

WANDERLEI ANTÔNIO ALVES DE LIMA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA COM
ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E AUSÊNCIA
DE LIPOXIGENASE**

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”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

WANDERLEI ANTÔNIO ALVES DE LIMA

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA COM
ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E AUSÊNCIA
DE LIPOXIGENASE**

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: 27 de outubro de 2003.

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. Luiz Antônio S. Dias
(Conselheiro)

Prof. Roberto Ferreira da Silva

Prof. Marcos P. del Giudice

Prof. Aluizio Borém de Oliveira
(Orientador)

Perante a lei de Deus, três classes de pessoas erram:

As que não sabem e não perguntam;

As que sabem e não ensinam;

As que ensinam e não praticam.

Provérbio Grego

“Nada, por certo, salvo a educação universal, pode contrabalançar a tendência à dominação do capital e à servilidade do trabalho. Se uma classe possui toda a riqueza e toda a educação, enquanto o restante da sociedade é ignorante e pobre, pouco importa o nome que dermos à relação entre uns e outros: em verdade e de fato, os segundos serão os dependentes servis e subjugados dos primeiros. Mas, se a educação for difundida por igual, atrairá ela, com a mais forte de todas as forças, posses e bens, pois nunca aconteceu e nunca acontecerá que um corpo de homem inteligentes e práticos venha a se conservar permanentemente pobre.”

Horace Mann

A Deus,

Aos meus pais Ari Alves de Lima (*in memoriam*) e Maria Francisca Alves de Lima,

Aos meus irmãos Elizabeth, Maria Aparecida, Ari Aparecido, Vanda, Gilmar, Tânia, Vanderléa e Darlam (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo auxílio de sempre em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Curso.

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

Ao professor Aluizio Borém pela sua orientação segura.

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela amizade e pelas sugestões.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pelas oportunidades oferecidas e pelo apoio sempre presentes.

Ao professor Luiz Antônio Dias, pela amizade, dedicação e incentivo.

Ao professor Tocio Sedyama, pelos conselhos e apoios constantes desde a graduação.

Ao Newton, pelas valiosas e proveitosas críticas e sugestões.

À Mara Rodrigues, pela ajuda, amizade e pelo apoio constantes.

Aos amigos Paulo Cesar (PC), Ratinho, Márcio, Dora, Josete, Carlota, Cuíca, Raquel, Marley, Márcia, Andrea, Guido, Telma, Wagner, Angela, Ludimila e Fábio, pela amizade, pela ajuda mútua e ótima convivência até hoje.

Aos colegas de trabalho da Fitotecnia e BIOAGRO, especialmente à Inês Chamel José, pelo estímulo, apoio e convívio agradável.

A Maria Carmem Behring, pelo convívio agradável.

Aos funcionários da Agronomia, especialmente ao Paulinho, pela ajuda e pela disposição.

Aos meus pais, por terem-me dado vida e me preparado para o mundo.

À minha família, em especial à minha irmã Maria Aparecida de Lima Maciel, pelo incentivo e pelo apoio constante.

Enfim, o meu reconhecimento e a minha gratidão a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

WANDERLEI ANTÔNIO ALVES DE LIMA, filho de Ari Alves de Lima e Maria Francisca Alves de Lima, nasceu em Pará de Minas, Minas Gerais, no dia 10 de agosto de 1970.

Realizou o curso primário na Escola Estadual Serafim Ribeiro de Rezende, em Florestal, Minas Gerais, e concluiu o curso Técnico em agropecuária na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF/UFV), em Florestal, MG.

Em 1991, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em Engenharia Agrônoma em dezembro de 1995.

Em 1996 iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia na UFV e defendeu tese em 1999.

Em agosto de 1999 iniciou o Doutorado em Fitotecnia na UFV defendendo tese em 27 de outubro de 2003.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	14
Capítulo 1 - Retardamento de colheita como método de diferenciação de genótipos de soja visando qualidade de sementes.	
Resumo.....	19
1. Introdução.....	20
2. Material e Métodos.....	22
2.1 Obtenção do material genético e procedimentos utilizados.....	22
2.2 Detecção da lipoxigenase 1 e 3 pelo método colorimétrico.....	26
2.3 Determinação da atividade de LOX1 e LOX3.....	27
2.4 Determinação de ácidos graxos.....	27

2.5 Grau de umidade.....	28
2.6 Teste de germinação.....	28
2.7 Primeira contagem.....	28
2.8 Envelhecimento acelerado.....	29
2.9 Emergência em leito de areia.....	29
2.10 Índice de velocidade de emergência.....	29
2.11 Condutividade elétrica.....	30
2.12 Teste de sanidade.....	30
2.13 Análises Estatísticas.....	31
3. Resultados e Discussão.....	31
4. Conclusões.....	42
5. Literatura Citada.....	43

Capítulo 2 - Relação entre retardamento de colheita, lipoxigenase, teor de ácido linolênico e qualidade fisiológica de sementes de soja

Resumo.....	46
1. Introdução.....	47
2. Material e Métodos.....	49
2.1 Obtenção do material genético e procedimentos utilizados.....	49
2.2 Análise Estatística.....	52
3. Resultados e Discussões.....	54
4. Conclusões.....	71
5. Literatura Citada.....	72

APÊNDICE..... 75

RESUMO

LIMA, Wanderlei Antônio Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2003. **Qualidade fisiológica de sementes de soja com alteração na composição de ácidos graxos e ausência de lipoxigenase.** Orientador: Aluizio Borém. Conselheiros: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, Maurílio Alves Moreira e Luiz Antônio dos Santos Dias.

Foram conduzidos dois experimentos: 1) retardamento de colheita como método de diferenciação de genótipos de soja, visando qualidade fisiológica de sementes; 2) relação entre retardamento de colheita, lipoxigenase, teor de ácido linolênico e qualidade fisiológica de sementes de soja. O primeiro experimento teve como objetivo principal avaliar se o retardamento de colheita pode se constituir em método eficiente para a seleção de genótipos com alta qualidade de sementes. Foram instalados ensaios de campo com genótipos identificados por: LOX⁻Lin^b (ausência de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico); LOX⁺Linⁿ (presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico); LOX⁻Linⁿ (ausência de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico) e LOX⁺Lin^b (presença de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico). As sementes foram colhidas nos estádios R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas aos testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência,

emergência de plântulas em leito de areia, condutividade elétrica e aldeídos totais. O retardamento de colheita realizado a partir do estágio R8+15 dias foi eficaz em diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos estudados. Em geral, os genótipos que não possuíam lipoxigenase em sua constituição apresentaram melhor qualidade fisiológica de sementes. No segundo experimento o objetivo foi avaliar a influência das características ausência e presença de lipoxigenase e teor de ácido linolênico na qualidade fisiológica das sementes. As sementes utilizadas receberam as mesmas identificações como no primeiro experimento. As sementes foram colhidas nos estádios R8, R8+15 e R8+30 dias. Parte dessas sementes foram imediatamente submetidas aos testes de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência, condutividade elétrica e teste de emergência em leito de areia. A outra parte restante foi armazenada por 6 meses e, a cada 2 meses, submetidas aos mesmos teste anteriormente citados. A deterioração dos genótipos estudados foi mais influenciada pelo teor de ácido linolênico do que pela lipoxigenase. Em geral, os genótipos de sementes de soja com baixo teor de ácido linolênico apresentaram maior vigor ao longo do armazenamento. O genótipo caracterizado pela presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico apresentou a pior qualidade de sementes.

ABSTRACT

LIMA, Wanderlei Antônio Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, october, 2003. **Physiological quality of soybean seeds with different composition of linolenic acid and of lipoxygenase.** Adviser: Aluizio Borém. Committee members: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, Maurílio Alves Moreira and Luiz Antônio dos Santos Dias.

In this work two experiments were carried out: 1) Harvest delay as a method differentiation of soybean genotypes for seed physiological quality. 2) analysis of the relationship among delayed harvest, lipoxygenases, linolenic acid content and physiological seed quality of soybean seeds. The first experiment were carried out with the objective to evaluate the effect of delaying harvest on the differentiation of seed quality. Four different genotypes were utilized: LOX⁻Lin^b (seeds without lipoxygenase and low linolenic acid content); LOX⁺Linⁿ (seeds with lipoxygenase and normal linolenic acid content); LOX⁻Linⁿ (seeds without lipoxygenase and normal linolenic acid content) e LOX⁺Lin^b (seeds with lipoxygenase and low linolenic acid content). The seeds were harvest at the R8 stage, and at 15- and 30- days after R8. Seed physiological quality was evaluated by the germination test, accelerated aging, emergence speed, electric conductivity, seedling emergence. It was concluded that: the delayed harvest from R8+15

days was efficient to differentiate genotypes for seed physiological quality. Genotypes seeds without lipoxygenase showed higher seed physiological quality. The second experiment were carried out with the objective of to evaluate the effects of lipoxygenases and linolenic acid content on seed quality after delaying harvest. The utilized genotypes had the same identification as on the first experiment. The seeds were harvested at the R8 stage, 15 - and 30-days after R8. Part of the seeds was evaluated for physiological quality (same as in the first experiment). Another portion was stored during 6 months and every 2 months it was submitted to the same physiological tests. It was concluded that: The deterioration of soybean seeds was more affected by linolenic acid content than lipoxygenase. The soybean genotypes with low linolenic acid content presented higher vigor after storage. The genotype by with lipoxygenase and normal linolenic acid content showed the lowest seed quality.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Qualidade fisiológica de sementes e retardamento de colheita

Segundo POPINIGIS (1985), entende-se por qualidade fisiológica da semente o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, sanitários e fisiológicos que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade; a qualidade fisiológica da semente significa sua capacidade para desenvolver funções vitais, abrangendo germinação, vigor e longevidade.

O conhecimento do nível de qualidade das sementes é essencial para o plantio de uma cultura e é avaliado por dois parâmetros principais: Viabilidade e vigor. Segundo AOSA (1983), o vigor das sementes compreende aquelas propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais sob ampla faixa de condições ambientais. Enquanto que a viabilidade é medida principalmente pelo teste padrão de germinação, que determina a máxima germinação da semente, nas condições mais favoráveis possíveis. O vigor representa atributos mais sutis da qualidade fisiológica, não revelados pelo teste de germinação e é determinado sob condições desfavoráveis, ou medindo-se o declínio de alguma função bioquímica ou fisiológica (POPINIGIS, 1985).

No ponto de maturidade fisiológica, as sementes possuem o máximo de vigor e germinação (POPINIGIS, 1985; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Nesse ponto, a semente é capaz de desenvolver, com eficiência plena, todas as funções fisiológicas que lhe são inerentes. Do ponto de vista fisiológico, esse seria o ponto ideal de colheita, pois a semente exibe máxima germinação, máximo vigor e menor grau de deterioração (POPINIGIS, 1985), porém a colheita mecanizada é inviável na prática, em razão do alto teor de umidade da semente, em torno de 40% (MARCOS FILHO, 1987).

Por ocasião da colheita da soja, a qualidade fisiológica da semente já está determinada, ou seja, nada mais pode ser feito para melhorar sua qualidade, podendo-se apenas trabalhar no sentido de preservar os níveis de germinação e vigor obtidos em função das condições a que foram submetidas no campo (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

Quando a semente atinge a sua maturidade fisiológica, normalmente, inicia-se a perda de sua qualidade, por processos de deterioração, levando à redução do vigor da mesma (SEDIYAMA et al., 1981; TEKRONY et al., 1991).

Após a maturidade fisiológica, a semente pode ser considerada como armazenada a campo, enquanto a colheita não se processa. Se as condições climáticas forem favoráveis, a sua qualidade fisiológica pode ser menos prejudicada, porém, a ocorrência de chuvas ou mesmo de orvalho, aliada às altas temperaturas com elevada umidade do ar, diminui a qualidade das sementes pelas suas sucessivas retrações e entumescimentos, à medida que se retarda a colheita (FRANÇA NETO e KRZYANOWSKI, 1990).

Os atributos fundamentais para avaliação da qualidade de sementes são a viabilidade e o vigor. ABDUL-BACKI (1980) considerou vigor da semente um atributo fisiológico mensurável, que é expresso como rápida, uniforme e alta germinação, ou emergência, mesmo em condições desfavoráveis.

É relativamente difícil a produção de soja de alta qualidade fisiológica nas regiões tropicais e subtropicais onde, normalmente, ocorre clima quente e úmido no verão. Tais condições aceleram a deterioração da sementes no

campo, em especial quando a colheita é retardada (CERQUEIRA e POPINIGIS, 1981).

O retardamento de colheita após o estágio R8 é apontado, por vários autores, como responsável por redução na germinação e no vigor das sementes devido ao avanço no processo de deterioração e ao aumento da incidência de patógenos sendo, portanto um método para a diferenciação de genótipos de soja quanto à qualidade das sementes (COSTA et al, 1983; BRACCINI, 1994; QUEIROZ, 2000). BRACCINI (1994) constatou, nas condições de Viçosa, que o retardamento de 45 dias após R8 é o mais adequado para tal diferenciação.

Independente da escolha de regiões favoráveis à produção de sementes, do controle do ambiente de armazenamento, ou dos arranjos de práticas aplicadas à melhoria de sua qualidade, o fator determinante e fundamental da qualidade fisiológico é intrínseco e depende do controle genético dessa característica pelo cultivar (KRZYZANOWSKI et al., 1993).

A qualidade de sementes e, principalmente, a de soja é um fator de extrema importância para a expansão da cultura em regiões tropicais e subtropicais. Diversas técnicas podem ser utilizadas para a produção de sementes de melhor qualidade em tais regiões, como por exemplo à localização dos campos de produção em regiões propícias para a produção de sementes, escolha de épocas de semeadura específicas e aplicação de fungicidas foliares. Entretanto o melhoramento genético para qualidade de sementes é, sem dúvida, o método mais eficaz para alcançar ganhos de qualidade. Hoje, os métodos mais utilizados para seleção de genótipos de soja para a qualidade de sementes são os que utilizam os princípios do envelhecimento acelerado, retardamento de colheita e de determinação das características do tegumento, como permeabilidade e conteúdo de lignina. (FRANÇA NETO et al., 1994).

Muito pouco é conhecido a respeito das causas fisiológicas e dos fatores genéticos que afetam a viabilidade e o vigor das sementes; porém, problemas dessa natureza são considerados dos mais importantes pelos

produtores de soja do país. Em geral, trabalhos realizados com a finalidade de selecionar genótipos com sementes de melhores características de germinação e vigor ignoram a ação bioquímica dos fatores genéticos responsáveis por essas características, pois ainda é desconhecida e é um dos objetivos dos projetos de pesquisa da atualidade (REIS et al., 1989).

1.2 Deterioração e vigor de sementes

A deterioração, segundo ABDUL-BAKI e ANDERSON (1972), é definida como qualquer transformação degenerativa na semente; trata-se de um processo contínuo, de progresso variável entre espécies, entre lotes de sementes da mesma espécie e entre sementes do mesmo lote. Essas transformações podem ser de origem bioquímica, física ou fisiológica (DELOUCHE e BASKIN, 1973).

A deterioração da semente é um processo de perda de vigor que envolve mudanças ou alterações citológicas, fisiológicas, bioquímicas e físicas, que podem, eventualmente causar a morte das sementes, sendo inexorável, irreversível e progressivo (BEWLEY e BLACK, 1994). Neste sentido, ABDUL-BAKI e ANDERSON (1972) relataram as principais manifestações fisiológicas e bioquímicas de sementes deterioradas. As primeiras referem-se a alterações na cor, perda de germinação, decréscimo na tolerância às condições sub-ótimas, alta sensibilidade a tratamentos com radiação, reduzido crescimento de plântulas, redução na germinação e aumento no número de plântulas anormais. Nas manifestações bioquímicas os autores incluíram: mudanças na atividade enzimática e respiratória, nas vias de síntese, nas membranas, nos compostos de reserva e nos cromossomos. Por sua vez, DELOUCHE e BASKIN (1973) relacionaram os eventos que caracterizam o processo de deterioração numa seqüência hipotética, envolvendo a degradação de membranas celulares, redução das atividades respiratórias e biossintéticas, germinação mais lenta, redução no potencial de

conservação, decréscimo na taxa de crescimento e desenvolvimento, menor uniformidade de emergência, maior sensibilidade às adversidades do ambiente, redução da emergência das plântulas no campo, aumento da ocorrência de plântulas anormais e, finalmente, perda do poder germinativo.

Segundo CARVALHO (1994) o processo de deterioração das sementes, cuja causa básica ainda não é bem conhecida, teria como conseqüência inicial a desestruturação de sistemas de membranas no nível celular. A causa imediata dessa desestruturação seria a ação de grupos químicos de alta reatividade denominados radicais livres. O processo pelo qual os radicais livres se formam através da atividade metabólica da célula é conseqüência da reação de lipídios estruturais, principalmente os polinsaturados, com o O₂, do que resultam radicais livres e peróxidos instáveis, razão pela qual esse processo é designado como peroxidação de lipídios. Assim, o processo de envelhecimento consiste, principalmente, de alterações nos ácidos graxos insaturados pela ação dos radicais livres, que resulta em uma desestruturação da membrana, com reflexos sobretudo sobre sua capacidade de regular o fluxo de água e de solutos, tanto de dentro quanto para fora de uma célula ou uma organela. A membrana interna da mitocôndria, por ser muito rica em lipídios insaturados e por ser toda cheia de dobras, o que aumenta o efeito de superfície, é a que apresenta de forma mais intensa essa peroxidação dos lipídios. Assim, além de um acentuado efeito sobre a permeabilidade das membranas, a peroxidação dos lipídios afeta muito a atividade respiratória por quebrar o gradiente protônico, necessário para manter o acoplamento respiratório.

Alguns pesquisadores têm proposto o estudo da deterioração de sementes por meio de algumas de suas conseqüências. Assim, mecanismos de envelhecimento que resultam da peroxidação de lipídios têm sido propostos para explicar a deterioração. A detecção de produtos secundários da peroxidação de lipídios (aldeídos) tem sido um parâmetro de medida do grau de deterioração da semente. A peroxidação de lipídios é acelerada pela ação

das enzimas lipoxigenases, as quais são encontradas em sementes, especialmente na soja (CARVALHO, 1994).

Os radicais livres têm potencial para provocar danos aos constituintes celulares, estando envolvidos na danificação da membrana celular, por desestabilização dos fosfolipídios e conseqüente acúmulo de ácidos graxos livres na membrana (BEWLEY, 1986). A velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação presente na molécula de ácido graxo. Quanto maior for o grau de insaturação presente no óleo e, ou, gordura, maior será a suscetibilidade à oxidação, e o primeiro produto formado é o hidroperóxido do ácido graxo (ARAÚJO, 1989).

WILSON J.R. e McDONALD JR (1986) propuseram um mecanismo de envelhecimento, proveniente da peroxidação de lipídios, para explicar a deterioração das sementes durante o armazenamento. O modelo inclui degradação de membranas, desnaturação de proteínas, interferência na síntese de proteínas e de DNA, acúmulo de substâncias tóxicas e desacoplamento do sistema de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa. De fato, na presença de oxigênio, ácidos graxos e ésteres oxidam-se, produzindo radicais livres intermediários altamente reativos, conhecidos como hidroperóxidos. Estes, sob ação catalítica das isoenzimas lipoxigenases, existentes nas sementes de soja em grande quantidade, são convertidos a outros radicais livres que, por meio de uma série de transformações, decompõem-se em ácidos, aldeídos e cetonas, de cadeia carbônica curta e, na maioria, voláteis (WILSON J.R. e McDONALD JR, 1986). Os aldeídos assim formados produzem uma gama de efeitos citotóxicos: reagem com grupos sulfidrilas, provocando inativação de proteínas (BENEDETTI et al., 1980); diminuem o índice de mitose em células e inibem as proteínas tubulinas, principais proteínas dos microtúbulos, necessários para a formação do fuso acromático (GABRIEL et al., 1997).

A importância da peroxidação de lipídios no envelhecimento de sementes foi avaliada por VIDAL et al. (1991), ZHANG et al. (1995), TRAWATHA et al. (1995) e KHAN et al. (1996). Esses autores constataram

correlação significativa entre os níveis de hexanal, aldeídos totais, aldeídos voláteis, liberados durante as primeiras horas de germinação, bem como o conteúdo de hidroperóxido na fração óleo, com a perda de vigor das sementes.

A deterioração é inevitável, podendo-se quando muito reduzir a velocidade de seu progresso, pelo emprego de técnicas adequadas de produção, secagem, beneficiamento, armazenamento e manuseio das sementes (CERQUEIRA e POPINIGIS, 1981).

Freqüentemente, podem ser observados lotes de sementes apresentando germinação semelhante mas exibindo comportamentos distintos no campo. Para DELOUCHE e BASKIN (1973), tais diferenças podem ser explicadas pelo fato de que as primeiras alterações nos processos bioquímicos, associadas à deterioração, geralmente ocorrem antes que o declínio na capacidade germinativa seja verificado. A perda de germinação é um indicativo importante da perda de qualidade, mas é a última consequência, ou seja, o evento final.

SANTOS et al. (1993) observaram que o retardamento de colheita favoreceu a deterioração da vagem e das sementes. Verificaram o efeito diferenciado entre genótipos, com relação às características de qualidade de vagens e de sementes e que nem sempre as variedades e linhagens com melhor qualidade de vagem apresentaram sementes de qualidade superior.

O intervalo entre a maturidade fisiológica e a colheita é como um período de armazenamento no campo em que a ocorrência de chuvas e, condições oscilantes de temperatura e umidade relativa do ar causam o entumescimento diferenciado dos tecidos externos das sementes em relação aos internos. Esse processo leva ao desenvolvimento de rugas e rachaduras no tegumento e fissuras no eixo embrionário e nos cotilédones, sintomas típicos de deterioração severa. Essa deterioração geralmente está associada à maior predisposição das sementes aos danos mecânicos e à maior facilidade de penetração de fitopatógenos, além da maior exposição do tecido cotiledonar ao ambiente (DELOUCHE, 1980). Se não há ocorrência de muita chuva, orvalho e altas temperaturas após a maturação fisiológica, a qualidade das sementes de

soja é preservada. Por outro lado, com chuvas, orvalho e altas temperaturas, a semente de soja sofre forte depreciação da qualidade fisiológica.

Na Nigéria, RUSSOM (1983) estudou os efeitos de diferentes períodos e ambientes de armazenagem sobre a germinação de sementes de linhagens de soja americanas e indonésias. Após nove meses de armazenagem convencional, com condições climáticas não controladas, as linhagens americanas apresentaram uma germinação média de 18%, ao passo que as indonésias tinham 82%. As linhagens resultantes de cruzamentos entre as americanas e indonésias apresentavam germinação intermediária, de 42%, o que demonstrou que o potencial de armazenamento das linhagens americanas, que apresentavam altas produtividades, poderia ser substancialmente melhorado.

No Brasil, nessa mesma ocasião, COSTA et al. (1983) verificaram que diferentes cultivares precoces de soja, expostos às mesmas condições climáticas durante as fases de pré-colheita e colheita, responderam diferentemente quanto à germinação e ao vigor das sementes. A taxa de deterioração das sementes expostas a diferentes períodos de retardamento de colheita variou com os cultivares.

DASSOU e KUENEMAN (1984) utilizaram uma câmara incubadora para a seleção de genótipos de soja com sementes tolerantes à deterioração no campo e na armazenagem. A exposição das sementes às condições de temperatura de 30°C e 95% de umidade relativa por um período de sete dias, ou a exposição das sementes em vagens, às mesmas condições por um período de dez dias, propiciaram a identificação de genótipos com elevados índices de tolerância à deterioração.

Independentemente da escolha de regiões favoráveis à produção de sementes, do controle do ambiente no armazenamento ou dos arranjos de práticas culturais aplicadas à melhoria de sua qualidade, o fator determinante e fundamental da qualidade fisiológica é intrínseco e depende do controle genético (KRZYZANOWSKI et al., 1993). Assim, os cultivares comerciais de soja apresentam diferenças quanto à qualidade fisiológica da semente. O

lançamento de novos cultivares torna-se importante para a agricultura apenas quando a semente de boa qualidade está disponível para os agricultores em quantidade adequada e no lugar apropriado (DELOUCHE e BASKIN, 1973).

1.3 Envelhecimento natural e composição química de sementes de soja.

A perda de vigor e viabilidade de sementes, provocada pelo efeito de armazenamento e condições desfavoráveis no campo, tem desafiado os melhoristas de soja do Brasil e do exterior. Sementes que germinam bem numa área geográfica podem ter desempenho medíocre em outra (REIS et al., 1989).

O armazenamento das sementes de soja inicia-se no campo, a partir da maturação fisiológica e finda no momento da semeadura, com a emergência das plântulas. Desta forma, as sementes passam por várias etapas de armazenamento: campo (pré-colheita), secagem, beneficiamento, armazenamento da semente beneficiada, transporte e semeadura (KRZYZANOWSKI et al., 1993).

Segundo CERQUEIRA e POPINIGIS (1981) é relativamente difícil produzir sementes de soja de alta qualidade nas regiões tropicais onde, normalmente ocorre clima quente e úmido no verão. Tais condições aceleram a deterioração da semente no campo, em especial quando a colheita é retardada. A produção de sementes nessas regiões requer a utilização de cultivares, cujas sementes suportam diversos outros fatores, que podem reduzir a sua qualidade como: altas temperaturas associadas com chuvas e umidade relativa do ar elevada durante as fases de pré-colheita e colheita; infecção das sementes por fungos patogênicos ou saprófitos; danos mecânicos durante e após a colheita; ataque de insetos sugadores às sementes e condições ambientais inadequadas durante o armazenamento.

O conhecimento da composição química das sementes é do interesse prático da Tecnologia de Sementes, porque, tanto o vigor quanto seu potencial

de armazenamento são influenciados pelo teor dos compostos presentes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). As sementes são higroscópicas, o que torna sua umidade dependente da umidade em que ela esteja exposta; com isso, ganhará ou perderá umidade conforme as oscilações da umidade externa. POPINIGIS (1985) exemplifica esta característica entre espécies diferentes, onde, a semente de milho adquire seu equilíbrio higroscópico a um grau de umidade maior que a semente de soja o que, de acordo com o autor, deve-se ao fato de que as sementes de soja apresentam maior porcentagem de óleo em relação à semente de milho. No entanto, sementes oleaginosas respiram com maior intensidade que as amiláceas, uma vez que a hidrólise do óleo é muito mais rápida que a dos carboidratos e das proteínas, servindo portanto de indicativo para o início de deterioração. Para AHRENS e PESKE (1993), os maiores danos são encontrados quando as sementes de soja secas são expostas à água da chuva ou do orvalho; com as sucessivas hidratações, começam a ocorrer distúrbios químicos e fisiológicos.

O critério comercial de avaliação da qualidade das sementes é baseado no teste de germinação conduzido em laboratório. Embora os resultados nem sempre revelem diferenças na qualidade fisiológica entre lotes de sementes, as diferenças podem manifestar-se durante o armazenamento e no campo. Métodos mais adequados, como o teste de vigor, que têm a finalidade de determinar com maior precisão o nível de qualidade das sementes, foram desenvolvidos por MARCOS FILHO (1984). Segundo este mesmo autor, o processo de envelhecimento das sementes, cuja causa básica ainda não é bem conhecida, teria como consequência inicial a desestruturação de sistemas de membranas no nível celular, tendo como causa imediata a ação de grupos de alta reatividade, denominados de radicais livres.

Segundo BEWLEY e BLACK (1994), os lipídios representam entre 17 a 22% da semente de soja. Os ácidos graxos polinsaturados, linoléico e linolênico destacam-se como os mais importantes, sendo susceptíveis à degradação oxidativa, por reações enzimáticas e não enzimáticas (ANDERSON e BAKER, 1983). Entretanto, segundo VIEIRA e CARVALHO

(1994), a correlação entre a peroxidação dos lipídios e a deterioração de sementes nem sempre tem sido verificada. De um modo geral, os autores só parecem concordar de maneira unânime que a primeira consequência da deterioração seja a desestruturação dos sistemas membranas com o resultante aumento da sua permeabilidade sem, contudo, haver consenso sobre quais seriam as causas básicas dessa desestruturação.

O conteúdo médio dos ácidos graxos constituintes do óleo de soja de variedades comerciais é de 11% de ácido palmítico, 4% de ácido esteárico, 24% de ácido oléico, 54% de ácido linoléico e 7% de ácido linolênico, sendo que os polinsaturados perfazem um total de, aproximadamente, 61%. O processamento industrial utilizado para que haja uma maior estabilidade oxidativa no óleo de soja é a hidrogenação química. Para o óleo que é usado em aquecimento como frituras, assados, cocção de alimentos, a hidrogenação é parcial, e para aqueles usados na produção de margarina e gordura hidrogenada, a hidrogenação é completa (KINNEY, 1996).

Lipoxigenases são enzimas que catalizam a adição de oxigênio molecular a ácidos graxos polinsaturadas contendo o sistema cis, cis - 1,4 - pentadieno (AXELROD et al. 1981; MACK et al., 1987). As lipoxigenases (LOX) estão presentes nas sementes de soja na forma de três isoenzimas LOX1, LOX2 e LOX3 (SANZ et al., 1992). Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas em sementes de soja são recessivos e possuem herança mendeliana simples. O locus L1 está ligado ao L2 e o locus L3 é independente (KITAMURA et al., 1983).

A peroxidação de lipídios é acelerada pela ação das lipoxigenases. A semente de soja, rica de lipoxigenases, tem sido um dos materiais biológicos mais utilizados em estudos enzimológicos. Há vários trabalhos relacionando os produtos de sua reação com o processo de deterioração de sementes, porém pouco se sabe sobre seu papel fisiológico na semente. HILDEBRAND (1989) lista as três principais áreas da fisiologia vegetal onde as lipoxigenases têm importância: crescimento e desenvolvimento; senescência e resposta a lesões e resistência a pragas. O autor completa ainda que, a alta atividade desta enzima

nas sementes em germinação pode acelerar a ruptura de membranas celulares e facilitar o transporte de produtos armazenados para o desenvolvimento do embrião. Seguindo este mesmo raciocínio FEUSSNER et al. (1995) relatam que os ácidos graxos oxigenados são, preferencialmente, quebrados de corpos lipídicos por lipases específicas e então são, subseqüentemente, liberados no citoplasma, podendo servir com substrato para a β -oxidação.

Em publicações mais recentes, esses mesmos autores, FEUSSNER et al. (2001), propõem um novo modelo de utilização de lipídios armazenados, durante o processo de germinação de sementes de determinadas espécies. Esse modelo LOX-dependente, difere do modelo clássico que considera a degradação peroxissomal e glioxissomal do ácido linolênico, onde a oxidação de lipídios armazenados é catalisada por LOX que precede a hidrólise de triacilgliceróis por lipases específicas. Após a oxidação dos lipídios, ocorre a formação de hidroperóxidos derivados que posteriormente são clivados por lipases específicas. Após a oxidação dos lipídios, ocorre a β -oxidação com produção de acetil-CoA, que são utilizados no crescimento das plântulas. Os autores afirmam ainda que, a via preferencial de degradação de lipídios armazenados depende da espécie e, para a soja, a via preferencial ainda é objeto de investigações.

O ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo que ocorre na maioria dos tecidos de plantas e o linoléico é encontrado em maior concentração em sementes (HILDEBRAND et al., 1988). Na fração óleo de sementes de soja, o ácido linoléico representa em torno de 57% enquanto que o ácido linolênico corresponde de 7 a 9% (KITAMURA et al., 1984). O óleo de soja contém em média 15% de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico), 25% de monoinsaturados (oléico) e 60% de polinsaturados (linoléico e linolênico) (ECONOMIC, 1990). Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais susceptíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (ANDERSON e BAKER, 1983). A hidroperoxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva a produção do 9 e o 13 hidroperóxidos do ácido graxo, que por reações subseqüentes produzem

aldeídos e cetonas de cadeia curta (AXELROD et al., 1981; GERMAN e KINSELLA, 1985; LAKOKI et al., 1976).

O processo pelo qual os radicais livres se formam por meio da atividade metabólica da célula é consequência da reação de lipídios estruturais (lipídios que compõem a membrana celular), principalmente os polinsaturados, com o O₂, resultando radicais livres e peróxidos instáveis, razão pela qual esse processo é designado como peroxidação de lipídios. Os ácidos graxos constituintes dos lipídios polares são muitos, mas, no tecido vegetal, os mais comuns são os ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) e os ácidos graxos insaturados (oléico, linoléico e linolênico).

WILSON JR e McDONALD JR (1986) propuseram um modelo no qual consideram a peroxidação de lipídios uma das principais causas da deterioração das sementes. Sementes armazenadas, com grande reserva de lipídios, estão sujeitas a um lento e consistente ataque por oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos oxigenados e radicais livres.

A composição e distribuição dos ácidos graxos nas moléculas dos triacilgliceróis, determinam, grandemente, a qualidade do óleo: valor nutricional, "flavor" e propriedades físicas como estabilidade oxidativa e ponto de fusão (YADAV, 1996). De acordo com este autor, óleos vegetais, incluindo o óleo de soja, contem ácidos graxos polinsaturados em níveis que excedem o requerimento diário humano e, uma vez que causam diminuição da estabilidade oxidativa do óleo, por via enzimática e não enzimática, gerando compostos de baixo peso molecular, voláteis, os quais produzem "off-flavor", rancidez e performance reduzida no óleo, havendo portanto, interesse em reduzi-lo. Segundo YEE (1996), uma vez que óleos vegetais são os principais componentes oléicos da nossa dieta, seu valor nutricional é muito importante.

2. LITERATURA CITADA

- ABDUL-BAKI, A.A. Biochemical aspects of seed vigor. **HortScience**, v.15, n.6, p.765-771, 1980.
- ABDUL-BAKI, A.A., ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T.T., ed. **Seed Biology**. New York, academic Press, v.2, p.283-315, 1972
- AHRENS, D.C., PESKE, S.T. Influência da umidade ambiental sobre o teor de água e a qualidade fisiológica da semente de soja. **Informativo ABRATES**, v.3, n.4, p.40-45, 1993.
- ANDERSON, J.D., BAKER, J.E. Deterioration of seeds during aging. **Phytopatology**, v.73, p. 321-325, 1983.
- ARAÚJO, J.M.A. Oxidação de lipídios. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 22p. 1989 (**Boletim de extensão**, 283).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigor testing handbook**. East Lasing, AOSA, 1983. 88p. (Handbook on seed testing. Contribution, 32).
- AXELROD, B., CHEESBROUGHT, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Meth. Enzimology**, v.71, p.441-451, 1981.
- BENEDETTI, A., COMPORT, M., ESTERBAUER, H. Identification of 4-hydroxynoneal as a cytotoxic product from the peroxidation of liver microsomal lipids. **Biochem. Biophys. Acta**, v.620, p.281-96, 1980.

- BEWLEY, J.D. Membrane changes in seed as related to germination and the perturbation resulting from deterioration in storage. In:McDONALD JÚNIOR, M.B., NELSON, C.J. (Eds.). **Physiology of seed deterioration**. Madison: Crop Science Society of America, 1986. p.27-45.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 445p,1994.
- BRACCINI, A.L., REIS, M.S., SEDIYAMA, C.S., SEDIYAMA, T. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária da semente de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) com diferentes graus de impermeabilidade do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.16, n.2, p.195-200, 1994.
- CARVALHO, N.M. de O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. de O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, cap.1, p. 1-30, 1994.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Ed. Nelson Moreira de Carvalho e João Nakagawa, 4 ed., Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- CERQUEIRA, W.P., POPINIGIS, F. Sementes . In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. (Eds.). **A Soja no Brasil**.s.I.: ITAL, p.711-14, 1981.
- COSTA, N.P., FRANÇA NETO, J.B, HENNING, A. A., KRZYZANOWSKI, F.C., PEREIRA, L.A.G., BARRETO, J.N. **Efeito do retardamento de colheita de cultivares de soja sobre a qualidade da semente produzida**. In: EMBRAPA (Londria, PR). Resultados de pesquisa de soja 1982/83. Londrina, p.61-64, 1983.
- DASSOU, S., KUENEMAN, E.A. Screening methodology for resistance to field weathering of soybean seed. **Crop Science**, v.24, n.4, p.774-779, 1984.
- DELOUCHE, J.C. Environmental effects on seed development and seed quality. *Hortscience*, v.15, n.6, p.775-80, 1980.
- DELOUCHE, J.C., BASKINI, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, 1 (2), p.427-52, 1973
- ECONOMIC implications of modified soybeans traits. Ames, Iowa: Iowa Soybean Promotion Board, American Sybean Association, 88p. (Special Report, 92), 1990.

- FEUSSNER, I. KÜHN, H. WASTERNAK, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **Plant Science**, v.6, n.6, p.268-73, 2001.
- FEUSSNER, I. WASTERNAK, C., KINDL, H., KÜHN, H. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids in implicated mobilization during germination. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.11849-53, 1995.
- FRANÇA NETO, J.B., HENNING, A.A., KRZYZANOWSKI, F.C. Seed production and technology for the tropics. In: EMBRAPA. Centro Nacional de **Pesquisa de soja (Londrina, PR). Tropical soybean: improvement and production. Rome: FAO, 1994. P.217-240.**
- FRANÇA NETO, J.B., KRZYZANOWSKI, F.C. **Sementes enrugadas: novo problema da soja.** Londrina: EMBRAPA - CNPSo, 1990. 4p. (EMBRAPA - CNPSo. Comunicado Técnico, 49).
- GABRIEL, L., BONELLI, G., DIANZANI, M.U. Inhibition of colchicine binding to rat liver tubulin by aldehydes and by linoleic acid hydroperoxide. **Chemical-Biological Interactions**, v.19, p.101-09, 1997.
- GERMAN, J.B., KINSELLA, J.E. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. **J. Agr. Food Chem.** V.33, p.680-683, 1985.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, v.7, p.201-219, 1988.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases.. **Physiol. Plant.**, v.76, p. 249-253, 1989.
- KHAN, M.M., HENDRY, G.A.F., ATHERTON, N.M. et al. Free radical accumulation and lipid peroxidation in tests of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. **Seed Science Research**, v.6, n.3, p.101-107, 1996.
- KINNEY, A.J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Foods Lipids**, v.3, p.373-92, 1996.
- KITAMURA, K. Biochemical of lipoxygenase lacking mutants. **Agric. Biol. Chemic.**, v.48, p.2339-2346, 1984.
- KITAMURA, K., DAVIES, C.S., KAIZUMA, N., NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.**, v.23, p.924-927, 1983.

- KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.S. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. In: **Informativo ABRATES**, v.1, p.15-50, 1991.
- KRZYZANOWSKI, F.C., GILLIOLI, J.L., MIRANDA, L.C. Produção de sementes no cerrado. In: ARANTES, N.E., SOUZA, P.I.M. (Ed). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, p. 465-522, 1993.
- LAKOKI, J.W., EMKEN, E.A., LAW, J.H., KEZON, F. Kenetic analysis of action of soybean lipoxygenase on linolenic acid. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6001-6006, 1976.
- MACK, A. J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. **Current Topics in Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154, 1987.
- MARCOS FILHO, J., PESCARIN, H.M.C., KOMATSU, Y.H., DEMÈTRIO, C.G.B., FANCELLI, A.L. Testes para avaliação do vigor de sementes de soja e sua relação com a emergência das plântulas em campo. **Pesq. Agrop. Bras.**, Brasília, v.19, p. 605-13, 1984.
- MARCOS FILHO, J., CICERO, S.M., SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, FEALQ, 1987. 230p.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília. M. A. AGIPLAN. 289p., 1985.
- QUEIROZ, T.F.N. **Qualidade fisiológica de sementes de genótipos de soja sem lipoxigenases**. Viçosa, UFV, 56p., 2000 (Tese de Mestrado).
- REIS, W.J.P., ROCHA, V.S., REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., SEDIYAMA, C.S. Correlação entre a evolução de n-hexanal e aldeídos totais e a germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Ceres**, v.36, n.203, p.27-37, 1989.
- RUSSOM, Z. Effect of storing period and type of storage on seed germination of American, Indonesian soybean lines and their crosses. **Oléagineux**, Paris, v.38, n.7, p.439-41, 1983.
- SANTOS, I.C., REIS, W.J.P., MOREIRA, M.A., ET AL. Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação e o vigor de sementes de soja. **Rev. Ceres**, v.40, n.231, p.438-44, 1993.
- SANZ, L.C., PÉREZ, A.G., OLIAS, J.M. **Informacion. La Lipoxigenasa en el Reino Vegetal I**. Propriedades. Sevilha, España: Instituto de la Grasa y sus Derivados, V.43, Fasc.4, p.231-39, 1992. 1992.

- SEDIYAMA, T., REIS, M.S., SEDIYAMA, T. et al. **Produção de sementes de soja em Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1981. 61p.
- SUDA, I., HAJIKA, M., NISHIBA, Y., FURUTA, S., IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.742-747, 1995.
- TEKRONY, D.M., EGLI, D.B. Relationship of seed vigor to crop yield: a review. **Crop Science**, v.31, n.3, p.816, 822, 1991.
- TRAWATHA, S.E., TEKRONY, D.M., HILDEBRAND, D.F. Relationship of soybean seed quality to fatty acid and C6-aldehyde levels during storage. **Crop Science**, v.35, n.5, p.1415-1422, 1995.
- VIDAL, R.M.R., MOREIRA, M.A, PINHEIRO, W.J. ROCHA, V.S., RESENDE, S.P., SEDIYAMA, C.S. Relação entre vigor e alterações bioquímica nagerminação de sementes de soja. **Revista Brasileira de fisiologia vegetal**, v.4, n.1, p.49-53, 1991.
- VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal:FUNEP, 1994. 164p.
- WILSON JR., D.O., McDONALD JR., M.B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Sci. and Techn.**, v.14, p.229-300, 1986.
- YADAV, N.S. Genetic manipulation of soybean oil quality. In: VERMA, D.P.S., SHOEMAKER, R.C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, p.165-1881, 1996.
- YEE, Y.B. An updatde and review of soybean oil in heath and medical researh. **Technical Bulletin: American Soybean Association**, 1996.
- ZANG, M., YOSHIYAMA, M., NAGASHIMA, Y., YOSHIOKA, T., ESASHI, T. Ageing of soybean seeds in relation to metobolism at different relative humidities. **Plant and Cell Physiology**. v. 36, p.1189-95, 1995.

RETARDAMENTO DE COLHEITA COMO MÉTODO DE DIFERENCIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA PARA QUALIDADE DE SEMENTES

RESUMO - O retardamento de colheita após o estágio R8 de maturação, muitas vezes, é considerado responsável pela redução da germinação e vigor de sementes de soja, podendo, desta forma, ser um método adequado para diferenciar genótipos em função da qualidade de suas sementes. Utilizando-se quatro genótipos do Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV), este trabalho teve como objetivo avaliar se o retardamento de colheita pode se constituir em método eficiente para a seleção de genótipos com alta qualidade de sementes. Foram utilizadas sementes de genótipos identificados por: LOX⁻Lin^b (ausência de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico); LOX⁺Linⁿ (presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico); LOX⁻Linⁿ (ausência de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico) e LOX⁺Lin^b (presença de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico). A confirmação das características dos genótipos foi realizada por testes colorimétricos e teste de determinação de atividade enzimática para lipoxigenase e cromatografia gasosa para os teores de ácido linolênico. As sementes foram colhidas nos estádios R8, R8+15 dias e R8+30 dias e submetidas aos testes de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência e condutividade elétrica, emergência em leito de areia e aldeídos totais. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, com 4 repetições. Após a análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. O retardamento de colheita realizado a partir do estágio R8+15 dias foi eficaz em diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos estudados. Em geral, sementes dos genótipos sem lipoxigenases mostraram melhor qualidade fisiológica de sementes.

PALAVRAS-CHAVE: Retardamento de colheita, lipoxigenase, ácido linolênico e qualidade fisiológica de sementes de soja

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja foi responsável por uma verdadeira revolução na agricultura nacional, tornando-se, em poucos anos, um dos principais itens de exportação.

A qualidade de sementes de soja é um fator de extrema importância para a expansão desta cultura em regiões tropicais e subtropicais. Diversas técnicas podem ser utilizadas para a produção de sementes de melhor qualidade em tais regiões como, por exemplo a localização dos campos de produção em regiões propícias para a produção de sementes, escolha de épocas de semeadura específicas e controle de doenças pela aplicação de fungicidas foliares. Entretanto, o melhoramento genético para qualidade de sementes é, sem dúvida, o método mais eficaz para alcançar ganhos de qualidade.

Um maior uso da soja, como fonte de proteínas na alimentação humana tem encontrado dificuldades, principalmente em razão do seu sabor característico ("beany flavor"). Outro aspectos inerentes à qualidade da soja, considerados relevantes pela indústria de alimentos, é, dentro outros, o teor de ácido linolênico no óleo, responsável pela baixa estabilidade dos produtos de soja. O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja da Universidade Federal de Viçosa, afim de desenvolver linhagens especiais para a agroindústria, criou um valioso germoplasma contendo, dentre outros, genes para ausência de lipoxigenase e baixos teores de ácido linolênico.

O sucesso de um programa de melhoramento de produção de diversas espécies agrícolas, propagadas por meio de sementes, depende da utilização de genitores superiores. Além de possuir elevado potencial de produtividade, resistência às doenças e insetos, ampla adaptação ambiental e alguns parâmetros especiais, como qualidade de fibra e de grão (KRZYZANOWSKI, 1998), essas cultivares devem produzir sementes de alta qualidade, o que assegurará a obtenção de estandes adequados de plantas. Pensando nisso,

torna-se de extrema importância o envolvimento de tecnólogos de sementes em programas de melhoramento genético onde, o amplo conhecimento de métodos de avaliação de qualidade das sementes propicia o desenvolvimento de técnicas de seleção de genótipos para a qualidade de sementes.

A qualidade fisiológica das sementes é influenciada diretamente pelo genótipo, sendo máxima por ocasião da maturidade fisiológica; nesta fase, o peso de matéria seca, a germinação e o vigor geralmente atingem valores máximos. A partir deste momento, alterações degenerativas começam a ocorrer, de modo que a qualidade fisiológica é mantida ou decresce, dependendo das condições ambientais no período que antecede a colheita, da condução dos processos de colheita, secagem, beneficiamento e das condições de armazenamento (DELOUCHE e BASKIN, 1973; McDONALD Jr., 1975).

Segundo SEDIYAMA et al. (1981), a colheita da soja deve ser feita de preferência logo após a maturação fisiológica. Entretanto, nem sempre esta é a realidade, principalmente se a colheita coincide com períodos chuvosos, que podem causar danos irreparáveis à qualidade dessas sementes. Em condições climáticas favoráveis, os problemas podem não se manifestar, porém a ocorrência de chuvas ou orvalho, associados a altas temperaturas, diminuem a qualidade das sementes, à medida que a colheita é retardada.

As sementes de soja são extremamente sensíveis à deterioração no período em que permanecem no campo até atingirem o teor de água adequado para a colheita. Para SEDIYAMA et al. (1981), o nível de tolerância à deterioração no campo difere entre cultivares e entre ambientes, porém o ambiente e, principalmente, as condições climáticas, como alta temperatura e precipitação, são mais importantes que o tempo de permanência da semente no campo após a maturação fisiológica.

Vários métodos podem ser utilizados para seleção de genótipos de soja para a alta qualidade das sementes e, dentre eles, os métodos mais utilizados para seleção de genótipos de soja para a qualidade de sementes, segundo FRANÇA NETO et al. (1994) são os que utilizam os princípios do envelhecimento acelerado, retardamento de colheita e de determinação das

características do tegumento, como permeabilidade e conteúdo de lignina. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo, avaliar a eficiência do retardamento de colheita como método para a seleção de genótipos com características contrastantes para a enzima lipoxigenase e teor de ácido linolênico, com alta qualidade fisiológica de sementes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material genético e procedimentos utilizados

Este trabalho foi conduzido no Campo Experimental Professor Diogo Alves de Mello, no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia e em Laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Os materiais utilizados foram oriundos do cruzamento entre a linhagem americana BARC-12 (que possui baixo teor de ácido linolênico, cerca de 3%), desenvolvida pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland, EUA e a linhagem UFV TN (derivada de Doko RC, possuindo alelos nulos para as três isoenzimas lipoxigenases) obtida pelo Programa de Melhoramento de Soja da UFV. Quatro genótipos similares fenotipicamente, mas contrastantes quanto à presença de LOX e quanto ao teor de ácido linolênico, cultivados na mesma época e local foram utilizados (Quadro 1).

Quadro 1 – Diferentes genótipos formados de acordo com as características estudadas.

Genótipos	Lipoxigenase	Ácido linolênico	Símbolo
1	Ausência	Baixo	LOX ⁻ Lin ^b
2	Presença	Normal	LOX ⁺ Lin ⁿ
3	Ausência	Normal	LOX ⁻ Lin ⁿ
4	Presença	Baixo	LOX ⁺ Lin ^b

O plantio das sementes dos genótipos em F7 foi efetuado dia 12/12/01. As sementes foram plantadas no campo em 15 fileiras de 6 metros. Cada fileira foi colhida individualmente. Do material correspondente a cada fileira foram tomadas, aleatoriamente, 10 sementes para a realização de microanálises para a confirmação das características em cada grupo. Cada linha de cada genótipo foi colhida individualmente, em três épocas diferentes e subsequentes, com retardamento de colheita, para determinar a deterioração e perda de qualidade fisiológica das sementes desses genótipos nas diferentes épocas. A primeira colheita foi realizada dia 18/04/2002, para todos os genótipos, no estágio R8 da escala de FEHR e CAVINESS (1979), isto é, quando as plantas se encontravam com 95% de suas vagens maduras. As demais colheitas foram feitas 15 e 30 dias após a primeira.

Na Figura 1 são apresentados os dados umidade relativa, temperatura e precipitação referentes ao período de 03/04/2002 a 01/06/2002, que incluem os períodos de colheita das sementes em R8, R8+15 e R8+30, respectivamente.

Após a colheita, as plantas de cada linha, foram secas à sombra e trilhadas. As sementes foram limpas e, à medida que atingiam o grau de umidade desejado (cerca de 12%), uma pequena porção de sementes de cada linha foi coletada para confirmação, em laboratório, quanto à presença ou ausência de lipoxigenase e à composição de ácidos graxos na porção óleo nessas sementes. As sementes remanescentes de cada linha foram armazenadas em câmara fria à temperatura de 10°C e aproximadamente 50% de umidade relativa, condições que permaneceram até a realização dos testes de qualidade.

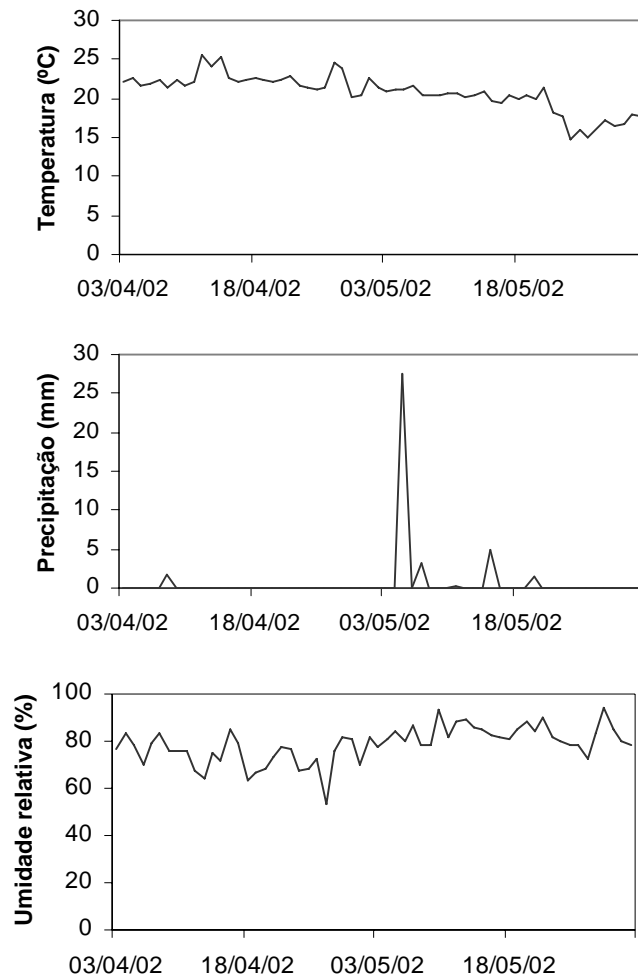


Figura 1 - Dados diários de umidade relativa do ar (%), temperatura média (°C) e precipitação (mm), no período de 03/04/02 a 01/06/02.

Antes do material ser acondicionado em câmara fria, foram realizadas determinações preliminares que forneceram informações a respeito do material estudado. Os resultados destas determinações encontram-se no Quadro 2.

Confirmada, em laboratório, a identidade de cada linha (lipoxigenase e ácido graxo), elas foram misturadas e homogeneizadas, constituindo assim, os genótipos. Posteriormente, as sementes de cada genótipo foram retiradas da câmara fria com dois dias de antecedência e colocadas à temperatura ambiente, para que a umidade das sementes entrasse em equilíbrio com o ambiente. Posteriormente, essas sementes tiveram sua qualidade fisiológica imediatamente avaliada por meio dos testes de germinação, primeira contagem

de germinação, envelhecimento acelerado, % e índice de velocidade de emergência das plântulas em substrato de areia, condutividade elétrica e aldeídos totais.

Quadro 2 - Dados médios da caracterização inicial dos genótipos estudados, onde G.u (Grau de umidade), C18:3 (teor de ácido graxo linolênico), LOX (isoenzima lipoxiganase), - (presença), + (ausência), Fus (*Fusarium spp.*), Pho (*Phomopsis spp.*), Ftot (Fungos totais) e três (E.C.) épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	E.C.	G.u (%)	Á.l (%)	LOX	Fus (%)	Pho (%)	Ftot (%)
LOX ⁻ Lin. ^b	R8	12,14	3,58	-	1	0	3
LOX ⁻ Lin. ^b	R8+15	12,70	3,82	-	1	0	3
LOX ⁻ Lin. ^b	R8+30	11,27	3,32	-	22	36	62
LOX ⁺ Lin. ⁿ	R8	11,43	10,08	+	4	0	8
LOX ⁺ Lin. ⁿ	R8+15	12,92	9,74	+	5	0	7
LOX ⁺ Lin. ⁿ	R8+30	10,47	10,15	+	22	34	59
LOX ⁻ Lin. ⁿ	R8	12,45	9,52	-	0	0	5
LOX ⁻ Lin. ⁿ	R8+15	13,0	9,88	-	2	0	4
LOX ⁻ Lin. ⁿ	R8+30	11,81	9,02	-	26	16	52
LOX ⁺ Lin. ^b	R8	12,87	3,44	+	1	0	5
LOX ⁺ Lin. ^b	R8+15	13,10	3,11	+	2	1	3
LOX ⁺ Lin. ^b	R8+30	11,47	3,38	+	24	46	77

2.2. Detecção das lipoxigenases 1 e 3 por meio do método colorimétrico

Conforme anteriormente discutido, o loco L1 está ligado ao loco L2, portanto não houve necessidade de análises para detecção da isoenzima lipoxigenase 2.

Na extração da isoenzima LOX 1 foram utilizados entre 5 e 10 mg de semente de soja raspada, envolvendo tegumento e cotilédones, em tubo de ensaio. As amostras foram mantidas submersas em 0,5 mL de água deionizada, por cinco minutos. Separadamente, em um becker, foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão borato de sódio 200 mM (pH 9,5), 2 mL de azul de metileno 100 mM, 3 mL de substrato linoleato de sódio 10 mM e 5 mL de água deionizada (solução suficiente para análise de 90 amostras). Para a detecção da LOX 1 as amostras foram submersas em água deionizada por 3 minutos em cada tubo de ensaio contendo 0,4 mL da solução preparada. Na semente de soja contendo LOX 1, há descoloração da solução e na semente de soja com ausência de LOX 1, a coloração é preservada.

Na extração da isoenzima LOX 3 foram utilizadas entre 5 e 10 mg de semente raspada, envolvendo tegumento e cotilédones, em tubo de ensaio. No tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de extrato de soja contendo somente a isoenzima LOX 2. O extrato contendo somente a LOX 2 foi obtido por meio da centrifugação a 13600g durante 15 minutos, 1 mg/mL (p/v) de sementes da linhagem CR 1,3 (sem LOX1 e 3), extraído em água deionizada. Separadamente em um becker, foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 6,8), 2 mL de β -caroteno com 50% de saturação em acetona, 3 mL de substrato linoleato de sódio 10 mM e 5 mL de água deionizada (solução suficiente para análise de 90 amostras). Para a detecção da lipoxigenase 3 colocou-se em cada tubo de ensaio contendo a soja raspada e extrato da LOX 2, 0,4 mL da solução preparada. Na semente de soja

contendo LOX 3, há o descoloramento rápido da solução e na semente de soja com ausência de LOX 3, a cor do β -caroteno (amarelado) é preservada.

2.3. Determinação da atividade de LOX 1 e 3.

Para extração de lipoxigenases 1 e 3 foram maceradas 10 mg de sementes em gral previamente resfriado e homogeneizado na presença de 600 mL de tampão tris 60 mM, pH 8,2, contendo CaCl_2 15 mM e sacarose 13% (p/v) e mantido a -20°C . O homogenato foi centrifugado a 13.600g por 20 minutos a 4°C para utilização do sobrenadante (extrato bruto). As atividades de LOX 1 e 3 foram determinadas espectrofotometricamente (OLIVEIRA et al., 1998). A determinação da atividade foi realizada medindo-se a absorvância após um período de 2 minutos a 234 e 280 nm para LOX 1 e LOX 3, respectivamente. As amostras de LOX 1 foram constituídas de 1 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 9,5, 6 mL de linoleato de sódio 10 mM e 2,5 mL de extrato bruto. As amostras de LOX 3 foram constituídas de 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8, 35 mL de linoleato de sódio 10 mM e 15 mL de extrato bruto.

2.4. Determinação de ácidos graxos

A identificação e quantificação de ácidos graxos (oléico e linolênico) presentes nas sementes de soja foram realizadas por cromatografia gasosa. As sementes a serem analisadas foram cortadas e trituradas manualmente por meio de uma lâmina. A cada amostra de 15 mg do material triturado foi adicionado 1 mL de hexano, sendo a mistura mantida a 4°C por cerca de 16 horas, sob atmosfera de N_2 . Após esse período, a solução de lipídios e hexano foi transferida para outro tubo e o solvente, evaporado por borbulhamento de N_2 . Para a obtenção de ésteres metílicos, foi utilizada uma modificação da metodologia descrita por BUBECK et. al. (1989). À fração lipídica foi adicionado 0,4 mL de metóxido de sódio 1 M, e os tubos foram mantidos em banho maria, a 30°C , por cerca de uma hora. Em seguida, foram

acrescentados 1 mL de água e 1 mL de hexano, e após uma hora. Com auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 mL da fase orgânica foi transferido para tubos limpos, aos quais foi adicionado sulfato de sódio anidro. Finalmente, 1 mL da fase orgânica foi injetado em cromatógrafo a gás. Foram utilizadas as seguintes condições de análise: temperatura da coluna, 225 °C; do injetor, 245 °C; do detector, 280 °C., e como gás de arraste foi utilizado o nitrogênio com um fluxo de 1,3 mL/min.

2.5. Determinação do grau de umidade das sementes

Para a determinação do grau de umidade, utilizou-se o método da estufa $105 \pm 3^\circ \text{C}$ durante 24 horas (BRASIL, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem média (base úmida) para cada genótipo.

2.6. Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes semeadas em papel germitest umedecido com água destilada utilizando um volume equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Foram confeccionados rolos, os quais foram colocados em germinador regulado para a temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. As avaliações foram realizadas aos cinco e oito dias após a instalação do teste, efetuadas segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais obtidas para cada genótipo.

2.7. Primeira contagem de germinação

Foi conduzido conjuntamente ao teste de germinação, consistindo do registro das porcentagens de plântulas normais encontradas na primeira contagem feita no quarto dia após a instalação do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais por genótipo.

2.8. Teste de envelhecimento acelerado

Seguindo a metodologia descrita por McDONALD e PHANEENDRANATH (1978), foram colocadas 250 sementes sobre tela, em caixas gerbox adaptadas (11 x 11 x 3,5 cm) contendo, ao fundo, 40 mL de água desmineralizada. Em seguida, as caixas foram tampadas, de modo a se obter 100% de umidade relativa em seu interior, foram mantidas em incubadora tipo BOD por 48 horas a 41°C, conforme recomendação de KRZYZANOWSKI et al. (1991). Após o período de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, em quatro repetições de 50 sementes, empregando-se o método descrito no item 2.6. As avaliações foram realizadas cinco dias após a instalação do teste, sendo os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais.

2.9. Teste de emergência em leito de areia

Em bandejas plásticas (0,27 x 0,32 x 0,06 m) contendo areia previamente lavada e esterilizada com brometo de metila, foram semeadas 200 sementes, em cinco repetições de 40 sementes por sulco. Este teste foi realizado em casa de vegetação, e as irrigações foram realizadas sempre que necessário. A avaliação e contagem de plântulas normais foram feitas no décimo dia após a instalação do teste, quando a porcentagem de germinação tornou-se constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais emergidas, de acordo com os critérios estabelecidos na Regra para Análise de Semente (BRASIL, 1992).

2.10. Determinação do índice de velocidade de emergência

Este teste foi instalado com a mesma metodologia descrita para o teste de porcentagem de emergência em leito de areia, descrito no item 2.9, diferindo apenas na avaliação. Foram feitas observações diárias e, a partir do quinto dia, foi computado diariamente e no mesmo horário o número de plântulas que apresentavam os cotilédones ainda fechados, perpendicular ao

eixo longitudinal do hipocótilo, até o décimo dia. Para a avaliação deste teste, foi empregado o índice de velocidade de emergência (IVE), sendo calculado através da fórmula de MAGUIRE (1962):

$$IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$$

Em que

IVE = índice de velocidade de emergência;

E_1, E_2, \dots, E_n = número de plântulas emergidas, computadas na primeira, Segunda, ..., última contagem; e

N_1, N_2, \dots, N_n = número de dias da sementeira à primeira, Segunda, ..., última contagem.

2.11. Condutividade elétrica

Para esta avaliação foi adotada a metodologia proposta pelo comitê de vigor da AOSA (AOSA, 1983) e relatada por MARCOS FILHO et al. (1987). Quatro repetições de 25 sementes para cada genótipo foram pesadas com precisão de 0,01g e colocadas em copos plásticos (6 cm de base) contendo 75 mL de água destilada. Em seguida, foram levadas para BOD regulada à temperatura constante de 25°C, onde permaneceram por um período de embebição de 24 horas. Decorridos este período, a condutividade elétrica da solução foi determinada através de leitura em condutímetro Digimed Cd-20 e os valores médios obtidos para cada genótipo foram expressos em $\mu\text{mhos/cm/g}$ de semente.

2.12. Teste de sanidade

Utilizou-se o método do papel-filtro (*Blotter Test*) para identificação dos patógenos das sementes. Em caixas gerbox previamente lavadas com detergente e desinfetadas com hipoclorito de sódio 2%, foram colocadas seis folhas de papel-filtro autoclavadas embebidas em solução de água desmineralizada e tratada com esteptomicina 100mg/l, na qual, em condições assépticas. Em cada uma caixa foram coladas 100 sementes de cada

tratamento. As sementes utilizadas foram pré-tratadas com álcool 70% e com hipoclorito de sódio 2% (40% de água sanitária + 60% de água destilada), durante um minuto cada, sendo em seguida lavadas com água desmineralizada e distribuídas de maneira eqüidistantes nas caixas gerbox.

As sementes foram incubadas em condições ambientais de laboratório durante sete dias, segundo HENNING (1987). Após o crescimento e esporulação dos patógenos, fez-se a identificação e foram determinados a porcentagem de sementes infectadas por *Alternaria sp.*, *Cercospora dematium*, *Cercospora kikuchii*, *Chaetomium sp.*, *Fusarium spp.* e *Phomopsis spp.* e o total de fungos.

2.13. Análise estatística

Antes de processar as análises de variância, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Considerando que todas as variáveis apresentaram apenas ligeiro desvio de normalidade, optou-se por analisá-las sem transformação. As análises de variância foram processadas em esquema fatorial 4 x 3 (quatro genótipos e três épocas de colheita), em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas quatro repetições para a primeira contagem (PCON), teste padrão de germinação (GERM), envelhecimento acelerado (ENVA), condutividade elétrica (COND), e cinco repetições para o teste de emergência em leito de areia (TELA) e índice de velocidade de emergência (INVE). As médias relativas aos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tuckey, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram processadas com o uso do software SAS (SAS, 1989).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar pelo Quadro 3 e pela Figura 2, que todas as características atribuídas aos genótipos foram confirmadas, ou seja,

fenotipicamente os genótipos são semelhantes, porém com características distintas para ausência e presença de lipoxigenase e teor de ácido linolênico.

Os resumos das análises de variância relativas aos dados de determinação do grau de umidade, primeira contagem, teste padrão de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e aldeídos totais encontram-se no Quadro 3.

Para cada variável analisada, verificou-se um conjunto diferenciado de efeitos significativos das diferentes fontes de variação. Nota-se pelo Quadro 3, em que notadamente, as épocas de colheita E2 (R8+15) e E3 (R8+30) estão contribuindo para a significância da interação, exceto, para germinação, é possível fazer uma diferenciação dos genótipos em relação ao retardamento de colheita.

Quadro 3 - Resumo da análise de variância referente a diversos testes realizados em sementes de soja de quatro genótipos, colhidas em três épocas de colheita.

F.V.	Valores de F							
	G.L	GERM	PCON	ENVA	COND	G.L	INVE	TELA
Genótipos (G)	3	20,46**	79,96**	51,16**	2,73	3	46,47**	39,79**
Épocas (E)	2	1076,15**	1401,41**	1243,31**	157,15**	2	913,81**	1022,11**
G x E	6	9,90**	15,34**	20,44**	8,47**	6	16,73**	17,65**
G/E1	3	0,29	8,18**	0,94	3,98*	3	1,16	0,19
G/E2	3	14,36**	76,0**	85,33**	5,03**	3	36,45**	25,87**
G/E3	3	25,61**	26,25**	5,77**	10,66**	3	42,32**	49,02**
Erro	36					48		
Média		72,21	62,92	56,5	91,5		7,54	71,33
C.V. (%)		6,06	5,90	7,73	10,09		5,34	6,87

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

3.1 Teste de germinação.

Os valores médios obtidos no teste de germinação (Quadro 4) indicam que os quatro genótipos não diferiram significativamente entre si no estágio R8, porém, a partir do estágio R8+15 já foi possível observar uma diferenciação entre os genótipos. No estágio de R8+15 dias, o teste de germinação revelou um desempenho superior dos genótipos LOX⁻Lin^b, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b em relação ao LOX⁺Linⁿ. No estágio R8+30 houve uma

diferenciação ainda maior, onde , os genótipos LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ foram superiores ao genótipos LOX⁺Linⁿ e LOX⁺Lin^b, os quais, não diferiram significativamente entre si.

Apesar do teste de germinação, por si, não permitir uma avaliação do potencial fisiológico das sementes em diferentes condições (vigor), ele nos fornece informações sobre o potencial de uma amostra para germinar sob condições ótimas de ambiente. Conforme o Quadro 4, percebe-se que esse potencial tende a decrescer à medida em que as sementes permanecem no campo após sua maturação fisiológica. Esse decréscimo foi mais acentuado nos genótipos que apresentam a enzima lipoxigenase em sua constituição, resultado esse, discordante do apresentado por MARTINS (2001) e DIAS (1999), que constataram que sementes de soja sem lipoxigenase são mais susceptíveis à deterioração no campo, provocada pelo retardamento de colheita.

Quadro 4 - Valores médios, em porcentagem, de plântulas normais obtidas no teste de germinação de sementes de soja em quatro genótipos: LOX⁻Lin^b, LOX⁺Linⁿ, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b, em função de três épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	Épocas de colheita		
	R8	R8+15	R8+30
LOX ⁻ Lin ^b	97,5 a	95,0 a	38,0 a
LOX ⁺ Lin ⁿ	96,5 a	76,5 b	25,5 b
LOX ⁻ Lin ⁿ	96,5 a	93,0 a	42,5 a
LOX ⁺ Lin ^b	99,0 a	88,0 a	18,5 b

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

3.2 Primeira contagem do teste de germinação

A primeira contagem baseia-se no princípio de que as amostras que apresentam maior porcentagem de plântulas normais na data da primeira contagem do teste de germinação são mais vigorosas e, indiretamente indicam uma tendência de rapidez de germinação (BRASIL, 1992).

Nota-se pelo Quadro 5 que a partir do estágio R8 já foi possível diferenciar os genótipos. As médias, neste estágio, indicam uma inferioridade de LOX⁺Linⁿ em relação aos demais, que manteve o mesmo comportamento até o estágio de R8+15. No estágio de R8+30, houve comportamento semelhante, verificado no teste de germinação em que os genótipos que não apresentam lipoxigenase em sua constituição (LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ), apresentaram médias superiores aos outros dois genótipos (LOX⁺Linⁿ e LOX⁺Lin^b).

Quadro 5 - Valores médios, em porcentagem, de plântulas normais obtidas no teste de primeira contagem de sementes de soja em quatro genótipos: LOX⁻Lin^b, LOX⁺Linⁿ, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b, em função de três épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	Épocas de colheita		
	R8	R8+15	R8+30
LOX ⁻ Lin ^b	91,5 a	86,5 a	31,5 a
LOX ⁺ Lin ⁿ	82,5 b	51,0 b	13,0 b
LOX ⁻ Lin ⁿ	91,0 a	80,5 a	32,0 a
LOX ⁺ Lin ^b	95,0 a	82,0 a	18,5 b

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

3.3 Envelhecimento acelerado

Com base no Quadro 6, verifica-se que não houve diferença significativa entre as médias dos genótipos no estágio R8, embora pode-se notar, que em valores numéricos o LOX⁺Linⁿ apresentou menor média que os demais. No R8+15 já foi possível diferenciar significativamente os genótipos. Neste estágio, as médias dos genótipos LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ foram superiores às demais médias. No estágio R8+30 ocorreu uma ordenação de médias semelhantes para todos o genótipo, caracterizando o LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ como superiores e os genótipos LOX⁺Linⁿ como inferior. Cabe ressaltar que neste último estágio, houve essa semelhança estatística, muito provavelmente, por serem, tanto o retardamento de colheita, onde as sementes ficam

armazenadas no campo à mercê das condições ambientais como o envelhecimento acelerado em que as sementes são submetidas à alta temperatura e alta umidade relativa, dois métodos de estresse. Nestas condições as sementes foram bastante sensíveis às condições de envelhecimento acelerado e conseqüentemente houve um efeito cumulativo de estresse. No final da avaliação do teste em envelhecimento acelerado todos os genótipos já estavam bastante comprometidos em relação à sua germinação, fato que dificultou sua diferenciação neste estágio de maturação.

Quadro 6 - Valores médios, em porcentagem, de plântulas normais obtidas no teste de envelhecimento acelerado de sementes de soja em quatro genótipos: LOX⁻Lin^b, LOX⁺Linⁿ, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b, em função de três épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	Épocas de colheita		
	R8	R8+15	R8+30
LOX ⁻ Lin ^b	92,5 a	82,5 a	18,5 a
LOX ⁺ Lin ⁿ	88,0 a	36,0 c	8,0 b
LOX ⁻ Lin ⁿ	91,0 a	73,5 a	19,5 a
LOX ⁺ Lin ^b	92,5 a	62,0 b	14,0 ab

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

De acordo com Association of Official Seed Analysis - AOSA (1983), como os testes de vigor constituem índices de qualidade fisiológica mais sensíveis do que o teste de germinação, qualquer um dos eventos que caracterizam o processo de deterioração, anterior à perda total do poder germinativo das sementes, pode se constituir em fundamento para o desenvolvimento de um teste de vigor.

Nessa situação, os testes que avaliam indiretamente a permeabilidade do sistema de membrana celular, como o de condutividade elétrica, seriam os mais sensíveis. Por outro lado, conforme a seqüência hipotética proposta por DELOUCHE e BASKIN (1973), o decréscimo do potencial de armazenamento é a segunda manifestação fisiológica da deterioração, após a

redução da velocidade de germinação. Consequentemente, o teste de envelhecimento acelerado pode ser considerado como um dos mais sensíveis para a avaliação do vigor, dentre os disponíveis.

3.4 Condutividade elétrica

Os valores médios obtidos pelo teste de condutividade elétrica (Quadro 7), mostraram que houve uma diferenciação entre os genótipos no estágio R8 classificando os genótipos em ordem crescente de condutividade em: LOX^+Lin^n , LOX^+Lin^b , LOX^-Lin^b e LOX^-Lin^n . Em R8+15 dias verifica-se uma ordenação semelhante das médias caracterizando o LOX^-Lin^n como o de maior condutividade (menor vigor) e o LOX^+Lin^b como o de menor condutividade (maior vigor). Em R8+30 houve uma inversão dos valores médios obtidos em R8 dias, onde, o LOX^+Lin^n que em R8 apresentava-se com menor valor de condutividade, em R8+30 obteve o maior valor. Os demais genótipos não diferiram entre si no estágio R8+30 dias.

Para sementes de soja, segundo PAIVA AGUERO (1995), a condutividade elétrica pode estimar, com alto grau de precisão, o desempenho das mesmas no campo, dependendo das condições climáticas predominantes por ocasião da semeadura. Pode-se determinar valores ou faixas de valores de condutividade para sementes de soja, no sentido de inferir sob que condições de campo devem ser utilizadas, com possibilidade de maior ou menor sucesso. Este autor verificou que se pode obter ótima emergência de sementes de soja no campo, com condutividade de até 110 $\mu\text{mhos/cm/g}$, desde que as condições de campo sejam adequadas à germinação e à emergência das mesmas. Por outro lado, sob pequenas limitações para a germinação, a condutividade não pode ser superior a 90 $\mu\text{mhos/cm/g}$. Também evidências de variabilidade genética para a permeabilidade de membranas celulares em sementes de soja foram constatadas por KRYZANOWSKI et al. (1997), que observaram que este teste mostrou-se promissor para seleção de genótipos quanto à qualidade das sementes, com base nas diferenças de permeabilidade de membrana celular.

Neste contexto, pode-se inferir que até o estágio R8+15 todos os genótipos, teoricamente, obteriam uma boa emergência no campo (Quadro 7).

Quadro 7 - Valores médias, em $\mu\text{mhos/cm/g}$, obtidas no teste de condutividade elétrica em sementes de soja em quatro genótipos: LOX⁻Lin^b, LOX⁺Linⁿ, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b, em função de três épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	Épocas de colheita		
	R8	R8+15	R8+30
LOX ⁻ Lin ^b	70,73 b	77,5 ab	126,57 ab
LOX ⁺ Lin ⁿ	59,45 c	77,32 ab	144,27 a
LOX ⁻ Lin ⁿ	81,62 a	95,37 a	109,20 b
LOX ⁺ Lin ^b	67,20 bc	71,50 b	117,27 b

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

3.5 Índice de velocidade de emergência

Os valores médios para o índice de velocidade de emergência estão apresentados no Quadro 8. De acordo com estes valores verifica-se que o teste não foi sensível para detectar diferenças entre os genótipos no estágio R8 dias. No entanto, como no teste de germinação, em R8+15 dias já foi possível determinar diferenças significativas entre os genótipos, nos quais os genótipos LOX⁻Lin^b, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b foram superiores ao LOX⁺Linⁿ. Em R8+30 o referido teste revelou desempenho superior para os genótipos LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ em relação aos genótipos LOX⁺Linⁿ e LOX⁺Lin^b, confirmando a inferioridade destes dois genótipos, apontadas em outros testes anteriormente mencionados.

Este método baseia-se no princípio que os lotes (genótipos) que apresentam maior velocidade de germinação de sementes são os mais vigorosos, ou seja, que há uma relação direta entre a velocidade e o vigor das sementes.

Quadro 8 - Valores médios pelo teste do índice de velocidade de emergência de sementes de soja em quatro genótipos: LOX⁻Lin^b, LOX⁺Linⁿ, LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b, em função de três épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	Épocas de colheita		
	R8	R8+15	R8+30
LOX ⁻ Lin ^b	7,25 a	7,07 a	3,00 a
LOX ⁺ Lin ⁿ	7,07 a	4,90 b	0,93 b
LOX ⁻ Lin ⁿ	7,40 a	6,62 a	3,42 a
LOX ⁺ Lin ^b	7,52 a	7,31 a	1,57 b

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

3.6. Emergência em leito de areia

Os resultados das médias referentes ao teste de emergência em leito de areia estão apresentados no Quadro 9. Analisando as médias, nota-se que o referido teste forneceu resultados semelhantes aos de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado e índice de velocidade de emergência, ou seja, a partir de R8+15 foi possível fazer uma diferenciação significativa dos genótipos e, em R8+30 foi possível, significativamente agrupar os genótipos em dois grupos de acordo com sua qualidade fisiológica. Os genótipos superiores: LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ (sem lipoxigenase) e LOX⁺Linⁿ e LOX⁺Lin^b (com lipoxigenase).

De maneira geral, nota-se que os resultados do teste de emergência em leito de areia, conduzido sob condições não controladas de ambiente, foram superiores aos outros testes, conduzidos em laboratórios sobre rolo de papel. Segundo FRANÇA NETO e HENNING (1984), após a emergência das plântulas no leito de areia, os tegumentos contaminados por fungos permaneceriam na areia e não teriam contato com os cotilédones, como ocorre no rolo de papel, evitando o apodrecimento e contaminação. Ao longo do experimento pode-se notar, acrescentando o que foi comentado pelos referidos autores, que houve diminuição de infestação por fungos, quando comparadas a

outros métodos laboratoriais, provavelmente, pela exposição das plântulas à luz diária e também pela lixiviação de contaminantes provocada pela água de irrigação.

Quadro 9 - Valores médios, em porcentagem, de plântulas normais emergidas obtidas no teste de emergência em leito de areia de sementes de soja em quatro genótipos: LOX⁻Lin^b (G1), LOX⁺Linⁿ (G2), LOX⁻Linⁿ (G3), LOX⁺Lin^b (G4), em função de três épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	Épocas de colheita		
	R8	R8+15	R8+30
LOX ⁻ Lin ^b	96,0 a	96,0 a	40,0 a
LOX ⁺ Lin ⁿ	95,0 a	71,5 b	14,0 b
LOX ⁻ Lin ⁿ	94,0 a	89,0 a	47,5 a
LOX ⁺ Lin ^b	96,0 a	94,0 a	23,0 b

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

3.7 Considerações finais

De uma maneira geral, para as condições em que este experimento foi conduzido e os testes utilizados, observou-se os que diferentes genótipos responderam de maneira diferenciada quanto à qualidade fisiológica de suas sementes. Os resultados indicaram que a enzima lipoxigenase, mais que o teor de ácido linolênico, afetou a qualidade fisiológica das sementes estudadas em diferentes épocas de colheita.

Este trabalho pôde mostrar que o retardamento de colheita, quando conciliado a métodos de análise de sementes mais usais, como por exemplo o envelhecimento acelerado, pode vir a ser uma metodologia simples e prática na diferenciação de genótipos quanto à qualidade de sementes. Uma vez que são dois métodos que submetem, na maioria das vezes, as sementes à condições de estresse, a análise conjunta dos dados obtidos com esses dois métodos poderiam ser relacionadas com o potencial fisiológico dessas sementes e, conseqüentemente, serem úteis também na obtenção de informações rápidas sobre longevidade das sementes.

Diante dos resultados obtidos, em relação ao retardamento de colheita, pode-se concluir que os genótipos que não possuíam a enzima lipoxigenase em sua constituição produziram sementes de melhor qualidade fisiológica, o que foi observado em praticamente todos os testes utilizados. A variação no teor de ácido linolênico não afetou a qualidade fisiológica de sementes, provavelmente, por este ser um substrato para a enzima lipoxigenase. Este fato pode vir a ser melhor entendido quando se compara LOX⁺Linⁿ, que apresentou a pior qualidade fisiológica de sementes, possuidor de um dos principais substratos para a atuação da enzima lipoxigenase e, conseqüentemente, avançar no processo de deterioração das sementes.

Em relação ao LOX⁺Lin^b, observou-se que suas sementes tiveram qualidade fisiológica intermediária em relação aos genótipos LOX⁻Lin^b e LOX⁻Linⁿ, de melhor qualidade fisiológica e o LOX⁺Linⁿ, comentado acima como o de pior qualidade fisiológica. Esta posição intermediária do genótipo quatro, provavelmente, pode ser devido aos teores reduzidos do substrato da enzima lipoxigenase, ou seja, ácido linolênico.

De modo geral, para todos os genótipos, as sementes colhidas no estágio R8+30 dias apresentaram qualidade fisiológica inferior quando comparadas às colhidas nos demais estádios. Esse fato deve-se principalmente pela ocorrência de chuvas e altas temperaturas neste período (Figura 1). Como as sementes de soja são muito sensíveis à ação de fatores externos, condições climáticas desfavoráveis, tais como as que ocorreram, resultaram na redução do vigor dessas sementes, porém em intensidade diferenciada entre os genótipos.

Analisando de forma conjunta os testes utilizados, foi possível constatar, de uma maneira geral que, o retardamento de colheita foi eficaz em diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos estudados, principalmente, quando se utilizou o teste de envelhecimento acelerado. A colheita realizada a partir do estágio R8+15 dias permitiu diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos. Os resultados indicaram que presença de lipoxigenase e teor de ácido linolênico interferem na qualidade

fisiológica das sementes de soja. Em geral, sementes de soja sem lipoxigenase apresentaram maior vigor e maior tolerância ao retardamento de colheita.

4. CONCLUSÕES

Os dados permitiram concluir que:

- O método de retardamento de colheita, após o estágio R8 de maturação, mostrou-se adequado para diferenciar genótipos em função de qualidade de suas sementes, principalmente, quando em associação com o método de envelhecimento acelerado;
- A colheita de sementes de soja realizada a partir do estágio de maturação R8+15 dias, na maioria dos testes, permitiu diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos estudados;
- No método de retardamento de colheita, a deterioração das sementes dos genótipos estudados foi mais influenciada pela enzima lipoxigenase do que do teor de ácido linolênico;
- Os genótipos que não apresentaram a enzima lipoxigenase em sua constituição apresentaram melhor qualidade fisiológica de sementes.

5. LITERATURA CITADA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigor testing handbook**. East Lasing, AOSA, 1983. 88p. (Handbook on seed testing. Contribution, 32).
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 365p, 1992.
- BUBECK, D.M., FEHR, W.R., HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Sci.**, v.29, p.652-56, 1989.
- DELOUCHE, J.C., BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Sci. & Technol.**, Zürich, 1(2), p.427-52, 1973.
- DIAS, A.C.P. **Atividade de lipoxigenases durante a germinação e qualidade fisiológica de sementes de soja**. Viçosa, UFV, 1999. Dissertação (Tese MS) - Universidade Federal de Viçosa, 68p., 1999.
- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University; Cooperative Extension Service. 12p., 1979.
- FRANÇA NETO, J.B., HENNING, A.A., KRZYZANOWSKI, F.C. Seed production and technology for the tropics. In: EMBRAPA. Centro Nacional de **Pesquisa de soja (Londrina, PR). Tropical soybean: improvement and production**. Rome: FAO, 1994. P.217-240.
- FRANÇA NETO, J.B., HENNING, A.A., **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina, EMBRAPA-CNPSSo, 39p., 1984. (Circular Técnico, 9).
- HENNING, A.A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: SOAVE, J., WETZEL, M.M.V.S. (Eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargil. P.441-53, 1987.
- KRZYZANOWSKI, F.C. Relationship between seed technology and federal plant breeding programs. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, p.83-87, 1998.
- KRZYZANOWSKI, F.C., FRANÇA NETO, J.B., COSTA, N.P., HENNIG, A.A., KASTER, M. **Permeabilidade de membrana de célula de sementes de soja**. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da

- Embrapa soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 1996. Londrina, p.145-48, 1997 (Documentos, 104).
- KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.S. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. In: **Informativo ABRATES**, v.1, p.15-50, 1991.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, p.176-77, 1962.
- MARCOS FILHO, J., CICERO, S.M., SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, FEALQ, 1987. 230p.
- MARTINS, C.A.O. **Avaliação de caracteres agronômicos de linhagens de soja com ou sem lipoxigase nas sementes**. Viçosa, UFV, 109p., 2001 (Tese Doutorado).
- McDONALD JR., M.B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proc. Assoc. Off. Seed Anal.**, Lansing, v.65, p.109-39, 1975.
- McDONALD JR., M.B., PHANEENDRANATH, B.R. A modified accelerated aging vigor test procedure. **Journal of Seed Technology**, v.3, n.1, p.27-37, 1978.
- OLIVEIRA, D.A, PIOVESAN, N.D., MORAES, R.M.A., ROCHEBOIS, G.B., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of the three genotypic classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques.**, v.12, p.71-74, 1998.
- PAIVA AGUERO, J.A. **Correlação de condutividade elétrica e outros testes de vigor com emergência de plântulas de soja n campo**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1995.92p. (Tese de Mestrado).
- REIS, W.J.P., ROCHA, V.S., REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., SEDIYAMA, C.S. Correlação entre evolução de n-hexanal e aldeídos totais e a germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Ceres**, v.36, n.36, p.27-37, 1989.
- SEDIYAMA, T. SILVA, R.F., THIÉBAUT, J.T.L., REIS, M.S., FONTES, L.A.N., MARTINS, O. Influência da época de semeadura e do retardamento de colheita sobre a qualidade das sementes e outras características agronômicas das variedades de soja UFV-1 e UFV-2, em Capinópolis, MG. **SOJA. SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA**, 2, EMBRAPA. Anais..., v.1, p.645-59, 1981.

SAS. Institute Inc. **SAS/STAT user's guide**. Version 6, 4.ed., v.2. Cary: SAS Institute, 846p., 1989.

SUDA, I., HAJIKA, M., NISHIBA, Y., FURUTA, S., IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.742-747, 1995.

WILSON JR., D.O., McDONALD JR., M.B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Sci. and Techn.**, v.14, p.229-300, 1986.

RELAÇÃO ENTRE RETARDAMENTO DE COLHEITA, LIPOXIGENASE, TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA

RESUMO – A perda de vigor e viabilidade da semente, causada por condições de campo e armazenagem desfavoráveis, tem sido um grande problema na produção de sementes de soja enquanto que a obtenção de cultivares com sementes de alta qualidade fisiológica tem sido um desafio para os melhoristas no Brasil. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das características ausência e presença de lipoxigenase e teor de ácido linolênico na qualidade fisiológica de sementes. Foram utilizadas sementes dos genótipos identificados por: LOX⁻Lin^b (ausência de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico); LOX⁺Linⁿ (presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico); LOX⁻Linⁿ (ausência de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico); LOX⁺Lin^b (presença de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico). As sementes foram colhidas nos estádios R8, R8+15 e R8+30 dias. Parte dessas sementes foram submetidas, imediatamente, aos testes de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência, condutividade elétrica e teste de emergência em leito de areia e determinação do teor de aldeídos totais. A outra parte restante foi armazenada por 6 meses e, a cada 2 meses, as sementes foram submetidas aos mesmos testes citados anteriormente. As análises de variância foram processadas em esquema de parcela subdividida, com fatorial 4 x 3 (quatro genótipos e duas épocas de colheita) na parcela e períodos de armazenamento na subparcela, em delineamento inteiramente casualizado. Os efeitos do período de armazenamento para cada época de colheita foram estudados pela análise de regressão. A deterioração das sementes dos genótipos estudados foi mais influenciada pelo teor de ácido linolênico do que pela presença de lipoxigenase. Em geral, os genótipos de sementes de soja com baixo teor de ácido linolênico apresentaram maior vigor ao longo do armazenamento. O genótipo caracterizado pela presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico apresentou a pior qualidade de sementes.

PALAVRAS-CHAVE: Qualidade fisiológica de sementes de soja, lipoxigenase, ácido linolênico e armazenamento.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da soja, nos últimos anos, tem se expandido em vários países, especialmente no Brasil. As últimas estatísticas indicam que a safra de 2003 do Brasil ultrapassou 52 milhões de toneladas. Esta expansão se deve às características agronômicas das variedades cultivadas, favoráveis ao plantio, produção e colheita e, especialmente, ao seu alto potencial como matéria prima para diversos produtos. As cultivares comerciais de soja diferem quanto à qualidade da semente. Desta forma, para o lançamento de novas cultivares torna-se importante que as variedades possuam sementes de alta qualidade.

A utilização de sementes de alta qualidade, principalmente nos trópicos, é fundamental para o estabelecimento de lavouras com população adequada e obtenção de alta produtividade. A perda de vigor e viabilidade da semente, causada por condições de campo e armazenagem desfavoráveis, tem sido um grande problema na produção de soja enquanto que a obtenção de cultivares com sementes de alta qualidade fisiológica tem sido um desafio à produção de soja no Brasil (MOREIRA et al., 1990).

A composição e distribuição dos ácidos graxos nas moléculas dos triacilgliceróis, determinam, grandemente, a qualidade do óleo: valor nutricional, "flavor" e propriedades físicas como estabilidade oxidativa e ponto de fusão (YADAV, 1996). Segundo YEE (1996), uma vez que óleos vegetais são os principais componentes graxos da nossa dieta, seu valor nutricional é muito importante. Há consenso, de acordo com opinião médica, em reduzir o teor de ácidos graxos saturados, especialmente o ácido palmítico, como reduzir também o teor de ácidos graxos polinsaturados.

O ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo que ocorre na maioria dos tecidos de plantas e o linoléico é encontrado em maior concentração em sementes (HILDEBRAND et al., 1988). Na fração óleo de sementes de soja, o ácido linoléico representa em torno de 57%, enquanto que o ácido linolênico corresponde de 7 a 9% (KITAMURA et al., 1984). Entre os óleos vegetais, o óleo de soja é o que apresenta o menor custo de produção

(YADAV, 1996). O óleo de soja contém, em média 15% de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico), 25% de monoinsaturados (oléico) e 60% de polinsaturados (linoléico e linolênico) (ECONOMIC, 1990). Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais susceptíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (ANDERSON e BAKER, 1983). A hidroxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva à produção do 9 e o 13 hidroperóxidos do ácido graxo, que por reações subsequentes produzem aldeídos e cetonas de cadeia curta (AXELROD et al., 1981; GERMAN e KINSELLA, 1985; LAKOKI et al., 1975).

A peroxidação de lipídios é acelerada pela ação das enzimas lipoxigenases, as quais, são encontradas em sementes, especialmente nas de soja (VIEIRA e CARVALHO, 1994). A semente de soja, rica em lipoxigenases, tem sido um dos materiais biológicos mais utilizados em estudos enzimológicos.

Lipoxigenases são enzimas que catalizam a adição de oxigênio molecular a ácidos graxos polinsaturadas contendo o sistema cis, cis - 1,4 - pentadieno (AXELROD et al. 1981; MACK et al., 1987). As lipoxigenases (LOX) estão presentes nas sementes de soja na forma de três isoenzimas LOX1, LOX2 e LOX3 (SANZ et al., 1992). Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas em sementes de soja são recessivos e possuem herança mendeliana simples. O locus L1 está ligado ao L2 e o locus L3 é independente (KITAMURA et al., 1983).

Com o objetivo de desenvolver linhagens especiais de soja para a agroindústria, o Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja da Universidade Federal de Viçosa, desenvolveu linhagens, contendo, dentre outros, genes para ausência de lipoxigenase e baixos teores de ácido linolênico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das características: presença e ausência das lipoxigenases e do teor de ácido linolênico na qualidade fisiológica de sementes de soja no armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material genético e procedimentos utilizados

Os materiais utilizados foram oriundos do cruzamento entre a linhagem americana BARC-12 (que possui baixo teor de ácido linolênico, cerca de 3%), desenvolvida pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland, EUA e a linhagem UFV TN (derivada de Doko RC, possuindo alelos nulos para as três isoenzimas lipoxigenases) obtida pelo Programa de Melhoramento de soja da UFV. Quatro genótipos similares fenotipicamente, mas contrastantes quanto à presença de LOX e teor de ácido linolênico, cultivados na mesma época e local foram utilizados (Quadro 1).

Quadro 1 – Diferentes genótipos formados de acordo com as características determinadas.

Genótipos	Lipoxigenase	Ácido linolênico	Símbolo
1	Ausência	Baixo	LOX ⁻ Lin ^b
2	Presença	Normal	LOX ⁺ Lin ⁿ
3	Ausência	Normal	LOX ⁻ Lin ⁿ
4	Presença	Baixo	LOX ⁺ Lin ^b

O plantio das sementes dos genótipos em RC1F7 foi efetuado dia 12/12/01. As sementes foram plantadas no campo em 15 fileiras de 6 metros para cada genótipo. Cada fileira foi colhida individualmente. Do material correspondente de cada fileira foram tomadas, aleatoriamente, 10 sementes para a realização de microanálises, para a confirmação das características desejadas de cada grupo. Cada linha de cada genótipo foi colhida individualmente, em três épocas diferentes e subsequentes, com retardamento de colheita, para determinar a deterioração e perda de qualidade fisiológica das sementes desses genótipos nas diferentes épocas. A primeira colheita foi realizada dia 18/04/2002, para todos os genótipos, no estágio R8 da escala de FEHR e CAVINESS (1979), isto é, quando as plantas se encontravam com

95% de suas vagens maduras. As demais colheitas foram feitas 15 e 30 dias após a primeira.

Na Figura 1 são apresentados os dados de umidade relativa, temperatura e precipitação relativos ao período de 03/04 a 01/06/2002, que inclui os período de colheita em R8, R8+15 e R8+30.

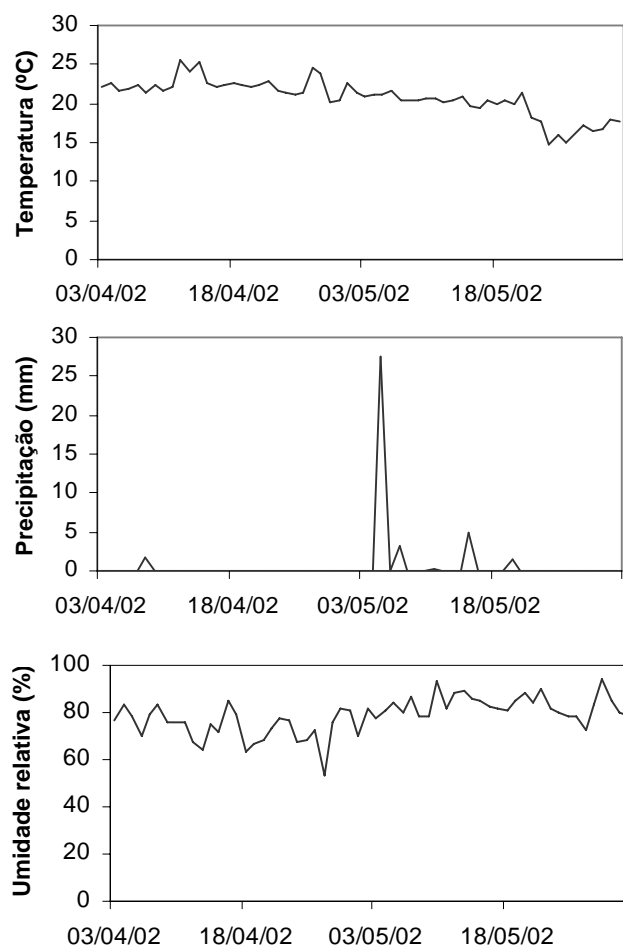


Figura 1 - Dados diários de umidade relativa do ar (%), temperatura média (°C) e precipitação (mm), no período de 03/04/02 a 01/06/03.

Após a colheita, as plantas de cada linha, foram secas à sombra e trilhadas. As sementes foram limpas e, à medida que atingiam o grau de umidade desejado (cerca de 12%), uma pequena porção de sementes de cada linha foi coletada para confirmação, em laboratório, quanto à presença ou ausência de lipoxigenase e à composição de ácidos graxos na porção óleo nessas sementes. As sementes remanescentes de cada linha foram

armazenadas em câmara fria à temperatura de 10°C e aproximadamente 50% de umidade relativa, condições que permaneceram até a realização dos testes de qualidade. Antes do material ser acondicionado em câmara fria, foram realizadas determinações preliminares, cujos resultados encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2 - Dados médios da caracterização inicial dos genótipos estudados, onde G.u (Grau de umidade), C18:3 (teor de ácido graxo linolênico), LOX(isoenzima lipoxiganase), - (presença), + (ausencia), Fus (*Fusarium spp.*), Pho (*Phomopsis spp.*), Ftot (Fungos totais) e três (E.C.) épocas de colheita, estágio de maturação R8, R8+15 dias e R8+30 dias.

Genótipos	E.C.	G.u (%)	Á.l (%)	LOX	Fus (%)	Pho (%)	Ftot (%)
LOX ⁻ Lin. ^b	R8	12,14	3,58	-	1	0	3
LOX ⁻ Lin. ^b	R8+15	12,70	3,82	-	1	0	3
LOX ⁻ Lin. ^b	R8+30	11,27	3,32	-	22	36	62
LOX ⁺ Lin. ⁿ	R8	11,43	10,08	+	4	0	8
LOX ⁺ Lin. ⁿ	R8+15	12,92	9,74	+	5	0	7
LOX ⁺ Lin. ⁿ	R8+30	10,47	10,15	+	22	34	59
LOX ⁻ Lin. ⁿ	R8	12,45	9,52	-	0	0	5
LOX ⁻ Lin. ⁿ	R8+15	13,0	9,88	-	2	0	4
LOX ⁻ Lin. ⁿ	R8+30	11,81	9,02	-	26	16	52
LOX ⁺ Lin. ^b	R8	12,87	3,44	+	1	0	5
LOX ⁺ Lin. ^b	R8+15	13,10	3,11	+	2	1	3
LOX ⁺ Lin. ^b	R8+30	11,47	3,38	+	24	46	77

Confirmada a identidade de cada linha no genótipo (lipoxigenase e ácido graxo), elas foram misturadas e homogeneizadas, constituindo assim, os grupos dos genótipos. Posteriormente, as sementes de cada genótipo foram retiradas da câmara fria com dois dias de antecedência e colocadas à temperatura ambiente, para que a umidade das sementes entrasse em equilíbrio com o ambiente. Essas sementes tiveram sua qualidade fisiológica imediatamente avaliada por meio dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e teste de emergência de plântulas

em substrato de areia, condutividade elétrica, % e aldeídos totais. As sementes remanescentes foram armazenadas no setor de armazenamento do Departamento de Fitotecnia da UFV em condições ambiente, durante seis meses. A cada dois meses estes lotes foram amostrados e submetidos aos mesmos testes de qualidade de sementes citados anteriormente.

Os dados climáticos, referente ao período de armazenamento, na UBS encontram-se, logo abaixo na Figura 2.

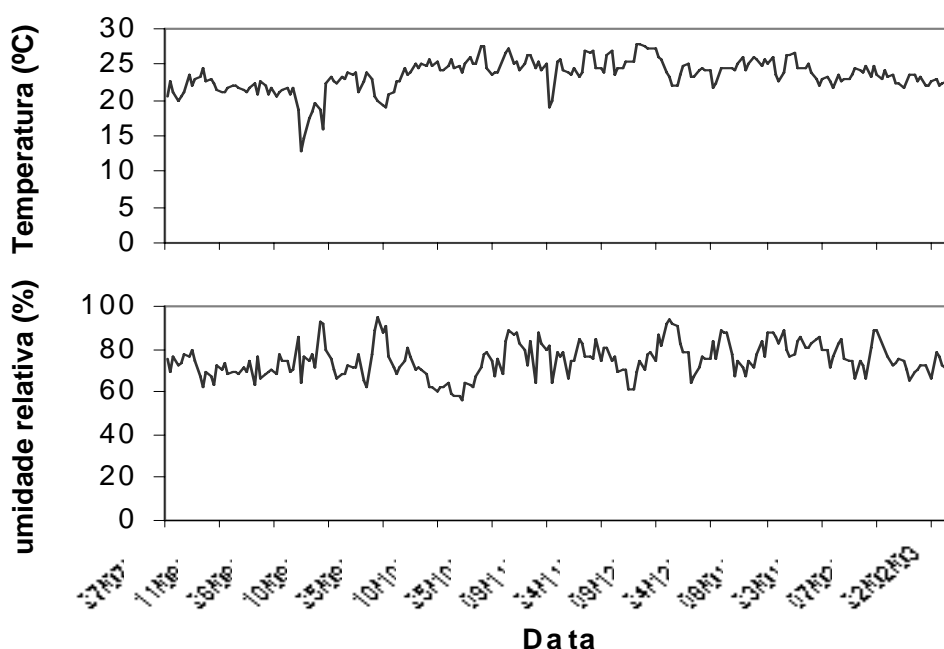


Figura 2 - Dados diários de temperatura média (°C) e umidade relativa do ar (%), de 02/07/02 a 28/02/02.

As determinações bioquímicas, grau de umidade, e de qualidade fisiológica e sanitária das sementes foram realizadas como descrito no capítulo 1.

2.2. Análise estatística

Antes de processar as análises de variância, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Considerando que todas as variáveis apresentaram apenas ligeiro desvio de normalidade, optou-se por analisá-las sem transformação. As análises de variância foram processadas em esquema

de parcela subdividida, com fatorial 4 x 3 (quatro genótipos e três épocas de colheita) na parcela e períodos de armazenamento na subparcela, em delineamento inteiramente casualizado. Foram quatro repetições para a primeira contagem (PCONT), teste padrão de germinação (GERM), envelhecimento acelerado (ENVA), condutividade elétrica (COND), e cinco repetições para o teste de emergência em leito de areia (TELA) e índice de velocidade de emergência (INVE). Os efeitos do período de armazenamento para cada época de colheita foram estudados pela análise de regressão, a 5% de probabilidade pelo teste F. Todas as análises foram processada com o uso do software SAS (SAS, 1989).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resumos das análises de variância relativas aos dados do teste de germinação (GERM), primeira contagem (PCONT), envelhecimento acelerado (ENVA), condutividade elétrica (COND), índice de velocidade de emergência (INVE) e teste de emergência em leito de areia (TELA) encontram-se no Quadro 3.

Para cada variável analisada, verificou-se um conjunto diferenciado de efeitos significativos das diferentes fontes de variação.

Quadro 3 - Resumo da análise de variância referente a diversos testes realizados em sementes de soja de quatro genótipos, colhidas em três épocas de colheita e armazenadas por quatro períodos.

F.V.	G.L.	Valores de F						
		GERM	PCON	ENVA	COND	G.L	INVE	TELA
Genótipos (G)	3	98,59**	120,61**	103,80**	37,52**	3	121,08*	87,69**
Épocas (E)	2	3242,92**	2475,95**	2825,65**	973,86**	2	3159,6	2819,25**
G x E	6	33,77**	37,17**	87,36**	23,0**	6	29,82**	23,99**
G/E1	3	160,027**	115,74**	656,69**	134,99**	3	146,87*	89,31**
G/E2	3	283,22**	170,12**	422,65**	273,03**	3	588,81*	517,74**
G/E 3	3	85,43**	42,62**	33,88**	299,08**	3	130,57*	117,24**
Erro a	36					48		
Armazen. (A)	3	489,59**	302,75**	843,06**	685,97**	3	744,06*	601,32**
A x G	9	8,92**	3,27**	9,08**	11,52**	9	6,64**	7,69**
A/G1	3	110,18**	75,71**	215,78**	103,37**	3	185,29*	143,21**
A/G2	3	178,77**	85,74**	147,06**	237,24**	3	221,70*	203,66**
A/G3	3	173,08**	108,08**	326,00**	171,78**	3	249,15*	202,19**
A/G4	3	51,32**	43,02**	181,45**	208,14**	3	107,81*	75,31**
A x E	6	21,17**	12,87**	135,09**	10,57**	6	61,10**	61,49**
A x G x E	18	3,44**	1,90**	7,64**	5,87**	18	5,61**	5,03**
Erro b	108					144		
C.V. ^a (%)		9,71	10,46	9,19	6,78		9,93	10,12
C.V. ^b (%)		8,72	10,28	12,73	7,27		9,33	9,78
Média		57,77	52,85	35,88	130,51		4,55	59,98

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^a Coeficiente de variação referente à parcela.

^b Coeficiente de variação referente à subparcela.

3.1 Teste de germinação

Na Figura 3, referente às sementes colhidas no estágio R8 de maturação, verifica-se que as médias estimadas dos genótipos LOX^-Lin^b e LOX^+Lin^b foram superiores aos demais, a partir do 4º mês de armazenamento. Os genótipos LOX^+Lin^n e LOX^-Lin^n apresentaram as menores médias no 6º mês de armazenamento.

No estágio R8+15 dias (Figura 3), já no início do armazenamento pode-se observar uma diferença entre as médias estimadas da germinação até o 6º mês de armazenamento, onde os genótipos LOX^-Lin^b e LOX^+Lin^b obtiveram as maiores médias em relação aos demais. Nota-se também que o LOX^+Lin^n obteve o pior performance em relação aos demais, no final do armazenamento.

No estágio R8+30 (Figura 3) a diferença entre as médias estimadas é ainda mais evidente, onde o LOX^-Lin^b manteve-se superior desde o início até o final do armazenamento (6 meses). O LOX^+Lin^b que nos dois estágios anteriores foi superior, juntamente com o LOX^-Lin^b , atingiu as piores médias junto com o LOX^+Lin^n , no final do armazenamento.

Em geral, genótipo sem lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico apresentou melhor qualidade de suas sementes em relação aos demais.

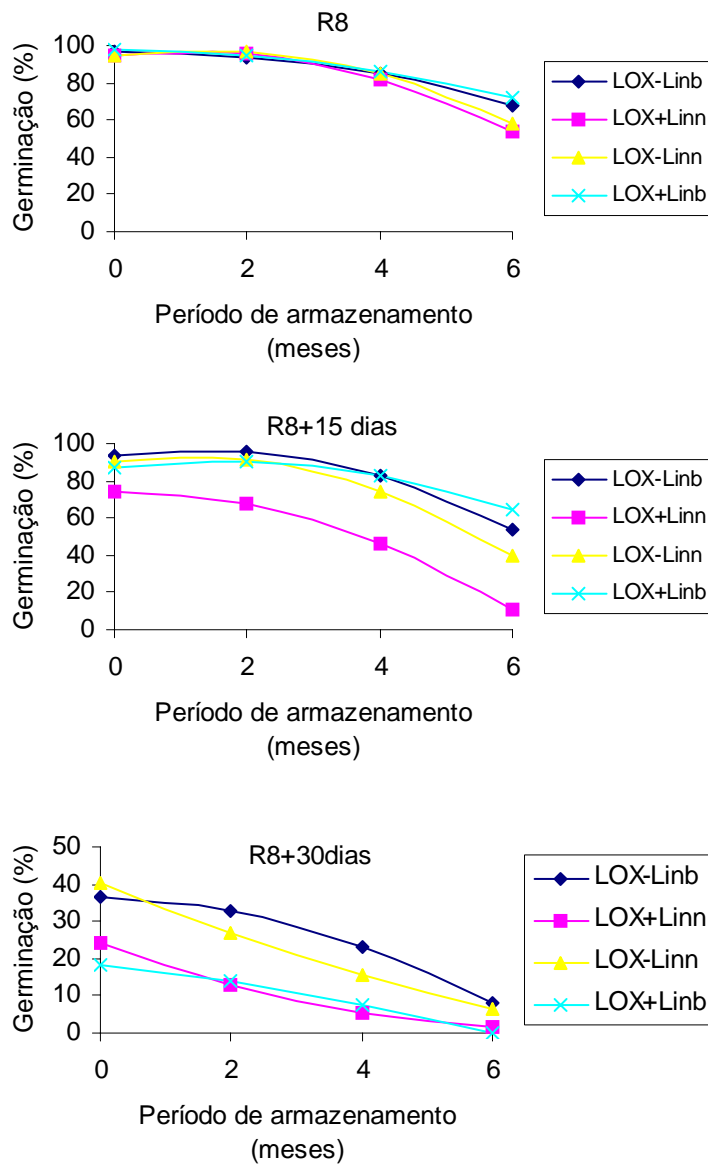


Figura 3 - Plântulas normais (%) obtidas no teste de germinação das sementes dos genótipos: $LOX^{-}Lin^b$; $LOX^{+}Lin^n$; $LOX^{-}Lin^n$ e $LOX^{+}Lin^b$ colhidas nos estádios de maturação R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas ao armazenamento por 6 meses.

3.2 Primeira contagem

As médias estimadas da germinação no teste de primeira contagem, semelhantemente ao ocorrido no teste de germinação, diferenciam as sementes

do LOX⁻Lin^b como de melhor qualidade em relação às dos demais genótipos, para todas as épocas de colheita. (Figura 4).

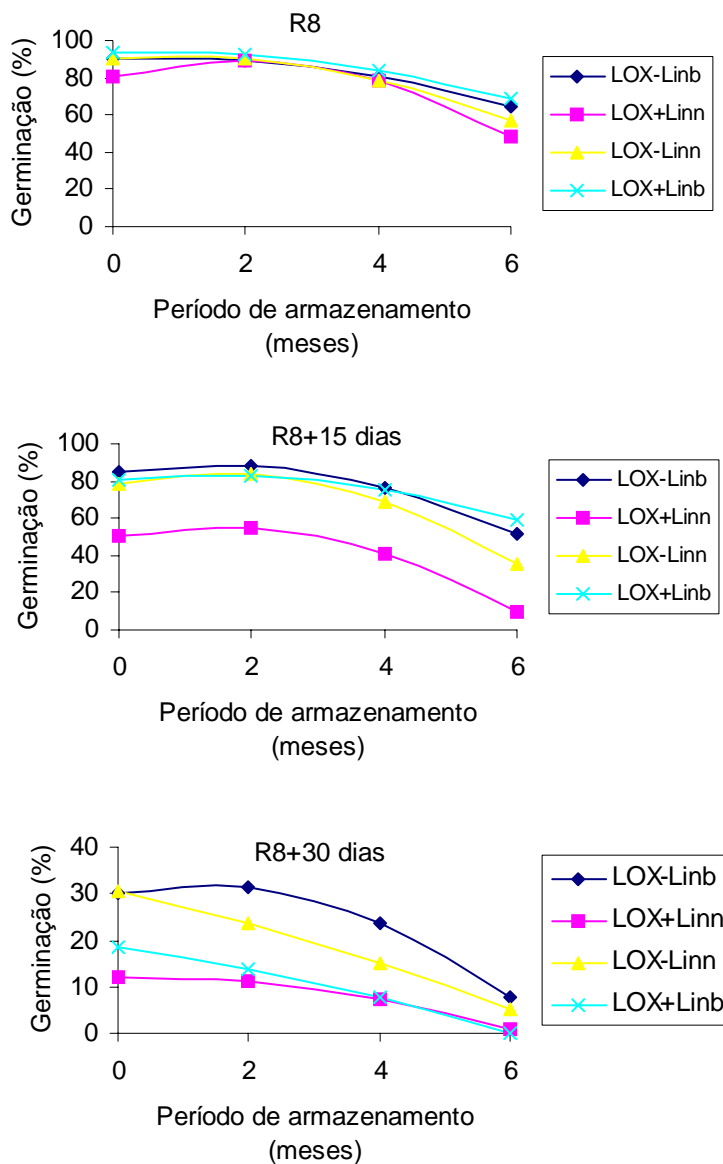


Figura 4 - Plântulas normais (%) obtidas no teste de primeira contagem de germinação das sementes dos genótipos: LOX⁻Lin^b; LOX⁺Linⁿ; LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b colhidas nos estádios de maturação R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas ao armazenamento por 6 meses.

LOX⁺Lin^b obteve médias superiores somente até o estágio R8+15 dias de maturação. Os genótipos LOX⁺Linⁿ e LOX⁻Linⁿ obtiveram as piores médias em todos os estádios de maturação (Figura 4).

3.3 Envelhecimento acelerado

As sementes de todos os genótipos avaliados apresentaram queda no vigor quando submetidas ao estresse de alta temperatura e umidade relativa, em todas as épocas de colheita ao longo do período de armazenamento (figura 5). As sementes do genótipo LOX⁻Lin^b foram as que demonstraram menor sensibilidade ao estresse ocasionado pelo teste, ou seja, para todas as épocas de colheita e para todos os períodos de armazenamento, foram que apresentaram menor variação e maiores médias em relação aos demais.

No estágio R8 de maturação os genótipos LOX⁺Linⁿ e LOX⁻Linⁿ apresentaram média inferiores aos genótipos LOX⁻Lin^b e LOX⁺Lin^b e também observa-se que os genótipos LOX⁺Linⁿ e LOX⁻Linⁿ apresentaram um decréscimo mais acentuado em suas médias no final do período de armazenamento, ocorrendo o mesmo em R8+15 dias (Figura 5). No estágio R8+15dias pode-se observar uma diferenciação dos genótipos a partir do início do armazenamento (0 mês) e uma superioridade no final do armazenamento para os genótipos LOX⁻Lin^b e LOX⁺Lin^b. Comportamento semelhante pode ser observado no estágio R8+30 (Figura 5).

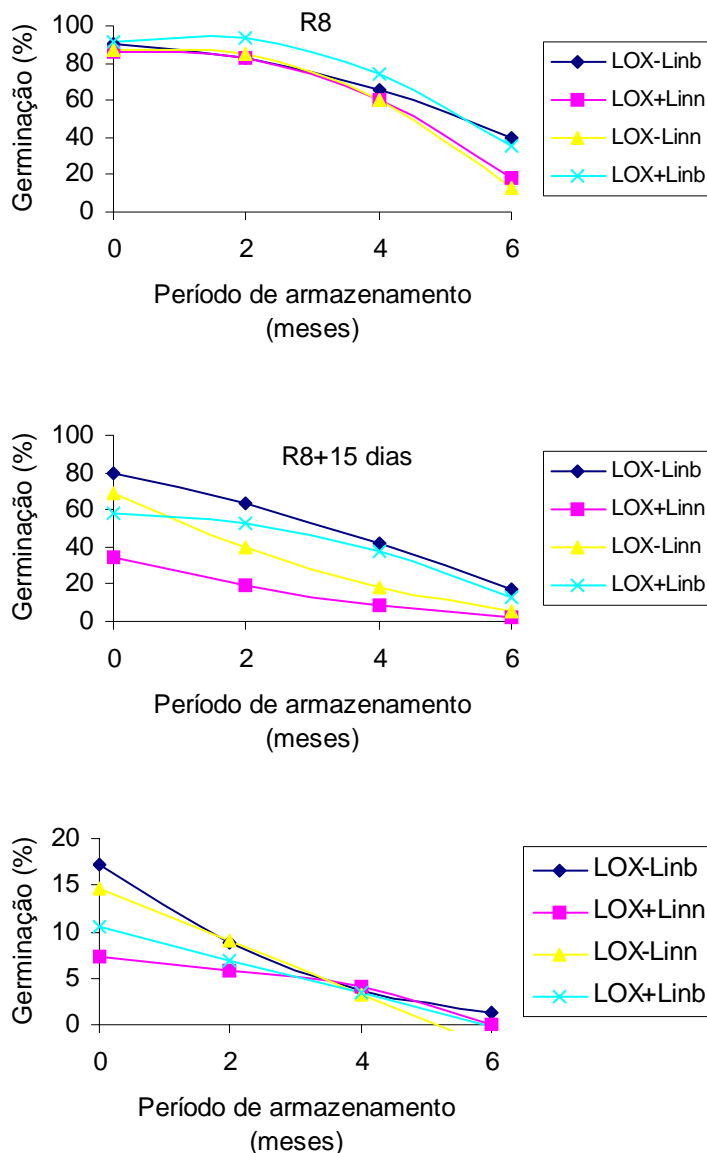


Figura 5 - Plântulas normais (%) obtidas no teste de envelhecimento acelerado das sementes dos genótipos: $LOX^{-}Lin^b$; $LOX^{+}Lin^n$; $LOX^{-}Lin^n$ e $LOX^{+}Lin^b$ colhidas nos estádios de maturação R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas ao armazenamento por 6 meses.

3.4 Índice de velocidade de emergência

Na Figura 6, em R8+15 dias, observa-se que, pelo índice de velocidade de emergência, as médias dos genótipos $LOX^{-}Lin^b$ e $LOX^{+}Lin^b$ foram superiores a todos os outros genótipos a partir do 4º mês de armazenamento, semelhante ao observado no teste de germinação. Em R8+15 e R8+30 (Figura

6) as médias já se diferem entre si, desde o início do armazenamento, onde os genótipos LOX^+Lin^n e LOX^-Lin^n apresentaram as menores médias. Observa-se que para o LOX^+Lin^n as médias ficaram próximas de zero no final do período de armazenamento. Em R8+30 o genótipo LOX^-Lin^b apresentou as melhores médias, seguido do LOX^-Lin^n , desde o início até o final do armazenamento, em relação aso demais genótipos.

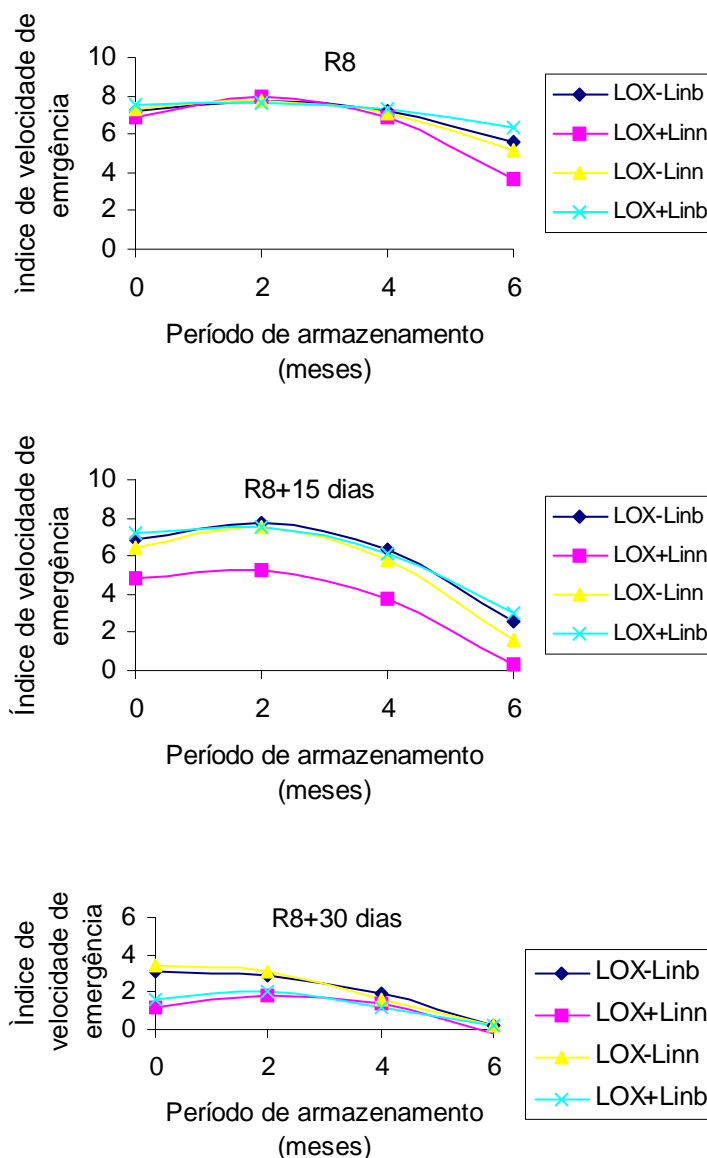


Figura 6 - Índice de velocidade de emergência das sementes dos genótipos: LOX^-Lin^b ; LOX^+Lin^n ; LOX^-Lin^n e LOX^+Lin^b colhidas nos estádios de maturação R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas ao armazenamento por 6 meses.

3.5 Condutividade elétrica

As médias estimadas pelas equações de regressão mostram que houve um acréscimo da condutividade elétrica para todos os genótipos estudados ao longo do armazenamento, porém de maneira diferenciada entre os genótipos (Figura 7).

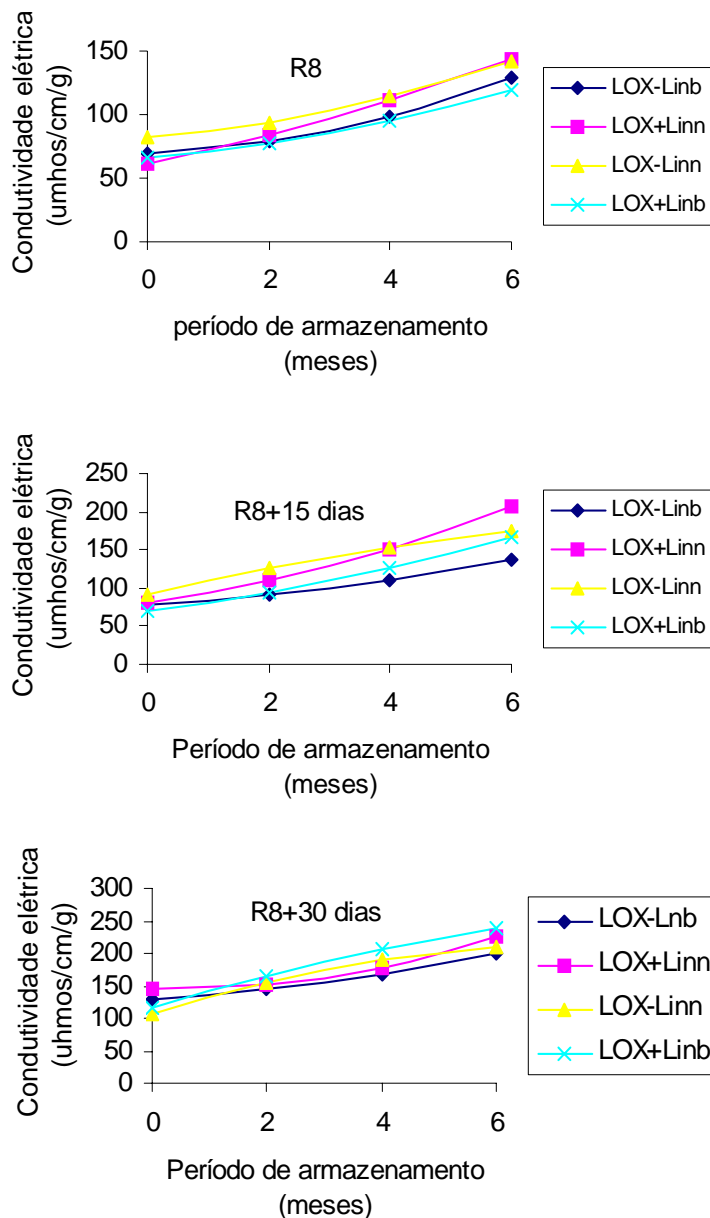


Figura 7 - Condutividade elétrica ($\mu\text{mhos/cm/g}$) das sementes dos genótipos: $\text{LOX}^- \text{Lin}^b$; $\text{LOX}^+ \text{Lin}^n$; $\text{LOX}^- \text{Lin}^n$ e $\text{LOX}^+ \text{Lin}^b$ colhidas nos estádios de maturação R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas ao armazenamento por 6 meses.

Em R8, nota-se que os genótipos LOX^-Lin^b e LOX^+Lin^b apresentaram menor condutividade ao longo do armazenamento em relação os demais. O mesmo pode ser observado em R8+15 dias. Porém, em R8+30, nota-se que o LOX^+Lin^b a partir do 2º mês de armazenamento diferiu e, foi superior aos demais. Em todos os estádios de maturação ao longo do período de armazenamento, de uma maneira geral, o LOX^-Lin^b foi o que apresentou a menor condutividade elétrica em relação aos demais (Figura 7).

3.6 Emergência em leito de areia

Pelos resultados da porcentagem de emergência de plântulas em leito de areia, pode-se notar que, praticamente todos os genótipos apresentaram médias estimadas semelhantes às obtidas nos testes de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado e índice de velocidade de emergência, discutidos anteriormente (Figura 8). Em R8, nota-se superioridade do genótipo LOX^-Lin^b e LOX^+Lin^b a partir do 4º mês. Em R8+15 o genótipo LOX^+Lin^n apresentou a menor média ao longo do armazenamento, seguido pelo LOX^-Lin^n . Em R8+30, LOX^-Lin^n e LOX^-Lin^b foram os que obtiveram as maiores médias em todo período de armazenamento.

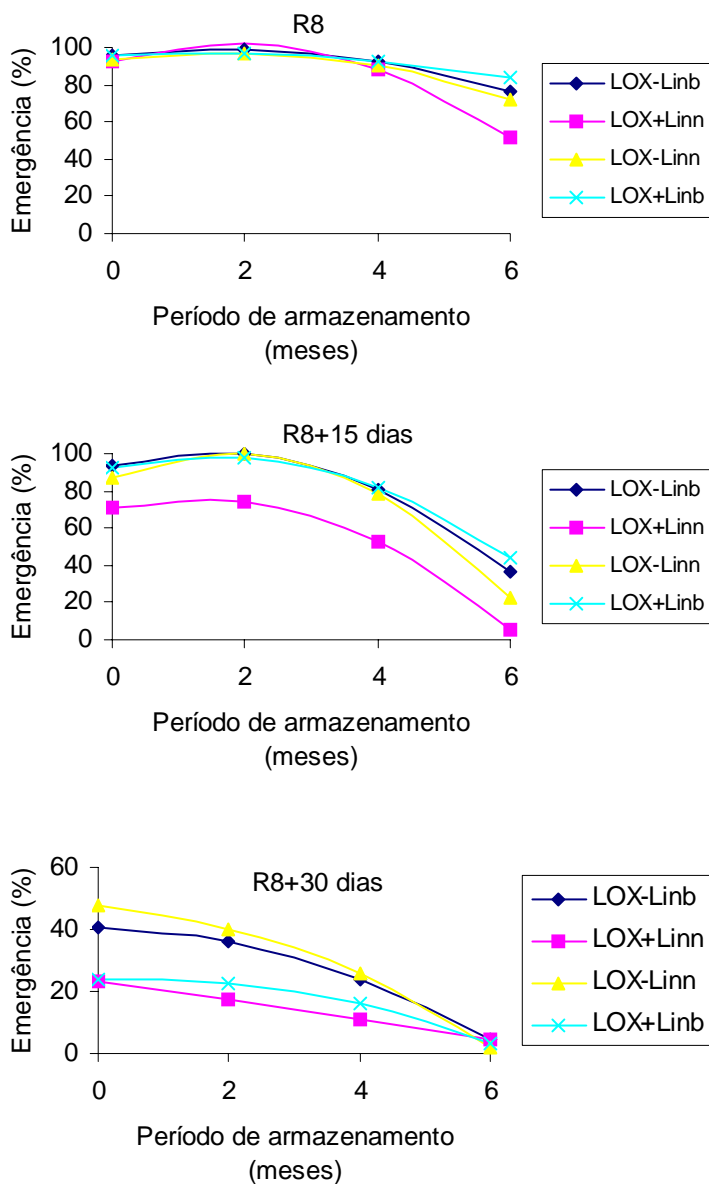


Figura 8 - Germinação (%) obtidas no teste de emergência em leito de areia das sementes dos genótipos: LOX⁻Lin^b; LOX⁺Linⁿ; LOX⁻Linⁿ e LOX⁺Lin^b colhidas nos estádios de maturação R8, R8+15 e R8+30 dias e submetidas ao armazenamento por 6 meses.

Os atributos fundamentais para avaliação da qualidade das sementes são a viabilidade e o vigor. ABDUL-BACKI (1980) considerou vigor da semente um atributo fisiológico mensurável, que é expresso como rápida, uniforme e alta germinação, ou emergência, mesmo em condições desfavoráveis. A avaliação eficiente do vigor depende da escolha adequada do método, em função dos objetivos pretendidos. O uso de apenas um teste pode

gerar informações incompletas. Há, portanto, a necessidade de eleição de métodos que se destinem especificamente à identificação de fatores estreitamente ligados ou determinantes do comportamento das sementes, em condições de campo e, ou armazenamento. Assim, a tendência predominante é a combinação de resultados de vários teste .

Segundo POPINIGIS (1985), entende-se por qualidade fisiológica da semente o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, sanitários e fisiológicos que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade; a qualidade fisiológica da semente significa sua capacidade para desenvolver funções vitais, abrangendo germinação, vigor e longevidade.

Portanto, de uma maneira geral, para as condições em que este experimento foi conduzido e considerando os diferentes teste avaliação da qualidade de sementes empregados, os dados obtidos sugerem que sementes com de baixo teor de ácido linolênico (com ou sem lipoxigenase) apresentaram melhor qualidade fisiológica de suas sementes e, conseqüentemente menor susceptibilidade à deterioração quando exposta à condições desfavoráveis no campo e ao longo do período de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com alguns autores que estudaram a associação entre a deterioração de sementes com ácidos graxos, e, principalmente, os polinsaturados.

WILSON JR e McDONALD JR (1986) propuseram um modelo no qual consideram a peroxidação de lipídios uma das principais causas da deterioração das sementes. As sementes armazenadas, com grande reserva de lipídios, estão sujeitas a um lento e consistente ataque por oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos oxigenados e radicais livres.

Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais susceptíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (ANDERSON e BAKER, 1983). A hidroperoxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva a produção do 9 e o 13 hidroperóxidos do ácido graxo, que por reações subsequentes produzem aldeídos e cetonas de cadeia curta

(AXELROD et al., 1981; GERMAN e KINSELLA, 1985; LAKOKI et al., 1975).

Na mesma linha de pensamento, segundo CARVALHO (1994), o processo de deterioração das sementes, cuja causa básica ainda não é bem conhecida, teria como consequência inicial a desestruturação de sistemas de membranas no nível celular. A causa imediata dessa desestruturação seria a ação de grupos químicos de alta reatividade denominados de radicais livres. O processo pelo qual os radicais livres se formam através da atividade metabólica da célula é consequência da reação de lipídios estruturais, principalmente os polinsaturados, com o O₂, do que resultam radicais livres e peróxidos instáveis, razão pela qual esse processo é designado como peroxidação de lipídios.

Considerando os testes fisiológicos realizados nas sementes colhidas no estágio R8+30 dias, notou-se que, em todos os testes, as sementes dos genótipos que apresentavam presença de lipoxigenase (com teor normal ou baixo teor de ácido linolênico), foram as de piores qualidade fisiológica, com maior intensidade para o genótipo com teor normal de ácido linolênico. Porém, nas sementes colhidas em R8 e R8+15 dias, menor vigor foi observado para os genótipos que apresentavam teor normal de ácido linolênico (com ou sem lipoxigenase). Diante disso, pelos dados obtidos, pode-se conjecturar duas possibilidades: primeira, para as sementes colhidas em R8 e R8+15 dias, a lipoxigenase teve o papel de auxiliar no processo de germinação das sementes, pois segundo FEUSSNER et al. (2001), a germinação de sementes de oleaginosas, como a soja, é caracterizada pela mobilização de lipídios de reservas como uma fonte de carbono para a emergência das plântulas. Apesar da importância da mobilização de lipídios, seu mecanismo é apenas parcialmente entendido. Dados recentes sugerem que um novo mecanismo de degradação de lipídios durante a germinação é iniciada por uma lipoxigenase, chamada de lipoxinase-13, usando especificamente ácidos graxos polinsaturados esterificados como substrato. Esta reação da lipoxigenase-13 leva a um acúmulo transitório de hidroperóxidos ésteres lipídicos nos lipídios

de reserva, e as correspondentes unidades de ácidos graxos oxigenados são, preferencialmente, removidos por lipases específicas. Então os hidróxidos de ácidos graxos livres são subsequentemente reduzidos em seus derivados hidróxidos, o quais podem ser usados na β -oxidação; segundo, o estágio R8+30, além de ser, por si, uma condição de estresse para as sementes, em particular neste experimento, onde este período coincidiu com a época chuvosa, ficando as sementes expostas a condições ambientais extremas (alta temperatura e alta umidade relativa). Este fato pode ser confirmado pelos valores relativamente baixos obtidos nos diferentes testes de vigor empregados. Estas condições podem ter prejudicado, de maneira mais acentuada, os genótipos que apresentavam lipoxigenase em sua constituição. Provavelmente, uma das principais causas deste comportamento foi a oxidação enzimática (lipoxigenase) e não enzimática (espôntanea) beneficiada pela temperatura e flutuações de umidade encontradas pelas sementes no campo.

Segundo SMITH e BERJAK (1995), o envelhecimento das sementes tem como principais causas os eventos de deterioração que ocorrem nos sistemas biológicos hidratados e que a umidade, pode ser um dos principais fatores que influenciam a longevidade das sementes. O oxigênio, a umidade e a temperatura agem sinergisticamente sobre a perda da viabilidade. Acrescente-se ainda que, a água é considerada como sendo um dos mais importantes fatores que atua no controle da peroxidação de lipídios, devido as interações entre radicais livres e moléculas.

DELOUCHE (1973) afirma que as oscilações de temperaturas, associadas a chuvas e, ou, à elevada umidade relativa do ar, contribuem gradativamente para que o processo de deterioração seja acentuado, com perdas significativas no potencial de germinação e vigor. Também VICK e ZIMMERMAN (1976) já haviam mencionado que nas sementes oleaginosas, que contêm grande quantidade de ácido graxo polinsaturado, os lipídios são sujeitos a ataque direto autocatalítico por oxigênio atmosférico quando em condições de estresse hídrico. Em alto nível de umidade, a atividade de

lipoxigenase favorece um mecanismo alternativo para o ataque de lipídios pelo oxigênio.

Os testes bioquímicos utilizados, condutividade elétrica e teor de aldeídos totais, estão relacionados à integridade de membranas e à peroxidação de lipídios, respectivamente.

É importante dizer que, embora o teste de condutividade elétrica seja classificado como um teste bioquímico (AOSA, 1983), ele, na verdade, envolve dois princípios, um físico e outro biológico. Isso porque, a avaliação do vigor, baseada na determinação da condutividade elétrica da solução de embebição da semente, é um princípio, onde se está avaliando a passagem de corrente elétrica através de determinada solução. Por outro lado, para que ocorra a lixiviação e a consequente medida da condutividade, devem haver alterações na integridade das membranas celulares, em função do grau de deterioração, ou seja, alterações bioquímicas, permitindo, assim, a perda de lixiviado, em função do estado da semente.

Os dados obtidos no teste de condutividade elétrica das sementes colhidas nos estádios R8 e R8+15 dias, sugerem que houve um aumento na quantidade de eletrólitos liberados ao longo do armazenamento e que as sementes dos genótipos que apresentavam teor normal de ácido linolênico apresentaram uma lixiviação mais intensa do que os genótipos com baixos teores de ácido linolênico. Segundo BEWLEY e BLAK (1994), os lipídios representam entre 17 a 22% da semente de soja. Os ácidos graxos polinsaturados, linoléico e linolênico destacam-se como os mais importantes, sendo susceptíveis à degradação oxidativa, por reações enzimática e não enzimáticas (ANDERSON e BAKER, 1983). Entretanto, segundo VIEIRA e CARVALHO (1994), a correlação entre a peroxidação dos lipídios e a deterioração de sementes nem sempre tem sido verificada. De um modo geral, os autores só parecem concordar de maneira unânime que a primeira consequência da deterioração seja a desestruturação dos sistemas membranas com o resultante aumento da sua permeabilidade sem, contudo, haver consenso sobre quais seriam as causas básicas dessa desestruturação.

Evidências de variabilidade genética para a permeabilidade de membranas celulares em sementes de soja foram constatadas por KRYZANOWSKI et al. (1997), onde o teste de condutividade elétrica aplicado às sementes mostrou-se promissor para seleção de genótipos quanto à qualidade das sementes, com base nas diferenças de permeabilidade de membrana celular, avaliada através de exsudados presentes na solução de embebição das sementes.

Analisando este teste aplicado no presente estudo, nas sementes colhidas no estágio R8+30 dias, notou-se que os genótipos que apresentavam presença de lipoxigenase (com teor normal ou baixo teor de ácido linolênico), obtiveram os mais altos valores de condutividade elétrica, ou seja, pior qualidade fisiológica de suas sementes. Este comportamento foi semelhante ao encontrado nos teste fisiológicos, citados acima, no estágio R8+30 dias.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho, considerando os testes fisiológicos e bioquímicos, estão de acordo com os obtidos por TRAWATHA et al. (1995a e 1995b), que trabalharam com sementes armazenadas à temperatura ambiente avaliadas em relação à sua qualidade fisiológica em diferentes períodos. Os autores observaram que as sementes com maior teor de ácidos linolênico e linoléico apresentaram perda mais rápida na sua qualidade fisiológica durante o armazenamento. Também ARAÚJO (1989) já afirmara que a velocidade de oxidação dos ácidos graxos é altamente acelerada pela presença de lipoxigenase e OLIVEIRA (2002) afirma que a característica baixo teor de ácido linolênico contribui para uma melhor qualidade e vigor de sementes de soja.

Porém, os resultados obtidos neste trabalho são discordantes com alguns autores, que trabalharam com sementes de soja na região de Viçosa (QUEIROZ, 1993; TEIXEIRA et al. 1995; DIAS, 1999 e QUEIROZ 2000) que utilizaram sementes de soja sem lipoxigenase e, de uma maneira geral, afirmaram que sementes de cultivares de soja sem lipoxigenase são menos vigorosas que as de cultivares com lipoxigenase. Uma possível explicação para essa discordância é que nos trabalhos estes autores citados acima, não foi

levado em consideração a interação da lipoxigenase com teores de um dos principais substratos dessa enzima, que é o ácido linolênico.

3.7 Considerações finais

Observou-se que os diferentes genótipos responderam de maneira diferenciada quanto à qualidade fisiológica de suas sementes. Os resultados indicaram que o teor de ácido linolênico, mais que a ausência da enzima lipoxigenase, afetou a qualidade fisiológica das sementes colhidas em diferentes estádios de maturação e armazenadas em condições de ambiente, ou seja, sementes de soja com maior teor de ácido linolênico estão mais susceptíveis à deterioração e, conseqüentemente, apresentaram sementes de menor qualidade fisiológica.

Nas épocas de colheita R8 e R8+15, condições estas menos estressantes que R8+30, notou-se que as enzimas lipoxigenases não interferiram na qualidade fisiológica das sementes, desde que, o teor de ácido linolênico fosse baixo. Tanto é que os genótipos LOX^-Lin^b e LOX^+Lin^b , nestas épocas de colheita foram os que obtiveram as melhores médias nos testes realizados. Entretanto, essas enzimas parecem ter um papel importante na deterioração das sementes colhidas em R8+3 dias, pois, o LOX^+Lin^b juntamente com o LOX^-Lin^b apresentaram melhor qualidade fisiológica de suas sementes em R8 e R8+15, em R8+30, em praticamente todos os testes, obteve o pior desempenho, juntamente com o LOX^+Lin^n . O desempenho nos testes fisiológicos do LOX^+Lin^n ajuda a confirmar esta suposição, uma vez que apresenta a característica de teor normal de ácido linolênico e presença da enzima lipoxigenase. Nota-se que este genótipo apresentou em todas as épocas de colheitas a pior qualidade fisiológica de sementes, ou seja, a lipoxigenase parece estar envolvida no processo de deterioração das sementes, porém, sendo mais relevante quando em associação com a característica teor normal de ácido linolênico e sob condição de estresse.

Nota-se também que, quando a colheita é realizada no estádio R8 de maturação, somente foi possível fazer uma diferenciação dos genótipos

estudados em relação à sua qualidade fisiológica, a partir do 4º mês de armazenamento. Em R8+15, exceto para o LOX⁺Linⁿ, essa diferenciação ocorreu, praticamente, a partir do 2º mês de armazenamento. Em R8+30 já foi possível essa diferenciação antes mesmos, das sementes serem armazenadas. Estes resultados, corroboram ainda mais, que o método de retardamento de colheita pode ser utilizado para seleção de genótipos para alta qualidade de sementes

É importante ressaltar que, no estágio de maturação R8+30, houve uma redução da qualidade fisiológica das sementes em relação aos outros estádios de maturação estudados. Esse fato deve-se principalmente pela ocorrência de chuvas e altas temperaturas neste período (Figura 1). Como as sementes de soja são muito sensíveis à ação de fatores externos, condições climáticas desfavoráveis, tais como as que ocorreram, resultaram na redução do vigor dessas sementes, porém em intensidade diferenciada entre os genótipos.

Analisando de forma conjunta os testes utilizados, foi possível identificar, de uma maneira geral que, o retardamento de colheita foi eficaz em diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos estudados, principalmente, em associação com armazenamento. Os resultados indicaram que presença de lipoxigenase e teor de ácido linolênico interferem na qualidade fisiológica das sementes de soja. Em geral, sementes de soja com baixo teor de ácido linolênico apresentaram maior vigor e maior tolerância ao retardamento de colheita.

4. CONCLUSÕES

A análise dos dados e interpretação dos resultados do presente trabalho permitiram concluir que:

- retardamento de colheita, em R8+15 dias, foi eficaz em diferenciar a qualidade fisiológica das sementes dos genótipos estudados, principalmente, em associação com armazenamento;
- A presença de lipoxigenase e o teor de ácido linolênico interferem na qualidade fisiológica das sementes de soja;
- A deterioração das sementes dos genótipos estudados foi mais influenciada pelo teor de ácido linolênico do que pela enzima lipoxigenase;
- Em geral, os genótipos de sementes de soja com baixo teor de ácido linolênico apresentaram maior vigor ao longo do armazenamento;
- A característica baixo teor de ácido linolênico pode vir a se tornar uma importante característica em programas de melhoramento;
- O genótipo que apresenta lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico, obteve a pior qualidade de sementes.
- A interação das características ausência de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico permite a obtenção de sementes de melhor qualidade.

5. LITERATURA CITADA

- ABDUL-BAKI, A.A. Biochemical aspects of seed vigor. **HortScience**, v.15, n.6, p.765-771, 1980.
- ANDERSON, J.D., BAKER, J.E. Deterioration of seeds during aging. **Phytopatology**, v.73, p. 321-325, 1983.
- ARAÚJO, J.M.A. Oxidação de lipídios. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 22p. 1989 (Boletim de extensão, 283).
- AXELROD, B., CHEESBROUGHT, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Meth. Enzimology**, v.71, p.441-451, 1981.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 445p,1994.
- CARVALHO, N.M. de O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. de O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, cap.1, p. 1-30, 1994.
- DELOUCHE, J.C. Percepts of seeds storage. In: SHORT FOR SEMMENS, 14. Mississippi, 1973. **Proceedings**. Mississippi, Mississippi State University, p.97-122, 1973.
- ECONOMIC implications of modified soybeans traits. Ames, Iowa: Iowa Soybean Promotion Board, American Soybean Association, 88p. (Special Report, 92), 1990.
- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University; Cooperative Extension Service. 12p., 1979.
- FEUSSNER, I. KÜHN, H. WASTERACK, C, Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **Plant Science**, v.6, n.6, p.268-73, 2001.
- GERMAN, J.B., KINSELLA, J.E. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. **J. Agr. Food Chem.** V.33, p.680-683, 1985.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. **Current Topics in Plant Biochemistry and Phisiology**, v.7, p.201-219, 1988.

- KITAMURA, K. Biochemical of lipoxigenase lacking mutantes, L1-Less, L2-Less and L3-Less soybeans. **Agric. Biol. Chem.**, v.48, n.9, p.2339-2346, 1984.
- KITAMURA, K., DAVIES, C.S., KAIZUMA, N., NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.**, v.23, p.924-927, 1983.
- KRZYZANOWSKI, F.C., FRANÇA NETO, J.B., COSTA, N.P., HENNIG, A.A., KASTER, M. **Permeabilidade de membrana de célula de sementes de soja.** In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Embrapa soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 1996. Londrina, p.145-48, 1997 (Documentos, 104).
- LAKOKI, J.W., EMKEN, E.A., LAW, J.H., J.H., KEZON, F. Kinecti analysis of action of soybean lipoxygenase on linlenic acid. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6001-6, 1976.
- MACK, A. J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. **Current Topics in Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154, 1987.
- MOREIRA, M.A., REZENDE, S.T., SEDIYAMA, C.S. & GOMES, J.C. Obtenção de cultivares de soja de sabor agradável e com sementes de alta qualidade fisiológica. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas.** Brasília, ABCTP, p.417-26, 1990.
- OLIVEIRA, D.A. **Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenase e teor de ácido linolênico com qualidade fisiológica de sementes de soja.** Viçosa, MG:UFV, 2002.100p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- OLIVEIRA, D.A, PIOVESAN, N.D.,MORAES, R.M.A., ROCHEBOIS, G.B., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of the three genotypic classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques.**, v.12, p.71-74, 1998.
- QUEIROZ, L.R. **Produção de aldeídos na germinação e qualidade fisiológica de sementes de soja com ausência de lipoxigenase.** Viçosa, MG:UFV, 1993.52p. Tese (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- QUEIROZ, T.F.N. **Qualidade fisiológica de genótipos de soja sem lipoxigenase.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 56p. Tese (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2000.

- SANZ, L.C., PÉREZ, A.G., OLIAS, J.M. **Informacion. La Lipoxigenasa en el Reino Vegetal I.** Propriedades. Sevilla, España: Instituto de la Grasa y sus Derivados, V.43, Fasc.4, p.231-39, 1992.
- SAS. Institute Inc. **SAS/STAT user's guide.** Version 6, 4.ed., v.2. Cary: SAS Institute, 846p., 1989.
- SMITH, M.T., BERJAK, P. Deteriorative Changes Associated With Loss of Viability of Stored Desiccation-Tolerant and Desiccation-Sensitive Seeds. In: KIGEL, J., GALILI, G. (Ed). **Seed Development and Germination.** New York: Marcel Dekker, p.701-46, 1995.
- TEIXEIRA, R.C., SEDIYAMA, T., BHERING, M.C., ROCHA, V.S, REIS, M.S., SEDIYAMA, C.S., MOREIRA, M.A. Germinação das sementes de linhagens de soja com ausência de lipoxigenase L1. **Revista Ceres**, v.42, n.239, p.38-44, 1995.
- TRAWATHA, S.E., TEKRONY, D.M., HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop. Science**, v.35, p.1415-22, 1995b.
- TRAWATHA, S.E., TEKRONY, D.M., HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop. Science**, v.35, p.862-868, 1995a.
- VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal:FUNEP, 1994. 164p.
- VICK, B.A., ZIMMERMAN, D.C. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedling. **Plant Physiol.**, v.57, p.780-88, 1976.
- WILSON JR., D.O., McDONALD JR., M.B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Sci. and Techn.**, v.14, p.229-300, 1986.
- YADAV, N.S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D.P.S., SHOEMAKER, R.C. (Eds) **Soybean genetics, molecular biology and biotecnology.** USA:CAB INTERNATIONAL, p.165-881, 1996.
- YEE, Y.B. An updatde and review of soybean oil in heath and medical research. **Technical Bulletin: American Soybean Association**, 1996.

APÊNDICE

Quadro 1 - Equações de regressão e coeficientes de determinação R² (%) obtidos em cada teste realizado (variável), referentes aos genótipos LOX⁻Lin^b (G1); LOX⁺Linⁿ (G2) ; LOX⁻Linⁿ (G3) e LOX⁺Lin^b (G4), colhidas no estádio R8, em função dos períodos de armazenamento.

R8			
Variável	Genótipos	Equações	R ²
Germinação (%)	G1	$Y=96,4750+0,6125X-0,9062X^2$	85
	G2	$Y=94,3250+4,2875X-1,8437X^2$	89
	G3	$Y=95,1250+4,5625X-1,7812X^2$	87
	G4	$Y=97,8+0,15X-0,75X^2$	80
Primeira contagem (%)	G1	$Y=90,3750+1,4375X-0,9687X^2$	76
	G2	$Y=81,1+8,8X-2,375X^2$	89
	G3	$Y=89,975+2,8625X-1,4062X^2$	84
	G4	$Y=93,6+1,425X-0,9375X^2$	73
Envelhecimento acelerado (%)	G1	$Y=89,875-1,0625X-1,2187X^2$	90
	G2	$Y=86,4+3,325X-2,4375X^2$	96
	G3	$Y=87,425+4,2125X-2,7812X^2$	90
	G4	$Y=91,475+5,8625X-2,5312X^2$	95
Índice de velocidade de emergência	G1	$Y=7,2257+0,5653X-0,1409X^2$	89
	G2	$Y=6,923+1,065X-0,267X^2$	91
	G3	$Y=7,3324+0,5137X-0,1452X^2$	84
	G4	$Y=7,4858+0,2174X-0,068X^2$	66
Condutividade elétrica (μmhos/cm/g)	G1	$Y=69,9656+1,5634X+1,3695X^2$	93
	G2	$Y=60,5874+10,7149X+0,5001X^2$	97
	G3	$Y=82,262+3,9784X+0,9787X^2$	96
	G4	$Y=66,0738+4,3418X+0,7541X^2$	92
Emergência em leito de areia (%)	G1	$Y=95,7+3,975X-1,1875X^2$	79
	G2	$Y=92,875+10,1875X-2,8437X^2$	89
	G3	$Y=93,2416+4,7317X-1,3714X^2$	73
	G4	$Y=95,525+1,6375X-0,5937X^2$	48

Quadro 2 - Equações de regressão e coeficientes de determinação R² (%) obtidos em cada teste realizado (variável), referentes aos genótipos LOX⁻Lin^b (G1); LOX⁺Linⁿ (G2) ; LOX⁻Linⁿ (G3) e LOX⁺Lin^b (G4), colhidas no estádio R8+15 dias, em função dos períodos de armazenamento.

R8 + 15 dias			
Variável	Genótipos	Equações	R ²
Germinação (%)	G1	$Y=93,8+4,65X-1,875X^2$	90
	G2	$Y=74,625+0,0625X-1,7812X^2$	91
	G3	$Y=90,275+4,8875X-2,2187X^2$	91
	G4	$Y=87,075+4,2875X-1,3437X^2$	92
Primeira contagem (%)	G1	$Y=84,425+5,2125X-1,7812X^2$	82
	G2	$Y=50,175+6,5875X-2,2187X^2$	91
	G3	$Y=78,75+7,3749X-2,437X^2$	93
	G4	$Y=81,1+3,425X-1,1875X^2$	89
Envelhecimento acelerado (%)	G1	$Y=79,8-7,3499X+0,5X^2$	90
	G2	$Y=33,9375-8,5937X+0,5468X^2$	82
	G3	$Y=68,4625-16,3937X-0,9843X^2$	81
	G4	$Y=58+0,000014X-1,25X^2$	76
Índice de velocidade de emergência	G1	$Y=6,8736+0,9883X-0,2832X^2$	92
	G2	$Y=4,8802+0,6676X-0,2375X^2$	94
	G3	$Y=6,4907+1,1478X-0,3281X^2$	94
	G4	$Y=7,2107+0,6103X-0,2174X^2$	96
Condutividade elétrica (µmhos/cm/g)	G1	$Y=78,5752+4,4745X+0,8768X^2$	95
	G2	$Y=81,8368+11,0033X+1,6184X^2$	93
	G3	$Y=6,4907+1,1478X-0,3281X^2$	94
	G4	$Y=68,9958+10,0922X+1,0125X^2$	94
Emergência em leito de areia (%)	G1	$Y=93,65+9,2X-3,125X^2$	93
	G2	$Y=71,115+7,7575X-3,1187X^2$	93
	G3	$Y=87,4+14,7X-4,25X^2$	95
	G4	$Y=92,65+8,075X-2,6875X^2$	95

Quadro 3 - Equações de regressão e coeficientes de determinação R² (%) obtidos em cada teste realizado (variável), referentes aos genótipos LOX⁻Lin^b (G1); LOX⁺Linⁿ (G2) ; LOX⁻Linⁿ (G3) e LOX⁺Lin^b (G4), colhidas no estádio R8+30 dias, em função dos períodos de armazenamento.

R8 +30 dias			
Variável	Genótipos	Equações	R ²
Germinação (%)	G1	$Y=36,425-0,4125X-0,7187X^2$	71
	G2	$Y=24,075-6,5875X+0,4687X^2$	83
	G3	$Y=40,2-7,15X+0,25X^2$	74
	G4	$Y=18,4-1,925X-0,1875X^2$	71
Primeira contagem (%)	G1	$Y=30,25+2,625X-1,0625X^2$	70
	G2	$Y=11,9750+0,2375X-0,3437X^2$	57
	G3	$Y=30,675-3,2875X-0,1562X^2$	64
	G4	$Y=18,4-1,925X-0,1875X^2$	71
Envelhecimento acelerado (%)	G1	$Y=17,2-4,9X+0,3749X^2$	66
	G2	$Y=7,35-0,825X$	55
	G3	$Y=14,6-2,825X$	55
	G4	$Y=10,45-1,775X$	42
Índice de velocidade de emergência	G1	$Y=3,0695+0,0827X-0,0918X^2$	83
	G2	$Y=1,1317+0,6010X-0,1364X^2$	68
	G3	Curva de tendência devido à falta de ajuste	
	G4	$Y=1,574+0,7733X-0,3127X^2+0,0243X^3$	69
Condutividade elétrica (μmhos/cm/g)	G1	$Y=128,004+6,0282X+1,0387X^2$	86
	G2	$Y=145,533-2,3432X+2,6176X^2$	91
	G3	$Y=105,194+29,55X-2,045X^2$	90
	G4	$Y=115,879+26,7213X-1,02140X^2$	93
Emergência em leito de areia (%)	G1	$Y=40,7250-0,6374X-0,9062X^2$	78
	G2	$Y=16,45+7,35X-1,75X^2$	65
	G3	$Y=47,4+1,55X-0,9999X^2$	98
	G4	$Y=23,6050+1,027X-0,74X^2$	61