

**MARTHA FREIRE DA SILVA**

**ARMAZENABILIDADE, ENVELHECIMENTO E CLASSIFICAÇÃO DO VIGOR DE  
SEMENTES DE SOJA POR ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

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: Laércio Junio da Silva

Coorientador: Felipe Lopes da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

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

T

S586a  
2020  
Silva, Martha Freire da, 1986-  
Armazenabilidade, envelhecimento e classificação do vigor de  
sementes de soja por espectroscopia do infravermelho próximo /  
Martha Freire da Silva. - Viçosa, MG, 2020.  
94 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Laércio Junio da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Semente. 2. Sementes - Qualidade. 3. Sementes -  
Deterioração. 4. Sementes -Armazenamento. 5. Vigor. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.3421

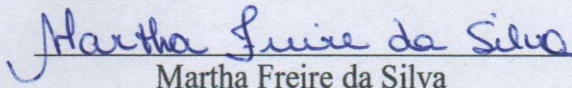
**MARTHA FREIRE DA SILVA**

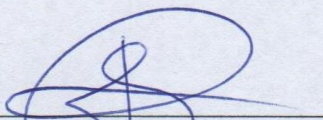
**ARMAZENABILIDADE, ENVELHECIMENTO E CLASSIFICAÇÃO DO VIGOR DE  
SEMENTES DE SOJA POR ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

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: 30 de outubro de 2020.

Assentimento:

  
Martha Freire da Silva  
Autora

  
Laércio Junio da Silva  
Orientador

A Deus, aos meus pais, irmãos, familiares e amigos,  
pelo incentivo, apoio incondicional e amor.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia pela minha formação e por todo o conhecimento adquirido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento - 001, pelo apoio neste trabalho.

À empresa GDM Seeds por viabilizar essa pesquisa e à Maria de Fátima Zorato pelas valiosas ideias, considerações e discussões sobre o trabalho.

Aos meus pais, irmãos e familiares, pelo apoio, incentivo, conselhos, dedicação e amor.

Ao meu tio Silmar pelo suporte, estímulo e cuidado sempre.

Ao meu orientador, Professor Laércio Junio da Silva, por toda ajuda, comprometimento, ensinamentos e cumplicidade. Sinceramente, eu não poderia ter tido um orientador melhor.

Ao meu coorientador, Professor Felipe Lopes da Silva, por me ensinar diariamente a ser um profissional e ser humano melhor.

Aos amigos Bruna, Naiara, Tati, Verônica, Uchoa, Rodrigo, Renata, Poliana, Renata (Pavão), Verônica, Kéllen, Marisa e Jaqueline, que se fazem presentes mesmo distantes fisicamente e que me apoiam e incentivam sempre.

Aos amigos do GSEM e, em especial, aos orientados do Professor Laércio, à Professora Denise e à Doutora Ariadne Oliveira, pela ajuda, contribuições e amizade.

Aos amigos André Medeiros, Francisco Charles, Rafaela Miranda, Lucas Rosmaninho, Jussara Roque, Priscila Evan, Lorena Moura, Guilherme Sousa, Cleiton Casagrande, Dalton Ferreira, Heloisa Rocha, Isabella Cavallin, Fernanda Cupertino, Ramon Gonçalves e a todos os estagiários (Júlia, Laryssa, Maycon, Wanderson, Wagner, Giulia, Lucas e Lívia) que me ajudaram na execução dos experimentos e/ou análises de dados.

Aos amigos do Programa Soja pela ajuda mútua, apoio, incentivo e amizade.

A Deus por me dar forças para vencer todos os obstáculos e me permitir encontrar tantas pessoas maravilhosas nessa trajetória, que certamente foram essenciais para esse sonho se tornar realidade.

Minha eterna gratidão a todos que, de forma direta ou indireta, tornaram possível a realização e conclusão deste trabalho. **Muito Obrigada!!!!**

## RESUMO

SILVA, Martha Freire da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2020. **Armazenabilidade, envelhecimento e classificação do vigor de sementes de soja por espectroscopia do infravermelho próximo.** Orientador: Laércio Junio da Silva. Coorientador: Felipe Lopes da Silva.

O rápido declínio na qualidade fisiológica das sementes de soja é um grave problema para empresas e agricultores. A redução na qualidade das sementes acontece ainda no campo ou durante o armazenamento, sendo essencial a utilização de testes rápidos e assertivos, que possam inferir sobre o vigor e/ou potencial de armazenamento das sementes. Desta forma, esse trabalho teve por objetivos: i) avaliar a eficiência de diferentes tempos de envelhecimento artificial na predição da armazenabilidade de sementes de cultivares de soja; ii) analisar o efeito do envelhecimento natural e artificial na composição bioquímica, qualidade fisiológica e tolerância à deterioração de sementes de soja; e iii) averiguar o potencial da espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) para identificar níveis de vigor em sementes de soja. Sementes recém-colhidas de seis cultivares de soja foram submetidas ao envelhecimento natural (armazenamento por oito meses sob condição refrigerada e não refrigerada) e artificial (envelhecidas a 41° C pelos períodos de 48, 96 e 144 horas) e analisadas quanto à germinação e vigor. As sementes recém-colhidas, armazenadas por oito meses na condição não refrigerada e envelhecidas artificialmente à 41 °C por 96 horas foram, ainda, avaliadas quanto ao teor de óleo, proteína, conteúdo de malonaldeído, ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico e analisados os espectros NIR das sementes. O envelhecimento artificial, à temperatura de 41°C por 96 horas apresenta potencial para ser utilizado na predição do desempenho de sementes de soja no armazenamento. Quanto maior o conteúdo de ácido graxo oleico e de proteína solúvel e menor o de ácido linoleico e linolênico, maior é a qualidade fisiológica e potencial de armazenamento das sementes de soja. Os comprimentos de ondas da região do infravermelho próximo de maior importância para a classificação do vigor das sementes apresentam relação com o conteúdo de óleo e proteína das sementes. A espectroscopia NIR apresenta potencial para ser utilizada na classificação do vigor de sementes de soja.

Palavras-chave: Deterioração. Vigor. Armazenamento. Óleo. Proteína. NIR.

## ABSTRACT

SILVA, Martha Freire da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2020. **Storage potential, aging and vigor classification of soybean seeds by near infrared spectroscopy.** Adviser: Laércio Junio da Silva. Co-adviser: Felipe Lopes da Silva.

Fast decline in physiological quality of soybean seeds is a serious problem for seed companies and farmers. Reduction in seeds quality can happen at the field level or during the storage, being essential the use of fast and assertive tests, that can infer on the vigor and / or potential of seed storage. Thus, this work aimed to: i) evaluate the efficiency of different times of artificial aging in predicting the storage of soybean seeds cultivars; ii) to analyze the effect of natural and artificial aging on the biochemical composition, physiological quality and tolerance to deterioration of soybean seeds; and iii) to investigate the potential of near infrared spectroscopy (NIR) to identify vigor levels in soybean seeds. Freshly harvested seeds from six soybean cultivars were submitted to natural aging (storage for eight months under refrigerated and unrefrigerated condition) and artificial aging (aging at 41° C for 48, 96 and 144 hours) and analyzed for germination and vigor. Freshly harvested seeds, stored for eight months in unrefrigerated condition and artificially aged at 41 °C for 96 hours, were also evaluated for oil, protein, malondialdehyde content, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic fat acids and analyzed the NIR spectra of seeds. Artificial aging at temperature of 41 °C for 96 hours has the potential to be used to predict the performance of soybean seeds in storage. The higher the content of oleic fatty acid and soluble protein and the lower the proportion of linoleic and linolenic acid, the greater the physiological quality and storage potential of soybean seeds. The oil and protein content are related to the physiological quality of the seeds and the wavelengths in the NIR region of greatest importance for the classification of seed vigor are also related to these compounds. NIR spectroscopy has the potential to be used in the classification of vigor of soybean seeds.

Keywords: Deterioration. Vigor. Storage. Oil. Protein. NIR.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>10</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>Capítulo I. Envelhecimento artificial para predição da armazenabilidade de sementes de soja, via GGE biplot. ....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>17</b>
<b>Chapter I. Artificial aging to predict soybean seed storage, using GGE biplot. ....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Localização e Visão Geral do Experimento.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Envelhecimento Natural: Armazenamento .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Envelhecimento Artificial.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Avaliações Fisiológicas .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.1 Grau de Umidade .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.2 Germinação.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.3 Primeira Contagem de Germinação.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.4 Envelhecimento Acelerado .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.5 Condutividade Elétrica .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.6 Emergência de Plântulas .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.7 Crescimento de Plântulas .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Envelhecimento Natural x Artificial via GGE Biplot.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Análises Estatísticas.....</b>	<b>24</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Envelhecimento Natural: Armazenamento .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Envelhecimento Artificial.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Envelhecimento Natural x Artificial via GGE Biplot.....</b>	<b>29</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>

<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>Capítulo II. Papel da composição bioquímica na tolerância à deterioração de sementes de soja sob envelhecimento natural e artificial. ....</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>41</b>
<b>Chapter II. Role of biochemical composition in tolerance to deterioration of soybean seeds under natural and artificial aging .....</b>	<b>42</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>42</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>2.1. Grau de Umidade.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. Germinação .....</b>	<b>45</b>
<b>2.3. Envelhecimento Acelerado.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4. Crescimento de plântulas .....</b>	<b>46</b>
<b>2.5. Massa seca de plântulas.....</b>	<b>46</b>
<b>2.6. Índice de Velocidade de Emergência .....</b>	<b>46</b>
<b>2.7. Condutividade Elétrica.....</b>	<b>46</b>
<b>2.8. Teor de Óleo e de Proteína Total.....</b>	<b>46</b>
<b>2.9. Conteúdo de Proteína Solúvel.....</b>	<b>46</b>
<b>2.10. Conteúdo de Malonaldeído (MDA) .....</b>	<b>47</b>
<b>2.11. Teor de Ácidos Graxos .....</b>	<b>47</b>
<b>2.12. Análise estatística .....</b>	<b>47</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo III. Viabilidade da espectroscopia do infravermelho próximo para classificação do vigor de sementes de soja .....</b>	<b>69</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>69</b>

<b>Chapter III. Feasibility of near infrared spectroscopy to classify vigor of naturally and artificially aged soybean seeds.....</b>	<b>70</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>70</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
<b>2.1. Grau de Umidade.....</b>	<b>73</b>
<b>2.2. Germinação .....</b>	<b>73</b>
<b>2.3. Envelhecimento Acelerado .....</b>	<b>73</b>
<b>2.4. Crescimento de plântulas .....</b>	<b>74</b>
<b>2.5. Massa seca de plântulas.....</b>	<b>74</b>
<b>2.6. Índice de Velocidade de Emergência .....</b>	<b>74</b>
<b>2.7. Condutividade Elétrica.....</b>	<b>74</b>
<b>2.8. Teor de Óleo.....</b>	<b>74</b>
<b>2.9. Conteúdo de Proteína Solúvel.....</b>	<b>74</b>
<b>2.10. Teor de Ácidos Graxos.....</b>	<b>75</b>
<b>2.11. Espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) .....</b>	<b>75</b>
<b>2.12. Análise estatística .....</b>	<b>75</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>94</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura de extrema importância para o agronegócio mundial. A produção de grãos na última safra foi de 362,075 milhões de toneladas, em uma área plantada de 125,691 milhões de hectares no mundo (USDA, 2020). Devido ao melhoramento genético, à grande diversidade do uso da oleaginosa e ao aumento da demanda global por alimentos e produtos derivados da soja, a produção e área destinada ao cultivo vem aumentando anualmente (USDA, 2020).

A qualidade fisiológica das sementes é, sem dúvida, um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso das lavouras de soja. Sementes de elevada qualidade apresentam bom desempenho em campo, rápida emergência e estabelecimento de plantas, mesmo sob condições ambientais não favoráveis (EBONE et al., 2020). O uso de sementes com elevada qualidade permite o acesso aos avanços genéticos, com garantias de qualidade e tecnologias de adaptação nas diversas regiões, assegurando maiores produtividades (FRANÇA-NETO et al., 2016). Por outro lado, a utilização de sementes de baixa qualidade geralmente acarreta crescimento inicial lento, falhas no estande de plantas e baixa tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Isso contribui para o aumento do custo de produção e redução da produtividade da cultura (EBONE et al., 2020).

Dentre os atributos relacionados à qualidade fisiológica das sementes destacam-se a germinação e o vigor, que são máximos no ponto de maturidade fisiológica (TRIPATHI; KHARE, 2016). A partir deste ponto, geralmente observa-se diversas alterações metabólicas e quedas nos parâmetros de qualidade, ocasionadas pelo processo de deterioração, que pode ser mais rápido ou lento, dependendo das características genéticas e das condições as quais as sementes permanecem expostas (NAGEL et al., 2014). Sendo assim, as sementes apresentam o seu máximo potencial fisiológico quando ainda estão na planta e as condições de campo ou de armazém contribui para a perda de qualidade.

O armazenamento de sementes de soja no Brasil é praticamente obrigatório, já que o período de colheita, que se inicia em fevereiro, não coincide com o de plantio, que se dá, geralmente, a partir de outubro. Sendo assim, as sementes normalmente permanecem armazenadas, pelo menos, por um período de oito meses. Dessa forma, as sementes ficam propensas à deterioração, o que, muitas vezes, incorre na redução do vigor e, em última instância, na perda da viabilidade. Como consequência, após o plantio, são evidenciadas falhas

de estande, emergência desuniforme e desenvolvimento comprometido das plantas.

A longevidade das sementes durante o armazenamento é controlada geneticamente (SANO et al., 2016) e é altamente influenciada pela qualidade inicial das sementes, histórico, conteúdo de água e composição química das sementes, bem como pelos agentes bióticos, umidade relativa, temperatura e duração do armazenamento (KHATUN et al., 2009; SINGH et al., 2011). Alguns autores citam a presença de marcadores moleculares de longevidade de sementes (NAIK et al., 2019; SANO et al., 2016; TRIPATHI; KHARE, 2016) e que a aquisição de longevidade ocorre durante o processo de maturação (LIMA et al., 2017; SANO et al., 2016). Porém, as bases genéticas do controle da longevidade das sementes de soja ainda precisam ser elucidadas.

O processo de deterioração das sementes irá ocorrer independentemente das condições de armazenamento (BEWLEY et al., 2013). No entanto, o ambiente no qual as sementes são expostas afeta a intensidade e velocidade da deterioração. O armazenamento inadequado pode promover a elevação da temperatura, aumento de acidez, intensificação da respiração, degradação das reservas, alteração das frações dos ácidos graxos, decomposição de membranas, peroxidação dos lipídeos, dentre outros fatores, que culminam em perda de vigor e da capacidade germinativa (KRZYZANOWSKI et al., 2018; SIMIC et al., 2007; SINGH et al., 2017).

A viabilidade das sementes de soja durante o armazenamento é curta em comparação às demais culturas (NAIK et al., 2019; SHELAR et al., 2008). Esta baixa longevidade pode estar associada ao teor de óleo e proporção de ácidos graxos das sementes. Sabe-se que a composição bioquímica da semente exerce influência sobre o processo de deterioração e afeta a sua qualidade e longevidade (SINGH et al., 2017). O grande efeito dos compostos bioquímicos na longevidade é relacionado às propriedades de sorção, aos sítios potenciais para ataques de radicais livres e à presença de compostos protetores nas sementes (SINGH et al., 2017), o que varia de acordo com o tipo e quantidade de reserva predominante (NAGEL; BORNER, 2010), bem como com as frações de compostos que compõem a semente (SINGH et al., 2017). Desta forma, os genótipos podem apresentar variação na sua composição química, que pode refletir na qualidade fisiológica e grau de tolerância à deterioração das sementes (NAIK et al., 2019).

Devido a expansão da fronteira agrícola de produção de soja no Brasil, sobretudo para as regiões mais quentes e úmidas, têm sido ainda mais perceptível esta perda diferencial de vigor das sementes entre genótipos. Empresas têm relatado que sementes de determinadas

cultivares, que apresentam elevado vigor após a colheita, perdem totalmente a viabilidade após poucos meses de armazenamento, enquanto outras apresentam manutenção ou reduzida queda de vigor. Assim, a identificação dos genótipos de melhor e pior desempenho no armazenamento surge como uma grande necessidade, sendo imprescindível, portanto, a adoção de testes rápidos, que sejam executados nas sementes recém-colhidas e que possam predizer o potencial de armazenamento dos lotes.

Técnicas de envelhecimento artificial podem ser utilizadas para presumir o envelhecimento natural, que ocorre durante o armazenamento (BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al., 2010; DELOUCHE; BASKIN, 1973; SHABAN, 2013). O envelhecimento artificial consiste em manter as sementes sob altas temperatura e umidade relativa, o que promove rápida deterioração (DELOUCHE; BASKIN, 1973). A temperatura, a umidade, tempo de exposição e eficácia do método de envelhecimento artificial como preditor de longevidade de sementes, depende de variados fatores, dentre eles, da espécie e cultivar (FANTAZZINI et al., 2018).

Outra técnica com potencial para averiguar as diferenças na qualidade fisiológica e que tem potencial para ser utilizada como teste rápido para predição do vigor de sementes é a espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) (AMBROSE et al., 2016; BAZONI et al., 2017; FAN et al., 2020; GAITÁN-JURADO et al., 2008; KUSUMANINGRUM et al., 2018; HUANG et al., 2013; MAYRINCK et al., 2020; QI et al., 2011; SHRESTHA et al., 2016;; SHETTY et al., 2012; YASMIN et al., 2019; ZHANG et al., 2020). A radiação da região eletromagnética do infravermelho próximo (700–2500 nm) é absorvida pela água e compostos orgânicos como carboidratos, proteínas, óleos ou álcoois (AGELET; HURBURGH JR., 2014). A energia absorvida por uma amostra, calculada a partir da radiação transmitida ou difusamente refletida, pode estar relacionada ao conteúdo de compostos (AGELET; HURBURGH JR., 2014). Assim, as técnicas espectroscópicas vibracionais permitem explorar as diferenças na composição bioquímica, que podem estar relacionadas com a viabilidade (KUSUMANINGRUM et al., 2018), vigor (FAN et al., 2020), bem como permitir evidenciar diferenças entre sementes envelhecidas e não envelhecidas (AMBROSE et al., 2016).

Visto a necessidade de obtenção de testes rápidos, com resultados que permitam identificar diferenças no vigor das sementes e que tenham correlação com o desempenho durante o armazenamento, este trabalho teve como objetivos:

- 1 - Avaliar a eficiência de diferentes tempos de envelhecimento artificial na predição da armazenabilidade de sementes de soja, utilizando-se o método GGE biplot.

2 - Analisar o efeito do envelhecimento natural e artificial sobre a qualidade fisiológica e composição bioquímica das sementes de cultivares de soja e verificar a influência da composição bioquímica na qualidade fisiológica e tolerância à deterioração.

3 - Averiguar o potencial da espectroscopia NIR para identificar níveis de vigor em sementes de soja.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGELET, L. E.; HURBURGH JÚNIOR, C. R. Limitations and current applications of Near Infrared Spectroscopy for single seed analysis. **Talanta**, v. 212, p. 288-299, 2014.

AMBROSE, A.; LOHUMI, S.; LEE, W. H.; CHO, B. K. Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Raman spectroscopy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 500-506, 2016.

BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; TATIĆ, M.; ĐORĐEVIĆ, V.; NIKOLIĆ, Z.; ĐUKIĆ, V. Seed viability of oil crops depending on storage conditions. **Helia**, v. 33, p. 153-160, 2010.

BAZONI, C. H.; IDA, E. I.; BARBIN, D. F.; KUROSZAWA, L. E. Near-infrared spectroscopy as a rapid method for evaluation physicochemical changes of stored soybeans. **Journal of Stored Products Research**, v. 73, p. 1-6, 2017.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392p.

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

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; TAGLIARI, A.; CHIOMENTO, L. T.; SILVEIRA, D. C.; CHAVARRIA, G. Soybean seed vigor: uniformity and growth as key factors to improve yield. **Agronomy**, v. 10, p. 1-15, 2020.

FAN, Y.; MA, S.; WU, T. Individual wheat kernels vigor assessment based on near spectroscopy coupled with machine learning methodologies. **Infrared Physics and Technology**, v. 105, p. 1-7, 2020.

FANTAZZINI, T. B.; ROSA, D. V. F.; PEREIRA, C. C.; PEREIRA, D. S.; CIRILLO, M. A.; OSSANI, P. C. Association between the artificial aging test and the natural storage of coffee seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 164-172, 2018.

FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; PÁDUA, G.P.; LORINI, I.; HENNING, F.A. Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade. **Embrapa Soja**, Londrina, PR, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151223/1/Documentos-380-L1.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2020.

GAITÁN-JURADO, A. J.; GARCÍA-MOLINA, M.; PEÑA-RODRÍGUEZ, F.; ORTIZ-SOMOVILLA, V. Near infrared applications in the quality control of seed cotton. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 16, p. 421-429, 2008.

HUANG, Z.; SHA, S.; RONG, Z.; CHEN, J.; HE, Q.; KHAN, D. M.; ZHU, S. Feasibility study of near infrared spectroscopy with variable selection for non-destructive determination of

quality parameters in shell-intact cottonseed. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 654-660, 2013.

KUSUMANINGRUM, D.; LEE, H.; LOHUMI, S.; MO, C.; KIMB, M. S.; CHOA, B. Non-destructive technique for determining the viability of soybean (*Glycine max*) seeds using FT-NIR spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 1734-1742, 2018.

LIMA, J. J. P.; BUITINK, J.; LALANNE, D.; ROSSI, R. F.; PELLETIER, S.; SILVA, E. A. A.; LEPRINCE, O. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **PLoS One**, v. 12, p. 1-25, 2017.

MAYRINCK, L. G.; LIMA, J. M. E.; GUIMARÃES, G. C.; NUNES, C. A.; OLIVEIRA, J. A. Use of near infrared spectroscopy in cotton seeds physiological quality evaluation. **Journal of Seed Science**, v. 42, p. 1-11, 2020.

NAGEL, M.; BORNER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed Science Research**, v. 20, p. 1-12, 2010.

NAGEL, M.; KRANNER, I.; NEUMANN, K.; ROLLETSHECK, H.; SEAL, C. E.; COUVILLE, L.; FERNANDEZ-MARÍN, B.; BORNER, A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 1011–1022, 2014.

NAIK, S. M.; MADHUSUDAN, K.; MOTAGI, B. M.; MUGALI, S.; NADAF, H. L. Molecular characterization of seed longevity and associated characters using SSR markers in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, p. 2357-2360, 2019.

QI, X.; LI, W.; LI, W.; LI, H. Study on the vigour testing of soybean seed based on near infrared spectroscopy Technology. **Applied Mechanics and Materials**, v. 58-60, p. 458-462, 2011.

SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H. M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant & Cell Physiology**, v. 57, p. 660-674, 2016.

SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, p. 627-631, 2013.

SHELAR, V. R.; SHAIKH, R. S.; NIKAM, A. S. Soybean seed quality during storage: a review. **Agricultural Reviews**, v. 29, p. 125-131, 2008.

SHETTY, N.; OLESEN, M. H.; GISLUM, R.; DELEURAN, L. C.; BOELT, B. Use of partial least squares discriminant analysis on visible-near infrared multispectral image data to examine germination ability and germ length in spinach seeds. **Journal of Chemometrics**, v. 26, p. 462-466, 2012.

SHRESTHA, S.; KNAPIČ, M.; ŽIBRAT, U.; DELEURAN, L. C.; GISLUM, R. Single seed near-infrared hyperspectral imaging in determining tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed quality in association with multivariate data analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 1027-1034, 2016.

ŠIMIĆ, B.; POPOVIĆ, R.; SUDARIĆ, A.; ROZMAN, V.; KALINOVIĆ, I.; ČOSIĆ, J. Influence of storage condition on seed oil content of maize, soybean and sunflower. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 72, p. 211-213, 2007.

SINGH, J.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. Factors affecting oilseed quality during storage with special reference to soybean (*Glycine max*) and niger (*Guizotia abyssinica*) seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 2215-2226, 2017.

TRIPATHI, N.; KHARE, D. Molecular approaches for genetic improvement of seed quality and characterization of genetic diversity in soybean: a critical review. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1645-1654, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Supply and demand report from the USDA (2019)**, Disponível em: <[www.usda.gov](http://www.usda.gov)>. Acesso em: 04, Jan. 2020.

YASMIN, J.; AHMED, M. R.; LOHUMI, S.; WAKHOLI, C.; KIM, M. S.; CHO, B. Classification method for viability screening of naturally aged watermelon seeds using FT-NIR spectroscopy. **Sensors**, v. 19, p. 1-14, 2019.

ZHANG, T.; FAN, S.; XIANG, Y.; ZHANG, S.; WANG, J.; SUN, Q. Non-destructive analysis of germination percentage, germination energy and simple vigour index on wheat seeds during storage by Vis/NIR and SWIR hyperspectral imaging. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 239, p. 1-11, 2020.

## **Capítulo I. Envelhecimento artificial para predição da armazenabilidade de sementes de soja, via GGE biplot.**

### **RESUMO**

A identificação de genótipos quanto a tolerância das sementes à deterioração no armazenamento surge como uma grande necessidade. Assim, torna-se imprescindível a adoção de testes rápidos e assertivos que quando aplicados às sementes recém-colhidas possam predizer o seu potencial de armazenamento. Dentre as metodologias potencialmente utilizadas para simular o desempenho de sementes no armazenamento está o envelhecimento artificial. A relação entre diferentes ambientes de envelhecimento, bem como entre o desempenho das sementes de genótipos sob multi ambientes podem ser investigadas por meio da análise de GGE biplot. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar a eficiência de diferentes tempos de envelhecimento artificial na predição do desempenho das sementes após o armazenamento utilizando-se o método GGE biplot. Sementes de seis cultivares de soja foram submetidas ao armazenamento, sob condição refrigerada e não refrigerada; e envelhecimento artificial, sendo envelhecidas artificialmente pelos períodos de 48, 96 e 144 horas. As sementes recém-colhidas e após o envelhecimento natural e artificial foram submetidas a testes de germinação e vigor. Os ensaios foram analisados separadamente, por meio de testes de médias, análise de regressão e de identidade de modelos, e em conjunto, utilizando-se o GGE biplot. O envelhecimento artificial, à temperatura de 41°C por 96 horas apresenta potencial para ser utilizado na predição do desempenho de sementes de soja no armazenamento. O método GGE biplot permite analisar as relações entre os ambientes de envelhecimento e visualizar o ranqueamento dos genótipos quanto ao desempenho das sementes submetidas ao envelhecimento natural e artificial.

Palavras-chave: *Glycine max* L. Merrill. Deterioração de sementes. Longevidade. Qualidade fisiológica de sementes. Vigor de sementes. Teste de identidade de modelos.

## **Chapter I. Artificial aging to predict soybean seed storage, using GGE biplot.**

### **ABSTRACT**

The identification of genotypes regarding the tolerance of seeds to deterioration in storage appears as a great need. Thus, it is essential to adopt rapid and assertive tests that, when applied to freshly harvested seeds, can predict their storage potential. Among the methodologies potentially used to simulate the performance of seeds in storage is artificial aging. The relationship between different aging environments, as well as between the performance of genotype seeds under multi environments can be investigated through the GGE biplot analysis. Thus, this work aimed to analyze the efficiency of different artificial aging times in predicting seed performance after storage using the GGE biplot method. Seeds of six soybean cultivars were submitted to storage, under refrigerated and unrefrigerated conditions; and artificial aging, being artificially aged for periods of 48, 96 and 144 hours. The freshly harvested seeds and after natural and artificial aging were submitted to germination and vigor tests. The assays were analyzed separately, using means tests, regression analysis and model identity test, and together, using the GGE biplot method. Artificial aging at temperature of 41 ° C for 96 hours has the potential to be used to predict the performance of soybean seeds in storage. The GGE biplot method allows analyzing the relationships between aging environments and visualizing the ranking of genotypes regarding the performance of seeds when subjected to natural and artificial aging.

**Keywords:** Glycine max L. Merrill. Deterioration of seeds. Longevity. Physiological quality of seeds. Seed vigor. Model identity testing

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica das sementes é um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso das lavouras de soja, porém ela é gradualmente perdida após a maturidade fisiológica, ainda no campo ou durante o armazenamento (SHELAR et al., 2008). Nessas condições, as sementes ficam propensas à deterioração, com redução do vigor e, em última instância, perda da viabilidade. Como consequência, após o plantio, são evidenciadas falhas de estande, emergência e desenvolvimento desuniforme das plantas, o que compromete a produtividade (EBONE et al., 2020).

O processo de deterioração das sementes é progressivo e irreversível (BEWLEY et al., 2013). No entanto, o ambiente no qual as sementes são expostas exerce muita influência sobre a intensidade e velocidade desse processo (SINGH et al., 2017). Além disso, existem diferenças entre espécies e cultivares quanto à tolerância à deterioração (NAIK et al., 2019; SANO et al., 2016; TRIPATHI, KHARE, 2016), que promove rápida ou lenta redução no vigor das sementes durante o armazenamento.

O rápido declínio no vigor das sementes no armazenamento implica em prejuízos para os produtores e empresas. Desta forma, a identificação dos lotes de sementes com alta e baixa tolerância à deterioração no armazenamento surge como uma grande necessidade, sendo imprescindível o desenvolvimento e adoção de testes rápidos e assertivos que quando aplicados às sementes recém-colhidas possam prever o seu potencial de armazenamento.

Técnicas de envelhecimento artificial têm sido utilizadas em estudos sobre os mecanismos ligados ao envelhecimento natural das sementes (BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al., 2010; DELOUCHE; BASKIN, 1973). O envelhecimento artificial promove estresse, devido a exposição de altas temperatura e umidade relativa às sementes, o que acarreta rápida deterioração (DELOUCHE; BASKIN, 1973). A temperatura, umidade, tempo de exposição e eficácia do método de envelhecimento artificial como preditor da armazenabilidade de sementes depende de variados fatores, dentre eles, da espécie e da cultivar (FANTAZZINI et al., 2018).

O teste de envelhecimento acelerado indicado para sementes de soja, utilizando-se temperatura de 41 °C por 48 horas (MCDONALD; PHANEENDRANATH, 1978), é utilizado rotineiramente por empresas para avaliação do vigor das sementes. Segundo alguns autores, o desempenho das sementes após este teste apresenta alta correlação com o potencial de

armazenamento destas (BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al. 2010; DELOUCHE, BASKIN, 1973; TIAN; LEI, 2008), podendo indicar quais lotes apresentam maior e menor tolerância à deterioração. Porém, a eficiência dessa metodologia em prever a armazenabilidade das sementes de diferentes genótipos de soja precisa ser melhor entendida, especialmente para sementes de cultivares mais recentes.

Novas técnicas têm sido utilizadas para análise de dados em que o efeito do genótipo e do ambiente podem ser investigados. Dentre essas técnicas, destaca-se o método GGE biplot. Este método foi desenvolvido para representar graficamente resultados da análise de componentes principais ou de decomposição de valores singulares, em que a relação entre os genótipos e ambientes pode ser visualizada pelo produto de vetores e pelo cosseno do ângulo entre dois vetores (YAN; KANG, 2003). O GGE biplot permite avaliar o desempenho de cultivares em distintos ambientes, analisando-se o efeito aditivo do genótipo (G) ao efeito multiplicativo da interação do genótipo-ambiente (GE) e submetendo-os à análise de componentes principais (YAN et al., 2000). É uma técnica bastante utilizada em estudos de melhoramento envolvendo a cultura da soja (DALÓ et al., 2019; WOYANN et al., 2020), principalmente quando se deseja selecionar ambientes representativos e discriminatórios e indicar genótipos estáveis e adaptados a ambientes específicos (YAN, HOLLAND, 2010). Ainda, é utilizada em alguns estudos para verificar a influência ambiental e genotípica nos níveis de micronutrientes em sementes de feijão (PHILIPO et al., 2020) e para verificar a adaptabilidade e estabilidade de cultivares de soja para produção e qualidade de sementes (SILVA et al., 2017). Embora ainda pouco explorada em estudos na área de sementes, é uma ferramenta com potencial para ser utilizada, uma vez que permite analisar a associação entre os genótipos, entre os ambientes e a interação entre estes (YAN; HOLLAND, 2010). Desta forma, essa análise pode auxiliar nos estudos que visam analisar as relações entre os ambientes de envelhecimento natural e artificial e comparar o desempenho das sementes de genótipos nestes ambientes.

Visto a necessidade de desenvolver ou adaptar testes rápidos que possam ser preditivos do potencial de armazenamento das sementes e a importância da associação de análises que permitam explorar as relações entre os genótipos e os ambientes de estudo, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes tempos de envelhecimento artificial na predição da armazenabilidade de sementes de soja, utilizando-se o método GGE biplot.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização e Visão Geral do Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa de Sementes e no Laboratório de Soja da Universidade Federal de Viçosa. Sementes comerciais de seis cultivares de soja, produzidas na safra 2018/2019, foram analisadas quando recém-colhidas e após serem submetidas ao envelhecimento natural e artificial. Os nomes comerciais das cultivares não foram divulgados, sendo denominados nesta pesquisa como GEN1, GEN2, GEN3, GEN4, GEN5 e GEN6. Os resultados de desempenho das sementes dos genótipos sob estas condições foram analisados individual e conjuntamente.

### 2.2 Envelhecimento Natural: Armazenamento

As sementes recém-colhidas das seis cultivares foram acondicionadas em sacos de papel Kraft Multifolha (devidamente lacrados e identificados) e armazenadas pelo período de 8 meses, sendo submetidas ao armazenamento por oito meses, sob condição refrigerada, ambiente refrigerado ( $17 \pm 3$  °C /  $70 \pm 5\%$  de UR) e, não refrigerado, ambiente galpão (13,8 - 30,7 °C e 50 - 92% de UR), na cidade de Passo Fundo, RS, Brasil.

Foi avaliado o desempenho fisiológico das sementes das cultivares quando recém-colhidas (inicial) e após o armazenamento na condição refrigerada (8m-refri) e não refrigerada (8m-galpão).

### 2.3 Envelhecimento Artificial

Para o envelhecimento artificial, as sementes recém-colhidas foram distribuídas sobre bandejas de tela metálica acopladas a caixas tipo gerbox, contendo 40 mL de água destilada ao fundo (DELOUCHE; BASKIN, 1973). As sementes foram mantidas sob umidade relativa de 100%, à temperatura de 41 °C, durante os períodos de 48, 96 e 144 horas. Para o tratamento controle, utilizou-se as sementes sem a exposição ao envelhecimento artificial. Este tratamento foi denominado tempo 0.

Após o envelhecimento, as sementes foram deixadas sobre bancada, em ambiente de

laboratório, para secagem natural até que atingisse a umidade inicial (aproximadamente 12%) e, em seguida, foram realizadas as avaliações fisiológicas.

## **2.4 Avaliações Fisiológicas**

As sementes envelhecidas, natural e artificialmente, e as do tratamento controle (denominadas de inicial, para as sementes armazenadas, e tempo 0, para as envelhecidas artificialmente) foram submetidas aos seguintes testes e determinações:

**2.4.1 Grau de Umidade** - O grau de umidade foi realizado imediatamente antes da execução dos testes, sendo determinado pelo método da estufa, a  $105 \pm 3$  °C, durante 24 h, utilizando-se quatro repetições de 50 sementes cada (BRASIL, 2009).

**2.4.2 Germinação** - Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram semeadas em papel germitest umedecido com um volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em germinador a 25 °C. Foram realizadas avaliações com registro da porcentagem das plântulas normais no 5º e 8º dias após a semeadura (BRASIL, 2009)

**2.4.3 Primeira Contagem de Germinação** - Foi realizada juntamente com o teste de germinação, sendo o registro da porcentagem de plântulas normais computado no 5º dia após a instalação do teste.

**2.4.4 Envelhecimento Acelerado** - Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram distribuídas em camada única sobre bandeja de tela metálica acoplada à caixa tipo gerbox que continha, ao fundo, 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas, para se obter 100% de UR em seu interior, e mantidas em câmara tipo BOD a 41 °C por 48 horas (MCDONALD; PHANEENDRANATH, 1978). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada no 5º dia após o início do teste (BRASIL, 2009).

**2.4.5 Condutividade Elétrica** - Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas e

colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada (ISTA, 1995). Em seguida, o conjunto foi mantido em câmara BOD a 25 °C, durante 24 horas (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica da solução, por meio de um condutivímetro.

**2.4.6 Emergência de Plântulas** - Quatro repetições de 50 sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo dois litros de areia como substrato. O substrato foi inicialmente umedecido até atingir 80% da capacidade de retenção de água e irrigado diariamente. Foram realizadas contagens diárias do número de plântulas emergidas até o 12º dia após a semeadura. Os dados das contagens foram utilizados para a obtenção de índices de uniformidade, velocidade, tempo médio e porcentagem de emergência, com o auxílio do pacote SeedCalc do Software R (SILVA et al., 2019).

**2.4.7 Crescimento de Plântulas** - Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes cada, semeadas equidistantemente sobre duas folhas de papel germitest, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco (NAKAGAWA, 1999). Posteriormente, foram confeccionados rolos, acondicionados em germinador, 25 °C, onde permaneceram por três dias. Após esse período, as plântulas foram escaneadas e, com o auxílio do Software VigorS<sup>®</sup>, foram mensurados o comprimento de raiz e de parte aérea. Os dados de comprimento foram utilizados para o cálculo de índices de crescimento (SAKO et al., 2001), uniformidade (CASTAN et al., 2018; SAKO et al., 2001), e vigor corrigido (MEDEIROS; PEREIRA, 2018) obtidos por meio do pacote SeedCalc do Software R (SILVA et al., 2019). As mesmas plântulas utilizadas para a mensuração do comprimento foram utilizadas para a obtenção da massa seca de plântulas. A massa seca foi obtida após a secagem das plântulas em estufa com circulação de ar forçada, a 70 °C por 72 horas. O material foi pesado em balança analítica com precisão de 0,001 g e os resultados expressos em mg<sup>-1</sup> plântula.

## **2.5 Envelhecimento Natural x Artificial via GGE Biplot**

As sementes das seis cultivares foram analisadas nos cinco ambientes de envelhecimento: armazenamento refrigerado, armazenamento não refrigerado, e sob envelhecimento artificial pelos períodos de 48, 96 e 144 horas. As relações entre as cultivares e ambientes foram

analisadas por meio do GGE biplot.

## 2.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos nos testes conduzidos com as sementes envelhecidas natural e artificialmente foram submetidos a metodologia de Singh (1981), para verificar quais as variáveis que apresentaram maiores contribuições para distinguir os tratamentos. Permaneceram nas análises subsequentes apenas as variáveis que apresentaram contribuição acima de 1%.

Para o envelhecimento natural (armazenamento), foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 3, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram em seis cultivares e três tipos de ambientes (sementes recém-colhidas, inicial; após oito meses de armazenamento sob condição refrigerada, 8 m - refri, e após oito meses sob condição não refrigerada, 8m - galpão). A significância das fontes de variação foi examinada pela estatística F ( $p < 0,05$ ) e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas com o auxílio do Software R (R CORE TEAM, 2020).

Para o envelhecimento artificial, foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 4, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram em seis cultivares de soja e quatro tempos de envelhecimento (0, 48, 96 e 144 horas). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tempos de envelhecimento, para cada cultivar, foram submetidas à análise de regressão. As curvas obtidas foram submetidas ao teste de identidade de modelos, por meio do Programa GENES (CRUZ, 2016).

A fim de se investigar o comportamento das sementes das cultivares sob os diferentes ambientes de envelhecimento e verificar qual dos ambientes de envelhecimento artificial apresenta maior correlação com os ambientes de envelhecimento natural, foi realizada a análise de GGE biplot. Para isso, foram utilizados os dados de ambos os ensaios, envelhecimento natural e artificial, exceto os dados do tratamento controle (sementes não envelhecidas).

Inicialmente, os dados das variáveis foram padronizados pela equação:  $X_i = (X - \mu) / \sigma$ . Em que,  $X_i$  é a média da repetição padronizada,  $X$  é a média da repetição,  $\mu$  é a média geral da variável e  $\sigma$  é o desvio padrão geral da variável. Por meio do produto dos valores padronizados de todas as variáveis que apresentaram contribuição acima de 1% pelo método Singh (1981),

foi obtida uma única variável, denominada Índice de Desempenho, para cada tratamento. A variável condutividade elétrica, por ser inversamente proporcional ao vigor das sementes, foi multiplicada por 1/CE.

Foi testada a interação entre as seis cultivares e os cinco ambientes de envelhecimento (teste F,  $p < 0,05$ ) e gerados gráficos pelo método GGE biplot. Foram realizadas análises de discriminação e representatividade de ambientes, do desempenho e estabilidade das cultivares em relação à média dos ambientes e o ranqueamento de desempenho das sementes das cultivares em cada ambiente de envelhecimento, conforme metodologia proposta por Yan (2001).

### 3. RESULTADOS

As variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), massa seca de plântula (MSP), comprimento de plântula (CP), índices de uniformidade de plântulas (Unif\_1 e Unif\_2), crescimento (CRE), vigor corrigido (VC), porcentagem de emergência (EM), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio para 50% das sementes germinarem ( $T_{50}$ ) e a taxa média de germinação (TMG) foram obtidas tanto para o experimento de armazenamento, quanto para o de envelhecimento artificial. A fim de identificar as variáveis com maiores contribuições relativas para distinguir os tratamentos, foi realizado o teste de Singh (1981) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Contribuição relativa das variáveis (%) para distinguir os tratamentos no experimento de envelhecimento natural (armazenamento) e envelhecimento artificial, seguindo a metodologia de Singh (1981).

Variável	Envelhecimento Natural	Envelhecimento Artificial
G	2,48	16,92
PC	0,00	0,00
EA	2,05	9,94
CE	0,25	2,94
MSP	1,62	0,41
CP	0,00	0,00
Unif_1	0,00	0,00
Unif_2	0,00	0,51
CRE	0,00	0,00
VC	92,74	55,49
EM	0,00	0,00
IVE	0,00	13,70

T50	0,10	0,08
TMG	0,77	0,00

G = germinação, PC = primeira contagem de germinação, EA = envelhecimento acelerado, CE = condutividade elétrica, MSP = massa seca de plântula, CP = comprimento de plântula, Unif\_1 e Unif\_2 = índices de uniformidade de plântulas, CRE = crescimento, VC = vigor corrigido, EM = porcentagem de emergência, IVE = índice de velocidade de emergência, T<sub>50</sub> = tempo médio para 50% das sementes germinarem, TMG = taxa média de germinação.

O VC foi a variável de maior importância, apresentando contribuição relativa de cerca de 92%, para o envelhecimento natural, e 55% para o envelhecimento artificial. Algumas variáveis tiveram pouca (< 0,51%) ou nenhuma contribuição para a diferenciação dos tratamentos. Assim, permaneceram nas análises subsequentes apenas aquelas que apresentaram contribuição maior que 1%, sendo elas a G, EA, MSP e VC para o envelhecimento natural e G, EA, CE, MSP, VC e IVE para o artificial.

O grau de umidade das sementes, na condição inicial, após o armazenamento e após o envelhecimento artificial, no momento da execução dos testes, foi de  $11,69 \pm 0,62$  %.

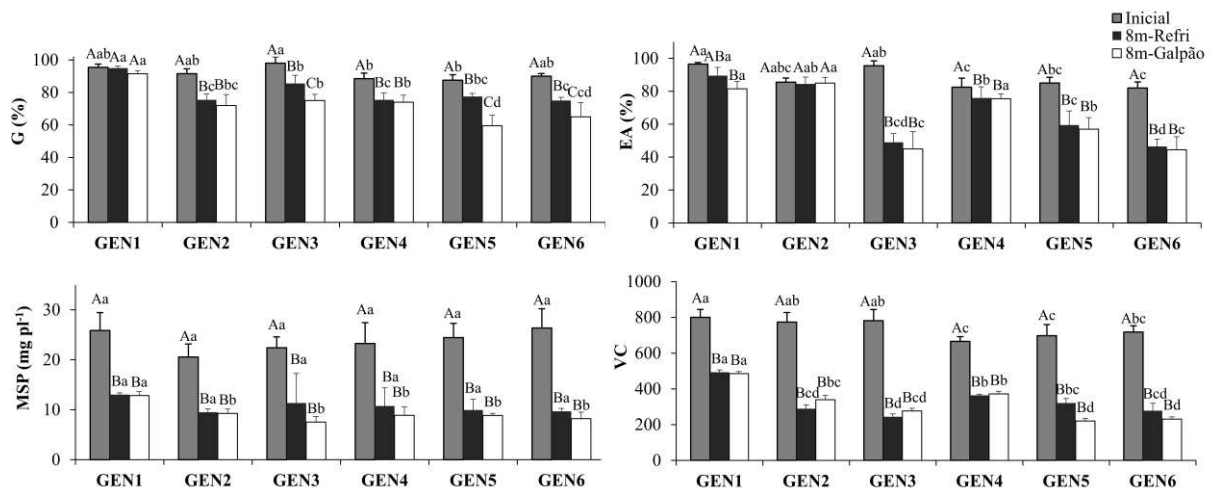
### 3.1 Envelhecimento Natural: Armazenamento

Considerando o envelhecimento natural, que ocorre durante o armazenamento, observamos que houve redução na germinação e no vigor das sementes das cultivares, em proporção distinta entre os ambientes de armazenamento (Figura 1).

As sementes da cultivar GEN1 não apresentaram redução na germinação, independentemente do tipo de armazenamento, refrigerado ou galpão. No entanto, houve queda na germinação para as sementes de todas as demais cultivares. Ainda, foi observado diferenças entre os ambientes, refrigerado e galpão, para as cultivares GEN3, GEN5 e GEN6. Para estas cultivares, houve menor redução da germinação no ambiente refrigerado, quando comparado ao ambiente galpão.

As sementes da cultivar GEN2, diferentemente das demais cultivares, não apresentaram redução na germinação após o teste de envelhecimento acelerado, o que indica elevado vigor dessas sementes.

O armazenamento promoveu redução na massa seca das plântulas e no índice de vigor corrigido das sementes em todas as cultivares. No entanto, não foram observadas diferenças entre os ambientes refrigerado e galpão.



**Figura 1.** Germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), massa seca de plântulas (MSP) e vigor corrigido (VC) de sementes de cultivares de soja recém-colhidas (Inicial) e após oito meses de armazenamento sob condição refrigerada (8m-Refri) e não refrigerada (8m-Galpão). \*\*\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, comparando-se o período inicial e após o armazenamento, 8 m-Refri e 8m-Galpão, e minúscula, comparando-se os genótipos em cada ambiente, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As sementes de todas as cultivares apresentaram elevada qualidade fisiológica quando recém-colhidas (Figura 1). No entanto, houve diferença na germinação e vigor inicial das sementes das cultivares. As sementes recém-colhidas da cultivar GEN3 apresentaram a maior porcentagem de germinação, enquanto as das cultivares GEN4 e GEN5 G e VC. As sementes de GEN1 apresentaram maior vigor após o teste de EA e MSP, enquanto as das cultivares GEN4 e GEN6 foram as que demonstraram o menor vigor após o teste de EA. Não houve diferença na MSP entre as cultivares quando recém-colhidas.

Após o armazenamento, as sementes da cultivar GEN1 apresentaram a maior porcentagem de germinação, em ambos os ambientes de armazenamento, enquanto, as sementes dos genótipos GEN4 e GEN6, no ambiente refrigerado, e, GEN5 e GEN6, no ambiente galpão, foram as que apresentaram menor germinação.

Os valores obtidos para o teste de EA não diferiram entre os ambientes refrigerado e galpão, para todas as cultivares. No entanto, após o armazenamento, GEN1 e GEN2 apresentaram maiores médias de plântulas normais e, GEN3 e GEN6, as menores médias nesse teste.

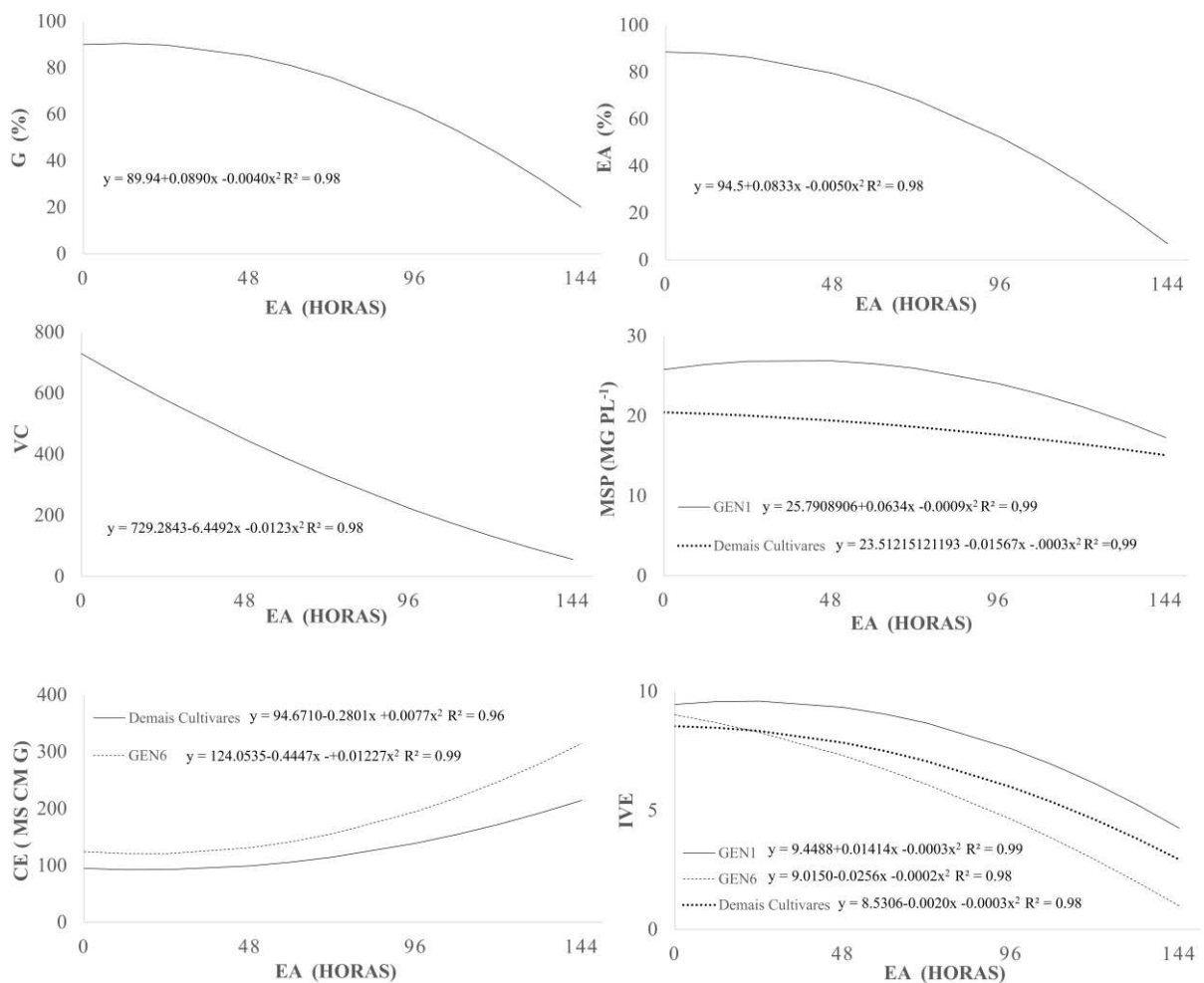
Houve drástica redução do VC com o armazenamento das sementes sob ambas as condições, refrigerada e galpão. Após o armazenamento, as sementes das cultivares GEN1 e GEN4 foram as que apresentaram maiores índices de VC, e GEN3, no ambiente refrigerado, e GEN5 e GEN6, no ambiente galpão, os menores. Em relação à MSP, as sementes da cultivar

GEN1, no ambiente refrigerado, foram as que apresentaram a maior média, não havendo diferença para as demais cultivares e ambientes.

Verificamos que cada teste elencou de maneira distinta as cultivares em relação à qualidade fisiológica das sementes após o armazenamento. No entanto, de maneira coincidente, independentemente do tipo de teste adotado, após o armazenamento, as sementes da cultivar GEN1 apresentaram maior qualidade fisiológica, e as da cultivar GEN6, a menor.

### 3.2 Envelhecimento Artificial

Os dados obtidos das cultivares após o envelhecimento artificial das sementes nos tempos 0 (controle), 48, 96 e 144 horas, evidenciam queda no vigor com o aumento do tempo de exposição ao envelhecimento (Figura 2).



**Figura 2.** Germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), vigor corrigido (VC), massa seca de plântulas (MSP), condutividade elétrica (CE) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de diferentes cultivares de

soja submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial (EA – Horas).

Por meio do teste de identidade de modelos, foi possível observar que as sementes de todas as cultivares apresentaram respostas idênticas, com redução das variáveis G, EA e VC, com o aumento do tempo de envelhecimento. Portanto, foi obtida uma curva única com os dados de todas as cultivares para essas variáveis (Figura 2). Verificamos que, dentre essas variáveis, foi observada queda mais acentuada nos valores de VC com aumento do tempo de envelhecimento.

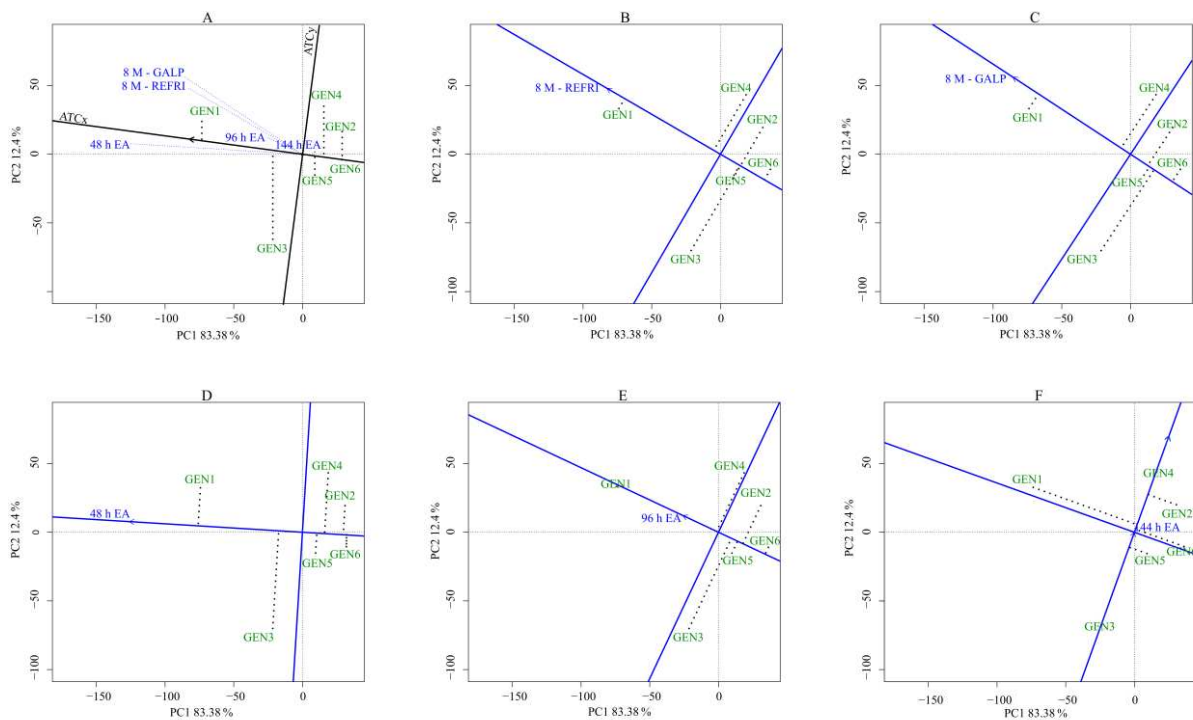
Houve diferença entre as cultivares quanto à MSP, CE e IVE, quando as sementes foram submetidas ao envelhecimento artificial (Figura 2). As sementes da cultivar GEN1 apresentaram redução menos acentuada da MSP, em relação ao demais cultivares, enquanto para GEN6, as sementes apresentaram aumento mais acentuado da condutividade elétrica.

Dentre os testes de vigor aplicados, o IVE, obtido no teste de emergência, foi o índice que permitiu evidenciar melhor as diferenças no vigor das sementes entre as cultivares (Figura 2). Pelos dados do IVE, observamos que GEN1 foi a cultivar cujas sementes tiveram menor redução no vigor, enquanto para GEN6, as sementes apresentaram maior redução da qualidade fisiológica com o envelhecimento artificial. As demais cultivares tiveram comportamento intermediário entre GEN1 e GEN6. Estes resultados são similares aos observados após o armazenamento, em que as sementes de GEN1 apresentaram a maior qualidade fisiológica e as de GEN6, a menor (Figura 1).

### **3.3 Envelhecimento Natural x Artificial via GGE Biplot**

Neste estudo, foram analisados, de forma conjunta, o desempenho das sementes de seis cultivares de soja após o envelhecimento artificial - por 48, 96 e 144 horas – e envelhecimento natural – armazenamento por oito meses nas condições refrigerada e galpão (Figura 3). Cada tempo de envelhecimento, juntamente com as duas condições de armazenamento, foram considerados um ambiente independente para a análise do GGE biplot. O desempenho das sementes dos genótipos foi medido por meio do índice de desempenho, construído pela multiplicação das variáveis de maior importância.

Verificamos que mais de 95% da variação total dos dados foi explicada pelos dois primeiros componentes principais (Figura 3). Isso evidencia que esta análise foi precisa e acurada.



**Figura 3.** Análise de GGE biplot dos dados de qualidade fisiológica obtidas para sementes de seis cultivares de soja após o armazenamento (envelhecimento natural) e diferentes tempos de envelhecimento artificial. 8M-Galp - armazenadas por oito meses na condição não refrigerada, galpão; 8M-Refri - armazenadas por oito meses em ambiente refrigerado; 48 h EA - 48 horas de envelhecimento artificial; 96 h EA - 96 horas de envelhecimento artificial; e 144 h EA - 144 horas de envelhecimento artificial. A – análise da capacidade de discriminação e representatividade dos ambientes de envelhecimento, considerando os envelhecimentos natural e artificial; B - análise dos genótipos em relação ao ambiente 8 M – Refri; C - análise dos genótipos em relação ao ambiente 8 M – Galp; D - análise dos genótipos em relação ao ambiente 48 h EA; E - análise dos genótipos em relação ao 96 h EA; F - análise dos genótipos em relação ao ambiente 144 h EA.

A Figura 3A apresenta a análise da capacidade de discriminação e representatividade dos ambientes, bem como da estabilidade e desempenho das sementes dos genótipos em relação aos ambientes de envelhecimento. O eixo ATC (*average tester coordinate*) representa o eixo médio dos ambientes, definido pelas médias do PC1 e PC2 relacionado a todos os ambientes testados. O eixo ATCx passa pela origem do biplot e a seta representada sobre ele é definida como o marcador do ambiente médio. Quanto menor a distância da projeção do genótipo sobre o marcador, melhor é o desempenho da cultivar. Desta forma, evidenciamos que as sementes da cultivar GEN1 apresentaram o maior e as de GEN6 o pior desempenho, quando considerados todos os ambientes de envelhecimento. O eixo ATCy, que também passa pela origem e é perpendicular ao ATCx, além de representar a linha tênue para definir os genótipos com desempenho acima (à esquerda da linha) e abaixo da média (à direita da linha), também é uma coordenada representativa para a estabilidade dos genótipos. Quanto mais próximo da origem

em relação a ATCy, maior é a estabilidade do genótipo nestes ambientes. Assim, evidencia-se que GEN6 foi a cultivar mais estável e GEN3 a que obteve menor estabilidade. Isso significa que as sementes de GEN6 sempre apresentaram baixo desempenho, independentemente do ambiente, enquanto as de GEN3 apresentaram maior ou menor desempenho, dependendo do ambiente a que foram submetidas.

O tamanho do vetor do ambiente, projetado em ATCx, representa a capacidade que o ambiente apresenta para distinguir o desempenho dos genótipos (Figura 3A). Nota-se, portanto, que o envelhecimento por 48 horas foi o ambiente que permitiu maior discriminação dos genótipos, seguidos dos ambientes de armazenamento na condição galpão, armazenamento em ambiente refrigerado, envelhecimento artificial por 96 e 144 horas, respectivamente. Assim, verificamos que, quanto mais drástico o envelhecimento artificial, menor foi a capacidade do ambiente para discriminar as cultivares.

O ângulo entre os vetores dos ambientes evidencia a relação entre eles, sendo que quanto menor, mais associados. Desta forma, notamos que o envelhecimento artificial das sementes por 96 horas apresentou maior associação ao armazenamento das sementes por oito meses, em ambos os ambientes, refrigerado e galpão (Figura 3A).

Quando analisados o desempenho das cultivares em cada ambiente de envelhecimento: ambiente de armazenamento na condição refrigerada (Figura 3B), sob armazenamento na condição galpão (Figura 3C) e após o envelhecimento artificial por 48 horas (Figura 3D), 96 horas (Figura 3E) e 144 horas (Figura 3F), notamos que o ranqueamento das cultivares foi diferente em todos os ambientes. Verificamos que após o armazenamento das sementes por oito meses sob condição refrigerada, as cultivares GEN1 e GEN4 apresentaram maiores índices de desempenho, seguido das cultivares GEN2, GEN5 e GEN3, que não diferiram entre si e da cultivar GEN6, cujas sementes apresentaram o pior desempenho (Figura 3B). No armazenamento das sementes no ambiente galpão, as cultivares GEN1 e GEN4 apresentaram desempenho acima da média, seguido de GEN2, que não diferiu de GEN5, e das cultivares GEN3 e GEN6, respectivamente (Figura 3C). Quando foi aplicado o envelhecimento artificial por 48 horas, as cultivares GEN1 e GEN3 apresentaram desempenho acima da média, seguidos de GEN5, GEN4, GEN2 e GEN6, respectivamente (Figura 3D). Já no ambiente 96 horas de EA, as cultivares GEN1 e GEN4 foram os que se apresentaram maiores índices, seguido de GEN3, GEN5, GEN2 e GEN6 (Figura 3E). Após o envelhecimento artificial por 144 horas, as cultivares GEN4, GEN2, GEN1 e GEN6 apresentaram desempenho acima da média e apenas

as cultivares GEN5 e GEN3, abaixo da média (Figura 3F). Embora nenhum dos ambientes tenha ranqueado as cultivares de maneira idêntica, os ambientes que apresentaram o ranqueamento mais similar foram os ambientes de armazenamento sob condição refrigerada e galpão e o envelhecimento artificial por 96 horas, que foram também os que apresentaram maior correlação entre si (Figura 3A).

#### 4. DISCUSSÃO

Dentre as variáveis utilizadas para analisar a qualidade fisiológica das sementes no envelhecimento natural e artificial, o VC foi a que apresentou maior grau de importância para distinguir o desempenho das cultivares. O vigor corrigido é calculado a partir do índice de vigor (SAKO et al., 2001), sendo proposto por Medeiros e Pereira (2018). O diferencial deste índice, em relação a outros testes (VIEIRA; CARVALHO, 1994) e índices de vigor (SAKO et al., 2001), é que engloba parâmetros relacionados à germinação das sementes e ao crescimento e uniformidade das plântulas (MEDEIRO; PEREIRA, 2018). Entendemos que cada teste de vigor utilizado em nossa pesquisa analisa de forma isolada uma determinada característica e que este índice permite analisar, de maneira combinada, tanto o potencial de germinação quanto o desempenho das plântulas. Assim, o VC se destacou na diferenciação dos tratamentos.

Neste trabalho, nós observamos que houve diferença de germinação e vigor das sementes entre as cultivares, tanto em relação ao tempo de envelhecimento quanto aos ambientes de armazenamento. Inicialmente, as sementes das cultivares GEN4 e GEN5 apresentaram o menor percentual de germinação e menor índice de vigor corrigido e as de GEN6 e GEN4 apresentaram o menor vigor após o teste de envelhecimento acelerado. Após o armazenamento, todas as cultivares apresentaram drástica redução no desempenho de plântulas, constatado pela acentuada queda de VC e de MSP (Figura 1). Com os testes de G, EA e VC, foi possível observar que as sementes dos genótipos GEN1, GEN4 e GEN2 mantiveram elevada qualidade fisiológica após o envelhecimento natural, independentemente do ambiente de armazenamento. Por outro lado, as sementes da cultivar GEN3 obtiveram alta germinação após o armazenamento, mas drástica queda no vigor, evidenciada pelos testes de EA e VC. As sementes da cultivar GEN6 foram as que apresentaram a menor germinação e vigor após o armazenamento em ambas as condições, o que pode ser reflexo do menor vigor inicial, detectado pelo EA (Figura 1). Por outro lado, a cultivar GEN1, que teve a maior qualidade

fisiológica inicial, foi a que apresentou maior tolerância à deterioração no armazenamento.

De acordo com Shelar et al. (2008), a manutenção da viabilidade e vigor durante o armazenamento está estritamente associada à qualidade inicial das sementes. Vergara et al. (2019) comprovaram que o desempenho de lotes de sementes de soja armazenadas por 120 e 180 dias de armazenamento, teve alta correlação com sua qualidade inicial, ou seja, os lotes que apresentaram menores níveis de germinação inicial apresentaram maior heterogeneidade em campo e menor tolerância à deterioração no armazenamento.

Embora o vigor inicial das sementes seja decisivo para maior longevidade das sementes no armazenamento, evidenciamos que, a cultivar GEN3, que apresentou alta germinação e vigor das sementes inicialmente, apresentou drástica redução do vigor com o armazenamento (Figura 1). Já a cultivar GEN4, que teve germinação e vigor inicial bastante similar ao da Cultivar GEN6, apresentou menor redução no vigor, comparado a maior parte das cultivares (Figura 1). Esses resultados nos levam a inferir sobre distintos níveis de tolerância à deterioração das sementes entre as cultivares.

De acordo com Naik et al. (2016), a constituição genética de cada cultivar pode levar a maior tolerância ou susceptibilidade à deterioração, que leva à maior ou menor longevidade das sementes no armazenamento. O grau de tolerância à deterioração das sementes é um atributo genético (SHELAR et al., 2008), que depende da habilidade das sementes de resistir à degradação, bem como dos mecanismos de proteção que elas apresentam (BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al., 2010).

A aquisição da longevidade se dá durante o processo de maturação, tendo início no final da fase de enchimento de grãos, estendendo-se até que as sementes atinjam o estado seco (LIMA et al., 2017). Alguns estudos sugerem que as sementes adquirem maior longevidade durante a maturação tardia, após o ponto de maturidade fisiológica (BASSO et al., 2018; LIMA et al., 2017). É provável que exista um programa transcricional pós-abscisão, que esteja associado à expressão de genes que codificam chaperonas, como as proteínas de choque térmico, à repressão de genes de cloroplasto, ao aumento da proporção de oligossacarídeos da família rafinose e à sinalização por ácido abscísico (LIMA et al., 2017). Além disso, a longevidade está associada a características físicas (TRIPATHI; KHARE, 2016) e químicas das sementes (SINGH et al., 2017), bem como às condições as quais elas permanecem expostas no armazenamento (NAGEL et al., 2014).

Neste estudo, as sementes de todas as cultivares apresentaram igual ou maior qualidade

fisiológica após o armazenamento no ambiente refrigerado ( $17 \pm 3$  °C /  $70 \pm 5\%$  de UR), em comparação a condição galpão (Figura 1). As sementes que foram armazenadas sob condição não refrigerada (galpão) foram submetidas a maior amplitude térmica e higroscópica (temperatura entre 8,8 e 30,7 °C e UR de 50 a 92%) e ficaram expostas a alta temperatura e umidade relativa, principalmente nos dois últimos meses de armazenamento.

O armazenamento sob alta temperatura e/ou alta umidade relativa pode promover a elevação da temperatura da massa de sementes, aumento de acidez, intensificação da respiração, degradação das reservas, alteração das frações dos ácidos graxos, decomposição de membranas, peroxidação dos lipídeos, dentre outros fatores, que culminam em perda de vigor e da capacidade germinativa (SINGH et al., 2017; ŠIMÍČ et al., 2007). A perda da viabilidade geralmente ocorre em última instância, sendo o vigor das sementes primeiramente afetado com a deterioração no armazenamento (BEWLEY et al., 2013), conforme foi evidenciado neste trabalho (Figura 1). Esta redução do vigor afeta o desempenho das plântulas, já que a deterioração compromete a mobilização de reservas dos tecidos de armazenamento para o eixo embrionário (MOHAMMADI et al., 2011), o que leva à redução do crescimento e uniformidade, reduzindo a massa seca das plântulas e o vigor (Figura 1).

Por outro lado, o armazenamento sob mais baixa temperatura e umidade, como sob condição refrigerada (Figura 1), pode auxiliar na manutenção ou menor redução da viabilidade e vigor das sementes durante o armazenamento (SHELAR et al., 2008). No entanto, independentemente das condições de armazenamento, é notória a diversidade genética que existe entre genótipos de soja quanto à longevidade das sementes (NAIK et al., 2016), conforme observado no presente trabalho (Figura 1).

Neste sentido, o ajuste de metodologias de testes já existentes ou o desenvolvimento de novos testes, com capacidade para prever a armazenabilidade das sementes de diferentes cultivares, de forma rápida e assertiva, é de extrema importância. O teste de envelhecimento acelerado, utilizando-se 41 °C por 48 h tem sido utilizado para diversas culturas (BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al., 2010; DELOUCHE; BASKIN, 1973; MCDONALD; PHANEENDRANATH, 1978; SHABAN, 2013; TIAN, LEI, 2008). No entanto, nem sempre essa metodologia reflete o desempenho de genótipos quando submetidos a longos períodos de armazenamento. Freitas et al. (2006), encontraram correlação entre 48 horas de envelhecimento e a germinação de sementes de algodão apenas para sementes armazenadas até seis meses. Para longevidade após 10 meses, o tempo de envelhecimento com maior correlação foi de 96 horas. Patil et al. (2017)

discutem que o tempo de envelhecimento artificial ideal para a predição do desempenho de sementes de soja no armazenamento depende, inclusive, da cultivar.

Neste estudo, verificamos que o envelhecimento artificial é um teste rápido potencial para ser utilizado para verificar a tolerância das sementes de cultivares de soja à deterioração no armazenamento. Identificamos que as sementes de todas as cultivares apresentaram redução de vigor com o aumento do tempo de exposição ao envelhecimento artificial, de forma mais ou menos acentuada dependendo da cultivar (Figura 2). Com os dados de MSP, CE e IVE foi possível classificar as sementes das cultivares em maior (GEN1) e menor (GEN6) nível de qualidade fisiológica.

Testamos os tempos de envelhecimento artificial de 48, 96 e 144 horas, a fim de verificar qual destes apresenta maior associação com os ambientes de armazenamento e, para isso, utilizamos a análise GGE biplot. Por meio desta análise, evidenciamos o desempenho e estabilidade das cultivares e a representatividade e habilidade de discriminação dos ambientes em diferenciar as cultivares, bem como realizamos o ranqueamento de desempenho das cultivares em cada ambiente de envelhecimento, conforme metodologia proposta por Yan (2001). Assim, encontramos que as sementes da cultivar GEN1 apresentaram a maior e GEN6 a menor qualidade fisiológica, em todos os ambientes de envelhecimento, evidenciando a assertividade dessa análise em verificar o desempenho das sementes.

A grande vantagem do método GGE é que ele permite a visualização da relação dos genótipos e da interação dos genótipos e ambientes, por meio de um gráfico biplot de fácil interpretação (SILVA; BENIN, 2012). São inúmeras as análises que podem ser realizadas com o GGE biplot e, de acordo com o objetivo da pesquisa, podem ser explorados os estudos com determinado foco, tais como: verificar a performance de diferentes cultivares em um dado ambiente; analisar a adaptação de uma cultivar em diferentes ambientes; comparar dois ou mais cultivares; identificar o melhor cultivar em cada ambiente; verificar a média de desempenho e estabilidade de cultivares e a representatividade e capacidade de discriminação de ambientes; ranquear cultivares baseado no desempenho médio e na estabilidade ou categorizar o ambiente baseado na sua habilidade de discriminação e representatividade (YAN, 2001), realizar a formação de mega-ambientes e de agrupamento de genótipos melhores adaptados (Yan et al., 2000), dentre outros.

Desta forma, o GGE biplot é uma ferramenta de análise bastante útil e utilizada no melhoramento de soja (DALÓ et al., 2019; WOYANN et al., 2020), sendo já também abordada

em alguns trabalhos relacionados à qualidade de sementes, com ênfase em melhoramento (PHILIPO et al., 2020; SILVA et al., 2017). No entanto, para avaliação da qualidade fisiológica de sementes sob ambientes de envelhecimento, para o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a utilizar esta técnica.

Embora a análise de GGE biplot não seja ainda muito adotada em estudos envolvendo a avaliação do desempenho de sementes de cultivares sob diferentes ambientes, nós exploramos neste trabalho as associações entre as sementes de diferentes cultivares sob distintas condições de envelhecimento, evidenciando as relações entre os ambientes e cultivares. Entendemos que esta análise tem potencial para ser aplicada em trabalhos na área de qualidade fisiológica de sementes.

Constatamos que 96 horas é o tempo de envelhecimento artificial cujo efeito sobre a qualidade das sementes mais se assemelha ao armazenamento de oito meses sob condição refrigerada e galpão, devido à proximidade dos vetores destes ambientes (Figura 3A). Na metodologia GGE biplot, o ângulo entre dois vetores pode ser utilizado como medida de associação, sendo que o cosseno do ângulo entre dois ambientes corresponde à correlação entre eles (SILVA; BENIN, 2012). Além disso, o ranqueamento dos genótipos nestes ambientes também foi similar (Figura 3). Em contrapartida, o índice de desempenho obtido com o envelhecimento por 48 horas, muitas vezes descrito como preditor de longevidade de sementes (DELOUCHE; BASKIN, 1973), não foi o que apresentou a maior associação com os resultados obtidos para as cultivares no armazenamento (Figura 3). Outros autores também encontraram que 48 horas de envelhecimento artificial não foi o melhor tempo de envelhecimento para predição do desempenho de sementes no armazenamento (FANTAZZINI et al., 2018; FREITAS et al., 2006; PATIL et al., 2017), o que reforça a nossa evidência da necessidade de ajuste do tempo de envelhecimento artificial para a predição da armazenabilidade de sementes de soja de maneira mais assertiva. Acreditamos, ainda, que pode ser que o tempo de envelhecimento precise ser ajustado de acordo com os genótipos utilizados, conforme foi relatado nos estudos de Fantazzini et al. (2018) e Patil et al. (2017).

Neste trabalho, o envelhecimento artificial das sementes por 96 horas a 41 °C foi o mais promissor para se inferir sobre o desempenho das sementes de cultivares de soja após o armazenamento por oito meses em condição refrigerada e não refrigerada. No entanto, entendemos que há necessidade de mais estudos, com maior número de cultivares e de lotes, além de avaliar outras metodologias de envelhecimento artificial, com diferentes tempos,

temperaturas e uso de solução salina, para refinar essa metodologia. No entanto, acreditamos que o presente trabalho apresenta relevância e significa um avanço nas pesquisas sobre deterioração de sementes, já que comprova a eficiência do uso do envelhecimento artificial como preditor da longevidade de sementes de soja e do uso do GGE biplot como método a auxiliar nesses estudos.

## 5. CONCLUSÕES

O envelhecimento artificial, à temperatura de 41 °C por 96 horas, apresenta potencial para ser utilizado na predição da tolerância de sementes de soja à deterioração no armazenamento.

O método GGE biplot permite analisar as relações entre os ambientes de envelhecimento e visualizar o ranqueamento dos genótipos quanto ao desempenho das sementes quando submetidas ao envelhecimento natural e artificial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; TATIĆ, M.; ĐORĐEVIĆ, V.; NIKOLIĆ, Z.; ĐUKIĆ, V. Seed viability of oil crops depending on storage conditions. **Helia**, v. 33, p. 153-160, 2010.

BASSO, D. P.; HOSHINO-BEZERRA, A. K.; SARTORI, M. M. P.; BUITINK, J.; LEPRINCE, O.; SILVA, E. A. A. Late seed maturation improves the preservation of seedling emergence during storage in soybean. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 185-192, 2018.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392p.

CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 167-172, 2018.

CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2020.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**, v. 38, p. 547-552, 2016.

DALLÓ, S. C.; ZDZIARSKI, A. D.; WOYANN, L. G.; MILIOLI, A. S.; ZANELLA, R.; CONTE, J.; BENIN, G. Across year and year-by-year GGE biplot analysis to evaluate soybean

performance and stability in multienvironment trials. **Euphytica**, v. 215, n. 113, p. 1-12, 2019.

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

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; TAGLIARI, A.; CHIOMENTO, L. T.; SILVEIRA, D. C.; CHAVARRIA, G. Soybean seed vigor: uniformity and growth as key factors to improve yield. **Agronomy**, v. 10, p. 1-15, 2020.

FANTAZZINI, T. B.; ROSA, D. V. F.; PEREIRA, C. C.; PEREIRA, D. S.; CIRILLO, M. A.; OSSANI, P. C. Association between the artificial aging test and the natural storage of coffee seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 164-172, 2018.

FREITAS, R. A.; DIAS, D. C. F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; DIAS, L. A. S.; JOSÉ, I. C. Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds. **Seed Science & Technology**, v. 34, p. 253-264, 2006.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). **Handbook of vigour test methods**. 3<sup>o</sup> ed. Zürich: ISTA, 1995. 117p.

LIMA, J. J. P.; BUITINK, J.; LALANNE, D.; ROSSI, R. F.; PELLETIER, S.; SILVA, E. A. A.; LEPRINCE, O. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **PLoS One**, v. 12, p. 1-25, 2017.

MCDONALD, M. B.; PHANEENDRANATH, B. R. A modified accelerated aging seed vigor test for soybeans. **Journal of Seed Technology**, v. 3, p. 27-37, 1978.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

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

MOHAMMADI, H.; SOLTANI, A.; SADEGHIPOUR, H. R.; ZEINALI, E. Effects of seed aging on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean. **International Journal of Plant Production**, v. 5, p. 65-70, 2011.

NAGEL, M.; KRANNER, I.; NEUMANN, K.; ROLLETSCHECK, H.; SEAL, C. E.; COUVILLE, L.; FERNANDEZ-MARÍN, B.; BORNER, A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 1011-1022, 2014.

NAIK, S. M.; MADHUSUDAN, K.; MOTAGI, B. M.; MUGALI, S.; NADAF, H. L. Molecular characterization of seed longevity and associated characters using SSR markers in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, p. 2357-

2360, 2019.

NAIK, S. M.; MADHUSUDAN, K.; MOTAGI, B. N.; NADAF, H. L.; THIMMARAJU. Diversity in soybean (*Glycine max*) accessions based on morphological characterization and seed longevity characteristics. **Progressive Research – An International Journal Society for Scientific Development**, v. 11, p. 377-381, 2016.

NAKAGAWA, J. Teste de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D. E; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceito e testes**. ABRATES, Londrina, 2.1-2.6, 1999.

PATIL, S. S.; DODDAGOUDAR, S. R.; KURNALLIKER, V. K.; MATHAD, R. C.; PATIL, R. P. Prediction of storability in soybean seeds through accelerated ageing technique [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Legume Research**, v. 40, p. 1-6, 2017.

PHILIPO, M.; NDAKIDEMI, P. A.; MBEGA, E. R. Environmental and genotypes influence on seed iron and zinc levels of landraces and improved varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tanzania. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 15, n. 100056, p. 1-10, 2020.

SAKO, Y.; MCDONALD, M. B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A. F.; BENNETT, M. A. A system for automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, p. 625-636, 2001.

SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H. M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant & Cell Physiology**, v. 57, p. 660-674, 2016.

SHELAR, V. R.; SHAIKH, R. S.; NIKAM, A. S. Soybean seed quality during storage: a review. **Agricultural Reviews**, v. 29, p. 125 – 131, 2008.

SILVA, K. B.; BRUZI, A. T.; ZAMBIAZZI, E. V.; SOARES, I. O.; PEREIRA J. L. A. R.; CARVALHO, M. L. M. Adaptability and stability of soybean cultivars for grain yield and seed quality. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, gmr16029646, 2017.

SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. Seedcalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 250-257, 2019.

SILVA, R. R.; BENIN, G. Biplot analysis: concepts, interpretations and uses. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1404-1412, 2012.

ŠIMIĆ, B.; POPOVIĆ, R.; SUDARIĆ, A.; ROZMAN, V.; KALINOVIĆ, I.; ČOSIĆ, J. Influence of storage condition on seed oil content of maize, soybean and sunflower. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 72, p. 211-213, 2007.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, p. 237-245, 1981.

SINGH, J.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. Factors affecting oilseed quality during storage with

special reference to soybean (*Glycine max*) and niger (*Guizotia abyssinica*) seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 2215-2226, 2017.

SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, p. 627-631, 2013.

TIAN, X.; SONG, S.; LEI, Y. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, p. 33-40, 2008.

TRIPATHI, N.; KHARE, D. Molecular approaches for genetic improvement of seed quality and characterization of genetic diversity in soybean: a critical review. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1645-1654, 2016.

VERGARA, R. O.; GAZOLLA-NETO, A.; GADOTTI, G. I. Space distribution of soybean seed storage potential. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 399-410, 2019.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

YAN, W.; HOLLAND, J. B. A heritability-adjusted GGE biplot for test environment evaluation. **Euphytica**, v. 171, p. 355-369, 2010.

YAN, W. GGE biplot - A windows application for graphical analysis of multienvironment trial data and other types of two-way data. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 1111-1118, 2001.

YAN, W.; HUNT, L. A.; SHENG, Q.; SZLAVNICS, Z. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE Biplot. **Crop Science**, v. 40, p. 597-605, 2000.

YAN, W.; KANG, M. S. **GGE biplot analysis: a graphical tool for breeders, geneticists, and agronomists**. Flórida: Boca Raton, 2003. 286p.

WOYANN, L. G.; MATEI, G.; ZDZIARSKI, A. D.; DALLACORTE, L. V.; MADELLA, L. A.; BENIN, G. Selection indexes based on linear-bilinear models applied to soybean breeding. **Agronomy Journal**, v. 112, p. 175-182, 2020.

## **Capítulo II. Papel da composição bioquímica na tolerância à deterioração de sementes de soja sob envelhecimento natural e artificial.**

### **RESUMO**

O rápido declínio na qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento é um grave problema para as empresas e produtores. A redução da qualidade das sementes pode estar associada à sua constituição bioquímica. No entanto, a relação entre a composição e os mecanismos ligados à perda de viabilidade e vigor das sementes de soja durante o envelhecimento ainda permanece não elucidada. Desta forma, este trabalho teve por objetivo analisar o papel da composição bioquímica das sementes de cultivares de soja na qualidade fisiológica e na tolerância à deterioração em decorrência do envelhecimento natural e artificial. Sementes de seis cultivares de soja foram analisadas inicialmente e após serem submetidas ao envelhecimento natural, armazenamento por oito meses, e artificial, utilizando-se temperatura de 41 °C e 100% umidade relativo por 96 horas. Foram realizados testes de grau de umidade, germinação e vigor e mensurados o teor de óleo, proteína total, proteína solúvel, malonaldeído e dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico das sementes. Verificou-se que o envelhecimento natural e artificial reduz a qualidade fisiológica e altera a composição bioquímica das sementes. No entanto as respostas ao envelhecimento natural e artificial são distintas, sendo o envelhecimento artificial mais drástico que o natural para redução da qualidade das sementes. O teor de óleo associado à composição dos ácidos graxos leva à maior ou menor deterioração das sementes. Quanto maior o conteúdo de ácido graxo oleico e de proteína solúvel, e menor o de ácido linoleico e linolênico, maior é a qualidade fisiológica e potencial de armazenamento das sementes de soja.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merrill. Armazenamento. Longevidade. Vigor. Análise de Componentes Principais.

## **Chapter II. Role of biochemical composition in tolerance to deterioration of soybean seeds under natural and artificial aging.**

### **ABSTRACT**

Fast decline in the physiological quality of seeds during storage is a serious problem for companies and producers. Reduction in seed quality may be associated with its biochemical constitution. However, the relationship between the composition and the mechanisms linked to the loss of viability and vigor of soybean seeds during aging remains unclear. Thus, this work aimed to analyze the role of the biochemical composition of soybean seed cultivars in the physiological quality and tolerance to deterioration after natural and artificial aging. Seeds of six soybean cultivars were analyzed freshly harvested and after being subjected to natural aging, storage for eight months, and artificial aging, using a temperature of 41 °C and 100% relative humidity for 96 hours. Moisture content, germination and vigor tests were carried out and the oil content, total protein, soluble protein, malonaldehyde and palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic fatty acids were measured. It was found that natural and artificial aging reduces the physiological quality and alters the biochemical composition of the seeds. However, the responses to natural and artificial aging are different, with artificial aging being more drastic than natural to reduce seed quality. The oil content associated with the composition of fatty acids leads to greater or lesser deterioration of the seeds. The higher the content of oleic fatty acid and soluble protein, and the lower the amount of linoleic and linolenic acid, the greater the physiological quality and storage potential of soybean seeds.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill. Storage. Longevity. Vigor. Principal Component Analysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura de extrema importância para o agronegócio mundial. Os seus grãos são considerados importante fonte de óleo e proteína (SINGH et al., 2017), o que os torna matéria prima diversificada, sendo utilizados tanto para a indústria alimentícia, com a produção de farelo para o consumo animal e de soja *in natura* e seus derivados para o consumo humano, como para a indústria de biocombustíveis (YILMAZ et al., 2018), cosméticos (SUH, 2017), tinturas (MU et al., 2019), plásticos biodegradáveis (GHOSAL et al., 2020), pneus (BRACE, 2019), dentre outros.

Por sua renomada importância, a obtenção de altas produtividades tem sido foco dos produtores, sendo a qualidade fisiológica das sementes imprescindível para se atingir estande de plantas adequado e, conseqüentemente, elevadas taxas produtivas da cultura (EBONE et al., 2020).

Dentre os atributos relacionados à qualidade fisiológica das sementes destaca-se a germinação e o vigor, que são máximos no ponto de maturidade fisiológica (TRIPATHI; KHARE, 2016). A partir deste ponto ocorrem diversas alterações metabólicas, que geralmente incorrem em quedas nos parâmetros de qualidade, ocasionadas pelo processo de deterioração, que pode ser mais rápido ou lento dependendo da constituição genética das sementes e das condições às quais elas permanecem expostas (NAGEL et al., 2014).

Há evidências de que o desempenho das sementes de cultivares sob envelhecimento natural pode ser simulado pelo envelhecimento artificial (FREITAS et al., 2006). Ambos os envelhecimentos contribuem para a redução da qualidade fisiológica das sementes (BEWLEY et al., 2013). Porém, a velocidade e intensidade do processo de envelhecimento depende de vários fatores, entre eles as condições ambientais, a espécie e a cultivar (FANTAZZINI et al., 2018).

As sementes oleaginosas são as mais afetadas pelo envelhecimento e a soja é descrita como uma das culturas cujas sementes mais sofre com a deterioração (NAIK et al., 2019; SHELAR et al., 2008). Com o envelhecimento das sementes, ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e disfunção mitocondrial, o que leva à deterioração (XIN et al., 2014). O envelhecimento ocasiona, ainda, aumento da peroxidação lipídica e da condutividade elétrica, enquanto promove a redução da germinação, vigor, conteúdo de açúcares totais, proteínas solúveis e da atividade enzimática (CHANDEL et al., 2015), o que culmina na perda

da qualidade, com redução da germinação e do vigor das sementes.

O rápido declínio da qualidade fisiológica das sementes de soja geralmente é atribuído ao seu alto teor de óleo (SINGH et al., 2017). Esta rápida deterioração das sementes se dá principalmente devido à peroxidação de lipídeos (BEWLEY et al., 2013). As sementes de soja apresentam altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, que apresentam grande propensão à peroxidação não enzimática (autoperoxidação) e enzimática (lipoxigenases), o que resulta em rápido declínio da qualidade das sementes (SINGH et al., 2017).

Muitos fatores contribuem para a predisposição das sementes à deterioração, dentre eles o fator genético apresenta grande importância (SHABAN, 2013; TRIPATHI; KHARE, 2016). Assim, alguns genótipos apresentam maior longevidade das sementes que outros (SHABAN, 2013), independente das condições a que são submetidos.

A composição bioquímica da semente, que está estritamente associada ao componente genético, também exerce influência sobre o processo de deterioração e afeta a sua qualidade e longevidade (SINGH et al., 2017). O grande efeito dos compostos bioquímicos na longevidade é relacionado às propriedades de sorção, aos sítios potenciais para ataques de radicais livres e à presença de compostos protetores nas sementes (SINGH et al., 2017), o que varia de acordo com o tipo e quantidade de reserva predominante nas sementes (NAGEL; BORNER, 2010), bem como com as frações de compostos que as compõem (SINGH et al., 2017).

Sabe-se que a composição bioquímica apresenta relação com a qualidade fisiológica e longevidade das sementes (SINGH et al., 2017). No entanto, ainda permanece por ser elucidado os mecanismos ligados à rápida perda de viabilidade e vigor de sementes de determinadas cultivares de soja durante o armazenamento, bem como da capacidade das sementes de determinadas cultivares se manterem viáveis mesmo quando sob condições ambientais não ideais. Desta forma, este trabalho teve por objetivos analisar o papel da composição bioquímica das sementes de cultivares de soja na qualidade fisiológica e na tolerância à deterioração em decorrência do envelhecimento natural e artificial.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes e no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes de seis cultivares de soja, as quais foram denominadas GEN1, GEN2, GEN3, GEN4,

GEN5 e GEN6. As sementes foram analisadas quando recém-colhidas e, então, submetidas ao armazenamento (envelhecimento natural) e envelhecimento artificial.

Para o envelhecimento natural, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel Kraft Multifolha, devidamente lacrados e identificados, e submetidas ao armazenamento sob condição não refrigerada, em galpão de sementes, na cidade de Passo Fundo, RS, Brasil, por oito meses. Durante esse período, que se estendeu dos meses de abril a dezembro, as temperaturas mínima e máxima observadas foram de 8,8 e 30,7 °C, respectivamente, e a variação de umidade relativa (UR) do ambiente foi de 50 a 92%.

Para o envelhecimento artificial, as sementes foram distribuídas sobre bandejas de tela metálica acopladas a caixas tipo *gerbox*, contendo 40 mL de água destilada ao fundo, sendo mantidas sob umidade relativa de 100% a 41 °C, pelo período de 96 horas. Após o envelhecimento, as sementes foram deixadas sobre bancada em ambiente de laboratório para secagem natural até que atingissem a umidade inicial (aproximadamente 12%).

As sementes recém-colhidas, envelhecidas artificialmente e armazenadas por oito meses foram submetidas aos seguintes testes e determinações:

**2.1. Grau de Umidade** - O grau de umidade foi determinado pelo método da estufa, a  $105 \pm 3$  °C, durante 24 h, sendo utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada (BRASIL, 2009). O teor de água foi medido imediatamente após o envelhecimento e antes da execução dos testes.

**2.2. Germinação** - Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram semeadas em papel germitest umedecido com volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em germinador a 25 °C. Foram realizadas avaliações com registro da porcentagem das plântulas normais no 5º e 8º dias após a semeadura (BRASIL, 2009).

**2.3. Envelhecimento Acelerado** - Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram distribuídas em camada única sobre bandeja de tela metálica acoplada à caixa tipo *gerbox* que continha, ao fundo, 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas, para se obter 100% de UR em seu interior, e mantidas em BOD a 41 °C por 48 horas (MCDONALD; PHANEENDRANATH, 1978). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada no 5º dia após a semeadura.

**2.4. Crescimento de plântulas** - Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes, semeadas equidistantemente sobre duas folhas de papel germitest, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco (NAKAGAWA, 1999). As sementes foram colocadas para germinar, em rolos de papéis umedecidos, e mantidas em germinador, a 25 °C, por três dias. As plântulas foram escaneadas e, com o auxílio do Software VigorS<sup>®</sup>, foram mensurados o comprimento de raiz e de parte aérea. Os dados de comprimento, juntamente com os de germinação, foram utilizados para o cálculo de índice Vigor Corrigido (VC) (MEDEIROS; PEREIRA, 2018), obtido por meio do pacote SeedCalc do programa R (SILVA et al., 2019).

**2.5. Massa seca de plântulas** - As mesmas plântulas utilizadas para a determinação do comprimento foram utilizadas para a obtenção da massa seca de plântulas. A massa seca foi obtida após a secagem das plântulas em estufa com circulação de ar forçada, a 70 °C por 72 horas.

**2.6. Índice de Velocidade de Emergência** - Quatro repetições de 50 sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo dois litros de areia como substrato. O substrato foi inicialmente umedecido até atingir 80% da capacidade de retenção de água e irrigado diariamente. Foram realizadas contagens diárias do número de plântulas emergidas até o 12º dia após a semeadura. Os dados das contagens foram utilizados para a obtenção do índice de velocidade de emergência, conforme proposto por Maguire (1962).

**2.7. Condutividade Elétrica** - Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas e colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada, sendo mantidos em BOD a 25 °C, durante 24 horas (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica da solução, utilizando-se condutivímetro modelo DIGIMED-DM 32.

**2.8. Teor de Óleo e de Proteína Total** - Foram utilizadas três repetições de 50 sementes cada. As sementes foram liofilizadas e trituradas em moinho de facas, sendo retirada uma alíquota de 10 g do pó da semente triturada por amostra. Os teores de óleo e de proteína total foram determinados por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), por meio do Equipamento Analisador FT-NIR, Thermo Scientific, modelo Antaris II.

**2.9. Conteúdo de Proteína Solúvel** - Foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes cada. As sementes foram embebidas por 16 horas. Os tegumentos foram retirados e os embriões das sementes liofilizados e moídos em moinho de bolas para obtenção de pó fino. Uma subamostra de 100 mg do material moído foi utilizada para cada uma das repetições de cada

tratamento. A determinação do teor de proteína solúvel foi realizada conforme a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

**2.10. Conteúdo de Malonaldeído (MDA)** - Foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes por tratamento. Para o preparo das amostras, as sementes foram embebidas por 16 horas, os tegumentos retirados e os embriões liofilizados e moídos em moinho de bolas para obtenção de pó fino. Utilizou-se 200 mg do material moído por amostra. A cada amostra foram adicionados 1,8 mL de ácido tricloroacético (TCA 0,1%, p/v), seguido de homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado a 19.000 g, durante 15 min., a 4 °C. Após este procedimento, 500 µL do sobrenadante foi coletado e adicionado a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 20%). Para composição do 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, sob agitação (CAKMAK; HORST, 1991). Após este período, efetuou-se banho de gelo, para parar a reação. Foram retiradas alíquotas de 250 µL e realizadas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm. Os cálculos da concentração de MDA foram realizados de acordo com Heath e Packer (1968), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**2.11. Teor de Ácidos Graxos** - O teor dos ácidos graxos esteárico, palmítico, oleico, linoleico e linolênico na fração de óleo da soja foi determinado por cromatografia gasosa. Foram utilizadas 10 sementes por tratamento, sendo realizadas três repetições por tratamento. As sementes foram liofilizadas e trituradas em moinho de facas, sendo 150 mg do material moído utilizado por amostra. As amostras foram colocadas em microtubos, onde foram adicionados 1 mL de hexano, e mantidas a 4 °C por 16 h. Após esse período, a fração lipídica foi vertida em tubos e o solvente foi evaporado por borbulhamento de N<sub>2</sub>. Para obtenção de ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por Jham et al. (1982). Após o preparo das amostras, alíquotas foram injetadas em cromatógrafo a gás CG-17A, equipado com amostrador automático (Shimadzu, modelo AOC-17) e integrador (Shimadzu, modelo C-R7A). A coluna capilar Carbowax (30m x 0,32mm) foi mantida a 225 °C, com temperatura do injetor e detector sendo 245 °C e 280 °C, respectivamente. O gás nitrogênio foi utilizado como portador, na vazão de  $1,1 \text{ mL min}^{-1}$ .

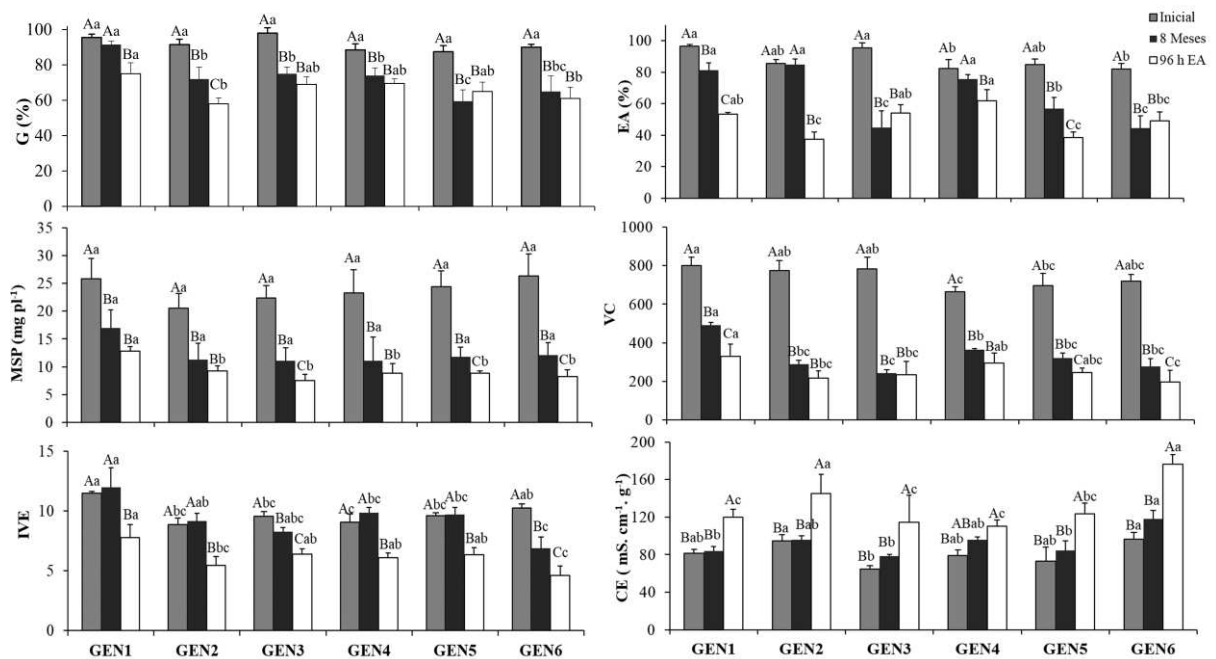
**2.12. Análise estatística** - O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 3, sendo seis genótipos e três tipos de envelhecimento:

sementes não envelhecidas (recém-colhidas), envelhecidas naturalmente (armazenadas durante oito meses), e envelhecidas artificialmente (em BOD, a 41 °C e 100% UR, por 96 horas). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para verificar o desempenho dos genótipos e as relações entre as variáveis fisiológicas e bioquímicas, os dados obtidos da avaliação fisiológica e da composição bioquímica das sementes foram submetidos à análise de componentes principais (PCA). Foram ainda obtidos os coeficientes de correlação de Pearson, cuja significância foi avaliada pelo teste  $t$  ( $p < 0,05$ ). O programa R 4.0.0 (R CORE TEAM, 2020) foi utilizado para a execução destas análises.

### 3. RESULTADOS

O grau de umidade inicial das sementes foi de  $11,8 \pm 0,9$  %. Após o armazenamento, as sementes apresentaram teor de água de  $11,46 \pm 0,8$  %, e subsequente ao envelhecimento artificial, atingiram a umidade de  $30,2 \pm 2,5$  %. No momento da execução dos testes, a umidade das sementes foi de  $11,69 \pm 0,62$  %.

A qualidade fisiológica das sementes foi reduzida após o envelhecimento natural e artificial (Figura 1).



**Figura 1.** Germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), massa seca de plântulas (MSP), vigor corrigido (VC), índice de velocidade de emergência (IVE) e condutividade elétrica (CE), em sementes de soja após serem colhidas (inicial) e submetidas ao envelhecimento natural, armazenamento por oito meses (8 meses), e artificial, envelhecimento por 96 horas (96 h EA). \*\*\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, comparando-se o

período inicial e os envelhecimentos, e minúscula, comparando-se os genótipos em cada ambiente, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

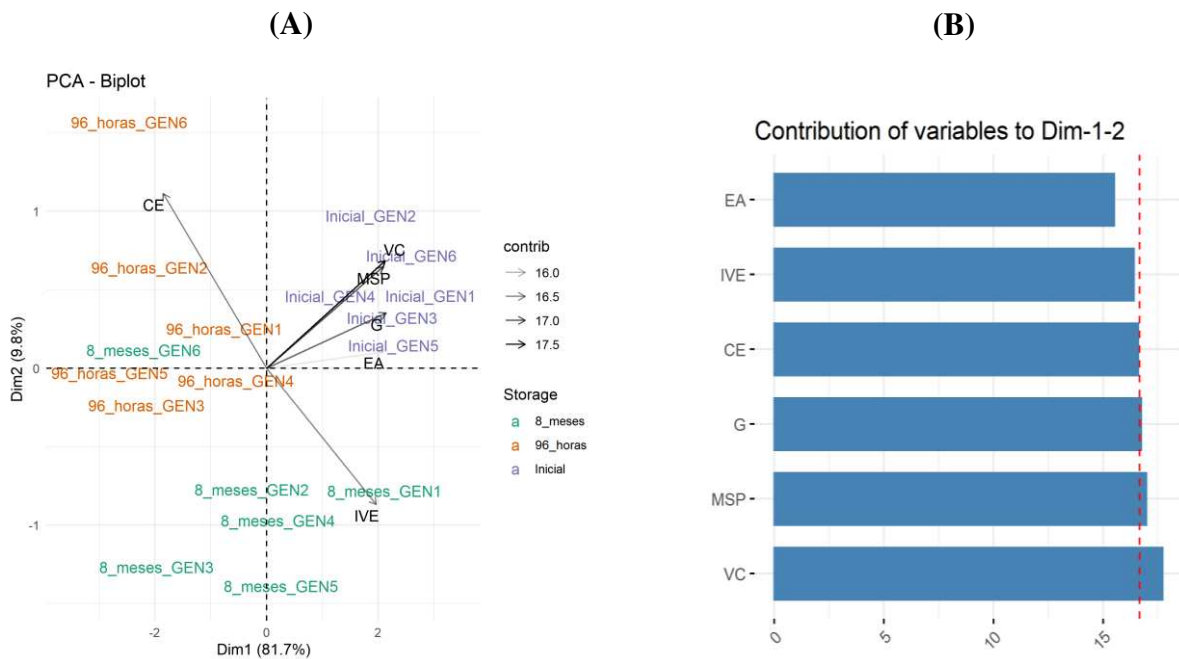
Após o armazenamento por oito meses, as sementes da cultivar GEN1 não tiveram queda de germinação, em relação à condição inicial, diferentemente das demais cultivares (Figura 1). As sementes da cultivar GEN2 mantiveram o vigor elevado após serem armazenadas, conforme observado pelo teste de EA. O IVE não diferiu entre a condição inicial e após o armazenamento, para as sementes das cultivares GEN1, GEN2, GEN4 e GEN5. Ainda, a CE das sementes na condição inicial foi similar às armazenadas para todas as cultivares. No entanto, o VC foi drasticamente reduzido em todas as cultivares, evidenciando redução do desempenho das plântulas e, conseqüentemente, queda no vigor das sementes após o armazenamento.

Houve diferença de desempenho entre as cultivares após o envelhecimento natural das sementes (Figura 1). Todas as cultivares apresentaram alta qualidade fisiológica das sementes quando recém-colhidas. No entanto, após serem submetidas ao armazenamento, as sementes da cultivar GEN1 apresentaram menor redução da qualidade fisiológica, enquanto as sementes da cultivar GEN6 apresentaram redução mais drástica.

Após serem submetidas ao envelhecimento artificial, houve redução na germinação e no vigor das sementes, com queda nos parâmetros de G, EA, MSP, VC, IVE e aumento da CE das sementes de todas as cultivares (Figura 1).

O desempenho das sementes de algumas cultivares foi similar quando foram submetidas ao envelhecimento artificial e natural. Não houve diferença na germinação das sementes entre o envelhecimento natural e artificial para as cultivares GEN3, GEN4, GEN5 e GEN6. Da mesma forma, após o teste de EA, as sementes das cultivares GEN3 e GEN6 apresentaram igual desempenho quando submetidas aos dois tipos de envelhecimento. Houve, ainda, redução de MSP na mesma proporção para as cultivares GEN1, GEN2 e GEN4 e diminuição do VC em igual intensidade para GEN2, GEN3 e GEN4. Entretanto, o envelhecimento artificial propiciou maior aumento de CE e redução mais acentuada no IVE nas sementes de todos os cultivares, em comparação às armazenadas (Figura 1). Desta forma, sugere-se que os dois processos de envelhecimento ocorrem por mecanismos distintos.

Por meio da análise de componentes principais (PCA), foi constatado, ainda, nítida diferença de qualidade fisiológica das sementes recém-colhidas, envelhecidas artificialmente e armazenadas (Figura 2A).

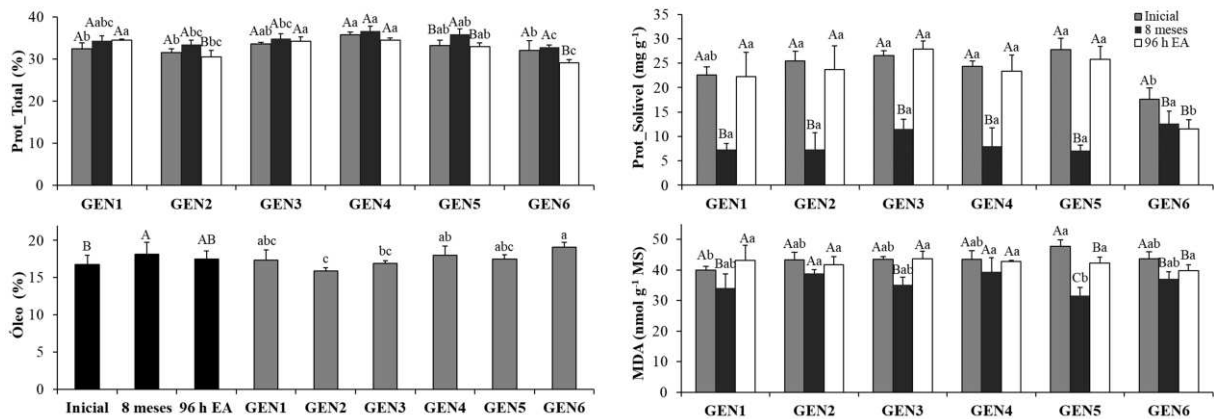


**Figura 2.** Biplot da análise de componentes principais (A) e contribuição das variáveis fisiológicas para a análise de PCA (B) de sementes de soja recém-colhidas (em roxo) e submetidas ao envelhecimento natural (em verde) e artificial (em laranja). VC = vigor corrigido; MSP = massa seca de plântulas; G = germinação; CE = condutividade elétrica; IVE = índice de velocidade de emergência; EA = envelhecimento acelerado.

Mais de 90% da variação total dos dados fisiológicos foi explicada pelos dois primeiros componentes (Figura 2A), sendo VC, MSP, G e CE as variáveis fisiológicas que mais contribuíram para a diferenciação dos tratamentos (Figura 2B).

As cultivares foram agrupadas de acordo com o tipo de envelhecimento a que foram submetidas, exceto a cultivar GEN6 após o armazenamento por oito meses, que teve comportamento atípico, estando mais similar às cultivares que foram submetidas ao envelhecimento artificial por 96 horas (Figura 2A). As sementes envelhecidas por 96 horas e a cultivar GEN6 após o armazenamento apresentaram maiores valores de CE (Figura 2A). Para o agrupamento das cultivares armazenadas por oito meses, o IVE foi a variável mais importante (Figura 2A).

A fim de investigar o efeito da composição bioquímica das sementes na qualidade fisiológica e na tolerância à deterioração durante o envelhecimento natural e artificial, foram analisados o teor de proteína total, óleo, proteína solúvel, conteúdo de malonaldeído (MDA) (Figura 3) e as frações dos ácidos graxos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico das sementes das diferentes cultivares de soja (Figura 4).

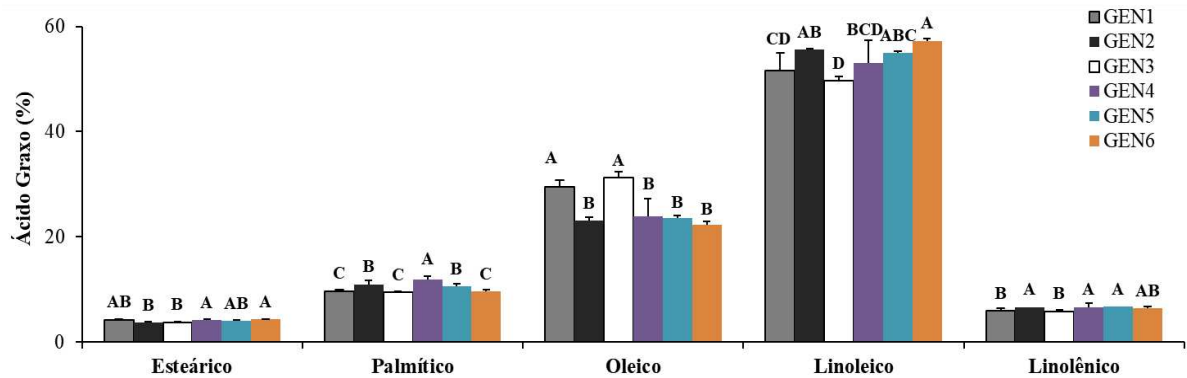


**Figura 3.** Teores de proteína total (Prot\_Total), proteína solúvel (Prot\_Solúvel), óleo e malonaldeído (MDA), em sementes de soja após serem colhidas (inicial) e submetidas ao envelhecimento natural, armazenamento por oito meses (8 meses), e artificial, envelhecimento por 96 horas (96 h EA). \*\*\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, comparando-se o período inicial e os envelhecimentos, e minúscula, comparando-se os genótipos em cada ambiente, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para as variáveis proteína total, proteína solúvel e MDA houve interação significativa entre as cultivares e os envelhecimentos. No entanto, para as variáveis teor de óleo e conteúdo de ácidos graxos, esta interação não foi significativa.

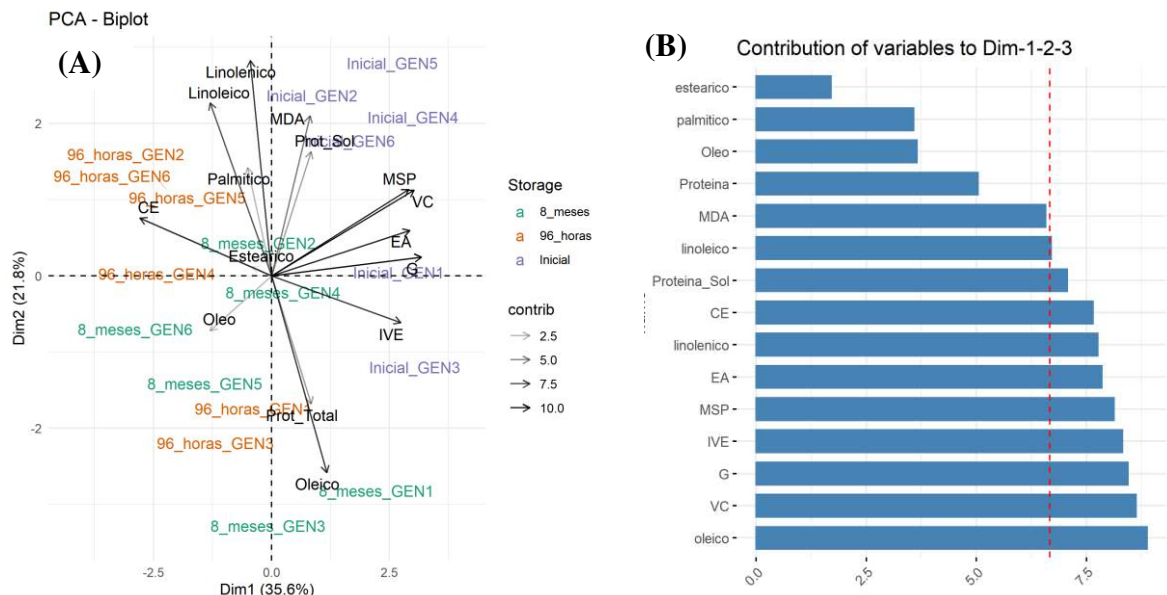
Houve redução no teor de proteína total apenas para as sementes das cultivares GEN2 e GEN6 após o envelhecimento artificial. No entanto, foi observada redução acentuada no conteúdo de proteína solúvel para todas as cultivares após o armazenamento. As sementes da cultivar GEN6 foram as que apresentaram o menor teor de proteína total e o menor conteúdo de proteína solúvel, inicial e após o envelhecimento artificial. O envelhecimento das sementes promoveu aumento do teor de óleo para todos os genótipos, sendo maior nas sementes da cultivar GEN6. Houve redução no conteúdo de MDA das sementes das cultivares GEN5 e GEN6, após o envelhecimento artificial, e nas sementes das cultivares GEN1, GEN3, GEN5 e GEN6 após o armazenamento (Figura 3).

As sementes das cultivares GEN1 e GEN3 apresentaram as maiores proporções de ácido oleico e as menores dos ácidos linoleico e linolênico (Figura 4). Por outro lado, as sementes da cultivar GEN6 apresentaram o maior teor de ácido linoleico (Figura 4).



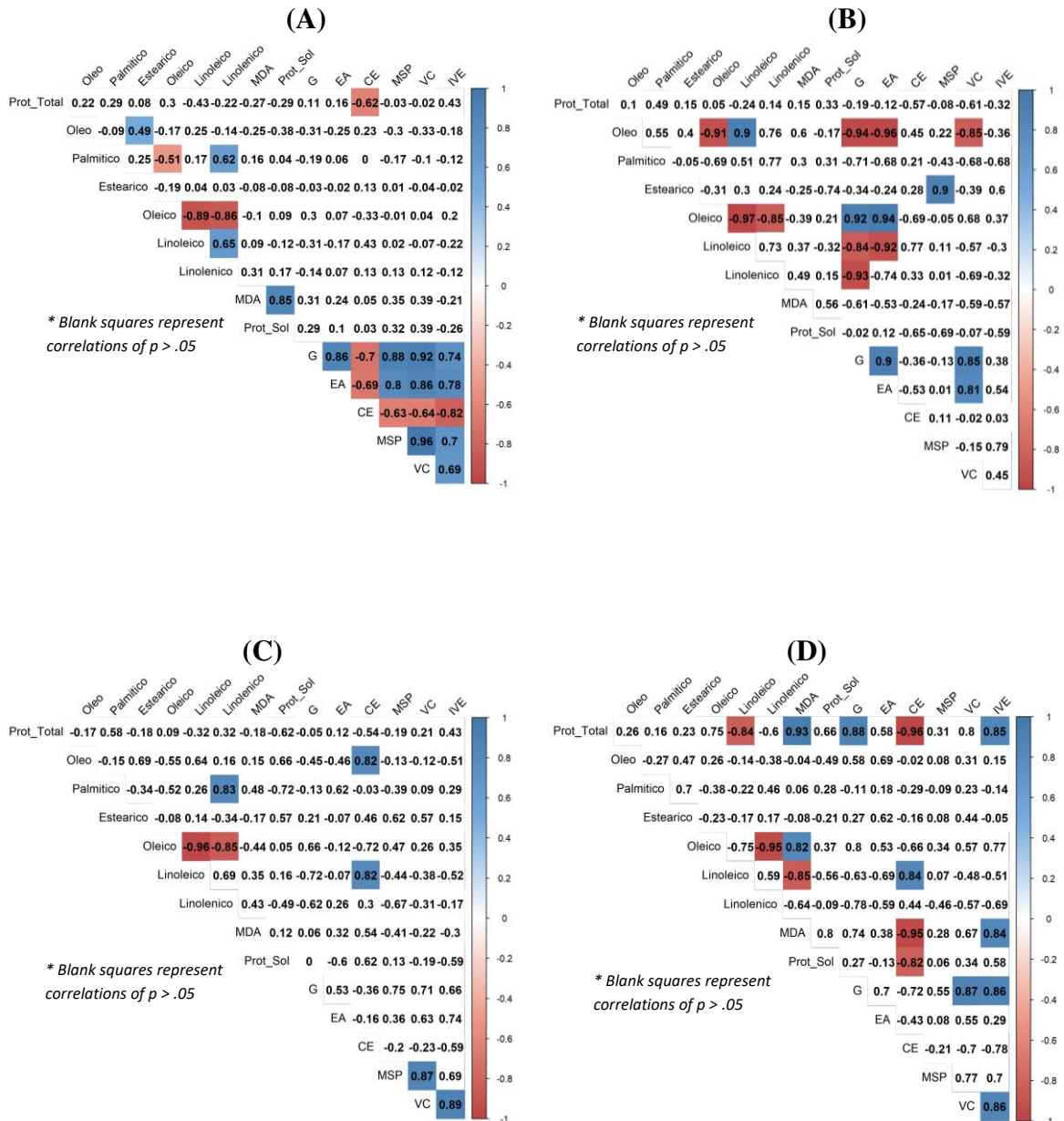
**Figura 4.** Teores de ácido graxo esteárico, palmítico, oleico, linoleico e linolênico em sementes de cultivares de soja recém-colhidas e submetidas ao envelhecimento artificial e natural. \*\*\* Não houve diferença estatística entre as sementes no período inicial, após o armazenamento (8 meses) e após o envelhecimento artificialmente (96 h de EA) para nenhuma cultivar. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Por meio da análise de PCA, utilizando-se todas as variáveis (fisiológicas e bioquímicas), foi constatado que o teor de ácido graxo oleico foi a variável de maior importância para explicar as diferenças entre os tratamentos, seguidas das variáveis VC, G, IVE, MSP, EA, ácido linolênico, CE e proteína solúvel. Foi também evidente a distinção entre as sementes recém-colhidas e envelhecidas, mas não foi nítida a distinção entre as sementes envelhecidas natural e artificialmente (Figura 5).



**Figura 5.** Análise de componentes principais (A) e de contribuição das variáveis (B) para verificar a relação entre as variáveis fisiológicas e bioquímicas e o desempenho de sementes de soja recém-colhidas (em roxo) e submetidas ao envelhecimento natural (em verde) e artificialmente (em laranja).

Para verificar a relação entre as variáveis bioquímicas e fisiológicas, foram analisados conjuntamente os dados das sementes recém-colhidas e envelhecidas natural e artificialmente (Figura 6A) e separadamente apenas das sementes recém-colhidas (Figura 6B), envelhecidas natural (Figura 6C) e artificialmente (Figura 6D).



**Figura 6.** Correlação entre as variáveis fisiológicas e composição bioquímica de sementes de soja: sementes recém-colhidas e envelhecidas natural e artificialmente (A); sementes recém-colhidas (B); sementes submetidas ao armazenamento (C); e sementes submetidas ao envelhecimento artificial (D).

Considerando apenas as correlações significativas de alta magnitude (>80%), houve correlação positiva entre as variáveis G, MSP e VC; VC e MSP; MDA e proteína solúvel e

negativa entre IVE e CE; e ácido oleico e os ácidos graxos linoleico e linolênico, quando analisadas conjuntamente as sementes recém-colhidas e envelhecidas natural e artificialmente (Figura 6A).

Para as sementes recém-colhidas (Figura 6B), observou-se que quanto maior a proporção de ácido oleico e quanto menor a proporção de óleo e dos ácidos linoleico e linolênico, maior é a germinação e o vigor das sementes, constatado pelo teste de EA.

Considerando as sementes mantidas sob armazenamento por oito meses, envelhecidas naturalmente, houve correlação negativa entre os teores do ácido oleico com os ácidos linoleico e linolênico (Figura 6C). O envelhecimento artificial por 96 horas, no entanto, evidenciou correlação negativa e significativa apenas entre os teores de ácido oleico e linolênico e, em adicional, mostrou correlação positiva entre a CE e o ácido linoleico; e negativa entre a proteína solúvel e CE (Figura 6D).

#### 4. DISCUSSÃO

O teor de água das sementes recém-colhidas e envelhecidas natural e artificialmente, no momento da execução dos testes, estava em torno de 12%. A uniformidade deste parâmetro é importante para que não haja interferência nos resultados obtidos, já que o teor de água afeta o metabolismo das sementes (RAVENEAU et al., 2017).

No presente estudo, houve diferença de desempenho entre as cultivares após o armazenamento, sendo que as sementes da cultivar GEN1 apresentaram menor redução enquanto as da cultivar GEN6 apresentaram a maior redução na qualidade fisiológica (Figura 1). Esse comportamento distinto entre as cultivares pode estar relacionado as suas diferenças genotípicas, uma vez que a longevidade das sementes durante o armazenamento é controlada geneticamente (SANO et al., 2016). No entanto, o potencial de armazenabilidade das sementes é também influenciado pela sua qualidade inicial, histórico, conteúdo de água e composição bioquímica, bem como pelos agentes bióticos, umidade, temperatura e duração do armazenamento (SINGH et al., 2017).

Neste trabalho, as sementes foram armazenadas sob condição não refrigerada, em que a temperatura variou de 8,8 a 30,7 °C e a umidade relativa do ambiente de 50 a 92%, tendo médias altas de temperatura e umidade nos meses de novembro e dezembro. Quando as sementes são armazenadas em ambientes com umidade elevada, elas absorvem água, aumentam o grau de

umidade em seu interior, o que leva ao aumento da atividade de enzimas hidrolíticas, da respiração e da proporção de ácidos graxos livres (SINGH et al., 2017). Temperaturas elevadas também promovem aumentos nas taxas metabólicas e nas reações enzimáticas, acelerando o processo de deterioração (SINGH et al., 2017). O armazenamento inadequado, sob altas temperaturas e/ou alta umidade relativa, pode promover a elevação da temperatura da massa de sementes, aumento de acidez, intensificação da respiração, degradação das reservas, alteração das frações dos ácidos graxos, decomposição de membranas, peroxidação dos lipídeos, dentre outros fatores (BEWLEY et al., 2013; ŠIMIC et al., 2007; SINGH et al., 2017), que culminam em perda de vigor e da capacidade germinativa das sementes (Figura 1).

Além das condições não ideais de armazenamento, o envelhecimento artificial também promove redução na qualidade fisiológica das sementes. Nós observamos que, quando submetidas ao envelhecimento artificial, as sementes também apresentaram redução no vigor (Figura 1). O envelhecimento artificial, também conhecido como envelhecimento acelerado, baseia-se na aplicação de altas temperatura e umidade às sementes, promovendo rápida deterioração (DELOUCHE; BASKIN, 1973), sendo possível, subsequentemente, a inferência sobre o vigor e a capacidade de armazenamento das sementes.

Nesta pesquisa, as sementes foram envelhecidas sob temperatura de 41°C e UR 100%, pelo período de 96 horas. Testes preliminares constataram que o tempo de 96 horas de envelhecimento artificial apresentou alta correlação com os resultados obtidos após oito meses de armazenamento. Freitas et al. (2006) também encontraram alta correlação entre o envelhecimento artificial a 41 °C por 96 horas e o desempenho de sementes de algodão em armazenamento superior a 10 meses.

Para algumas variáveis avaliadas no presente trabalho, as sementes de algumas cultivares apresentaram o mesmo desempenho quando submetidas ao envelhecimento natural e artificial (Figura 1). No entanto, por meio dos testes de CE e IVE, foi possível observar diferenças entre os dois tipos de envelhecimentos. Após o envelhecimento artificial, as sementes de todas as cultivares apresentaram acentuado aumento na condutividade elétrica e maior decréscimo no IVE, quando comparado ao armazenamento.

A análise de PCA realizada com os dados das variáveis fisiológicas, também evidenciou nítida distinção entre o envelhecimento natural e artificial (Figura 2A). Por meio desta análise, evidenciamos que as cultivares se agruparam de acordo com o tipo de envelhecimento a que foram submetidas e que a cultivar GEN6, após o armazenamento por

oito meses, teve comportamento atípico, estando similar às cultivares que foram submetidas ao envelhecimento artificial por 96 horas. Conforme constatado pelos teste de CE, IVE (Figura 1) e pela análise de PCA (Figura 2A), evidenciamos que o envelhecimento artificial foi mais drástico que o envelhecimento natural. Portanto, para as sementes da cultivar GEN6 o processo de deterioração foi mais drástico durante o armazenamento, comparado às demais cultivares.

As sementes envelhecidas por 96 horas e a cultivar GEN6 após o armazenamento apresentaram maiores valores de CE. O teste de CE evidencia o grau de estruturação das membranas celulares durante o processo de embebição (BEWLEY et al., 2013). Desta forma, quanto maior a CE, ou seja, quanto maior a lixiviação de exsudatos das sementes, menor é o grau de integridade das membranas, podendo indicar a ocorrência de deterioração e, conseqüentemente, menor vigor das sementes (PRIESTLEY; LEOPOLD, 1979). A grande influência da CE para a cultivar GEN6 após o armazenamento pode ser indicativa da maior sensibilidade desta cultivar à deterioração, com redução da integridade das membranas celulares, que pode justificar o pior desempenho das sementes no armazenamento e após o envelhecimento artificial. O aumento da CE está relacionado à peroxidação de lipídios de membranas, apontado como o principal mecanismo de deterioração de sementes oleaginosas (MCDONALD, 1999; VIJAYAKUMAR et al., 2019).

Além disso, o IVE foi a variável mais importante para o agrupamento das cultivares armazenadas por oito meses (Figura 2A), demonstrando que, mesmo com a redução da qualidade fisiológica dessas sementes, a alta velocidade de emergência das plântulas aponta maior qualidade fisiológica comparado às sementes envelhecidas artificialmente.

Os resultados dos testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes e a análise de PCA nos leva a inferir que, embora haja grande similaridade entre os dois envelhecimentos, o envelhecimento artificial e o natural são incitados por mecanismos distintos. As sementes após o armazenamento apresentaram umidade de  $11,46 \pm 0,8 \%$ , enquanto sob envelhecimento artificial atingiram teor de água de  $30,2 \pm 2,5 \%$ . Essa alta umidade atingida pelas sementes, em combinação com a alta temperatura do ambiente por subseqüentes horas (96 h), favorece a intensificação da respiração, propiciando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que acarreta reações deletérias e promove a desestabilização de membranas e o aumento do grau e velocidade dos processos de deterioração (BEWLEY et al., 2013; XIN et al., 2014). Desta forma, observamos que o envelhecimento artificial promoveu danos às membranas das

sementes, que culminou com o aumento da CE e redução do IVE, que não foram observados nas sementes após o armazenamento (Figura 1).

Apesar de o envelhecimento artificial das sementes ser utilizado para predição do desempenho durante o envelhecimento natural, ainda permanece incerto o quanto esses dois processos de envelhecimento se assemelham (RAJJOU et al., 2008). Priestley e Leopold (1980) e Shaban (2013) citam que os envelhecimentos natural e artificial não acontecem na mesma ordem e magnitude. Machado Neto et al. (2001) discutem que padrões de degradação de proteínas no envelhecimento artificial e natural são provavelmente incitados por diferentes mecanismos fisiológicos. Freitas et al. (2006) descrevem que não foi possível estabelecer correlação entre o envelhecimento natural e artificial para as alterações no conteúdo de lipídios e na atividade da lipoxigenase em sementes de algodão. Por outro lado, Sung (1996) afirma que ambos os envelhecimentos afetam a peroxidação de lipídios e a inibição da atividade de enzimas. Rajjou et al. (2008) também evidenciam diversos eventos moleculares similares entre ambos os tipos de envelhecimentos. No entanto, independente da intensidade e do modo de ação, tanto o envelhecimento artificial como o natural promovem deterioração, o que culmina em redução da viabilidade e do vigor das sementes (FREITAS et al., 2006; MACHADO NETO et al., 2001; RAJJOU et al., 2008), conforme foi evidenciado neste trabalho (Figura 1).

O processo de deterioração das sementes, seja ele incitado pelo envelhecimento natural ou artificial, está associado às condições as quais as sementes são expostas e à genética que elas apresentam, sendo a composição bioquímica um dos fatores que mais afeta a qualidade e a longevidade das sementes (SANO et al., 2016; SHABAN et al., 2013; TRIPATHI; KHARE, 2016).

Constatamos que existe variação na composição bioquímica entre as cultivares de soja e que esta variação pode explicar as diferenças de desempenho entre as cultivares, seja quando recém-colhidas, ou envelhecidos natural e artificialmente (Figuras 3, 4, 5 e 6). As sementes da cultivar GEN6, que apresentaram o pior desempenho após o armazenamento (Figura 1), continham o menor teor de proteína total e de proteína solúvel antes de serem envelhecidas.

Além disso, observamos que as proteínas solúveis são bastante propensas à degradação durante o envelhecimento. Enquanto o teor de proteína total foi reduzido apenas para as cultivares GEN2 e GEN6, quando sob envelhecimento artificial, houve redução acentuada nos níveis de proteína solúvel para todas as cultivares após o armazenamento e para a cultivar GEN6

após o envelhecimento artificial (Figura 4). A redução no conteúdo de proteína solúvel pode ser atribuída à reação de Amadori e Maillard, que tem como consequência a agregação e perda da solubilidade de proteínas solúveis, conforme resultados obtidos por Castellión et al. (2010). Estes autores encontraram redução no teor de proteína solúvel após o armazenamento de sementes de quinoa e atribuíram a maior longevidade das sementes de alguns genótipos durante o envelhecimento natural ao maior teor de proteína solúvel nas sementes recém-colhidas. Assim, foi sugerida uma correlação entre a estabilidade das proteínas e a vida útil das sementes. Mathias et al. (2019) também ressaltam que o conteúdo de proteína solúvel pode ser utilizado como indicador de qualidade fisiológica das sementes de soja.

Notamos que, enquanto o teor de proteína solúvel foi drasticamente reduzido nas sementes após o armazenamento, houve manutenção de níveis elevados após o envelhecimento artificial, para a maioria das cultivares (Figura 3). Isso pode estar ligado à maior taxa metabólica das sementes durante o processo de envelhecimento artificial. Nesta condição, as sementes foram mantidas sob elevada temperatura e umidade relativa (41 °C e 100% UR por 96 horas) e atingiram umidade aproximada de 30%. Possivelmente, o elevado teor de água favoreceu a intensificação do metabolismo, com síntese de proteínas, incluindo enzimas de mobilização de reservas e ligadas aos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, o que não ocorreu durante o envelhecimento natural, em que as sementes possuíam reduzido teor de água (aproximadamente 12%). Neste caso, as taxas metabólicas são bastante reduzidas (BEWLEY et al., 2013) e, diferentemente do envelhecimento artificial, durante o armazenamento predominam os processos de deterioração ligados à oxidação de ácidos graxos (SINGH et al., 2017) e a degradação de proteínas por meio das reações de Amadori e Maillard (CASTELLIÓN et al., 2010).

Constatamos que houve aumento no teor de óleo com o envelhecimento e que a cultivar GEN6 apresentou a maior proporção de óleo em relação às demais cultivares (Figura 3). Embora não seja esperado o aumento do teor de óleo com o envelhecimento das sementes, Priestley e Leopold (1979) também encontraram resultados semelhantes em sementes de soja. O teor de óleo é inversamente proporcional a germinação e ao vigor (Figura 6B), o que pode também justificar o pior desempenho das sementes de GEN6, em relação às demais cultivares.

Após o envelhecimento natural e artificial, evidenciamos que o conteúdo de MDA das sementes se manteve igual ou sofreu redução em relação às sementes antes do envelhecimento (Figura 3). O MDA é um produto secundário, gerado com a oxidação dos ácidos graxos poli-

insaturados, cuja determinação, em amostras biológicas, é indicativa do grau de estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001). Por ser um produto originado da peroxidação lipídica, espera-se que haja aumento da sua produção com o envelhecimento das sementes. No entanto, neste trabalho, não foi constatado o incremento no MDA com o envelhecimento. Ataíde et al. (2012), que também encontraram redução de MDA em sementes de *Pterogyne nitens* após 72 horas de envelhecimento, justificam esta queda por duas razões, possíveis: morte das células e consequente degradação do composto, e ação de enzimas do complexo antioxidativo, que tem sua atividade aumentada sob estresse oxidativo e que atuam em ação contrária à peroxidação.

Embora tenhamos encontrado resultados conflitantes para o teor de óleo e conteúdo de MDA, a análise de contribuição das variáveis para a PCA com os dados de todo o experimento mostra que estas características não tiveram grande importância para a diferenciação dos tratamentos (Figura 5B). Ambas as variáveis tiveram importância menor que a importância média ao considerar todas as variáveis.

Evidenciamos que as cultivares GEN1 e GEN3, que tiveram pouca redução da qualidade fisiológica das sementes após o envelhecimento natural e artificial (Figura 1), apresentaram as maiores proporções de ácido oleico e as menores dos ácidos linoleico e linolênico (Figura 4). Por outro lado, as sementes da cultivar GEN6 apresentaram o maior teor de ácido linoleico (Figura 4) e a maior redução na qualidade fisiológica após ambos os envelhecimentos (Figura 1).

As sementes de soja apresentam em média cerca de 20% de óleo em sua constituição, sendo o óleo composto principalmente pelos ácidos graxos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3). A porcentagem desses cinco ácidos graxos no óleo de soja são, em média, 10%, 4%, 18%, 55% e 13%, respectivamente (CLEMENTE; CAHOON, 2009), mas existe variação de concentração entre variedades comerciais (TAMAGNO et al., 2020), conforme também observado no presente trabalho (Figura 4). A composição de ácidos graxos é o fator mais importante para determinar a susceptibilidade do óleo à oxidação (MORELLO et al., 2004), sendo que o grau de insaturação dos ácidos graxos tem influência significativa na sua degradação (PRIESTLEY, 1986). Trabalhos anteriores evidenciaram que a viabilidade de sementes de soja no armazenamento está associada à oxidação de ácido graxos insaturados, principalmente à do ácido linoleico (TATICÍ et al., 2012).

As análises das correlações deste trabalho apontam para relação inversa entre o ácido graxo oleico e os ácidos graxos linoleico e linolênico (Figura 6). Os ácidos linoleico e linolênico

destacam-se como os mais susceptíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (SINGH et al., 2017) e, portanto, as sementes que apresentaram maiores proporções destes ácidos graxos, apresentaram, também, maior propensão à deterioração. Oliveira et al. (2006) constataram que o baixo teor de ácido linolênico presente na fração óleo da semente de soja favorece a produção de sementes de melhor qualidade. Wang et al. (2019), trabalhando com sementes de amendoim, evidenciaram que as sementes com maior teor de ácido oleico apresentaram menor redução da qualidade fisiológica durante o armazenamento.

As sementes oleaginosas, de modo geral, apresentam baixa longevidade e podem sofrer intensa deterioração com o envelhecimento. A soja está entre as oleaginosas cujas sementes mais deterioram durante o armazenamento (NAIK et al., 2019; SHELAR et al., 2008), o que pode estar associado ao seu alto teor de ácido graxo linoleico, que, conforme dados obtidos com o presente trabalho, tem relação inversa com o potencial de germinação e o vigor das sementes.

Enquanto alto teor de proteína solúvel pode ser indicador de manutenção da qualidade fisiológica em sementes envelhecidas de soja (MATHIAS et al., 2019), alta CE evidencia maior grau de deterioração e menor vigor das sementes (BEWLEY et al., 2013). O aumento da CE pode ser consequência da peroxidação dos ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico, presente nas membranas (SINGH et al., 2017), o que pode justificar a correlação positiva entre o teor de ácido linoleico e os valores de CE (Figura 6).

## 5. CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica das sementes de soja é reduzida com o envelhecimento natural e artificial. No entanto, o processo de deterioração se dá por mecanismos distintos nestas condições, sendo a redução da qualidade das sementes mais drástica com o envelhecimento artificial.

A composição bioquímica das sementes, que está estritamente associada à sua qualidade fisiológica e ao seu potencial de armazenamento, é alterada pelo envelhecimento natural e artificial.

O teor de óleo, associado à composição dos ácidos graxos, leva à maior ou menor suscetibilidade a deterioração das sementes durante o envelhecimento. Quanto maior o conteúdo de ácido graxo oleico e de proteína solúvel, e menor o de ácido graxo linoleico e linolênico, maior é a qualidade fisiológica e o potencial de armazenamento das sementes de

soja.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATAÍDE, G. M.; FLORES, A.V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 71-76, 2012.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392p.

BRACE, L. E. **Tire having tread for low temperature performance and wet traction**. Depositante: The Goodyear Tire & Rubber Company. US 10,364,342 B2. Depósito 22 mar 2017. Concessão: 30 jul 2019.

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, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CASTELLION, M.; MATIACEVICH, S.; BUERAB, P.; MALDONADO, S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. **Food Chemistry**, v. 121, p. 952–958, 2010.

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, 1991.

CHANDEL, R. K.; KHAN, Z.; GANDOTRA, S. Alterations in protein and isozymes profiles during accelerated ageing in soybean (*Glycine max* (l.) merrill). **Journal of Functional and Environmental Botany**, v. 5, n. 1, p. 64-69, 2015.

CLEMENTE, E. T.; CAHOON, E. B. Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1030-1040, 2009.

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

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; TAGLIARI, A.; CHIOMENTO, L. T.; SILVEIRA, D. C.; CHAVARRIA, G. Soybean seed vigor: uniformity and growth as key factors to improve yield. **Agronomy**, v. 10, n. 545, p. 1-15, 2020.

FREITAS R. A.; DIAS, D. C. F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; DIAS, L. A. S.; JOSÉ, I. C. Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds. **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 253-264, 2006.

GHOSAL, K.; BHATTACHARJEE, U.; SARKAR, K. Facile green synthesis of bioresorbable polyester from soybean oil and recycled plastic waste for osteochondral tissue regeneration. **European Polymer Journal**, v. 122, p. 1-16, 2020.

HEATH, R. L; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189–198, 1968.

JHAM, G. N.; TELES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, p. 132-133, 1982.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 1-11, 2001.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C.; TAKAKI, M. Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 137–149, 2001.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, p. 177- 237, 1999.

MCDONALD, M. B.; PHANEENDRANATH, B. R. A modified accelerated aging seed vigor test for soybeans. **Journal of Seed Technology**, v. 3, p. 27-37, 1978.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MATHIAS, V; COELHO, C. M. M; GARCIA, J. Soluble protein as indicative of physiological quality of soybean seeds. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 3, p.730 – 740, 2019.

MEDEIROS, A. D.; 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.

MORELLO, J. R.; MOTILVA, M. J.; TOVAR, M. J.; ROMERO, M. P. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 357-364, 2004.

MU, B.; LIU, L.; LI, W.; YANG, Y. High sorption of reactive dyes onto cotton controlled by chemical potential gradient for reduction of dyeing effluents. **Journal of Environmental Management**, v. 239, p. 271-278, 2019.

NAGEL, M.; BORNER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed**

**Science Research**, v. 20, p. 1-12, 2010.

NAGEL, M.; KRANNER, I.; NEUMANN, K.; ROLLETSCHECK, H.; SEAL, C. E.; COUVILLE, L.; FERNANDEZ-MARÍN, B.; BORNER, A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 1011–1022, 2014.

NAIK, S. M.; MADHUSUDAN, K.; MOTAGI, B. M.; MUGALI, S.; NADAF, H. L. Molecular characterization of seed longevity and associated characters using SSR markers in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 2357-2360, 2019.

NAKAGAWA, J. **Teste de vigor baseados no desempenho das plântulas**. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D. E FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceito e testes**. Abrates, Londrina, p. 2.1-2.6. 1999.

OLIVEIRA, O. D. A.; PIOVESAN, N. D.; JOSÉ, I. C.; BARROS, E. G. A.; DIAS, D. C. F. S.; MOREIRA, M. A. Lipoxigenases e teor de ácido linolênico relacionados à qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 30-35, 2006.

PRIESTLEY, D. A. **Seed aging implications for seed storage and persistence in the soil**. Comstock Publishing Associates, New York, 1986. 245 p.

PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 63, p. 726-729, 1983.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 796-805, 2008.

RAVENEAU, M.; BENAMAR, A.; MACHEREL, D. Water content, adenylate kinase, and mitochondria drive adenylate balance in dehydrating and imbibing seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 13, p. 3501-3512, 2017.

R CORE TEAM., 2020. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 02, agosto. 2020.

SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H. M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, p. 660-674, 2016.

SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, n. 11, p. 627-631, 2013.

SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 250-257, 2019.

SHELAR, V. R.; SHAIKH, R. S.; NIKAM, A. S. Soybean seed quality during storage: a review. **Agricultural Reviews**, v. 29, n. 2, p. 125-131, 2008.

ŠIMIC, B.; SUDARIC, A.; LIOVIC, I.; KALINOVIC, I.; ROZMAN, V.; COSIC, J. Influence of Storage Condition on Seed Oil Content of Maize, Soybean and Sunflower. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 72, n. 3, p. 211-213, 2007.

SINGH, J.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. Factors Affecting Oilseed Quality during Storage with Special Reference to Soybean (*Glycine max*) and Niger (*Guizotia abyssinica*) Seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 10, p. 2215-2226, 2017.

SUH, N. **Plant fat composition for cosmetic preparation**. Depositante: Nam-Su Suh, Seoul (KR). US 9,987,216 B2. Depósito: 22 ago 2017. Concessão: 5 Jun 2018.

SUNG, J. M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 85-89, 1996.

TAMAGNO, S.; AZNAR-MORENO, J. A.; DURRETT, T. P.; PROSAD, P. V. V.; ROTUNDO, J. L.; CIAMPITTI, I. A. Dynamics of oil and fatty acid accumulation during seed development in historical soybean varieties. **Field Crops Research**, v. 248, n. 107719, p. 2020.

TATIĆ, M.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; ĐORĐEVIĆ, NIKOLIĆ, Z.; ĐUKIĆ, V.; VUJAKOVIĆ, M.; CVIJANOVIC, G. Soybean seed viability and changes of fatty acids content as affected by seed aging. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 45, p. 10310-10316, 2012.

TRIPATHI, N.; KHARE, D. Molecular approaches for genetic improvement of seed quality and characterization of genetic diversity in soybean: a critical review. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1645-1654, 2016.

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

VIJAYAKUMAR, H. P.; VIJAYAKUMAR, A.; SRIMATHI, P.; SOMASUNDARAM, G.; PRASAD, S. R.; NATARAJAN, S.; RAJA, K.; DHANDAPANI, R.; VISHWANATH, K. Correlation among physiological and histological changes in soybean seeds during storage. **Journal of Environmental Biology**, v. 40, p. 217-225, 2019.

WANG, H.; YU, S. T.; WANG, C. T.; YU, G. Q.; CUI, X. Y.; YOU, S. L.; GAO, Z. Y.; SHI, P. X.; YU, H. B.; REN, L. Effect of different aging treatments on the vigor of high-oleic acid peanut seeds. **Earth and Environmental Science**, v. 346, p. 1-9, 2019.

YILMAZ, N.; ATMANLI, A.; VIGIL, F. M. Quaternary blends of diesel, biodiesel, higher alcohols and vegetable oil in a compression ignition engine. **Fuel**, v. 212, p. 462-469, 2018.

XIN, X.; TIAN, Q.; YIN, G.; CHEN, X.; ZHANG, J.; NG, S. Reduced mitochondrial and

ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 140-147, 2014.

## 7. ANEXOS

**Tabela 1.** Germinação (G), Envelhecimento Acelerado (EA), Vigor Corrigido (VC), Massa Seca de Plântulas (MSP), Índice de Velocidade de Germinação (IVE) e Condutividade Elétrica (CE) de sementes de cultivares de soja recém-colhidas (inicial) e submetidas ao envelhecimento natural (8 meses) e artificial (96 h EA) <sup>1/</sup>.

Genótipos	G (%)			EA (%)			MSP (mg planta <sup>-1</sup> )			VC			IVE			CE (mS cm <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )		
	Inicial	8 Meses	96 h EA	Inicial	8 Meses	96 h EA	Inicial	8 Meses	96 h EA	Inicial	8 Meses	96 h EA	Inicial	8 Meses	96 EA	Inicial	8 Meses	96 h EA
<b>GEN1</b>	96Aa	92Aa	75Ba	97Aa	82Ba	54Cab	25,86Aa	16,93Ba	12,83Ba	800,12Aa	492,90Ba	331,12Ca	11,50Aa	11,99Aa	7,75Ba	81,76Bab	83,85Bb	119,70Ac
<b>GEN2</b>	92Aa	72Bb	58Cb	86Aab	85Aa	38Bc	20,57Aa	11,26Ba	9,27Bb	773,58Aab	288,96Bbc	218,71Bbc	8,87Abc	9,17Aab	5,45Bbc	94,89Ba	96,13Bab	145,26Aa
<b>GEN3</b>	98Aa	75Bb	69Bab	96Aa	45Bc	54Bab	22,40Aa	11,11Ba	7,54Cb	781,84Aab	244,46Bc	234,29Bbc	9,56Abc	8,24Babc	6,40Cab	64,44Bb	78,28Bb	114,66Ac
<b>GEN4</b>	89Aa	74Bb	70Bab	83Ab	76Aa	62Ba	23,26Aa	11,06Ba	8,89Bb	665,51Ac	363,89Bb	295,77Bab	9,05Ac	9,87Abc	6,09Bab	79,35Bab	95,84ABab	110,11Ac
<b>GEN5</b>	88Aa	60Bc	65Bab	85Aab	57Bb	39Cc	24,44Aa	11,75Ba	8,86Cb	697,59Abc	321,11Bbc	245,35Cabc	9,61Abc	9,71Abc	6,34Bab	73,05Bab	84,19Bb	123,63Abc
<b>GEN6</b>	90Aa	65Bbc	61Bb	82Ab	45Bc	49Bbc	26,37Aa	12,08Ba	8,21Cb	718,20Aabc	278,00Bbc	197,75Cc	10,25Aab	6,88Bc	4,60Cc	96,30Ba	118,02Ba	176,16Aa
<b>CV</b>	7,56%			8,30%			17,35%			9,85%			8,18%			11,05%		

<sup>1/</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, comparando os ambientes (inicial, 8 meses e 96 h EA), e minúscula na coluna, comparando os genótipos em cada ambiente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Teores de proteína total, proteína solúvel, de óleo e de malonaldeído (MDA) em sementes de cultivares de soja recém-colhidas (inicial) e submetidas ao envelhecimento natural (8 meses) e artificial (96 h EA)<sup>1/</sup>.

Genótipo	Proteína Total (%)			Proteína Solúvel (mg g <sup>-1</sup> )			Óleo (%)			Total	MDA (nmol g <sup>-1</sup> MS)		
	Inicial	8 Meses	96 h EA	Inicial	8 Meses	96 h EA	Inicial	8 Meses	96 h EA		Inicial	8 Meses	96 h EA
<b>GEN1</b>	32,43Ab	34,35 Aabc	34,41Aa	22,63Aab	7,39Ba	22,28Aa	16,13	17,34	18,49	17,32abc	39,91Ab	34,02Bab	43,20Aa
<b>GEN2</b>	31,58Ab	33,45Abc	30,43Bbc	25,47Aa	7,39Ba	23,74Aa	16,71	16,78	14,18	15,89c	43,30Aab	38,94Aa	41,77Aa
<b>GEN3</b>	33,62Aab	34,83Aabc	34,14Aa	26,62Aa	11,52Ba	27,87Aa	16,07	16,91	17,78	16,92bc	43,53Aab	35,15Bab	43,60Aa
<b>GEN4</b>	35,70Aa	36,57Aa	34,44Aa	24,39Aa	7,95Ba	23,31Aa	17,07	18,76	18,24	18,03ab	43,51Aab	39,34Aa	42,76Aa
<b>GEN5</b>	33,179Aab	35,87Aab	32,95Aab	27,82Aa	7,07Ba	25,75Aa	17,17	18,20	17,05	17,47abc	47,82Aa	31,56Cb	42,30Ba
<b>GEN6</b>	32,00Ab	32,81Ac	29,14Bc	17,66Ab	12,66Ba	11,52Bb	17,29	20,70	19,02	19,07a	43,59Aab	37,11Bab	39,83ABa
<b>Total</b>							16,73B	18,11A	17,47 AB				
<b>CV (%)</b>		3,35			14,53				8,42				6,72

<sup>1/</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, comparando os ambientes (inicial, 8 meses e 96 h EA), e minúscula na coluna, comparando os genótipos em cada ambiente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Teores de ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico em sementes de cultivares de soja recém-colhidas (inicial) e submetidas ao envelhecimento natural (8 meses) e artificial (96 h EA)<sup>1/</sup>.

Genótipo	Palmítico (%)				Esteárico (%)				Oleico (%)				Linoleico (%)				Linolênico (%)			
	Inicial	8 Meses	96 h EA	Total	Inicial	8 Meses	96 h EA	Total	Inicial	8 Meses	96 h EA	Total	Inicial	8 Meses	96 h EA	Total	Inicial	8 Meses	96 h EA	Total
<b>GEN1</b>	9,55	9,79	9,76	9,69c	4,30	4,47	4,17	4,31a	28,62	29,66	30,33	29,54a	51,17	50,32	53,26	51,58cd	6,37	5,76	5,71	5,95b
<b>GEN2</b>	10,92	11,07	11,03	11,00b	3,72	3,74	3,78	3,75b	22,76	22,89	23,46	23,03b	55,90	55,69	55,07	55,55ab	6,71	6,61	6,67	6,66a
<b>GEN3</b>	9,37	9,58	9,50	9,48c	3,77	3,78	3,68	3,74b	31,93	30,82	31,10	31,28a	49,07	49,91	49,85	49,61d	5,86	5,91	5,87	5,88b
<b>GEN4</b>	11,68	11,80	12,36	11,94a	4,23	4,15	5,13	4,51a	22,59	23,45	25,49	23,84b	54,63	53,94	50,57	53,04bcd	6,86	6,66	6,45	6,65a
<b>GEN5</b>	10,49	10,56	10,58	10,54b	4,06	4,08	4,09	4,07ab	23,39	24,04	23,35	23,59b	55,03	54,79	55,13	54,98abc	7,00	6,52	6,86	6,80a
<b>GEN6</b>	9,77	9,43	9,78	9,65c	4,39	4,51	4,32	4,40a	22,00	22,65	22,08	22,24b	57,35	57,21	57,21	57,26a	6,49	6,20	6,62	6,44ab
<b>Total</b>	10,30 A	10,37A	10,50A		4,07A	4,12A	4,19A		25,22A	25,58A	25,97A		53,86A	53,64A	53,51A		6,55A	6,28A	6,36A	
<b>CV</b>	3,29%				11,03%				6,63%				4,52%				7,04%			

<sup>1/</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, comparando os ambientes (inicial, 8 meses e 96 h EA), e minúscula na coluna, comparando os genótipos em cada ambiente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Capítulo III. Viabilidade da espectroscopia do infravermelho próximo para classificação do vigor de sementes de soja**

#### **RESUMO**

O processo de deterioração das sementes que ocorre com o envelhecimento ocasiona a perda da sua qualidade fisiológica. Visto a importância da utilização de sementes vigorosas e da necessidade da associação de novas técnicas e testes que permitam a distinção de níveis de vigor de sementes de forma rápida e assertiva, a espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) consiste em uma técnica bastante promissora. Desta forma, este trabalho teve por objetivo investigar a viabilidade do NIR, associado a métodos químiométricos, para identificar diferenças nos níveis de qualidade de sementes de soja envelhecidas natural e artificialmente. Foram utilizadas sementes de seis cultivares de soja, sendo analisadas quando recém-colhidas e após serem submetidas ao envelhecimento natural, armazenamento por oito meses; e artificial, envelhecimento à temperatura de 41 °C por 96 horas. Foi determinado o grau de umidade e realizados os testes de germinação, envelhecimento acelerado, crescimento e massa seca de plântulas, índice de velocidade de emergência e condutividade elétrica. Também foram determinados os teores de proteína, óleo e dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. Os espectros NIR foram obtidos das sementes secas e trituradas. Os diferentes tipos de envelhecimentos promovem deterioração em níveis distintos, tendo reflexo no vigor das sementes, que foram categorizadas em alta qualidade (recém-colhidas), qualidade intermediária (as que foram armazenadas) e baixa qualidade (sementes envelhecidas artificialmente). As regiões do espectro eletromagnético entre os comprimentos de ondas de 1000-1200 nm; 1350-1450 nm; 1800-1900 nm e 2300-2400 nm são importantes para distinguir os níveis de qualidade das sementes de soja. O teor de óleo e proteína apresentam relação com a qualidade fisiológica das sementes e os comprimentos de ondas de maior importância para a classificação do vigor das sementes também apresentam relação com esses compostos. A espectroscopia NIR em combinação com métodos químiométricos apresenta potencial para ser utilizada na classificação de sementes de soja quanto ao vigor.

Palavras-chave: NIR. Armazenamento de sementes. Deterioração de sementes. Vigor de sementes. Conteúdo de óleo. Conteúdo de proteína.

### **Chapter III. Feasibility of near infrared spectroscopy to classify vigor of naturally and artificially aged soybean seeds.**

#### **ABSTRACT**

The process of deterioration of the seeds that occurs with aging causes the loss of its physiological quality. Given the importance of using vigorous seeds and the need to associate new techniques and tests that allow the distinction of seed vigor levels in a fast and assertive manner, near infrared spectroscopy (NIR) is a very promising technique. Thus, this work aimed to investigate the viability of the NIR, associated to chemometric methods, to identify differences in the quality levels of naturally and artificially aged soybean seeds. Seeds from six soybean cultivars were used, being analyzed when freshly harvested and after being subjected to natural aging, storage for eight months; and artificial, aging at 41 ° C for 96 hours. The degree of humidity was determined and tests of germination, accelerated aging, growth and dry mass of seedlings, emergence speed index and electrical conductivity were performed. Protein, oil and palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic fat acids contents were also determined. The NIR spectra were obtained from the dried and crushed seeds. The different types of aging cause deterioration at different levels, reflecting on the vigor of the seeds, which were categorized into high quality (freshly harvested), intermediate quality (seeds stored) and low quality (artificially aged seeds). The regions of the electromagnetic spectrum between wavelengths of 1000-1200 nm; 1350-1450 nm; 1800-1900 nm and 2300-2400 nm are important to distinguish the quality levels of soybean seeds. The oil and protein content are related to the physiological quality of the seeds and the wavelengths of greatest importance for the classification of seed vigor are also related to these compounds. NIR spectroscopy in combination with chemometric methods has potential to be used in the classification of soybean seeds for vigor.

**Keywords:** NIR. Seed storage. Seed deterioration. Seed vigor. Oil content. Protein content.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica das sementes é um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso das lavouras de soja no mundo. Sementes de elevada qualidade apresentam bom desempenho em campo, rápida emergência e estabelecimento de plantas, mesmo sob condições ambientais não favoráveis (EBONE et al., 2020). Por outro lado, a utilização de sementes de baixa qualidade geralmente acarreta crescimento inicial lento das plantas, falhas no estande de plantas no campo e baixa tolerância aos estresses bióticos e abióticos (BEWLEY et al., 2013), o que, conseqüentemente, contribui para o aumento do custo de produção e queda de produtividade da cultura.

Visto que o vigor das sementes reduz com o decorrer do tempo e que o plantio de sementes vigorosas é imprescindível, torna-se cada vez mais necessário a elaboração e utilização de diferentes métodos para aferir sob a qualidade das sementes de forma rápida e precisa.

Rotineiramente, a qualidade fisiológica das sementes é avaliada pelos testes de germinação e vigor em laboratório (AMERY et al., 2018). Para soja, os métodos desenvolvidos para detecção do vigor de acordo com as regras da *International Seed Testing Association* (ISTA) incluem o teste de germinação, tetrazólio, envelhecimento acelerado, emergência, índice de velocidade de emergência, condutividade elétrica e os baseados no desempenho de plântulas (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Estes testes permitem identificar lotes de sementes que possuem maior probabilidade de apresentar o desempenho desejado durante o armazenamento e em campo (NAVARRO et al., 2015).

Além destes testes, as propriedades físicas e químicas das sementes também podem ser indicativas do vigor (HAYATI et al., 2020) e a quantificação de compostos pode auxiliar na discriminação da qualidade fisiológica entre lotes de sementes. No entanto, todos estes testes envolvem procedimentos laboriosos, que demandam muito tempo para preparo, execução e análise, necessitam de mão de obra e experiência do analista e nem sempre representam o desempenho das sementes em campo (FAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Desta forma, diante do atual cenário, de maior preocupação das empresas que visam a produção de sementes de alta qualidade e da maior exigência por parte dos agricultores, por sementes de alto vigor, surge a necessidade da inovação nos testes para avaliação da qualidade das sementes. Neste sentido, sugere-se a elaboração de novos testes e/ou utilização de técnicas

e métodos que demande menos tempo e mão de obra e que permita a avaliação da qualidade fisiológica de forma rápida e precisa. Dentro deste contexto, a espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), em combinação com métodos quimiométricos, surge como técnica promissora para estes fins (FAN et al., 2020; MAYRINCH et al., 2020).

A obtenção de espectros NIR é realizada em um instrumento de operação simples, capaz de gerar grande quantidade de informações, com tempo de análise curto e pouca necessidade de mão de obra (LI et al., 2020). A medição é considerada de baixo custo, não necessita utilizar produtos químicos ou reagentes, não gera resíduos poluentes, utiliza-se pequena quantidade de amostras, sem necessitar de pré-processamento, podendo, ainda, consistir em uma análise não destrutiva (LI et al., 2020; MAYRINCK et al., 2020).

A radiação da região eletromagnética NIR (780-2500 nm) é absorvida pela água e compostos orgânicos como carboidratos, proteínas, óleos ou álcoois (AGELET; HURBURGH, 2014). A energia absorvida por uma amostra, calculada a partir da radiação transmitida ou difusamente refletida pode estar relacionada ao conteúdo de compostos (AGELET; HURBURGH, 2014). As informações espectrais obtidas de moléculas orgânicas extraídas de leituras no equipamento NIR, quando associadas a métodos quimiométricos, podem permitir evidenciar diferenças na composição bioquímica das sementes, que podem estar relacionadas com a viabilidade (KUSUMANINGRUM et al., 2018) e vigor (FAN et al., 2020).

Vários trabalhos tem sido publicados comprovando a eficiência da utilização do NIR para averiguar diferenças na qualidade das sementes de milho (AMBROSE et al., 2016), soja (BAZONI et al., 2017; KUSUMANINGRUM et al., 2018; QI et al., 2011), trigo (FAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020), algodão (GAITÁN-JURADO et al., 2008; HUANG et al., 2013; MAYRINCK et al., 2020); espinafre (SHETTY et al., 2012); tomate (SHRESTHA et al., 2016); melancia (YASMIN et al., 2019), dentre outros. No entanto, os estudos sobre a viabilidade do NIR para distinguir níveis de vigor em sementes ainda são incipientes. A comprovação da eficácia desta técnica pode significar um grande avanço em termos de aumentar a eficiência e acurácia no processo de avaliação da qualidade de sementes de soja, o que representa economia de tempo e recursos. Desta forma, este trabalho teve por objetivo analisar a viabilidade da espectroscopia NIR, em combinação a métodos quimiométricos, para identificar diferenças nos níveis de vigor de sementes de soja envelhecidas natural e artificialmente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Sementes e no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas sementes de seis cultivares de soja, os quais foram denominados GEN1, GEN2, GEN3, GEN4, GEN5 e GEN6. As sementes foram analisadas após serem colhidas e, então, submetidas ao envelhecimento natural e artificial.

Para o envelhecimento natural, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel Kraft Multifolha e submetidas ao armazenamento sob condição não refrigerada, em galpão, na cidade de Passo Fundo, RS, Brasil, por oito meses.

Para o envelhecimento artificial, as sementes foram distribuídas sobre bandejas de tela metálica acopladas a caixas tipo *gerbox*, contendo 40 mL de água destilada ao fundo, sendo mantidas sob umidade relativa de 100% a 41 °C, pelo período de 96 horas. Após o envelhecimento, as sementes foram deixadas sobre bancada em ambiente de laboratório para secagem natural até que atingissem a umidade inicial (aproximadamente 12%).

As sementes recém-colhidas, envelhecidas artificialmente e armazenadas por oito meses foram submetidas aos seguintes testes e determinações:

**2.1. Grau de Umidade (U)**- O grau de umidade foi determinado pelo método da estufa, a  $105 \pm 3$  °C, durante 24 h, sendo utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada (BRASIL, 2009).

**2.2. Germinação (G)** - Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram semeadas em papel germitest umedecido com volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em germinador a 25 °C. Foram realizadas avaliações com registro da porcentagem das plântulas normais no 5º e 8º dias após a semeadura (BRASIL, 2009).

**2.3. Envelhecimento Acelerado (EA)** - Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram distribuídas em camada única sobre bandeja de tela metálica acoplada à caixa tipo *gerbox* que continha, ao fundo, 40 ml de água destilada. As caixas foram tampadas, para se obter 100% de UR em seu interior, e mantidas em BOD a 41 °C por 48 horas (MCDONALD; PHANEENDRANATH, 1978). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada no 5º dia após a semeadura.

**2.4. Crescimento de plântulas** - Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes, semeadas equidistantes sobre duas folhas de papel germitest, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco (NAKAGAWA, 1999). As sementes foram colocadas para germinar, em rolos de papéis umedecidos, e mantidas em germinador, a 25 °C, por três dias. As plântulas foram escaneadas e, com o auxílio do Software VigorS<sup>®</sup>, foram mensurados o comprimento de raiz e de parte aérea. Os dados de comprimento, juntamente com os de germinação, foram utilizados para o cálculo de índice Vigor Corrigido (VC) (MEDEIROS; PEREIRA, 2018), obtido por meio do pacote SeedCalc do programa R (SILVA et al., 2019).

**2.5. Massa seca de plântulas (MSP)** - As plântulas utilizadas no teste de crescimento foram utilizadas para a obtenção da massa seca, obtida após a secagem das plântulas em estufa com circulação de ar forçada, a 70 °C por 72 horas.

**2.6. Índice de Velocidade de Emergência (IVE)** - Quatro repetições de 50 sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo 2 litros de areia como substrato. O substrato foi inicialmente umedecido até atingir 80% da capacidade de retenção de água e irrigado diariamente. Foram realizadas contagens diárias do número de plântulas emergidas até o 12º dia após a semeadura. Os dados das contagens foram utilizados para a obtenção do índice de velocidade de emergência, conforme proposto por Maguire (1962).

**2.7. Condutividade Elétrica (CE)** - Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas e colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada, sendo mantidos em BOD a 25 °C, durante 24 horas (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica da solução, utilizando-se condutivímetro.

**2.8. Teor de Óleo** - Foram utilizadas três repetições de 50 sementes cada. As sementes foram liofilizadas e trituradas em moinho de facas, sendo retiradas alíquotas de 0,9 g do pó da semente triturada por amostra. As amostras foram pesadas, em 'filter bags', e secas em estufa a 105 °C por 3 horas. Após este procedimento, as amostras foram novamente pesadas e colocadas no extrator Ankom<sup>®</sup> XT15, onde foi executada a extração do óleo por 50 min a 90 °C, utilizando-se éter de petróleo como extrator (AOCS, 2009). Após a extração, as amostras foram removidas do extrator e secas em estufa a 105 °C por 30 minutos. O teor de óleo foi calculado com base na diferença de pesos entre as amostras antes e após a extração conforme metodologia AM 5-04 da AOCS (AOCS, 2009).

**2.9. Conteúdo de Proteína Solúvel** – Foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes

cada. As sementes foram embebidas por 16 horas. Os tegumentos foram retirados e os embriões das sementes liofilizados e moídos em moinho de bolas para obtenção de pó fino. Uma subamostra de 100 mg do material moído foi utilizada para cada uma das repetições de cada tratamento. A determinação do teor de proteína solúvel foi realizada conforme a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

**2.10. Teor de Ácidos Graxos** – O teor dos ácidos graxos esteárico, palmítico, oleico, linoleico e linolênico na fração de óleo da soja foi determinado por cromatografia gasosa. Foram utilizadas 10 sementes por tratamento, sendo realizadas três repetições por tratamento. As sementes foram liofilizadas e trituradas em moinho de facas, sendo 150 mg do material moído utilizado por amostra. As amostras foram colocadas em microtubos, onde foram adicionados 1 mL de hexano, e mantidas a 4 °C por 16 h. Após esse período, a fração lipídica foi vertida em tubos e o solvente foi evaporado por borbulhamento de N<sub>2</sub>. Para obtenção de ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por Jham et al. (1982). Após o preparo das amostras, alíquotas foram injetadas em cromatógrafo a gás CG-17A, equipado com amostrador automático (Shimadzu, modelo AOC-17) e integrador (Shimadzu, modelo C-R7A). A coluna capilar Carbowax (30m x 0,32mm) foi mantida a 225 °C, com temperatura do injetor e detector sendo 245 °C e 280 °C, respectivamente. O gás nitrogênio foi utilizado como portador, na vazão de 1,1 mL min<sup>-1</sup>.

**2.11. Espectroscopia do infravermelho próximo (NIR)** - Foram utilizadas três repetições de 50 sementes cada. As sementes foram liofilizadas e trituradas em moinho de facas, sendo retirada uma alíquota de 10 g do pó da semente triturada por amostra. Três espectros foram coletados por amostra. Cada espectro foi obtido de 32 *scans* na faixa entre 10.000 - 4000 cm<sup>-1</sup> (1.000 – 2.500 nm), com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Realizou-se a média e foi obtido um único espectro para cada amostra. As leituras foram realizadas no espectrômetro Thermo Scientific, modelo Antaris II, em modo de reflectância (R) e os resultados foram expressos em log (1/R).

**2.12. Análise estatística** – O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo utilizados seis cultivares e três tratamentos de envelhecimento: sementes não envelhecidas (recém-colhidas), sementes envelhecidas naturalmente (armazenadas durante oito meses), e sementes envelhecidas artificialmente (em BOD, a 41 °C e 100% UR, por 96 horas), totalizando 18 tratamentos e três repetições cada. Os tratamentos foram separados em classes, sendo, portanto, investigados apenas os efeitos dos

envelhecimentos sobre o desempenho fisiológico das sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Para verificar a relação dos envelhecimentos e das variáveis fisiológicas e bioquímicas conjuntamente, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) (JOLLIFFE; CADIMA, 2016).

Os espectros NIR foram classificados de acordo com o desempenho fisiológico das sementes como de alto, intermediário e baixo vigor. Com os espectros, inicialmente, foi realizada uma análise exploratória, plotando-se gráficos dos espectros originais por tratamento, da média dos espectros por classe, seguido da PCA (JOLLIFFE; CADIMA, 2016), utilizando-se os espectros originais. Posteriormente, os dados foram submetidos aos métodos quimiométricos de pré-tratamentos e construção de modelos de classificação. Foram utilizados os pré-tratamentos: autoescalar, correção do espalhamento multiplicativo (MSC), variação normal padrão (SNV), e 1° e 2° derivada pelo método Savitzky-Golay, utilizando-se janela de 13 variáveis (SAVITZKY; GOLAY, 1964). O número de variáveis latentes (VL) foi determinado por validação cruzada aleatória com dez divisões. Para cada combinação de pré-tratamento, foi gerado um modelo de classificação por meio da PLS-DA (BARKER; RAYENS, 2003), utilizando-se 90% dos dados para treinamento e 10% para validação cruzada. A predição de um modelo PLS-DA é um valor nominal de zero ou um. Valores próximos de zero e um indicam que a amostra não está (0) ou está (1) na classe modelada. O desempenho dos modelos foi avaliado pela acurácia, sensibilidade e especificidade para o treinamento e validação cruzada. A acurácia indica uma performance geral do modelo. Dentre todas as classificações, quantas o modelo classificou corretamente (BARKER; RAYENS, 2003). Sensibilidade é o número de amostras previstas para pertencer à classe dividido pelo número de amostras que pertencem à classe. A especificidade é o número de amostras que se prevê não estarem na classe dividido pelo número real que não estão na classe. A acurácia, sensibilidade e especificidade foram calculados de acordo com as Equações (1), (2), (3), respectivamente.

$$(1) \text{ Acurácia} = \frac{VP+VN}{VP+VN+FP+FN} \quad (2) \text{ Sensibilidade} = \frac{VP}{VP+FN} \quad (3) \text{ Especificidade} = \frac{VN}{VN+FP}$$

Onde, VP é verdadeiro positivo, VN é verdadeiro negativo, FN é falso negativo e FP é falso positivo. VP é o número de amostras que pertencem à classe i, classificadas como pertencentes à classe i. VN é o número de amostras que não pertencem à classe i, classificadas como não

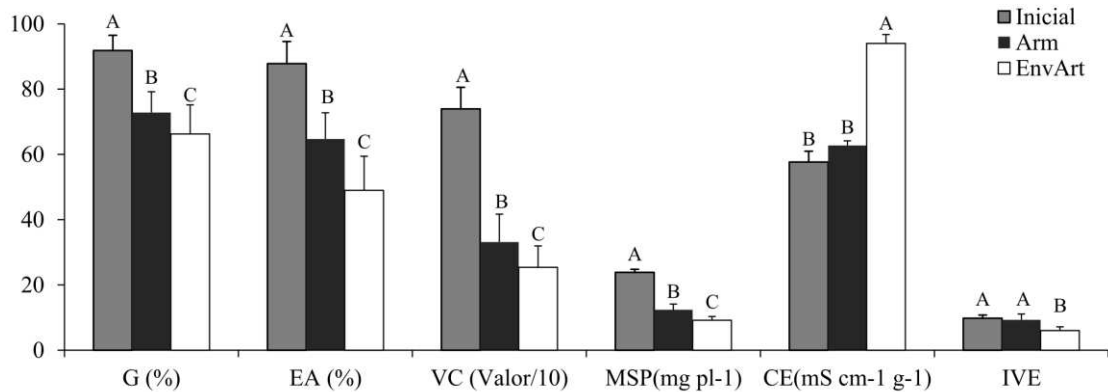
pertencentes à classe  $i$ . FN é o número de amostras pertencentes à classe  $i$ , não classificadas como pertencentes à classe  $i$ . FP é o número de amostras que não pertencem à classe  $i$ , classificadas como pertencentes à classe  $i$  (BARKER; RAYENS, 2003).

Para a construção de modelos de classificação via PLS-DA, foi utilizado todo o espectro NIR, abrangendo a região entre 1000 - 2500 nm. Foram também identificadas as faixas de comprimento de onda que representaram importância acima de 50% para cada classe e os 20 comprimentos de onda mais importantes para o modelo de classificação que apresentou melhor resultado. A importância de variável (varImp) foi obtida por meio do pacote *caret* do software R 4.0.2 (R Core Team, 2020), sendo baseada em somas ponderadas dos coeficientes de regressão absoluta. Os pesos foram calculados em função da redução das somas dos quadrados ao longo do número de componentes PLS e foram calculados separadamente para cada resultado.

As análises dos dados foram realizadas por meio do software R 4.0.2 (R Core Team, 2020), com o auxílio dos pacotes *caret*, *signal*, *prospectr*, *nira* e *patchwork*.

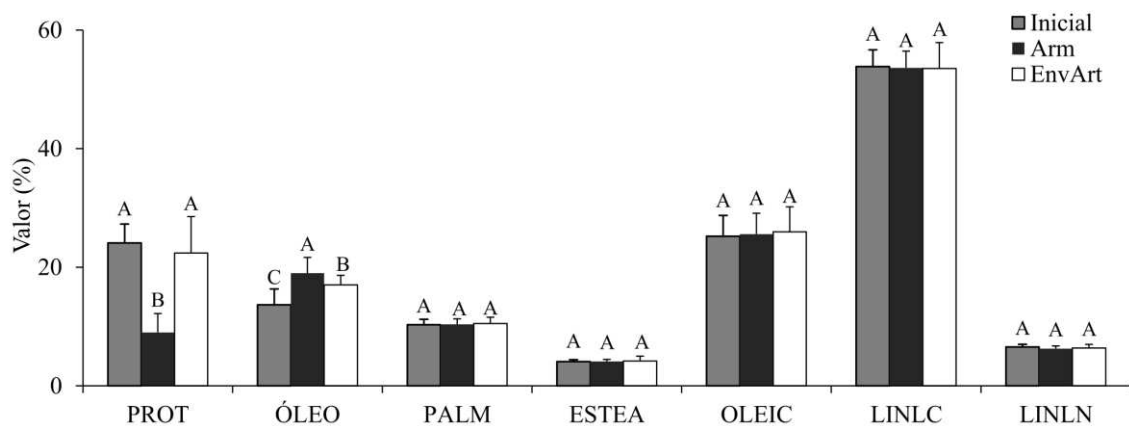
### 3. RESULTADOS

O grau de umidade de todas as sementes foi de aproximadamente 12 % antes da execução dos testes. As sementes recém-colhidas (inicial) apresentaram a maior qualidade fisiológica em relação aos demais tratamentos, com maior porcentagem de germinação (G) e de plântulas normais após o teste de envelhecimento acelerado (EA), maior índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântulas (MSP), vigor corrigido (VC) e menor condutividade elétrica (CE). Por outro lado, as sementes envelhecidas artificialmente (envArt) apresentaram o menor desempenho fisiológico, com menores valores de G, EA, MSP, VC, IVE e maior CE. As sementes que foram mantidas sob armazenamento natural (arm) apresentaram desempenho intermediário (Figura 1). Assim, as sementes foram classificadas em de alto vigor (recém-colhidas), vigor intermediário (armazenadas) e de baixo vigor (envelhecidas artificialmente).



**Figura 1.** Germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), vigor corrigido (VC), massa seca de plântulas (MSP), condutividade elétrica (CE) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de soja recém-colhidas (inicial), armazenadas por oito meses (arm) e envelhecidas artificialmente à 41 °C por 96 horas (envArt).

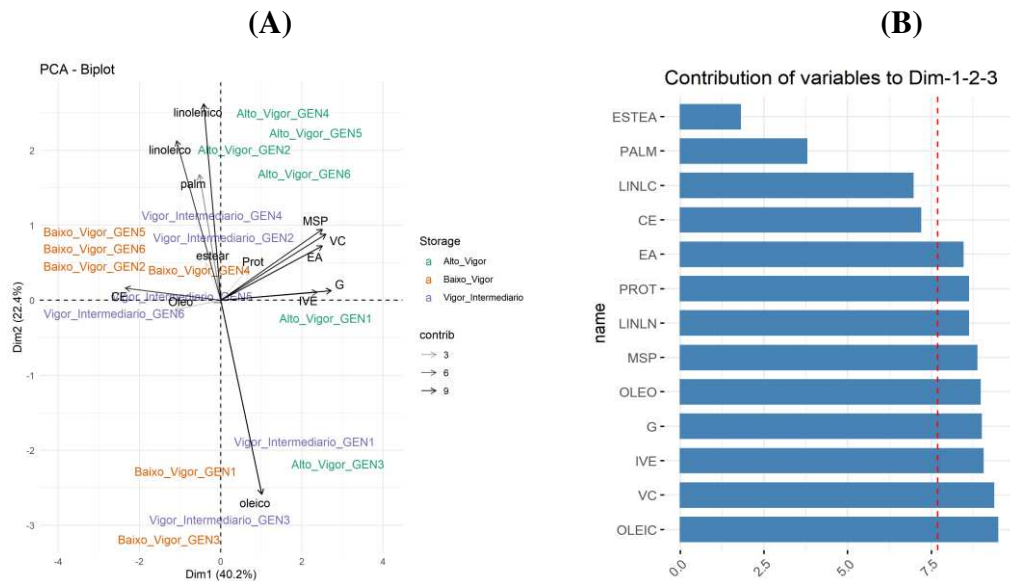
O conteúdo de proteína solúvel (PROT) foi menor nas sementes armazenadas, não diferindo entre as sementes recém-colhidas e envelhecidas artificialmente. No entanto, o teor de óleo foi maior nas sementes armazenadas e envelhecidas artificialmente. Não houve diferença significativa no conteúdo dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico entre as sementes com diferentes níveis de vigor (Figura 2).



**Figura 2.** Teores de Proteína (PROT), óleo e ácidos graxos palmítico (PALM), esteárico (ESTEA), oleico (OLEIC), linoleico (LINLC) e linolênico (LINLN) em sementes soja recém-colhidas (inicial), armazenadas por oito meses (arm) e envelhecidas artificialmente à 41 °C por 96 horas (envArt).

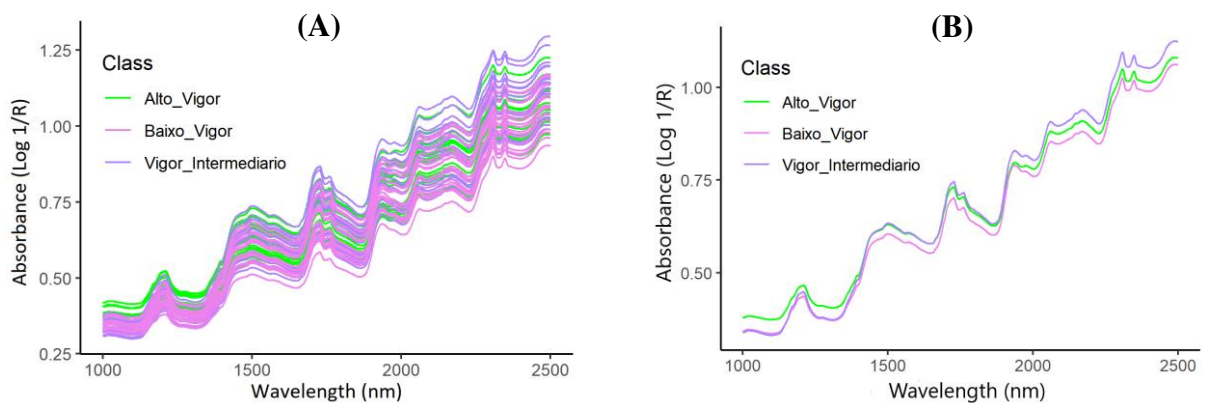
Na análise conjunta dos dados fisiológicos e bioquímicos (Figura 3), cerca de 79% da variação total dos dados pôde ser explicada pelos três primeiros componentes principais. Nesta análise, as variáveis mais importantes para distinguir os tratamentos foram o conteúdo de ácido graxo oleico, vigor corrigido, índice de velocidade de emergência, germinação, teor de óleo, massa seca de plântulas, teor de ácido linolênico, conteúdo de proteína e envelhecimento acelerado, respectivamente (Figura 3).

Foi possível evidenciar separação entre as sementes recém-colhidas (ficaram mais concentradas do lado direito), das que foram envelhecidas artificial e naturalmente (lado esquerdo). No entanto, não houve grande distinção entre as sementes que foram armazenadas das que foram envelhecidas artificialmente, quando analisados o vigor e os resultados das análises bioquímicas conjuntamente (Figura 3).



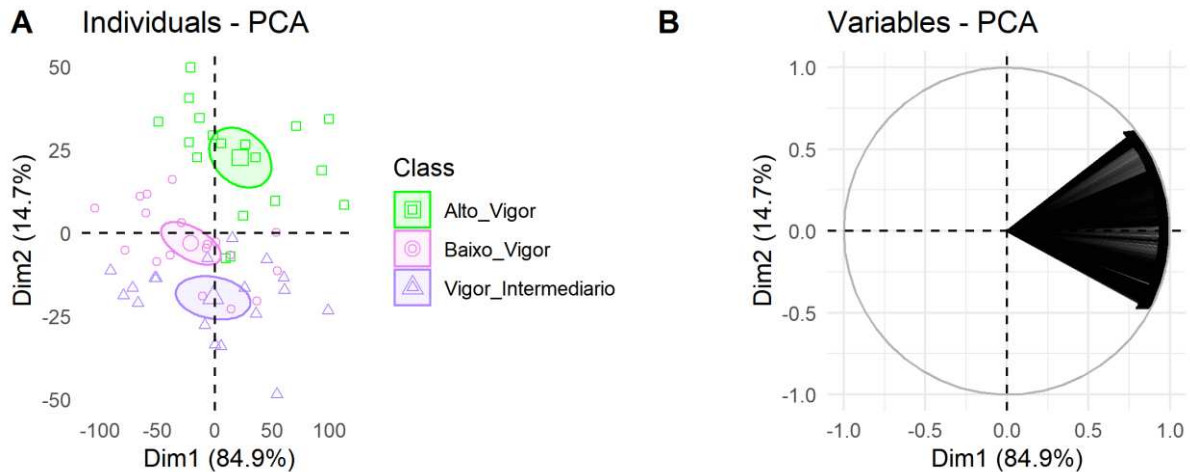
**Figura 3.** Biplot da análise de componentes principais (PCA) (A) e contribuição das variáveis fisiológicas e bioquímicas (B) para distinção entre os tratamentos. Oleic = ácido oleico; VC = vigor corrigido; IVE= índice de velocidade de emergência; G= germinação; MSP = massa seca de plântulas; LINLN = ácido linolênico; PROT = proteína; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; LINLC = ácido linoleico; PALM = ácido palmítico; ESTEA = ácido esteárico.

Por meio dos espectros NIR, foi possível evidenciar diferenças entre os três níveis de qualidade fisiológica das sementes em função dos tipos de envelhecimentos (Figura 4).



**Figura 4.** Espectros originais (A) e médias dos dados espectrais por classe (B). Em roxo, sementes recém-colhidas (alto vigor); em verde, sementes armazenadas por oito meses (vigor intermediário); e, em rosa, sementes envelhecidas artificialmente à 41°C por 96 horas (baixo vigor).

Mais de 99% da variação dos dados espectrais pôde ser explicada pelos dois primeiros componentes na análise de PCA utilizando-se os espectros originais, que evidenciou a distinção entre os níveis de vigor das sementes (Figura 5).



**Figura 5.** Análise de componentes principais (PCA). (A) Scores e (B) Loadings da PCA dos dados espectrais originais de sementes de soja de alto vigor (recém-colhidas), vigor intermediário (armazenadas por oito meses) e baixo vigor (envelhecidas artificialmente à 41°C por 96 horas). Os scores se referem ao agrupamento das amostras e os loadings das variáveis.

Os espectros foram submetidos a diferentes tipos de pré-tratamentos e por meio do método PLS-DA foram obtidos modelos de classificação dos três níveis de qualidade fisiológica das sementes: alto vigor (recém-colhidas), vigor intermediário (sementes armazenadas) e baixo vigor (sementes envelhecidas artificialmente) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de variáveis latentes (VL) que maximiza o modelo, acucária, sensibilidade (Sn) e especificidade (Sp) para o conjunto de dados de treinamento e validação cruzada dos modelos de classificação gerados por meio da análise PLS-DA com diferentes tipos de pré-tratamentos.

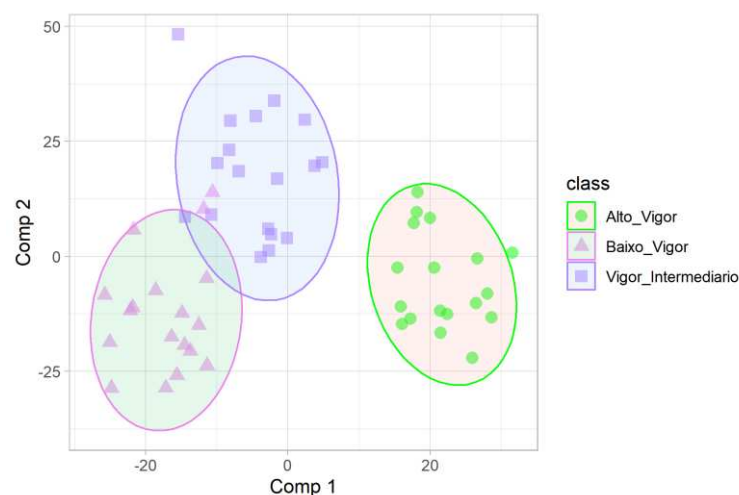
Pré-tratamentos	Treinamento				Validação Cruzada		
	VL	Acucária	Sn	Sp	Acucária	Sn	Sp
Espectro original	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9815	0,9833	0,9908
Sc	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9831	0,9850	0,9916
MSC	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9291	0,9333	0,9652
SNV	9	0,9814	0,9814	0,9907	0,9271	0,9316	0,9641
<b>1° Der. SG</b>	<b>8</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>
2° Der. SG	5	1,0000	1,0000	1,0000	0,9896	0,9900	0,9950
MSC + Sc	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9358	0,9416	0,9683
SNV + Sc	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9251	0,9300	0,9627
1° Der SG + Sc	8	1,0000	1,0000	1,0000	0,9866	0,9883	0,9936

<b>2° Der SG + Sc</b>	<b>5</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	<b>0,9903</b>	<b>0,9916</b>	<b>0,9950</b>
1° Der. SG + MSC	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9711	0,9733	0,9861
2° Der. SG + MSC	8	1,0000	1,0000	1,0000	0,8765	0,8766	0,9366
1° Der. SG + SNV	10	1,0000	1,0000	1,0000	0,9691	0,9716	0,9850
2° Der. SG + SNV	8	1,0000	1,0000	1,0000	0,8745	0,8800	0,9383

Sc = Autoescalar; Der. SG = Derivada de Savitzky-Golay; MSC = Multiplicative Scatter Correction (correção do espalhamento multiplicativo); SNV = Standard Normal Variate (variação normal padrão).

Todos os modelos apresentaram alta acurácia, sensibilidade e especificidade (Tabela 1). O modelo classificatório obtido por meio dos espectros originais, sem qualquer tipo de pré-tratamento de dados, demonstrou alta acurácia (0,98), sensibilidade (0,98) e especificidade (0,99). Após a aplicação dos pré-tratamentos 1ª derivada de SG e 2ª derivada de SG, seguida do procedimento de autoescalar, as métricas dos modelos de classificação apresentaram incremento, com valores de acurácia, sensibilidade e especificidade iguais ou muito próximos a 1, tanto no treinamento quanto na validação cruzada, utilizando-se menor número de variáveis latentes (8 e 5, respectivamente) (Tabela 1).

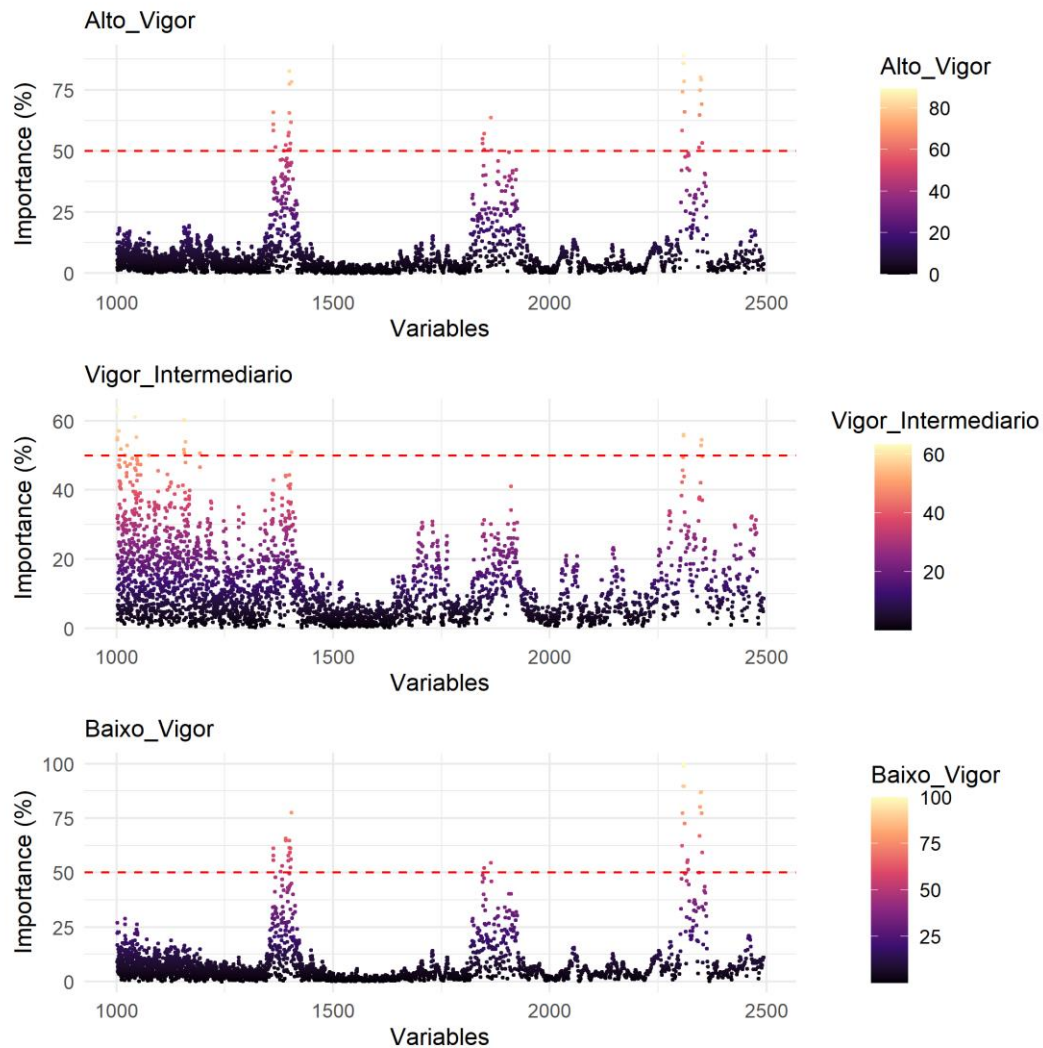
Considerando o modelo em que foram utilizados os pré-tratamentos 2ª derivada de SG seguida de autoescalar os dados pela variância, foi possível observar clara separação das classes visualizadas no gráfico de scores da PLS-DA (Figura 6). Com base neste modelo de classificação foram construídos, ainda, gráficos da importância das variáveis para cada classe (Figura 7) e identificados os comprimentos de onda de maior importância (Figura 8).



**Figura 6.** Scores da PLS-DA dos dados espectrais, de sementes de soja de alto vigor (recém-colhidas), vigor intermediário (armazenadas por oito meses) e baixo vigor (envelhecidas artificialmente à 41°C por 96 horas).

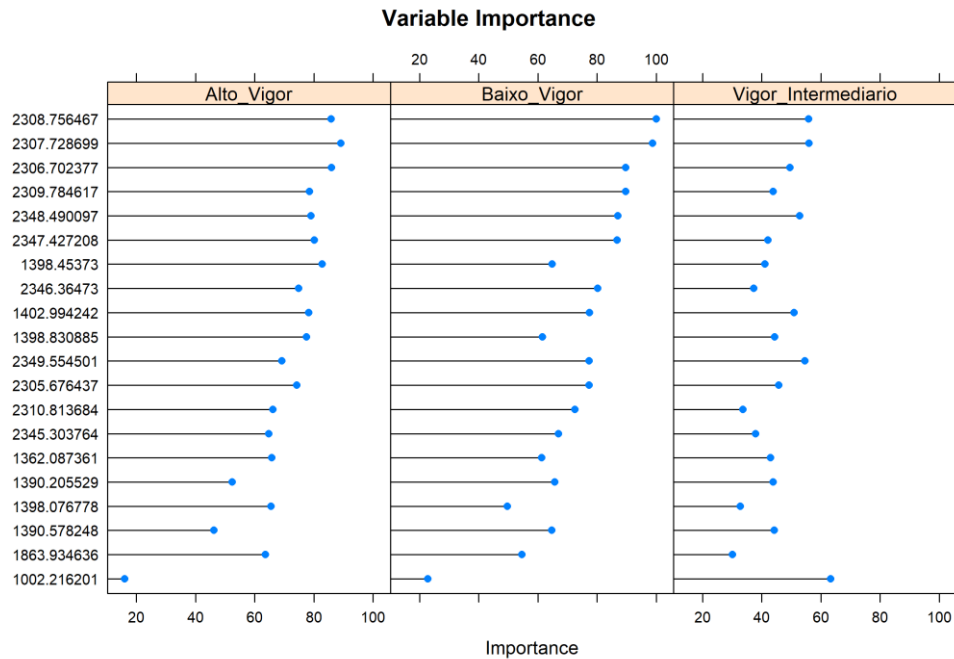
Considerando as variáveis que apresentaram contribuição acima de 50% para a distinção

das classes, nota-se que os comprimentos de onda na região entre 1350-1450, 1800-1900 e 2300-2400 nm foram importantes para a classificação das sementes de alto vigor. Para as sementes com vigor intermediário, as regiões mais importantes compreenderam os comprimentos de ondas entre 1000-1200; 1350-1450 e 2300-2400 nm. Já para as sementes de baixo vigor, as regiões do espectro de maior importância situaram-se entre 1350-1450; 1800-1900 e 2300 a 2400 nm.



**Figura 7.** Importância das variáveis de comprimento de ondas para classificação via PLS-DA dos níveis de vigor de sementes de soja envelhecidas natural e artificialmente. Sementes de alto vigor (recém-colhidas), vigor intermediário (armazenadas por 8 meses) e baixo vigor (envelhecidas artificialmente à 41 °C por 96 horas).

Os 20 comprimentos de ondas mais significativos para a construção do modelo PLS-DA para classificação das sementes quando ao nível de vigor compreenderam os comprimentos de 1002 nm, 1362 nm, 1390 nm, 1398 nm, 1402 nm, 1863 nm e às faixas entre 2305-2310 e 2345-2349 nm (Figura 8).



**Figura 8.** Variáveis de maior importância para classificação via PLS-DA dos níveis de vigor de sementes de soja envelhecidas natural e artificialmente. Sementes de alto vigor (recém-colhidas), vigor intermediário (armazenadas por 8 meses) e baixo vigor (envelhecidas artificialmente à 41 °C por 96 horas).

#### 4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, sementes de seis genótipos foram analisadas recém-colhidas e após serem submetidas ao envelhecimento natural, armazenamento durante oito meses, e artificial, em que foram expostas à temperatura de 41 °C por 96 horas. Observamos que os diferentes tipos de envelhecimentos promovidos às sementes tiveram reflexo na sua qualidade fisiológica.

Os testes de vigor demonstraram que as sementes recém-colhidas apresentaram o maior potencial fisiológico, seguido das sementes que foram armazenadas e das envelhecidas artificialmente. A maior qualidade fisiológica das sementes é atingida no ponto de maturidade fisiológica. A partir deste momento, inicia-se o processo de deterioração das sementes (BEWLEY et al., 2013), o que justifica a redução na qualidade fisiológica com o processo de envelhecimento, tanto natural quanto artificial (Figura 1).

Quando os dados de vigor e de composição bioquímica das sementes foram analisados conjuntamente (Figura 3), não foi possível evidenciar nítida diferença entre as sementes envelhecidas natural e artificialmente. No entanto, houve clara distinção entre as sementes envelhecidas das não envelhecidas. As sementes recém-colhidas, apresentaram o maior vigor e

conteúdo de proteína solúvel, enquanto as sementes envelhecidas apresentaram maior condutividade elétrica e teor de óleo e menor desempenho fisiológico (Figura 1 e 2).

Estes resultados mostram a relação positiva entre o conteúdo de proteína solúvel e o vigor das sementes e entre o maior teor de óleo e de condutividade elétrica e o envelhecimento das envelhecidas. Gao et al. (2015) também evidenciaram essa mesma relação positiva de óleo e negativa da proteína com o envelhecimento de sementes de soja. Castellion et al. (2010) e Mathias et al. (2019) ressaltam que o conteúdo de proteína solúvel pode ser utilizado como indicador positivo de qualidade de sementes. Por outro lado, o alto teor de óleo e de ácidos graxos poli-insaturados levam à maior propensão à peroxidação não enzimática e enzimática, o que resulta em rápido declínio da qualidade das sementes (SINGH et al., 2017). A peroxidação dos lipídeos de membrana é apontada como o principal mecanismo de deterioração das sementes oleaginosas e, tem como consequência o aumento da condutividade elétrica, conforme pôde ser observado para as sementes envelhecidas deste trabalho (Figura 1).

Os espectros NIR obtidos das sementes evidenciaram clara distinção entre os níveis de qualidade das sementes (figura 4). Ainda na análise exploratória e mesmo sem qualquer tipo de pré-tratamento, a PCA utilizando-se os espectros originais permitiu evidenciar a distinção entre as três classes de qualidade das sementes, que representou mais de 99% da variação total dos dados com os dois primeiros componentes (Figura 5). Notamos que a análise de PCA dos dados espectrais originais permitiu melhor diferenciação dos tipos de envelhecimento, que a PCA dos dados fisiológicos e bioquímicos, que demonstrou a separação de apenas duas classes, envelhecidas e não envelhecidas (Figura 3 e 4). Isso se deve possivelmente ao fato de termos quantificado apenas os teores de proteína, óleo e suas frações, e de a variação no teor de óleo e de ácidos graxos terem sido pequenas entre as sementes envelhecidas natural e artificialmente (Figura 2).

No entanto, a radiação da região eletromagnética do infravermelho próximo pode ser absorvida por diversos outros compostos contidos nas sementes, como carboidratos (GUO et al., 2011), açúcares solúveis (GUO et al., 2011), celulose, hemicelulose, lignina (HUANG; YU, 2019), dentre outros, além do óleo e proteína (AGELET; HURBURGH, 2014; GUO et al., 2011). Assim, os espectros NIR podem conter valiosas informações qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos das sementes, e permitir maior sensibilidade para detecção de diferenças entre amostras, em relação a outras metodologias tradicionais de quantificação de compostos isolados (VENKATESAN et al., 2020).

Embora a calibração do modelo de classificação tenha sido satisfatória com os dados dos espectros originais, evidenciamos que o pré-tratamento dos dados espectrais pela segunda derivada de Savitzky-Golay, seguida da aplicação da autoescala pelo desvio padrão, promoveu melhor desempenho na calibração e validação cruzada do modelo (Tabela 1). Portanto, estes pré-tratamentos foram aplicados aos espectros originais previamente à construção do modelo de classificação e para a posterior identificação dos comprimentos de onda de maior importância. É comum a aplicação de pré-tratamentos aos dados espectrais, a fim de minimizar o efeito dos ruídos instrumentais e melhorar a eficiência dos modelos de calibração (RINAN et al., 2009). Os modelos de classificação PLS-DA demonstraram altos valores de acurácia, sensibilidade e especificidade (Tabela 1), o que evidencia a viabilidade do NIR, juntamente com a aplicação de métodos quimiométricos, para a classificação das sementes quanto ao nível de vigor. A PLS-DA é uma técnica bastante utilizada para a construção de modelos classificatórios, permitindo a separação entre grupos de observações, de modo que a separação máxima entre as classes seja obtida (BRERETON; LLOYD, 2014). Tem sido muito utilizada em classificação de dados de alta dimensionalidade e com variáveis altamente correlacionadas, como os dados espectrais obtidos do NIR (BRERETON; LLOYD, 2014). Para predição da qualidade de sementes, é descrito como o método mais eficiente (VENKATESAN et al., 2020).

Por meio da PLS-DA é possível, ainda, realizar a identificação e/ou seleção discriminativa de variáveis (BRERETON; LLOYD, 2014). Nossos resultados evidenciaram que as regiões do espectro mais importantes para a classificação do nível de vigor das sementes, via PLS-DA, foram as faixas de comprimentos de ondas entre 1350-1450 nm, 1800-1900 nm e 2300-2400 nm para as sementes de alto vigor; 1000-1200 nm, 1350-1450 nm e 2300-2400 nm, para as de vigor intermediário; e 1350-1450 nm; 1800-1900 nm e 2300-2400 nm para as de baixo vigor (Figura 7).

Notamos que as regiões do espectro que abrangem os comprimentos de onda de 1350-1450 nm e 2300-2400 nm foram coincidentemente importantes para a classificação de todas as três classes (Figura 7). A região entre 1350 -1430 nm é representada por combinações de bandas características de C-H da molécula de  $\text{CH}_2$ , sendo os picos de 1392 nm e 1414 nm correspondentes a bandas de combinação da vibração de C-H, associada à lipídeos (HOURANT et al., 2000). Ainda, a região de 1330-1392 nm também representa bandas refletindo lipídeos (MUKASA et al., 2019). Gislum et al. (2018) descrevem os picos de 1379, 1400 e 1424 nm com alta correlação ao conteúdo de óleo em sementes. Por outro lado, Xu et al. (2020) também

descreve a região de 1325-1500 nm com picos de alta absorção de moléculas associadas a proteína. Os comprimentos de ondas de 1390 e 1440 nm, corresponde ao segundo sobretom de estiramento de C-H, e o de 1420 nm ao segundo sobretom do estiramento de O-H. Além disso, os comprimentos de 1365 nm, 1375 nm e 1400 nm, são descritos como importantes para diferenciar conteúdo de proteína solúvel em sementes.

Nossos resultados evidenciaram diferenças nos teores de óleo e proteína solúvel entre os diferentes níveis de vigor das sementes (Figura 2), e é sabido que com o processo de envelhecimento ocorre alterações nesses compostos (Bewley et al., 2013). Assim, os comprimentos de onda destacados como os de maior importância para distinção dos níveis de vigor das sementes evidenciam as alterações nesses compostos.

A região do espectro eletromagnético correspondente à faixa de comprimento de ondas de 2230-2500 nm é característica da combinação do estiramento e de outros modos de vibração de C-H (HOURANT et al., 2000). Na região entre 2280-2330 nm existem combinações de bandas de estiramento de C-H e de deformação de CH<sub>2</sub> que podem estar relacionadas a carboidratos, açúcares e celulose (WORKMAN; WEYER, 2007) e bandas de combinação de O-H e de alongamento de C-O, associadas a polímeros (KUSUMANINGRUM, et al, 2018). Bandas de combinação de estiramento e de deformação de C-H também estão associadas a grupos peptídicos associados a proteínas na região entre 2270-2532 nm (WORKMAN; WEYER, 2007). A região de 2240-2470 é caracterizada por bandas de combinação de C-H de moléculas de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> associadas a óleo e ácidos graxos (MUKASA et al., 2019; HOURANT et al., 2000). Ainda, os picos de absorção em 1450, 1940 e 2300 nm foram descritos como importantes para evidenciar mudanças físico-químicas em sementes armazenadas de soja (BAZONI et al., 2017).

Assim, apesar de não ter sido quantificado no presente trabalho os teores dos diferentes carboidratos nas sementes, com o envelhecimento, tanto natural quanto artificial, ocorrem alterações nesses compostos (BEWLEY et al., 2013). Durante o armazenamento, os açúcares, principalmente os açúcares redutores reagem com proteínas e, conseqüentemente, inativa enzimas vitais para o metabolismo das sementes (CASTELLIÓN et al., 2010), o que está ligado à redução dos níveis de proteínas solúveis observados nas sementes armazenadas no presente trabalho (Figura 2) e às alterações nos espectros do NIR, que evidenciaram esse processo.

Considerando apenas a classificação das sementes recém-colhidas e envelhecidas artificialmente, a faixa de 1800-1900 nm também teve relativa importância (Figura 7). A região

entre 1880-1930 nm está associada a bandas de combinação de vibração de O-H (HOURANT et al., 2000). Há também combinação de vibração de estiramento de O-H e do terceiro sobretom de C-O associado à celulose com absorção em 1820 nm (WORKMAN; WEYER, 2007). O pico de absorção em 1860 nm é relatado pela combinação de estiramento assimétrico do N-H com amida II, relacionado a proteínas (KUSUMANINGRUM et al., 2017). A região entre 1850-2050 nm tem pouca informação sobre óleo e gorduras (HOURANT et al., 2000).

Para a classe de sementes armazenadas, a região entre os comprimentos de onda de 1000-1200 nm teve destaque (Figura 7). Os picos de 972 e 1009 nm correspondem ao terceiro sobretom de O-H associado a sacarídeos (WORKMAN; WEYER, 2007). A faixa entre 1090-1180 nm corresponde ao segundo sobretom de C-H da molécula de CH<sub>2</sub>; entre 1100-1200 nm ao segundo sobretom de C-H do CH<sub>3</sub>, e de 1150-1260 nm ao segundo sobretom de C-H do CH=CH (HOURANT et al., 2000). Os comprimentos de onda de 1145 e 1190 nm foram descritos como comprimentos associados à absorção de moléculas de proteína (ARMSTRONG et al., 2006). Xu et al. (2020) descrevem a absorção no comprimento de onda 990 nm devido ao terceiro sobretom de estiramento de O-H; 1020 nm como o segundo sobretom de estiramento de NH; 1130 e 1165 nm com associação ao terceiro sobretom de estiramento de NH, sendo os comprimentos de onda de 980 nm, 1180 nm, 1190 nm, 1230 nm e 1235 nm como importantes para distinguir o conteúdo de proteína solúvel em sementes de soja. Além disso, o pico em 1210 nm e bandas próximas a 1180 nm foram descritos com associação ao segundo sobretom do C-H, relatados com ácidos graxos (HOURANT et al., 2000). Ainda, óleos ricos em ácidos graxos mono ou poli-insaturados apresentam maior absorção na região do comprimento de onda de 1164 nm do que gorduras ricas em ácidos graxos saturados (HOURANT et al., 2000).

Os 20 comprimentos de ondas mais importantes para a construção do modelo PLS-DA para classificação dos níveis de vigor das sementes determinados pelos tipos de envelhecimentos compreendem os comprimentos de 1002 nm, 1362 nm, 1390nm, 1398 nm, 1402 nm, 1863 nm e as faixas entre 2305-2310 e 2345-2349 nm (Figura 8). Um pico de absorção em 1002 nm está associado à sacarose amorfa (OZAKI et al., 2006). A faixa de comprimento de onda entre 1362-1480 nm é considerada uma das faixas mais importantes para calibração de modelos de ácidos graxos monossaturados, poliinsaturados e saturados (OZAKI et al., 2006). A absorção no comprimento de 1390 nm é descrita para lipídeos (AMERY et al., 2018) e esse mesmo comprimento de onda relacionado a proteínas (XU et al., 2020). A absorção em 1400 e 1403 nm foram relatadas como importantes para diferenciar a viabilidade em sementes de

mamona (GISLUM et al., 2018) e de trigo (FAN et al., 2020), respectivamente. O pico de absorção em 1396 nm foi um dos comprimentos de ondas mais importantes para o modelo de predição do conteúdo de proteína em soja (ARMSTRONG et al., 2006). A absorção em 1860 nm foi descrita para moléculas associadas a proteínas (KUSUMANINGRUM et al., 2018). A região dos comprimentos de ondas em torno de 2300 foi importante para avaliação de mudanças físico-químicas em soja armazenada (BAZONI et al., 2017). A faixa entre 2308–2348 nm está associada a lipídios e os comprimentos de onda de 2308 e 2346 nm representam bandas de importante absorção para óleo (OZAKI et al., 2006), sendo que o pico de absorção em 2308 nm pode ser usado para diferenciar ácidos graxos monoinsaturados de poliinsaturados (HOURANT et al., 2000). Já os picos em 2306 e 2346 nm foram descritos como importantes para distinguir óleo de soja de demais tipos de óleo (OZAKI et al., 2006). O comprimento de onda de 2345 nm foi também relacionado a lipídeos e importante para diferenciar a viabilidade de sementes de melancia (LOHUMI et al., 2013).

Assim, as alterações observadas nos espectros das sementes envelhecidas natural e artificialmente refletiram as alterações nos lipídios e proteínas nas sementes, sendo que com o envelhecimento artificial essas alterações foram mais drásticas e levaram à maior redução da qualidade das sementes. Embora o envelhecimento artificial seja muitas vezes utilizado como preditor do envelhecimento natural, que ocorre durante o armazenamento das sementes, estes dois tipos de envelhecimentos apresentam suas peculiaridades (GAO et al., 2015). O envelhecimento natural geralmente acontece de maneira lenta e gradual, diferentemente do artificial que ocorre de maneira rápida e drástica (GAO et al., 2015). Durante o armazenamento, as taxas metabólicas das sementes são baixas e os mecanismos de deterioração que predominam estão ligados à oxidação de ácidos graxos (SINGH et al., 2017) e à degradação de proteínas por meio das reações de Amadori e Maillard (CASTELLIÓN et al., 2010). Essas reações promovem a agregação, perda da solubilidade e consequente redução do conteúdo de proteínas solúveis, o que pôde ser constatado neste trabalho (Figura 2). Por outro lado, o envelhecimento artificial leva ao aumento da taxa metabólica das sementes, devido à exposição destas a altas temperatura e umidade relativa (BEWLEY et al., 2013). Esse aumento no metabolismo das sementes promove a formação de espécies reativas de oxigênio, síntese de proteínas, incluindo as que atuam no processo de mobilização de reservas (SINGH et al., 2017, BEWLEY et al., 2013), comprometendo o tamanho, uniformidade e massa seca das plântulas (Figura 1). Comumente, também induz a peroxidação de lipídeos (BEWLEY et al., 2013), que leva ao aumento da

condutividade elétrica e redução do vigor das sementes, conforme verificado em nossos resultados (Figura 1).

Embora a identificação de compostos químicos específicos em sementes seja bastante difícil, devido a sobreposição de bandas espectrais que podem estar associada a diferentes compostos (KUSUMANINGRUM et al., 2018), nós evidenciamos nesse trabalho que existem regiões do espectro eletromagnético que apresentam maior importância para distinguir os níveis de vigor em sementes de soja determinados pelo envelhecimento natural e artificial das sementes (Figura 7). Vimos, ainda, que os diferentes tipos de envelhecimentos promovem deterioração em níveis distintos que tem reflexo na qualidade das sementes (Figura 1). Além disso, foi possível evidenciar a relação entre proteína solúvel, óleo e suas frações de ácidos graxos, com a qualidade das sementes (Figura 1 e 2) e verificar a relação entre óleo e proteína com os comprimentos de ondas de maior importância para a classificação dos níveis de vigor de sementes de soja envelhecidas natural e artificialmente.

## 5. CONCLUSÕES

As regiões do espectro eletromagnético entre os comprimentos de ondas de 1000-1200 nm; 1350-1450 nm; 1800-1900 nm e 2300-2400 nm são importantes para distinguir os níveis de qualidade das sementes de soja.

A espectroscopia NIR, em combinação com métodos quimiométricos, apresenta potencial para classificar sementes de soja quanto ao vigor.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGELET, L. E.; HURBURGH, C. R. Limitations and current applications of Near Infrared Spectroscopy for single seed analysis. **Talanta**, v. 212, p. 288-299, 2014.

AMBROSE, A.; LOHUMI, S.; LEE, W. H.; CHO, B. K. Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 500-506, 2016.

AMERY, M.; GENEVE, R. L.; SANCHES, M. F.; ARMSTRONG, P. R.; MAGHIRANG, E. B.; LEE, C.; VIEIRA, R. D.; HILDEBRAND, D. F. Near-infrared spectroscopy used to predict soybean seed germination and vigour. **Seed Science Research**, v. 28, p. 245-252, 2018.

AOCS - American oil chemists' society. **Official methods and recommended practices of**

the AOCS, 6th ed., Denver: AOCS. 2009.

ARMSTRONG, P. R. Rapid single-kernel NIR measurement of grain and oil-seed attributes. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 767-772, 2006.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial mínimos quadrados para discriminação. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 166-173, 2003.

BAZONI, C. H.; IDA, E. I.; BARBIN, D. F.; KUROZAWA, L. E. Near-infrared spectroscopy as a rapid method for evaluation physicochemical changes of stored soybeans. **Journal of Stored Products Research**, v. 73, p. 1-6, 2017.

BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. **Journal of Chemometrics**, v. 28, p. 213-225, 2014.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3° ed., New York: Springer. 2013, 407 p.

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, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CASTELLION, M; MATIACEVICH, S.; BUERAB, P.; MALDONADO, S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. **Food Chemistry**, v. 121, p. 952–958, 2010.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; TAGLIARI, A.; CHIOMENTO, L. T.; SILVEIRA, D. C.; CHAVARRIA, G. Soybean seed vigor: uniformity and growth as key factors to improve yield. **Agronomy**, v. 10, n. 545, p. 1-15, 2020.

FAN, Y.; MA, S.; WU, T. Individual wheat kernels vigor assessment based on nir spectroscopy coupled with machine learning methodologies. **Infrared Physics and Technology**, v. 105, p. 1-7, 2020.

GAITÁN-JURADO, A. J.; GARCÍA-MOLINA, M.; PEÑA-RODRÍGUEZ, F.; ORTIZ-SOMOVILLA, V. Near infrared applications in the quality control of seed cotton. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 16, n. 4, 421-429, 2008.

GAO, H. W.; MAN, Q.; PAN, J.; LEI, Y. Q.; YU, H. B.; WU M.; ZHANG, W. H.; LIU L. K. Differences in properties of seed vigor between artificially and naturally aged soybean seeds. **Seed**, v. 34, n.1, p.14-9, 2015.

GISLUM, R.; NIKNESHAN, P.; SHRESTHA, S.; TADAYYON, A.; DELEURAN, L. C.; BOELT, B. Characterisation of castor (*ricinus communis* l.) seed quality using fourier transform

near-infrared spectroscopy in combination with multivariate data analysis **Agriculture**, v. 59, n. 8, p. 1-10, 2018.

GUO, J.; YOU, T.; PRISECARU, V.; COSTESCU, D.; NELSON, R. L. BAIANU, I. C. NIR calibrations for soybean seeds and soy food composition analysis total carbohydrates, oil, proteins and water contents. **Nature Precedings**, v. 6, p. 1-40, 2011.

HAYATI, P. K. D.; ANGGASTA, G. N.; ANWAR, A. Physical and chemical properties of dura and pisifera genotypes of oil palm seed and its viability and vigor. **International Conference of Bio-Based Economy and Agricultural Utilization**, v. 497, p. 1-8, 2020.

HOURANT, P.; BAETEN, V.; MORALES, M.T.; MEURENS, M.; APARICIO, R. Oil and fat classification by selected bands of near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.54, p.1168-1174, 2000.

HUANG, Z.; SHA, S.; RONG, Z.; CHEN, J.; HE, Q.; KHAN, D. M.; ZHU, S. Feasibility study of near infrared spectroscopy with variable selection for non-destructive determination of quality parameters in shell-intact cottonseed. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 654-660, 2013.

HUANG, J.; YU, C. Determination of cellulose, hemicellulose and lignin content using near-infrared spectroscopy in flax fiber. **Textile Research Journal**, v. 0, n. 00, p. 1-9, 2019

HUANG, Y.; LU, R.; CHEN, K. Prediction of firmness parameters of tomatoes by portable visible and near-infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 185-198, 2018.

JHAM, G. N.; TELES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, p. 132-133, 1982.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 374, n. 20150202, p. 1-16, 2016.

KUSUMANINGRUM, D., LEE, H., LOHUMI, S., MO, C., KIMB, M. S., CHOA, B. Non-destructive technique for determining the viability of soybean (*Glycine max*) seeds using NIR spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 1734-1742, 2018.

LI, X., ZHANG, L., ZHANG, Y., WANG, D., WANG, X., YU, L. ZHANG, W., LI, P. Review of NIR spectroscopy methods for nondestructive quality analysis of oilseeds and edible oils. **Trends in Food Science & Technology**, n. 101, p. 172-181, 2020.

LOHUMI, S.; MO, C.; KANG, J.; HONG, S.; CHO, B. Nondestructive evaluation for the viability of watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds using fourier transform near infrared spectroscopy. **Journal of Biosystems Engineering**. v. 38, n. 4, p.312-317, 2013.

MAYRINCK, L. G.; LIMA, J. M. E.; GUIMARÃES, G. C.; NUNES, C. A.; OLIVEIRA, J. A. Use of near infrared spectroscopy in cotton seeds physiological quality evaluation. **Journal of**

**Seed Science**, v. 42, p. 1-11, 2020.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, p. 177-237, 1999.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MATHIAS, V.; COELHO, C. M. M.; GARCIA, J. Soluble protein as indicative of physiological quality of soybean seeds. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 3, p. 730-740, 2019.

MEDEIROS, A. D.; 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.

PEREZ MUKASAA, COLLINS WAKHOLIA, CHANGYEUN MOB, MIRAE OHC, HYE-JOON JOOD, HYUN KWON SUHA, BYOUNG-KWAN CHO. Determination of viability of retinispora (*Hinoki cypress*) seeds using FTNIR spectroscopy. **Infrared Physics and Technology**, v. 98, p. 62-68, 2019.

NAKAGAWA, J. **Teste de vigor baseados no desempenho das plântulas**. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D. E FRANÇA NETO, J. B. (Ed.) Vigor de sementes: conceito e testes. ABRATES, Londrina, p. 2.1-2.6, 1999.

NAVARRO, M.; FEBLES, G.; HERRERA, R. S. Vigor: essential element for seed quality. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 49, n. 4, p. 447-458, 2015.

OZAKI, Y.; MCCLURE, W. F.; CHRISTY, A. A. **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006. 406 p.

QI, X.; LI, W.; LI, W.; LI, H. Study on the vigour testing of soybean seed based on near infrared spectroscopy Technology. **Applied Mechanics and Materials**, v. 58-60, p. 458-462, 2011.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. URL <https://www.R-project.org/>

RINNAN, A. S.; BERG, F. V. D.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, 2009.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

SHETTY, N.; OLESEN, M. H.; GISLUM, R.; DELEURAN, L. C.; BOELT, B. 2012. Use of partial least squares discriminant analysis on visible-near infrared multispectral image data to examine germination ability and germ length in spinach seeds. **Journal of Chemometrics**, v. 26, n. 8, p. 462-466, 2012.

SHRESTHA, S.; KNAPIČ, M.; ŽIBRAT, U.; DELEURAN, L. C.; GISLUM, R. Single seed near-infrared hyperspectral imaging in determining tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed quality in association with multivariate data analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 1027-1034, 2016.

SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. Seedcalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 250-257, 2019.

SINGH, J.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. Factors Affecting Oilseed Quality during Storage with Special Reference to Soybean (*Glycine max*) and Niger (*Guizotia abyssinica*) Seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 10, p. 2215-2226, 2017.

VENKATESAN, S.; MASILAMANI, P.; JANAKI, P., EEVERA, T.; SUNDARESWARAN, S.; RAJKUMAR, P. Role of Near - Infrared Spectroscopy in Seed Quality Evaluation: A Review. **Agricultural Reviews**, R1960, p. 1-10, 2020.

VIEIRA, R. D.; KRZYŻANOWSKI, F. C. **Teste de condutividade elétrica**. In: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França Neto, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: Abrates. cap. 4, p. 1-26, 1999.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP. 1994, 164p.

WORKMAN, J. JR.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, NY. 2007. 346p.

XU, R.; HU, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, S.; GUO, Q.; QI, P.; CHEN, L.; YANG, X.; ZHANG, F.; LIU, L.; QIU, L.; WANG, J. Use of near-infrared spectroscopy for the rapid evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merri.] water soluble protein content. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 224, n. 117400, p. 1-8, 2020.

YASMIN, J.; AHMED, M. R.; LOHUMI, S.; WAKHOLI, C.; KIM, M. S.; CHO, B. 2019. Classification Method for Viability Screening of Naturally Aged Watermelon Seeds Using NIR Spectroscopy. **Sensors**, v. 19, p. 1-14, 2019.

ZHANG, T.; FAN, S.; XIANG, Y.; ZHANG, S.; WANG, J.; SUN, Q. Non-destructive analysis of germination percentage, germination energy and simple vigour index on wheat seeds during storage by Vis/NIR and SWIR hyperspectral imaging. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 239, n. 118488, p. 1-11, 2020.

## CONCLUSÃO GERAL

O envelhecimento artificial, à temperatura de 41°C por 96 horas apresenta potencial para ser utilizado na predição do desempenho de sementes de soja no armazenamento.

Quanto maior o conteúdo de ácido graxo oleico e de proteína solúvel e menor o de ácido linoleico e linolênico, maior é a qualidade fisiológica e potencial de armazenamento das sementes de soja.

Os comprimentos de ondas na região do infravermelho próximo considerados de maior importância para a classificação do vigor das sementes apresentam relação com o conteúdo de óleo e proteína das sementes.

A espectroscopia NIR apresenta potencial para classificar sementes de soja quanto ao vigor.