. Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade. **EMBRAPA Soja - Documentos**, p. 75, 2016.

GARNCZARSKA, M.; BEDNARSKI, W.; JANCELEWICZ, M. Ability of lupine seeds to germinate and to tolerate desiccation as related to changes in free radical level and antioxidants in freshly harvested seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 56–62, jan. 2009.

GAY, C.; GEBICKI, J. M. A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, n. 2, p. 217–220, 10 set. 2000.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–14, 1 fev. 1977.

GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 10375–10394, 30 jul. 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, dez. 2010.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, nov. 2011.

GU, J. et al. Proteomic Dissection of Seed Germination and Seedling Establishment in *Brassica napus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 2016, p. 1482, 24 out. 2016.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–5, 1 jun. 1987.

HUTH, C. et al. Susceptibility to weathering damage and oxidative stress on soybean seeds with different lignin contents in the seed coat 1. **Journal of Seed Science**, p. 296–304, 2016.

ISLAM, M. Z. et al. Cherry tomato qualities affected by foliar spraying with boron and calcium. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 46–52, 2 fev. 2016.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice

Leaf Senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–9, 1 fev. 1976.

KATO, Y.; SAKAMOTO, W. FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 2018, p. 855, 20 jun. 2018.

KHAN, F. A. et al. **Seed deterioration and priming-An Overview** **SKUAST Journal of Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.IndianJournals.com>. Acesso em: 25 jan. 2019.

KIBINZA, S. et al. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. **Physiologia Plantarum**, v. 128, n. 3, p. 496–506, nov. 2006.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 309–315, set. 2011.

KRANNER, I. et al. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 10, p. 805–811, jul. 2010.

KUBALA, S. et al. Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. **Plant Science**, v. 231, n. 2015, p. 94–113, fev. 2015.

KUMAR, J. S. P. et al. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, set. 2015.

KUO, M. C.; KAO, C. H. Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 1, p. 149–152, 2003.

LI, Y. et al. Changes in the mitochondrial protein profile due to ROS eruption during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 114, n. 2017, p. 72–87, maio 2017.

LU, H. et al. Subfamily-Specific Fluorescent Probes for Cysteine Proteases Display Dynamic Protease Activities during Seed Germination. **Plant Physiology**, v. 168, n. 4, p. 1462–1475, ago. 2015.

LV, Y. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Wheat Seeds during Artificial Ageing and Priming Using the Isobaric Tandem Mass Tag Labeling. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162851, 15 set. 2016.

LV, Y. et al. Dynamic proteomic changes in soft wheat seeds during accelerated ageing. **PeerJ**, v. 6, n. 2018, p. e5874, 2 nov. 2018.

MALIK, C. P. Seed deterioration: a review. 2: 374-85. 2013. **International Journal of Life Science Botany and Pharmacy Research**, v. 2, n. 3, p. 374–385, 2013.

MANTOVANI, E.C. BERNARDO, S.; PALARETTI, L. . **Irrigação: princípios e métodos**. Viçosa: UFV, 2009.

MEDEIROS, A. D. et al. Parameters based on X-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. xxx–xxx, 2018.

MIN, C. W. et al. High-throughput proteome analysis reveals changes of primary metabolism and energy production under artificial aging treatment in *Glycine max* seeds. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 841–853, 21 dez. 2016.

MIN, C. W. et al. In-depth proteomic analysis of *Glycine max* seeds during controlled deterioration treatment reveals a shift in seed metabolism. **Journal of Proteomics**, v. 169, n. 2017, p. 125–135, out. 2017.

MISHRA, S.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 248, n. 3, p. 565–577, 21 jul. 2011.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 1 set. 2002.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11–19, jan. 2017.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 459–481, jun. 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1 ago. 1981.

NGUYEN, T.-P. et al. A role for seed storage proteins in *Arabidopsis* seed longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6399–6413, out. 2015.

NOCTOR, G.; REICHEL, J.-P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, n. 2018, p. 3–12, ago. 2018.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination—Still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574–581, dez. 2010.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J. et al. (Eds.). . **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA – SEA, 1991. p. 189 – 246.

ÖZACAR, M. et al. The novel multi cross-linked enzyme aggregates of protease, lipase, and catalase production from the sunflower seeds, characterization and application. **Colloids and**

Surfaces B: Biointerfaces, v. 173, n. 2019, p. 58–68, jan. 2019.

PALMA, J. M. et al. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 6–8, p. 521–530, jun. 2002.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 3, p. 324–349, 2005.

PARKHEY, S.; NAITHANI, S. C.; KESHAVKANT, S. ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, n. 2012, p. 261–267, ago. 2012.

PEIXOTO, P. H. P., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MOSQUIM, P. R., & MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 1, p. 23–29, set. 2006.

PITOL, C. Tolerância da soja à chuva pós-maturação. In: MELOTTO, A. M. et al. (Eds.). . **SOJA: Tecnologia & Produção**. Curitiba: Midiografi, 2016. p. 190.

R CORE TEAM. **R Development Core TeamR: A Language and Environment for Statistical Computing**, 2018.

RAJJOU, L. et al. Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 148, n. 1, p. 620–641, 18 jul. 2008.

RAO, R. S. P.; MØLLER, I. M. Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 21, p. 4166–4173, nov. 2011.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. 24: 981–990. 2012. **Cellular Signaling**, v. 24, n. 2012, p. 981–990, 2012.

REINHECKEL, T. et al. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. **Free Radical Research**, v. 29, n. 4, p. 297–305, 7 jan. 1998.

RHEE, S. G. CELL SIGNALING: H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1882–1883, 30 jun. 2006.

ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Water and Seed Survival. **Annals of Botany**, v. 63, n. 1, p.

39–39, jan. 1989.

SAHU, B. et al. Insights on germinability and desiccation tolerance in developing neem seeds (*Azadirachta indica*): Role of AOS, antioxidative enzymes and dehydrin-like protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, n. 2017, p. 64–73, mar. 2017a.

SAHU, B. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidative enzymes in dehydrating Karanj (*Pongamia pinnata*) seeds during storage. **South African Journal of Botany**, v. 112, n. 2017, p. 383–390, set. 2017b.

SANO, N. et al. Proteomic Analysis of Embryonic Proteins Synthesized from Long-Lived mRNAs During Germination of Rice Seeds. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 4, p. 687–698, abr. 2012.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2015.

SETHY, S. K.; GHOSH, S. Effect of heavy metals on germination of seeds. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 4, n. 2, p. 272–5, jul. 2013.

SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **international journal of agriculture and crop sciences IJACS**, v. 11, n. 6, p. 627–631, 2013.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, n. 1, p. 1–26, 24 abr. 2012.

SHARMA, S. et al. Positional effects on soybean seed composition during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 353–359, 6 abr. 2013.

SHARMA, S. N. et al. Gene expression patterns regulating the seed metabolism in relation to deterioration/ageing of primed mung bean (*Vigna radiata* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 2018, p. 40–49, mar. 2018.

SHEN, W. et al. Arabidopsis Aspartic Protease ASPG1 Affects Seed Dormancy, Seed Longevity and Seed Germination. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 7, p. 1415–1431, 10 abr. 2018.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, n. 1, p. 51–55, maio 1994.

VERMA, G. et al. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. **Journal of Plant Physiology**, v. 184, n. 2015, p. 79–88, jul. 2015.

VESELOVA, T. V.; VESELOVSKY, V. A.; OBROUCHEVA, N. V. Deterioration

mechanisms in air-dry pea seeds during early aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, n. 2015, p. 133–139, fev. 2015.

VIEIRA, R. D.; KRZYŻANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). . **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES - Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999. p. 1–26.

WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2109–2127, abr. 2012.

WANG, W. Q. et al. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 2, p. 606–626, 2013.

WILSON, K. A.; TAN-WILSON, A. Proteases catalyzing vicilin cleavage in developing pea (*Pisum sativum* L.) seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 224–225, n. 2018, p. 86–94, maio 2018.

WOJTYLA, Ł. et al. Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 66, p. 1–16, 4 fev. 2016.

XIN, X. et al. Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 2, p. 140–147, jan. 2014.

YIN, X. et al. Physiological and proteomic analyses on artificially aged *Brassica napus* seed. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 2015, p. 1–11, 25 fev. 2015.

ZHANG, H. et al. Carbonylated protein changes between active germinated embryos and quiescent embryos give insights into rice seed germination regulation. **Plant Growth Regulation**, v. 83, n. 2, p. 335–350, 10 nov. 2017.

ZUFFO, A. M. et al. Physiological and enzymatic changes in soybean seeds submitted to harvest delay1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 4, p. 488–496, dez. 2017.

RESUMO

PINHEIRO, Daniel Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Capítulo II. Vigor e alterações físicas de sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientadores: Felipe Lopes da Silva e Laércio Junio da Silva.

A exposição das sementes a ciclos subsequentes de absorção e perda de água no campo favorecem o processo de deterioração por umidade e faz deste um dos principais fatores que afetam a qualidade das mesmas. O objetivo do trabalho foi avaliar o vigor e alterações físicas de sementes de soja submetidas à deterioração por umidade na fase pré-colheita. Seis cultivares de soja (BMX APOLO, BMX 6563, NS 5959, NA 5909, BMX POTÊNCIA e TMG 1175) foram produzidas em casa de vegetação e submetidas à deterioração por umidade por meio de um sistema de precipitação, aplicando-se 0; 60 (30+30); 120 (60+60) e 180 (90+90) mm de precipitação quando as plantas atingiram o estágio R8. Após a colheita, as sementes foram avaliadas quanto ao vigor (primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, emergência e tetrazólio), teste de raios X e análise de plântulas. Observou-se redução do vigor de todas as cultivares submetidas à deterioração por umidade, sendo de até 34 e 40 pontos percentuais pelos testes de primeira contagem e envelhecimento acelerado, respectivamente. O teste de tetrazólio permitiu identificar correlação negativa entre o dano por umidade e a viabilidade das sementes. Tanto a densidade relativa quando a integrada não foram alteradas significativamente com a deterioração por umidade, de maneira oposta ao dano por umidade. De maneira geral, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA foram mais susceptíveis. Por outro lado, NA 5909 e TMG 1175 foram mais tolerantes à deterioração por umidade na fase de pré-colheita. A presença dos danos por umidade externos nas sementes de soja está diretamente relacionada à redução do vigor.

Palavras-chave: Análise de plântulas. *Glycine max*. Proteínas. Raios X. Qualidade fisiológica.

ABSTRACT

PINHEIRO, Daniel Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Chapter II. Vigor and physical changes in soybean seeds under deterioration by humidity in preharvest stage.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisers: Felipe Lopes da Silva and Laércio Junio da Silva.

The exposure of seeds to subsequent cycles of absorption and loss of water in the field favors the process of deterioration by humidity, making this one of the main factors that affects the quality. The aim of this work was to evaluate the vigor and physical changes of soybean seeds submitted to deterioration by humidity in pre harvest stage. Six soybean cultivars (BMX APOLO, BMX 6563, NS 5959, NA 5909, BMX POTÊNCIA e TMG 1175) were produced in greenhouse and submitted to deterioration by a precipitation system, applying 0; 60 (30 + 30); 120 (60 + 60) and 180 (90 + 90) mm of precipitation when the plants reached the R8 stage. After harvest, the seeds were evaluated for vigor (first germination count, accelerated aging, emergence and tetrazolium), X-ray test and seedling analysis. The vigor of all cultivars subjected to deterioration by humidity was reduced, being up to 34 and 40 percentage points by the first count and accelerated aging tests, respectively. The tetrazolium test identified a negative correlation between moisture damage and seed viability. Relative and integrated density were not significantly changed with deterioration by humidity, as opposed to moisture damage. In general, the cultivars BMX 6563 and BMX POTÊNCIA were more susceptible. On the other hand, NA 5909 and TMG 1175 were more tolerant to moisture deterioration in the pre harvest phase. The presence of external moisture damage in soybean seeds is directly related to reduced vigor.

Keywords: Seedling analysis. *Glycine max*. Proteins. X-ray. Physiological quality.

INTRODUÇÃO

Como uma das culturas agrícolas mais importantes a nível global, a soja (*Glycine max* (L) Merrill) é diretamente dependente de sementes de alta qualidade, que por sua vez engloba aspectos fisiológicos, físicos e sanitários e que de maneira conjunta, contribuem para obtenção de sementes de alto vigor e melhor desempenho no campo (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

A qualidade fisiológica das sementes de soja é máxima no estágio R7, quando o conteúdo de matéria seca, a germinação e o vigor atingem valores máximos. Todavia, em razão do elevado teor de água das sementes neste estágio, o ponto de colheita recomendado é o estágio R8, quando 95% das vagens apresentam coloração típica de vagem madura (FEHR; CAVINESS, 1977). Após a maturidade fisiológica, alterações degenerativas começam a ocorrer nas sementes, de modo que a qualidade das mesmas pode ser mantida ou decrescer, dependendo principalmente das condições ambientais no período que antecede a colheita (FEHR; CAVINESS, 1977; BHATIA *et al.*, 2010; FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

Neste contexto, a ocorrência de chuvas ou flutuações diárias de umidade relativa do ar, especialmente associadas a altas temperaturas, resulta na deterioração e reduz a qualidade das sementes, sobretudo em regiões tropicais (SHELAR, 2008; MALIK, 2013; MARCOS FILHO, 2015; PITOL, 2016; MATHIAS *et al.*, 2017). Sob essas condições, é comum observar danos por umidade nas sementes de soja, caracterizados pela presença de rugas ou rompimento do tegumento na região oposta ao hilo ou sobre o eixo embrionário, e que são diretamente relacionados à redução da qualidade fisiológica das sementes (FORTI *et al.*, 2013; MARCOS FILHO, 2015; FRANÇA-NETO *et al.*, 2016).

A detecção destes danos comumente é feita pelo teste de tetrazólio, enquanto a qualidade de sementes é avaliada por meio do teste de germinação e complementada por outros testes de vigor (FRANÇA NETO *et al.*, 1999; MARCOS FILHO, 2015b; BASSO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). Embora eficientes estes testes apresentam algumas limitações, como o maior tempo para obtenção de resultados e serem destrutivos, não permitindo assim a reutilização das sementes em outras análises. Neste sentido, a técnica de raios X surge como alternativa viável para avaliação do vigor de sementes, uma vez que é classificada como simples, rápida e não destrutível, sendo baseada na absorção desses raios pelos tecidos, que por sua vez são transpostos para a imagem em tons de cinza (RAHMAN; CHO, 2016; ABUD; CÍCERO; GOMES JUNIOR, 2018; NORONHA; MEDEIROS;

PEREIRA, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2018b; SEVERIANO *et al.*, 2018b). Forti et al. (2013) utilizaram a técnica de raios X e concluíram que sementes de soja com danos por umidade apresentaram menor qualidade fisiológica quando comparadas às sementes sem danos. Estes autores também concluíram que os testes de raios X e tetrazólio podem ser utilizados com eficiência na análise dos efeitos da deterioração por umidade em campo. No entanto, apesar dessas vantagens, este teste também apresenta limitações, como a subjetividade de interpretação, morosidade e necessidade de mão-de-obra qualificada. Neste contexto, o uso do software ImageJ® busca superar essas limitações e tem sido recentemente utilizado como ferramenta para análise semi-automatizada de imagens radiográficas de sementes de várias espécies (ABUD; CÍCERO; GOMES JUNIOR, 2018; NORONHA; MEDEIROS; PEREIRA, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2018).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o vigor e as alterações físicas por meio do teste de raios X em sementes de diferentes cultivares de soja submetidas à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido utilizando as sementes colhidas no experimento relatado no capítulo 1 com as cultivares de crescimento indeterminado BMX 6563 (GM = 6,3); BMX APOLO (GM = 5,5); BMX POTÊNCIA (GM = 6,7); NA 5909 (GM = 5,9); NS 5959 (GM = 5,9) e TMG 1175 (GM = 7,5) (Tabela 1). Os tratamentos de precipitação também foram os mesmos descritos no capítulo 1, sendo de 0 (controle); 60 (30+30); 120 (60+60) e 180 (90+90) mm.

Após serem colhidas e secas em ambiente de laboratório, as sementes de cada tratamento foram submetidas a avaliações fisiológicas, físicas e bioquímicas descritas a seguir:

I. Avaliações fisiológicas

Primeira contagem de germinação

Quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento foram distribuídas em rolos de papel toalha, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador a 25 °C e as avaliações efetuadas no quinto dia após a montagem, de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análises de

Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais (Figuras 6 e 7).

Envelhecimento acelerado

Foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, que foram colocadas em caixas “gerbox” sobre uma tela, contendo 40 mL de água e mantidas em BOD a 41 °C durante 48 horas (MARCOS FILHO, 1999). Após esse período, as sementes foram colocadas para germinar a 25 °C conforme descrito para o teste de primeira contagem de germinação (BRASIL, 2009) e a avaliação realizada no quinto dia após a instalação do teste.

Emergência de plântulas

Foi conduzido em bandejas contendo solo e areia na proporção 3:1. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação. As irrigações foram feitas de acordo com a necessidade visando manter o solo próximo à capacidade de campo. Foram utilizadas 200 sementes, com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. Foram efetuadas contagens diárias de plântulas normais (Figura 20) emergidas até a estabilização. Foram avaliados a porcentagem de emergência e o índice de velocidade de emergência (IVE) (MAGUIRE, 1962).



Figura 20 - Emergência de plântulas de soja em casa de vegetação. A) Plântulas recém-emergidas B) Plântulas mais desenvolvidas. Setas: padrão de plântulas normais adotado. Fotos: Daniel Teixeira Pinheiro.

Teste de tetrazólio

Foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, que foram pré-condicionadas em papel-toalha umedecido com água destilada por um período de 16 horas, em germinador com temperatura ajustada para 25 °C. As sementes foram transferidas para copos plásticos, com volume de 50 mL, sendo totalmente submersas em solução de tetrazólio (2-3-5, trifênil cloreto

de tetrazólio), à concentração de 0,075% e mantidas à temperatura de 40 °C por, aproximadamente, 3,5 h no interior de uma câmara de germinação, na ausência de luz. Após o processo de coloração, as sementes foram lavadas com água corrente e mantidas submersas até o momento da avaliação. Posteriormente, as sementes foram avaliadas individualmente, seccionando-as longitudinalmente e simetricamente, com o auxílio de lâmina e classificadas de acordo com os critérios propostos por França Neto *et al.* (1999). Além disso, foi avaliada a porcentagem de danos por umidade, caracterizados por lesões simétricas em ambos os cotilédones no lado oposto ao hilo (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA-NETO, 1999).

Análise computadorizada de imagens de plântulas (ImageJ®)

Foram utilizadas as mesmas sementes que posteriormente advindas do teste de raios X (avaliações físicas), sendo distribuídas em linha disposta no terço superior de duas folhas de papel para germinação e cobertas com uma terceira folha. O substrato foi previamente umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos contendo as sementes foram mantidos em germinador a 25 °C por três dias. Ao final deste período, a aquisição de imagens de plântulas foi realizada por scanner (HP, Scanjet 200), em que as plântulas de cada repetição foram digitalizadas com uma resolução de 200 dpi.

Para uso no ImageJ®, as imagens foram inseridas no software e após ajustes de escala, foi demarcado individualmente o hipocótilo e a parte radicular de cada plântula. A partir destes dados, foi gerado para cada repetição os índices de crescimento e uniformidade, a partir de equações propostas por Sako *et al.* (2001), além do índice de vigor corrigido, proposto por Medeiros e Pereira (2018). Os resultados de comprimento foram expressos em milímetros por plântula e os índices em valores adimensionais, podendo variar de 1 a 1000, quanto maior o valor, melhor é o desempenho para aquela característica.

II. Avaliações físicas

Teste de raios X

Foram utilizadas as mesmas sementes que posteriormente foram submetidas à análise de plântulas, com quatro repetições de 10 sementes. As sementes foram fixadas de forma ordenada sobre plástico adesivo, para possibilitar posterior identificação individual nas análises subsequentes. Em seguida, foram geradas as imagens radiográficas usando equipamento Faxitron, modelo MX-20 (Faxitron X-ray Corp. Wheeling, IL, U.S.A),

submetendo-se as sementes à radiação por 5 segundos, 23 kV e uma distância focal de 41,6 cm. As imagens digitais geradas foram salvas em computador e analisadas de forma semi-automatizada pelo software ImageJ[®], para a obtenção das seguintes variáveis:

Densidade relativa: Definida como a soma dos valores cinza de todos os pixels na área selecionada dividida pelo número de pixels da seleção (GEIGER; BLEM; LUDWIG, 2016).

Densidade Integrada: Soma dos valores dos pixels na imagem ou seleção, isto é equivalente ao produto de área e valor cinza médio (densidade relativa).

Dano por umidade: Foram quantificadas as sementes com ausência ou presença de dano por umidade, com os dados em porcentagem (%). Os danos foram caracterizados pelo enrugamento do tegumento do lado oposto ao hilo (Figura 21).

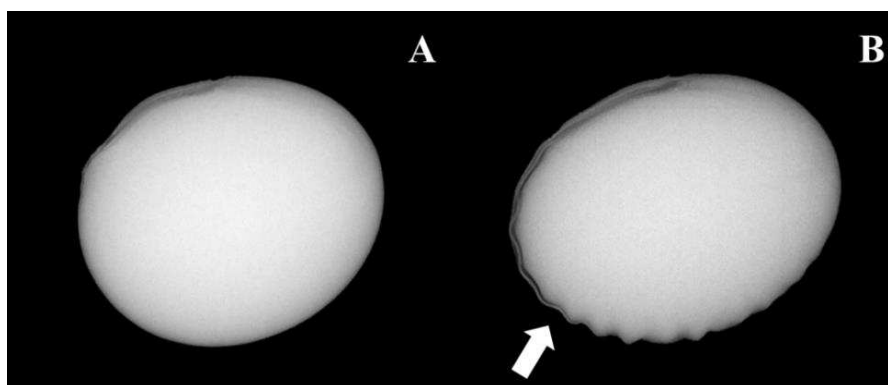


Figura 21 - Imagens de raios X em escala de cinza de sementes de soja com ausência (A) e presença (B) de dano por umidade. Seta: Enrugamento do tegumento caracterizando o dano por umidade.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6x4, sendo seis variedades de soja e quatro níveis de precipitação simulada (0; 60; 120 e 180 mm) com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Depois de confirmar a distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Foi realizada também análise multivariada de componentes principais (PCA) para todas as avaliações realizadas. Uma matriz “n x p” foi obtida, onde n corresponde ao número de tratamentos (n = 24) e “p” o número de variáveis analisadas (p = 13). Os autovalores e

autovetores foram calculados a partir das matrizes de covariância e plotados em gráficos bidimensionais (diagrama de ordenação de categorias e círculo de correlações), geradas a partir do pacote factoextra (KASSAMBARA; MUNDT; 2016). A correlação de Pearson (r) foi realizada para os dados do teste de tetrazólio (viabilidade e danos por umidade) e para os dados obtidos nas demais avaliações realizadas. O software estatístico R foi utilizado em todas as análises (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os níveis de precipitação e as cultivares para a primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência (IVE). Na primeira contagem de germinação, observam-se reduções significativas na porcentagem de plântulas normais de todas as cultivares com a aplicação dos níveis de precipitação. Essas reduções foram mais evidentes nas cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA, sendo de 27 e 34 pontos percentuais (p.p.) quando se compara o maior nível de precipitação (180 mm) e o controle (0 mm). Por outro lado, a cultivar TMG 1175 só apresentou redução significativa a 180 mm, sendo de somente 12 p.p. com relação ao controle (0 mm). As informações obtidas no teste de primeira contagem podem ser utilizadas como um teste de vigor, uma vez que permite inferir sobre a velocidade de germinação (Nakagawa et al., 1999). Desta forma, pode-se concluir que todas as cultivares tiveram sua velocidade de germinação reduzida, principalmente nos maiores níveis de precipitação (120 e 180 mm) (Tabela 7).

No teste de envelhecimento acelerado, observa-se que houve diferença significativa entre as cultivares mesmo sem aplicação da precipitação (0 mm), sendo maior para as sementes da BMX APOLO e menor para NA 5959 e BMX POTÊNCIA, respectivamente. Com a aplicação das precipitações, todas as cultivares apresentaram reduções significativas na porcentagem de plântulas normais, principalmente nos níveis de 120 e 180 mm. Quando se compara o maior nível de precipitação (180 mm) com o controle (0 mm), observa-se que a cultivar BMX APOLO apresentou a maior redução, sendo de 40 p.p. (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios obtidos nos testes de primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) de seis cultivares de soja, submetidas a diferentes níveis de precipitação.

	BMX 6563	BMX APOLO	BMX POTÊNCIA	NA 5909	NS 5959	TMG 1175
Precipitação (mm)	Primeira contagem de germinação (%)					
0	92 Aa	85 Aa	87 Aa	88 Aa	88 Aa	89 Aa
60	79 Bb	79 Ab	72 Bb	79 Bb	82 Aab	88 Aa
120	68 Cc	72 Bb	68 Bc	79 Bb	71 Bb	85 Aa
180	65 Cc	65 Bc	53 Cd	77 Ba	70 Bb	77 Ba
Média	76	75	70	81	78	85
CV(%)	9,17					
Precipitação (mm)	Envelhecimento acelerado (%)					
0	76 Abc	86 Aa	72 Ac	74 Ac	82 Aabc	84 Aab
60	58 Bc	69 Bab	61 Bbc	65 Bbc	74 Ba	68 Bab
120	55 Bb	65 Ba	60 Bab	59 Bab	66 Ca	65 Ba
180	55 Bb	46 Cc	58 Bab	59 Bab	65 Ca	62 Bab
Média	61	67	63	64	72	70
CV(%)	6,40					
Precipitação (mm)	Emergência de plântulas (%)					
0	90 Aab	92 Aab	93 Aab	90 Aab	88 Ab	97 Aa
60	84 Aa	83 Ba	88 Aba	85 ABA	83 Aa	91 ABA
120	84 Aa	82 Ba	85 Ba	82 Ba	84 Aa	88 Ba
180	75 Bb	78 Bcd	77 Cb	89 Aba	85 Aabc	80 Cbcd
Média	83	84	86	87	85	89
CV(%)	4,42					
Precipitação (mm)	IVE					
0	3,72 Abc	3,95 Aab	3,78 Abc	3,43 ABc	3,85 Abc	4,34 Aa
60	3,42 Abb	3,27 Bb	3,91 Aa	3,36 Bb	3,60 Abab	3,65 Bab
120	3,29 Bca	3,37 Ba	3,67 Aa	3,21 Ba	3,46 ABA	3,53 Bca
180	2,99 Cc	2,99 Bc	2,92 Bbc	3,78 Aa	3,42 Babc	3,22 Cbc
Média	3,36	3,40	3,57	3,45	3,58	3,69
CV(%)	6,25					

Letras diferentes maiúsculas na coluna (entre níveis de precipitação) e minúsculas na linha (entre cultivares) diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação.

A redução do vigor por meio do envelhecimento artificial é associada diretamente à maior produção e concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BAILLY, 2004; SHARMA *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015; DENG *et al.*, 2017). As mitocôndrias

constituem o processo respiratório e conseqüentemente são os principais locais de produção de EROS e as principais organelas expostas aos danos oxidativos (RATAJCZAK *et al.*, 2019). Neste contexto, Xin *et al.* (2014) avaliaram os efeitos da deterioração em sementes de soja e observaram significativa redução da quantidade de mitocôndrias viáveis em células embrionárias submetidas ao envelhecimento acelerado. Desta forma, o processo de envelhecimento inibe a biogênese e a restauração mitocondrial durante a embebição das sementes, o que por sua vez afeta diretamente a síntese e a produção de ATP, reduzindo a energia disponível para o desenvolvimento do embrião (YIN *et al.*, 2009; XIN *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2018). É importante destacar que neste trabalho, as sementes foram submetidas a um duplo processo de deterioração, por meio das precipitações aplicadas ainda na planta (pré-colheita) e envelhecimento acelerado, onde as sementes foram submetidas à alta temperatura e umidade relativa.

Com exceção das cultivares NA 5909 e NS 5959, a emergência de plântulas foi reduzida significativamente com a aplicação dos níveis de precipitação. As demais cultivares apresentaram comportamento semelhantes, com reduções de aproximadamente de 15 p.p. comparando-se o maior nível de precipitação (180 mm) com o controle (0 mm). Além de reduzir a porcentagem, a deterioração por umidade causou redução significativa do IVE, indicando menor velocidade de emergência (Tabela 7).

De maneira semelhante ao relatado, já foi observado que a deterioração de sementes de soja por meio da combinação de precipitações (30 mm) e épocas de armazenamento (0, 90 e 180 dias) contribuiu para redução tanto na porcentagem de emergência quanto do IVE, sobretudo em cultivares com menores teores de lignina no tegumento (CASTRO *et al.*, 2016). Em sementes de soja submetidas ao atraso de colheita no campo, a redução da porcentagem e da velocidade de emergência foi observada principalmente após 15 dias de atraso na colheita, reduzindo o vigor de maneira significativa (ZUFFO *et al.*, 2017).

A emergência de plântulas bem sucedida se dá por meio da combinação da porcentagem e da velocidade, que por sua vez estão diretamente relacionadas a fatores como mobilização de reservas ao embrião, enfraquecimento das paredes celulares do tegumento, balanço hormonal e outros (SORIANO *et al.*, 2014; PEAUCELLE; WIGHTMAN; HÖFTE, 2015; ŽÁDNÍKOVÁ *et al.*, 2015; DE WIT; GALVÃO; FANKHAUSER, 2016; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016; WARPEHA; MONTGOMERY, 2016; PHAM *et al.*, 2018). Em espécies epígeas como a soja, estes e outros fatores em conjunto serão preponderantes para o alongamento celular e formação da alça cotiledonar, que irá atuar no rompimento da

superfície do solo e proteção do meristema apical da plântula (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016; BASSO et al., 2018). Desta forma, pode-se compreender que a deterioração por umidade pode ter afetado diversos processos fisiológicos que levaram à menor porcentagem e velocidade de emergência das plântulas de soja.

A deterioração por umidade induzida pelas precipitações causou tanto a redução da viabilidade quanto aumento significativo dos danos por umidade nas sementes de soja avaliados por meio do teste de tetrazólio. A redução da viabilidade das sementes foi mais evidente nas cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA, com valores significativos de até 40 p.p. (Figura 22).

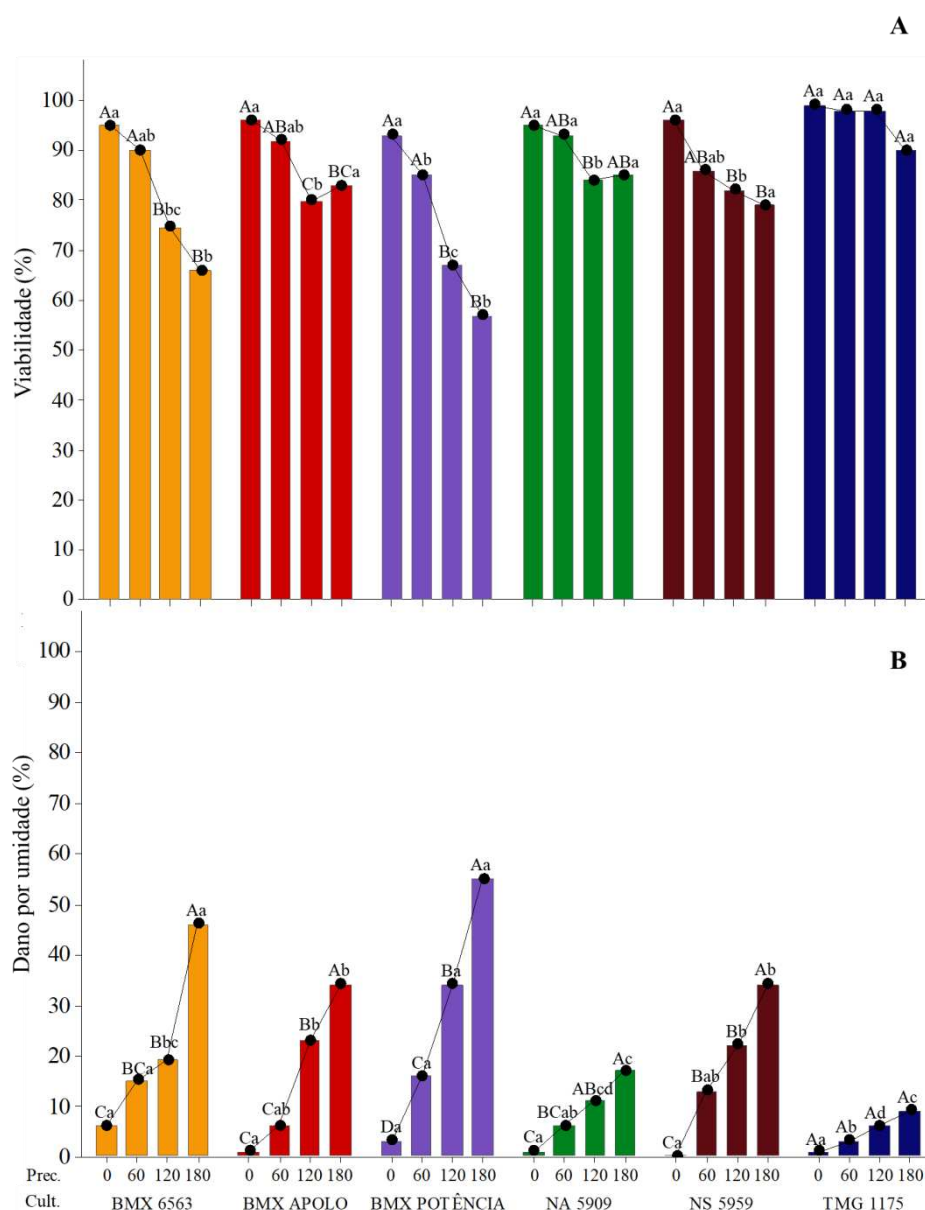


Figura 22 - Viabilidade (A) e danos por umidade (B) avaliados pelo teste de tetrazólio em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas entre os níveis de precipitação e minúsculas entre cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A cultivar TMG 1175 foi a única entre as avaliadas na qual não houve diferença significativa tanto para a viabilidade quanto para os danos por umidade nas sementes submetidas às precipitações (Figura 22). Estes resultados corroboram os observados para o vigor, sendo que em geral, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA apresentaram maior e TMG 1175 menor suscetibilidade à deterioração por umidade, respectivamente.

Em um contexto geral, é possível observar que à medida que a viabilidade (Figura 22A) das sementes foi reduzida, os danos por umidade (Figura 20B) foram maiores. Essa tendência foi confirmada por meio da correlação de Pearson entre estes parâmetros, sendo possível observar correlação negativa e significativa para os três níveis de precipitação aplicados (60, 120 e 180 mm) (Figura 23).

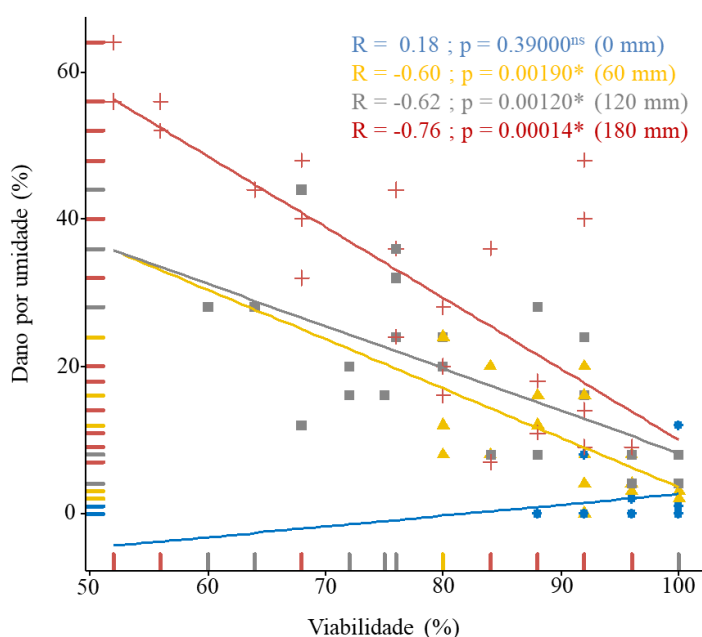


Figura 23 - Correlação de Pearson obtida entre a viabilidade, danos por umidade e e viabilidade das sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. ^{ns},*: não significativo e significativo a 5% pelo teste t ($p < 0,05$), respectivamente.

O teste de tetrazólio é baseado na modificação da coloração dos tecidos vivos da semente por meio da reação das enzimas desidrogenases, catalisadoras da respiração celular, com o sal de tetrazólio. Com esta reação, é formado um composto de coloração avermelhada,

não difusível, denominado formazan (FRANÇA-NETO *et al.*, 1999). As diferenças de coloração observadas permitem diferenciar os tecidos vivos, deteriorados e mortos, possibilitando a classificação das sementes em viáveis ou não viáveis (BRASIL, 2009). Neste contexto, à medida que a deterioração foi intensificada nas sementes de soja, foram observados danos por umidade caracterizados pelas estrias no lado oposto ao hilo, bem como maior proporção e intensidade de tecidos com coloração vermelha intensa (indicando maior intensidade respiratória) e tecidos brancos (mortos) (Figura 24).

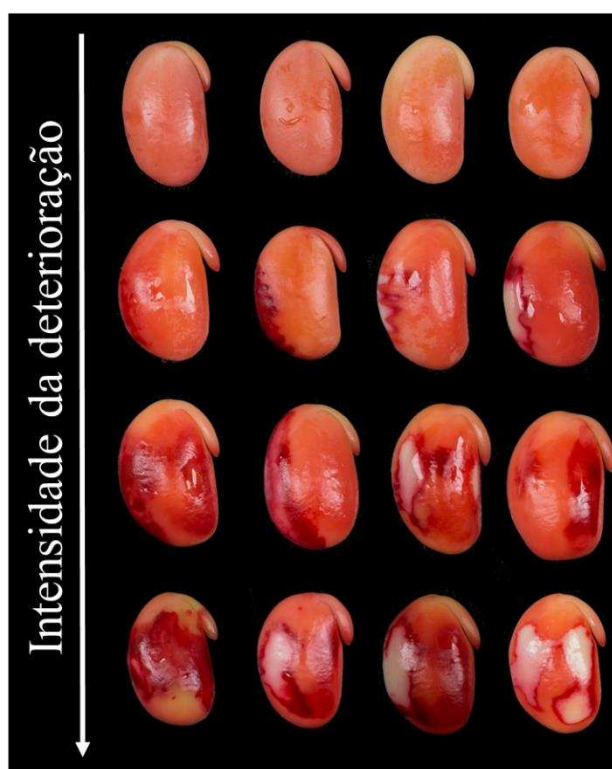


Figura 24 - Intensidade da deterioração avaliada por meio do teste de tetrazólio. Fotos: Paulo Hilst. Tratamento da imagem: Daniel Pinheiro.

O enrugamento do lado oposto ao hilo característico de dano causado pela umidade se dá devido ao rompimento de “células em forma de ampulheta” que atuam amenizando a expansão, contração e rompimento das células parenquimáticas do tegumento quando submetidas a ciclos subsequentes de hidratação e desidratação (FORTI *et al.*, 2013). Desta forma, as células cotiledonares ficam mais expostas ao ambiente e o processo de deterioração se estende a toda semente (Figura 24).

De maneira semelhante, Huth *et al.* (2016) observaram danos em sementes de soja submetidas à deterioração por umidade, sobretudo em sementes expostas a variações diárias

da umidade relativa. Também avaliando a deterioração em sementes de soja, Forti *et al.* (2013) reforçam que sementes caracterizadas com danos por umidade pelo teste de tetrazólio apresentam menor potencial fisiológico, de acordo com a extensão e localização destes danos. A deterioração de sementes de soja pelo atraso de colheita também foi responsável pela redução da viabilidade e do vigor, que foram relacionados principalmente aos danos por umidade e por percevejo, identificados pelo teste de terazólio (ZUFFO *et al.*, 2017). Castro *et al.* (2016) reforçam que os danos por umidade avaliados pelo teste de tetrazólio em sementes de soja estão diretamente associados à redução do vigor das sementes e pode variar, dentre outros fatores, com o teor de lignina no tegumento.

Avaliando as análises físicas por meio do teste de raios X, observa-se que houve interação significativa entre os fatores precipitação e cultivares com relação à densidade integrada e danos por umidade. A densidade relativa foi a única variável na qual a interação não foi significativa (Tabela 8).

Tabela 8 - Densidade relativa, densidade integrada e danos por umidade obtidas por meio do teste de raios X em sementes de seis cultivares de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação.

	BMX 6563	BMX APOLO	BMX POTÊNCIA	NA 5909	NS 5959	TMG 1175	
Precipitação (mm)	Densidade relativa (cinza.pixel ⁻¹)						Média
0	192,61	198,93	191,62	194,85	191,77	191,02	193,47 A
60	192,22	199,83	190,18	196,77	191,51	188,34	193,14 A
120	191,55	200,72	189,79	193,92	194,20	189,51	193,28 A
180	194,06	196,42	185,95	194,25	192,78	185,76	191,54 A
Média	192,61 b	198,98 a	189,39 c	194,95 b	192,57 b	188,66 c	
CV(%)	1,37						
Precipitação (mm)	Densidade integrada (cinza.pixel ⁻¹ .mm ²⁻¹)						Média
0	7447 Aa	7616 Aa	7427 Aa	7476 Aa	7362 Aa	6551 Aa	7313,17
60	7135 Aa	7447 ABa	6904 ABa	7401 Aa	7042 Aa	6270 Ab	7033,17
120	7025 Aab	7540 ABa	7003 ABab	7233 Aa	7233 Aa	6608 Ab	7060,00
180	7015 Aab	6915 Ba	6600 Bbc	7317 Aab	7317 Aab	6009 Ac	6855,83
Média	7155,50	7379,50	6983,50	7356,75	7356,75	6359,50	
CV(%)	5,00						
Precipitação (mm)	Dano por umidade (%)						Média
0	23 Ca	5 Bab	5 Cab	5 Cab	3 Cb	3 Bb	7
60	58 Ba	20 Bcd	53 Bab	38 Bbc	18 Cd	13 Bd	33

120	68 Abb	48 Ab	75 Aa	40 Bb	45 Bb	40 Ab	53
180	80 Aa	43 Ac	75 Aab	60 Abc	68 Ac	48 Ac	62
Média	57,25	29,00	52,00	35,75	33,50	26,00	
CV(%)	23,96						

Letras diferentes maiúsculas na coluna (entre níveis de precipitação) e minúsculas na linha (entre cultivares) diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação.

Por meio das análises fisiológicas, observou-se que as precipitações aplicadas impactaram negativamente o potencial fisiológico das sementes de soja, juntamente com a ocorrência de danos por umidade. Como destacado no teste de tetrazólio, os danos por umidade em sementes de soja causam enrugamento nos cotilédones, fissuras no tegumento e pode causar a morte dos tecidos e comprometer os atributos relacionados à integridade física das sementes, característica essas que têm sido avaliadas por técnicas de raios X (FORTI *et al.*, 2013).

Nas radiografias geradas das sementes, o dano por umidade é caracterizado pelo enrugamento visível no tegumento, nos cotilédones ou na própria região do eixo embrionário das sementes (Figura 21). Esse enrugamento pode apresentar diferentes intensidades e, quanto mais expressivo é o nível deste enrugamento ao longo da semente, maior a chance de redução da qualidade fisiológica da semente (PINTO *et al.*, 2009).

Observou-se que com o aumento da precipitação houve incremento na ocorrência do dano por umidade nas sementes em todos os tratamentos, com proporções variadas em função da cultivar analisada. As cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA apresentaram 57 e 70 pontos percentuais de incremento comparando-se o maior nível de precipitação (180 mm) com o controle (0 mm). As cultivares BMX APOLO e TMG 1175 foram as que menos apresentaram danos por umidade no maior nível de precipitação (180 mm). De maneira geral, esses resultados estão de acordo com os observados nas análises fisiológicas, onde BMX 6563 e BMX POTÊNCIA foram mais e TMG 1175 menos suscetíveis à deterioração por umidade, respectivamente (Tabela 8).

A análise de sementes por meio de imagens de raios X tem apresentado potencial na avaliação da qualidade, bem como na fenotipagem eficiente de forma não destrutiva, fornecendo características internas e anatômicas (ELMASRY *et al.*, 2019). Embora a avaliação visual da radiografia quando feita por analista seja a abordagem mais simples e mais sensível, pode se tornar um processo moroso, sujeito a erros e impraticável em grande escala (MEDEIROS *et al.*, 2019). Portanto, o uso de variáveis obtidas por meio de softwares

apresentam grande potencial para otimização do processo de aquisição de informações das radiografias, reduzindo substancialmente a subjetividade inerente ao analista. Dentre essas variáveis, a densidade relativa tem se destacado em trabalhos realizados com sementes de espécies olerícolas, gramíneas forrageiras e florestais (ABUD; CÍCERO; GOMES JUNIOR, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2019). Desta forma, foram realizadas avaliações visuais para identificar a ocorrência de dano por umidade de cada tratamento e, análises com software para quantificar a intensidade desse dano ao longo das sementes por meio da densidade. A aplicação das precipitações ocasionou em redução da densidade integrada somente nas cultivares BMX APOLO e BMX POTÊNCIA, no maior nível de precipitação (180 mm). A densidade relativa não foi reduzida significativamente em nenhuma das cultivares analisadas. No entanto, considerando os valores absolutos, vale ressaltar que tanto a densidade relativa quanto integrada foram reduzidas com a aplicação das precipitações (Tabela 8), conforme ilustrado pela figura 25.

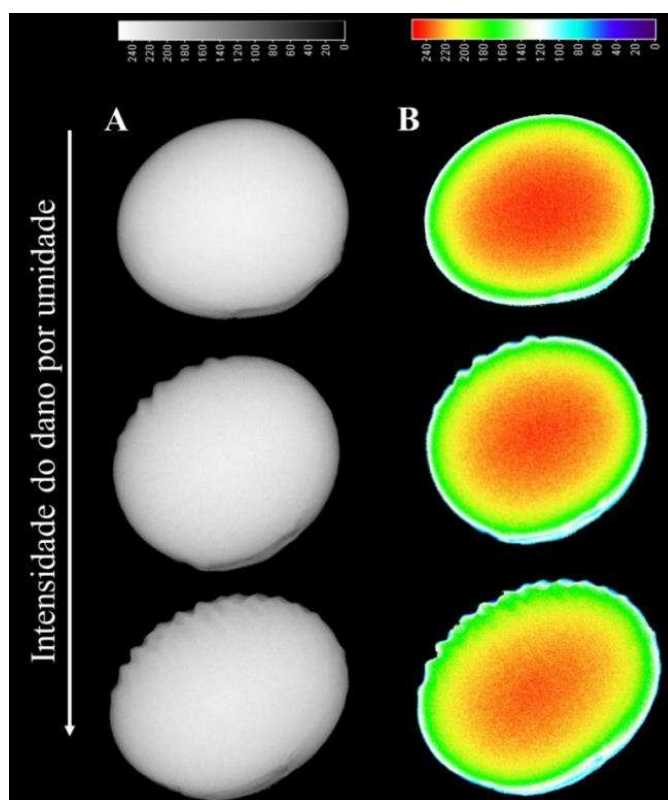


Figura 25 - Representação de diferentes níveis de dano por umidade em sementes de soja por meio de imagens de raios X em escala de cinza (A) e representação da densidade de tecido em escala de cores (B).

Considera-se que zonas próximas ao branco na escala de cinza (Figura 25A) e vermelha na escala de cores (Figura 25B) indicam tecidos mais densos, respectivamente (Figura 25). A diferenciação da densidade tecidual em sementes com diferentes intensidades de deterioração ocorre devido à resistência variável à passagem dos raios X, em que os fótons podem ser transmitidos, espalhados (dispersão de Compton) ou absorvidos (colisão fotoelétrica) quando colidem sobre um objeto (KOTWALIWALE *et al.*, 2014). Portanto, é possível constatar visualmente que de maneira geral, o incremento do dano por umidade propiciou uma tendência na redução da densidade tecidual das sementes. Esse é o primeiro trabalho que realiza esse tipo de abordagem em sementes de soja utilizando a técnica de raios X. A redução de densidade tecidual observada com o incremento do dano por umidade pode estar relacionada com a separação dos tecidos da epiderme e da hipoderme, expondo o tecido do parênquima subjacente ou o cotilédone a danos físicos, propiciando, por sua vez, a deterioração parcial dos seus tecidos (FORTI *et al.*, 2013), conforme foi abordado anteriormente pelo teste de tetrazólio (Figuras 22, 23 e 24).

Por meio da análise computadorizada de plântulas, observa-se que somente o índice de vigor corrigido (IVC) apresentou interação significativa entre os fatores precipitação e cultivares. Em geral, a deterioração por umidade provocada pela aplicação das precipitações acarretou nas reduções do comprimento da parte aérea, raiz e total de plântulas em todas as cultivares analisadas (Tabela 9).

Tabela 9 - Comprimento da parte aérea, raízes e total; índice de uniformidade (IU) e índice de vigor corrigido (IVC) obtidos através da análise computadorizada de imagens de plântulas.

	BMX 6563	BMX APOLO	BMX POTÊNCIA	NA 5909	NS 5959	TMG 1175	
Precipitação (mm)	Comprimento da parte aérea (mm.plântula ⁻¹)						Média
0	19,47	29,04	32,45	30,12	26,81	31,31	28,20 A
60	15,46	26,77	25,83	28,09	24,78	27,28	24,70 B
120	12,90	26,30	26,96	25,19	22,40	27,16	23,49 BC
180	13,84	26,16	29,13	20,78	19,85	21,52	21,88 C
Média	15,42 c	27,07 ab	28,59 a	26,04 ab	23,46 b	26,82 ab	
CV (%)	14,23						
Precipitação (mm)	Comprimento de raízes (mm.plântula ⁻¹)						Média
0	33,43	55,54	62,07	61,08	51,22	48,92	52,04 A
60	24,60	51,54	50,08	48,96	47,53	41,51	44,04 B
120	21,04	45,10	43,50	38,39	36,51	44,52	38,18 C
180	19,01	40,23	42,30	33,44	30,28	29,11	32,39 D

Média	24,52 c	48,10 a	49,49 a	45,47 ab	41,39 b	41,02 b	
CV (%)	14,89						
Precipitação (mm)	Comprimento total (mm.plântula ⁻¹)						Média
0	52,90	84,58	94,52	91,20	78,03	80,24	80,24 A
60	40,06	78,32	75,91	77,05	72,31	68,79	68,74 B
120	33,94	71,41	70,46	63,57	58,91	71,69	61,66 C
180	32,85	66,39	71,43	54,22	50,13	50,63	54,27 D
Média	39,94 d	75,17 ab	78,08 a	71,51 abc	64,84 c	67,84 bc	
CV (%)	13,7						
Precipitação (mm)	Índice de uniformidade (IU)						Média
0	853,51	905,58	918,09	908,93	906,52	934,35	904,50 A
60	900,01	891,06	863,68	897,00	903,07	934,82	898,27 A
120	894,26	920,34	881,41	904,65	933,92	913,92	908,08 A
180	912,69	894,44	887,65	935,60	899,65	924,99	909,17 A
Média	890,12 ab	902,86 ab	887,71 b	911,54 ab	910,79 ab	927,02 a	
CV (%)	4,1						
Precipitação (mm)	Índice de vigor corrigido (IVC)						Média
0	393,51 Ab	471,31 Aa	512,09 Aa	499,06 Aa	500,72 Aa	468,76 Aa	474,24
60	337,19 ABc	434,15 ABab	377,47 Bbc	411,05 Bab	452,39 Aa	426,46 Aab	406,45
120	295,48 Bb	374,35 BCa	356,05 Bab	382,98 Ba	388,36 Ba	424,64 Aa	370,31
180	298,89 Bb	341,77 Cab	280,36 Cb	373,45 Ba	339,67 Bab	329,34 Bab	327,25
Média	331,27	383,42	381,49	416,63	420,29	412,30	
CV (%)	8,48						

Letras diferentes maiúsculas na coluna (entre níveis de precipitação) e minúsculas na linha (entre cultivares) diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação.

Assim como considerado anteriormente para a emergência e o IVE (Tabela 7), a deterioração por umidade pode causar redução no comprimento das plântulas por meio de uma combinação de diversos fatores, como o aumento nas taxas respiratórias, degradação de reservas, desbalanço hormonal e outros (SORIANO *et al.*, 2014; PEAUCELLE; WIGHTMAN; HÖFTE, 2015; ŽÁDNÍKOVÁ *et al.*, 2015; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Para o índice de uniformidade (IU) não houve diferença significativa entre os níveis de precipitação aplicados. Este resultado indica que apesar de causar queda na germinação e do comprimento das plântulas, a deterioração por umidade não afetou de forma significativa a uniformidade das plântulas, ou seja, houve redução de crescimento, porém de forma homogênea dentro de cada tratamento.

O aumento nos níveis de precipitação causou redução no índice de vigor corrigido (IVC) em todas as cultivares analisadas, confirmando os resultados previamente observados pelos testes de vigor (Tabela 7). As maiores reduções no IVC foram observadas principalmente para as cultivares BMX 6563, BMX APOLO e BMX POTÊNCIA. A cultivar TMG 1175 teve o IVC reduzido significativamente somente no maior nível de precipitação aplicado (180 mm). O IVC propõe um balizamento mais eficiente dos resultados do índice de vigor proposto por Sako *et al.* (2001), uma vez que realiza um ajuste baseado na germinação, oferecendo um resultado mais representativo do potencial fisiológico das sementes (MEDEIROS; PEREIRA, 2018). Portanto, de maneira geral, observando os resultados apresentados, fica evidente que os danos por umidade observados nas sementes resultaram em redução do potencial fisiológico das sementes, bem como, em aspectos físicos relacionados à sua integridade tecidual.

A análise de componentes principais (PCA) permitiu observar que os componentes 1 (PC1) e 2 (PC2) explicaram respectivamente 58 e 15,7% da variabilidade total dos dados, totalizando 73,7% (Figura 26A).

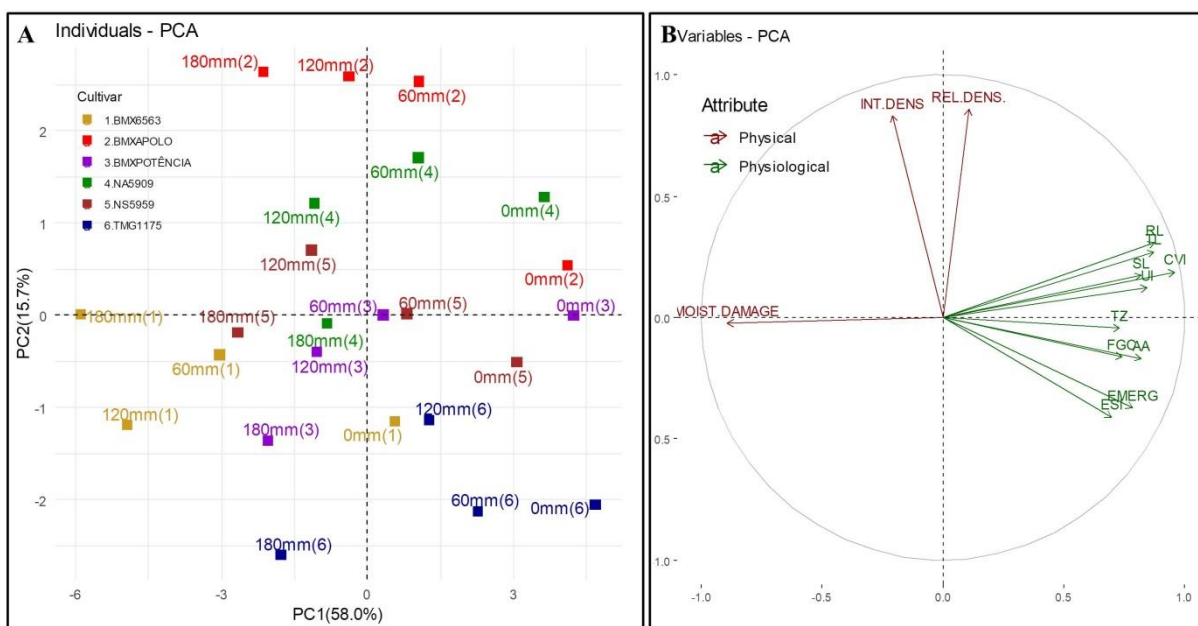


Figura 26 - Análise de componentes principais (PCA) obtida pela combinação linear das variáveis fisiológicas (germinação e vigor), bioquímicas (proteínas e protease) e físicas (raios X) em seis cultivares de soja, submetidas a diferentes níveis de precipitação. Diagrama de ordenação (A) e círculo de correlação (B), PC1 – Componente principal 1; PC2 – Componente principal 2; REL. DENS. = Densidade Relativa; INT. DENS. = Densidade Integrada; MOIST.DAMAGE = Dano por umidade; SL = Comprimento de parte aérea; RL = Comprimento de raiz; TL = comprimento total; UI = Índice de uniformidade; CVI = Índice de

vigor corrigido; FGC – Primeira contagem de germinação; AA – Envelhecimento acelerado; EMERG – Emergência; ESI – Índice de Velocidade de Emergência; TZ – Teste de tetrazólio.

Pode-se observar por meio do diagrama de ordenação (Figura 26A) que todas as cultivares apresentaram uma tendência de agrupamento dos tratamentos controle (0 mm) e do menor nível de precipitação (60 mm) nos escores positivos do componente 2 (PC2), correspondente aos locais onde se concentraram as variáveis fisiológicas (vigor) no círculo de correlação (Figura 26B). Por outro lado, o agrupamento dos maiores níveis de precipitação aplicados (120 e 180 mm) foi observado nos escores negativos do PC2 (Figura 26A), correspondente à localização das variáveis de dano por umidade pelo teste de raios X (Figura 26B).

Considerando os vetores de potencial fisiológico (cor verde) no círculo de correlação (Figura 26B), observa-se que se encontram opostos aos vetores dos danos por umidade por meio do teste de raios X (cor vermelha), indicando correlação negativa entre estes parâmetros. Estes resultados confirmam que a deterioração por umidade, sobretudo nos maiores níveis de precipitação (120 e 180 mm), contribuiu para a redução do vigor das sementes ao mesmo tempo em que favoreceu o aumento dos danos por umidade.

Com relação às cultivares, observa-se que em geral, os agrupamentos de NS 5959, NA 5909 e TMG 1175 foram mais centralizados no eixo PC1, além de próximos dos vetores de vigor (cor verde) e distantes dos vetores de dano por umidade pelo teste de raios X (cor vermelha). Por outro lado, as cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA tiveram em geral, agrupamento mais disperso no diagrama de correlação, além de próximos dos vetores de dano por umidade (Figura 26A). De maneira geral, essas observações reforçam os resultados das análises fisiológicas, indicando maior susceptibilidade das cultivares BMX 6563 e BMX POTÊNCIA à deterioração por umidade na fase de pré-colheita.

A análise de PCA revelou que os cinco primeiros componentes foram responsáveis por 93,89% da variação total de todas as variáveis (Tabela 10).

Tabela 10 - Cargas dos vetores, autovalores e proporção de variação associada a cinco componentes principais (PC) da PCA de 13 variáveis associadas à qualidade fisiológica, análises bioquímicas e físicas em sementes de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação.

Variáveis	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
DENS.REL	0.11	0.86	0.36	0.14	0.12
DEN.INT	-0.21	0.83	0.20	0.37	-0.10
DANO.UMIDADE	-0.89	-0.02	-0.06	0.13	0.36
CPA	0.82	0.17	-0.51	-0.09	-0.01
CR	0.88	0.31	-0.32	0.01	-0.11
CT	0.87	0.27	-0.39	-0.02	-0.08
IU	0.84	0.12	-0.12	-0.21	0.42
IVC	0.96	0.19	0.02	-0.08	0.07
PCG	0.74	-0.16	0.59	-0.17	-0.06
EA	0.82	-0.17	0.27	0.18	0.11
EMERG	0.78	-0.37	0.01	0.39	-0.04
IVE	0.70	-0.41	-0.01	0.55	0.07
TZ	0.73	-0.04	0.56	-0.26	-0.03
Autovalor	7.54	2.04	1.44	0.81	0.38
Variância (%)	57.99	15.68	11.06	6.24	2.92
Variância acumulada (%)	57.99	73.67	84.73	90.97	93.89

DENS.REL – densidade relativa; DENS.INT. – densidade integrada; DANO.UMIDADE – dano por umidade; CPA – comprimento da parte aérea; CR – comprimento de raízes; CT – comprimento total; IU – índice de uniformidade; IVC – índice de vigor corrigido; PCG – primeira contagem de germinação; EA – envelhecimento acelerado; EMERG – emergência; IVE – índice de velocidade de emergência; TZ – teste de tetrazólio.

A maioria das variáveis foi mais fortemente relacionadas ao PC1, com exceção das variáveis físicas densidade relativa e densidade integrada, que foram mais relacionadas pelo componente 2 (PC2). Os componentes PC3, PC4 e PC5 em geral, tiveram contribuições menores na variabilidade total dos dados (Tabela 10).

Pela análise de correlação de Pearson, observa-se que as variáveis físicas, densidade relativa e integrada não foram correlacionadas significativamente com as variáveis fisiológicas. No entanto, a variável de dano por umidade pelo teste de raios X foi correlacionada negativa e significativamente com todas as demais variáveis. Pode-se observar também que, de maneira geral, as variáveis fisiológicas se correlacionaram positiva e significativamente entre si (Figura 27).

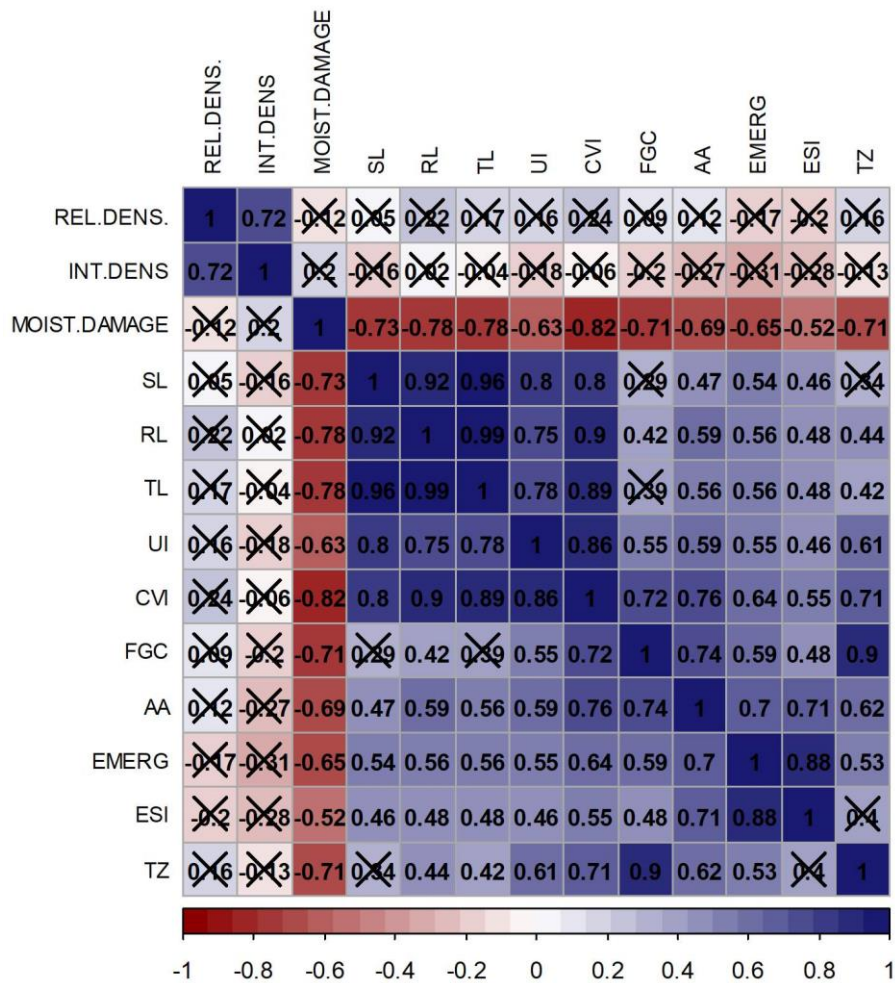


Figura 27 - Correlação de Pearson (r) entre todas as variáveis analisadas seis cultivares de soja submetidas a diferentes níveis de precipitação. REL. DENS. = Densidade Relativa; INT. DENS. = Densidade Integrada; MOIST.DAMAGE = Dano por umidade; SL = Comprimento de parte aérea; RL = Comprimento de raiz; TL = comprimento total; UI = Índice de uniformidade; CVI = Índice de vigor corrigido; FGC = Primeira contagem de germinação; AA = Envelhecimento acelerado; EMERG – Emergência; ESI – Índice de Velocidade de Emergência; TZ – Teste de tetrazólio. Quadrantes marcados com “X” representam correlação não significativa a 5% de probabilidade pelo teste t.

Em síntese, essas observações confirmam que a presença de dano por umidade caracterizado pelo enrugamento e/ou rompimento do tegumento está diretamente relacionado à redução do vigor de sementes de soja.

CONCLUSÕES

A deterioração por umidade induzida pelas precipitações contribui para a redução do vigor de sementes de soja. A técnica de raios X combinada a análises automatizadas de

imagens apresenta potencial para identificar de maneira rápida danos físicos, bem como a intensidade dos mesmos. A presença dos danos por umidade na superfície do tegumento das sementes de soja está diretamente relacionada à redução do vigor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, H. F.; CÍCERO, S. M.; GOMES JUNIOR, F. G. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, n. 1, p. 34950, 9 fev. 2018.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93–107, 1 maio 2004.
- BASSO, D. P. et al. Late seed maturation improves the preservation of seedling emergence during storage in soybean. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 2, p. 185–192, jun. 2018.
- BHATIA, V. S. et al. Field Deterioration of Soybean Seed: Role of Oxidative Stresses and Antioxidant Defense Mechanism. **Journal of Plant Biology**, v. 32, n. 2, p. 179–190, 2010.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- CASTRO, E. DE M. et al. Physiological quality of soybean seeds produced under artificial rain in the pre-harvesting period. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 1, p. 14–21, 8 mar. 2016.
- DE WIT, M.; GALVÃO, V. C.; FANKHAUSER, C. Light-Mediated Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 513–537, 29 abr. 2016.
- DENG, B. et al. Can antioxidant's reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity contribute to aged seed recovery? Contrasting effect of melatonin, ascorbate and glutathione on germination ability of aged maize seeds. **Free Radical Research**, v. 51, n. 9–10, p. 765–771, 3 out. 2017.
- ELMASRY, G. et al. Recent Applications of Multispectral Imaging in Seed Phenotyping and Quality Monitoring-An Overview. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 5, mar. 2019.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. **Special report**, v. 3, p. 87, 1977.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.

FRANÇA-NETO, J. DE B. et al. Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade. **EMBRAPA Soja - Documentos**, p. 75, 2016.

GEIGER, M.; BLEM, G.; LUDWIG, A. Evaluation of ImageJ for Relative Bone Density Measurement and Clinical Application. **Journal of Oral Health and Craniofacial Science**, v. 1, n. 1, p. 012–021, 2016.

HUTH, C. et al. Susceptibility to weathering damage and oxidative stress on soybean seeds with different lignin contents in the seed coat 1. **Journal of Seed Science**, p. 296–304, 2016.

JEEVAN KUMAR, S. P. et al. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, set. 2015.

JIANG, F. L. et al. Changes in respiration and structure of non-heading Chinese cabbage seeds during gradual artificial aging. **Scientia Horticulturae**, v. 238, n. 2018, p. 14–22, ago. 2018.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. **R package version**, v. 1, n. 3, 2016.

KOTWALIWALE, N. et al. X-ray imaging methods for internal quality evaluation of agricultural produce. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–15, 2014.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: [s.n.].

MAGUIRE, J. D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor1. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176, 20 nov. 1962.

MALIK, C. P. Seed deterioration: a review. 2: 374-85. 2013. **International Journal of Life Science Botany and Pharmacy Research**, v. 2, n. 3, p. 374–385, 2013.

MARCOS FILHO, J. Teste de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). . **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1–21.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. [s.l.] Ed. Abrates, 2015a.

MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363–374, ago. 2015b.

MATHIAS, V. et al. Implicações da época de colheita sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Agro@mbiente On-Line**, v. 11, n. 3, p. 223–231, 2017.

MEDEIROS, A. D. et al. Parameters based on X-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. xxx–xxx, 2018.

MEDEIROS, A. D. DE et al. High-throughput phenotyping of brachiaria grass seeds using free access tool for analyzing X-ray images. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. PRELLO, 2019.

MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. SAPL ®: a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 3, p. 222–228, 2018.

NAKAGAWA, J., KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J. D. B. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 9–13.

NORONHA, B. G. DE; MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lam. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 393, abr. 2018.

PEAUCELLE, A.; WIGHTMAN, R.; HÖFTE, H. The Control of Growth Symmetry Breaking in the Arabidopsis Hypocotyl. **Current Biology**, v. 25, n. 13, p. 1746–1752, jun.

2015.

PEREIRA, D. F. et al. Contributing to agriculture by using soybean seed data from the tetrazolium test. **Data in Brief**, 4 jan. 2019.

PHAM, H. M. et al. Alternative oxidase (AOX) over-expression improves cell expansion and elongation in cotton seedling exposed to cool temperatures. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 11, p. 2287–2298, 1 nov. 2018.

PINTO, T. L. F. et al. An assessment of mechanical and stink bug damage in soybean seed using X-ray analysis test. **Seed Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 110–120, 2009.

PITOL, C. Tolerância da soja à chuva pós-maturação. In: MELOTTO, A. M. et al. (Eds.). . **SOJA: Tecnologia & Produção**. Curitiba: Midiografi, 2016. p. 190.

R CORE TEAM. **R Development Core TeamR: A Language and Environment for Statistical Computing**, 2018.

RAHMAN, A.; CHO, B.-K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v. 26, n. 4, p. 285–305, 12 dez. 2016.

RATAJCZAK, E. et al. Mitochondria Are Important Determinants of the Aging of Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1568, 28 mar. 2019.

SAKO, Y. et al. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 625–636, 2001.

SEVERIANO, R. L. et al. X-ray test on passion fruit seeds submitted to different aryl removal methods. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 3, p. 356–362, 2018.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, n. 1, p. 1–26, 24 abr. 2012.

SHELAR, V. R. Role of mechanical damage in deterioration of soybean seed quality during

storage- a review. **Agricultural Review**, v. 29, p. 177–184, 2008.

SORIANO, D. et al. Effects of burial and storage on germination and seed reserves of 18 tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Oecologia**, v. 174, n. 1, p. 33–44, 4 jan. 2014.

VICTOR AUGUSTO FORTI et al. Weathering Damage in Soybean Seeds: Assessment, Seed Anatomy and Seed Physiological Potential. **Seed Technology**, v. 2, n. 35, p. 213–224, 2013.

WARPEHA, K. M.; MONTGOMERY, B. L. Light and hormone interactions in the seed-to-seedling transition. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, n. 2016, p. 56–65, jan. 2016.

XIN, X. et al. Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 2, p. 140–147, jan. 2014.

YIN, G. et al. Mitochondrial Damage in the Soybean Seed Axis During Imbibition at Chilling Temperatures. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 7, p. 1305–1318, jul. 2009.

ŽÁDNÍKOVÁ, P. et al. Strategies of seedlings to overcome their sessile nature: auxin in mobility control. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 14 abr. 2015.

ZUFFO, A. M. et al. Physiological and enzymatic changes in soybean seeds submitted to harvest delay1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 4, p. 488–496, dez. 2017.