

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA & TECNOLOGIA DE  
SEMENTES**



**“O REFLEXO DA PRESENÇA DE SEMENTES ESVERDEADAS NA  
QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SOJA”.**

**MARIA DE FÁTIMA ZORATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas,  
sob a orientação do Prof. Dr. Silmar Teichert Peske,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência & Tecnologia de Sementes,  
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Setembro de 2003**

**Dados de catalogação na fonte:**  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

C313e Zorato, Maria de Fátima

O reflexo da presença de sementes esverdeadas na qualidade fisiológica em soja / Maria de Fátima Zorato; orientador Silmar Teichert Peske. – Pelotas, 2003. Tese (Doutorado). Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2003.

1. soja 2. sementes verdes 3. qualidade fisiológica  
4. armazenamento I. Peske, Silmar Teichert  
(orientador). II. Título.

CDD 633.582

**“O REFLEXO DA PRESENÇA DE SEMENTES ESVERDEADAS NA  
QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SOJA”**

**MARIA DE FÁTIMA ZORATO**

**Bióloga**

**Mestre em Agronomia**

**TESE**

**Submetida como parte dos requisitos**

**para obtenção do Grau de**

**DOUTOR EM CIÊNCIAS**

**Programa de Pós Graduação em Ciência & Tecnologia de Sementes**

**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**

**Pelotas, RS – Brasil.**

**Aprovado em: 19/09/2003**

MARIA DE FÁTIMA ZORATO

Bióloga

O REFLEXO DA PRESENÇA DE SEMENTES ESVERDEADAS NA  
QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SOJA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Silmar Teichert Peske

Francisco Amaral Villela

José de Barros França Neto

Cláudio Takaeda

COMISSÃO EXAMINADORA:



Silmar Teichert Peske  
Orientador



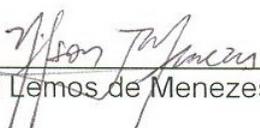
Luís Osmar Braga Schuch



Francisco Amaral Villela



Maria Ângela André Tillmann



Nilson Lemos de Menezes



Cleiton Stigger Perleberg

## APRESENTAÇÃO

A presente Tese foi redigida em “Forma de Publicação” e composta pelos seguintes trabalhos científicos:

- Presença de sementes de soja esverdeadas na qualidade fisiológica.
- Sementes esverdeadas: testes alternativos para determinar sua qualidade.

Antecedendo a apresentação dos referidos trabalhos encontra-se uma Introdução de caráter geral.

**O Deus que me conecta com o universo.**

## **DEDICO**

**A meus pais Omar e Maria Aparecida, que me conduziram pelo rumo certo e por todo afeto.**

**Aos meus irmãos Mara Lúcia e Omar Júnior que acreditam nos meus sonhos.**

**Aos cunhados Humberto e Sandra Regina pelo constante apoio.**

**Aos sobrinhos Rafael e Mariele Cristina, fonte de constante aprendizado.**

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que compartilharam e tornaram possível a realização desta Tese:

Ao Professor Ph.D. Silmar Teitchert Peske, a quem expresso minha gratidão pela orientação, confiança, credibilidade e liberdade na condução do trabalho.

Ao Dr. Cláudio Takeda meu profundo reconhecimento pela realização da competente análise estatística dos dados, sugestões e críticas fundamentais, pelo auxílio em trabalhos de campo e pela capacidade de transformar horas turbulentas em suavidade para obtenção de glória no desafio.

À diretoria da Aprosmat, nas pessoas dos Diretores-Presidentes, Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Christopher Barry Ward, responsável da liberação e incentivos e Edeon Vaz Ferreira que permitiu a continuidade do curso.

Ao Dr. Elton Hamer pelo constante estímulo, mostrando que o sonho pode tornar-se realidade.

Ao Ph.D. Clovis Terra Wetzel pelo carinho, compreensão, amizade e incentivos durante o árduo trajeto.

Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Gilberto Flávio Goellner, Fazenda Girassol, grande amigo incentivador, pelas condições de realização do trabalho, através de estrutura física e pessoal.

A Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Nadia Cristina Astafeief, Responsável Técnica do laboratório da Aprosmat, amiga e escudeira, sem a qual não teria sido possível a realização do curso, minha dívida de gratidão.

Ao companheiro Walmir Míssio e sua competente equipe de trabalho (Sementes Girassol) pela dedicação e grande responsabilidade.

Aos colaboradores do laboratório da Aprosmat, pela percepção e auxílio nas análises, meu carinho especial.

Aos colaboradores técnicos e operacionais da Fundação MT pela parceria na condução dos experimentos de campo e pela grande amizade e companheirismo.

A Mônica Curzel e Regina Ward pelos trabalhos de finalização, apresentação e tradução, meu carinho infindo.

Aos proprietários das fazendas: Arco Íris, Agro-Sol, Bom Jesus, Carolina, Girassol, Mônica e Tropical, através de seus Responsáveis Técnicos, pelo apoio e cessão das sementes.

A Embrapa Soja, através do laboratório de sementes, na condução de teste de condutividade, meu respeito e agradecimento.

Aos amigos de todas as horas, Zilda de Fátima & Luiz Carlos Miranda, Márcio José Dal Moro Mathias, Marcos Aurélio Bacceti, Alzirene & Alexandre Possebon da Silva, Vanessa & Elcio Cardoso, Márcia & Eleri Hamer, Sebastiana & Valentino Astafeief, Mabel Nakai, Marcia Midori Yuyama, Paulo Afonso Takao Watanabe e José Francisco Vieira Martins, pela ilimitada energia transmitida, pelo carinho e respeito à minha carreira profissional.

A Professora Dra. Patrícia Sinnecker, da Universidade de São Paulo-USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela colaboração e envio de trabalho, o qual muito corroborou para o desenvolvimento desta Tese.

Aos colaboradores das bibliotecas do IAPAR, EMBRAPA SOJA, UEL e UFPel por gentilezas, ensinamentos e direcionamentos.

À Universidade Federal de Pelotas-UFPel, em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade da realização do curso.

Ao corpo docente do curso de doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes, por oferecer seus conhecimentos e me darem a chance de aprender.

Aos colegas do curso, pelo convívio e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual teria sido impossível esta pesquisa.

## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
REFERÊNCIAS .....	14

### CAPÍTULO 1

#### **PRESENÇA DE SEMENTES DE SOJA ESVERDEADAS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA**

RESUMO .....	19
ABSTRACT .....	20
INTRODUÇÃO .....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS .....	36
TABELAS .....	41
FIGURAS.....	43

### CAPÍTULO 2

#### **SEMENTES ESVERDEADAS EM SOJA: TESTES ALTERNATIVOS PARA DETERMINAR SUA QUALIDADE**

RESUMO .....	45
ABSTRACT .....	46

INTRODUÇÃO .....	47
MATERIAL E MÉTODOS .....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS .....	61
TABELAS .....	65
FIGURAS .....	69
CONCLUSÃO GERAL .....	71

## O REFLEXO DA PRESENÇA DE SEMENTES ESVERDEADAS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SOJA, 2003 – UFPel

Aluna: Maria de Fátima Zorato

Orientador: Silmar Teichert Peske

**RESUMO** - A retenção de clorofila tem afetado a produção de sementes de soja, na região dos cerrados, principalmente, no Estado de Mato Grosso. A consequência é a diminuição de germinação e vigor com prejuízos no estabelecimento de população adequada de plantas, no momento de semeadura. A degradação de clorofila pode ser afetada pelo estágio de maturação, por condições de secagem, condições climáticas e por produtos químicos dessecantes. O processo de maturação, além da importância na degradação do pigmento verde tem efeito distinto na produção das duas enzimas específicas da germinação, isocitrato liase e malato sintase, que convertem os lipídios em açúcares solúveis. A maturação, também, pode ser importante reduzindo a possibilidade da clorofila na produção de radicais livres que causam danos oxidativos, os quais afetam a longevidade das sementes. Em sementes armazenadas ocorrem mudanças associadas à deterioração que podem ser medidas através de envelhecimento acelerado e reações bioquímicas. Este estudo teve como objetivo averiguar a influência exercida na qualidade, avaliar protocolos que sejam adjuvantes em determinar essa qualidade de sementes com retenção de clorofila. As sementes esverdeadas apresentaram menor germinação, viabilidade e vigor, comprimento de plântulas, capacidade de emergência em campo e peso de massa seca e maior desuniformidade de plântulas, taxa de deterioração e quantidade de lixiviados. Clorofila é indicativo de redução de qualidade em sementes de soja e, diferentes porcentagens de sementes esverdeadas interferem em maior ou menor intensidade na qualidade, sendo possível avaliar o risco do potencial fisiológico do lote, através da subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade) e do teste de tetrazólio, em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado, no período de 24 horas, pode ser utilizado para determinar a qualidade de sementes de soja esverdeada.

Termos para indexação: *Glycine max*, clorofila, vigor, germinação.

## **THE REFLECTION OF THE PRESENCE OF GREEN SEED IN THE PHYSIOLOGICAL QUALITY IN SOYBEAN, 2003 - UFPel.**

Student: Maria de Fátima Zorato

Adviser: Silmar Teichert Peske

**ABSTRACT** - Chlorophyll retention has been affecting soybean seed production, in the savannah (cerrado) region, mainly in the state of Mato Grosso. The consequence of this verification, are the losses in germination and vigor, and consequently losses in establishing an adequate plant population, at seeding. Chlorophyll decay can be affected by the maturation period, drying conditions, climatic conditions, and desiccating chemical agents. The maturation process, besides the importance of degradation from the green pigmentation, has a distinct effect on the production of specific germination enzymes, such as isocitrate lyase and malate syntase, these convert the lipids into soluble sugars. Maturation can also be considered important in reducing chlorophyll's capacity to produce free radicals that cause oxidation damage, these that determine the storage life of seed. Within stored seed, changes occur associated with deterioration, these can be measured through accelerated aging and biochemical reactions. This study was developed with the objective; verify the influence exerted on quality, evaluate adjuvant protocols in determining this quality of seed with chlorophyll retention. Green seed demonstrated lower germination, viability and vigor, less uniformity in seedlings, a higher rate of deterioration, higher level of leachate, reduced plant length, lower emergence capacity in the field, as well as a lower dry matter weight. Chlorophyll is an indication of reduction quality in soybean seeds. In the tetrazolium tests, the subclass WD 4-5, indicated the risk of the physiological quality of lot, when present, green seed. The viability obtained from a tetrazolium test, in substitution to accelerated aging germination test with an exposure of 24 hours can be utilized in determining the quality of green soyabena seeds.

Index terms: *Glycine max*, Chlorophyll, vigor, germination.

## INTRODUÇÃO GERAL

A degradação parcial da clorofila em soja deixa como consequência cotilédones esverdeados e tem causado preocupação aos produtores brasileiros. Sobretudo no Centro-Oeste, região severamente afetada pelo fenômeno, que se traduz em prejuízos, tanto para a indústria de óleos comestíveis, como para a produção de sementes. Este mesmo problema tem ocorrido em outros países tropicais onde a soja é cultivada.

Para a indústria esmagadora de grãos acarreta perdas porque o óleo, com elevado teor de clorofila, proveniente da extração de grãos verdes, sofre redução em sua estabilidade oxidativa, levando o produto ao processo de rancificação e, conseqüentemente, reduzindo a vida útil de prateleira. Além disso, confere coloração indesejável (mais escura), e comercialmente inadequada e diminui o processo de hidrogenação. A remoção dos pigmentos verdes por adsorção em agentes clarificantes eleva o custo de refinação (Endo et al., 1984; Usuki et al., 1984; Ward et al., 1992 e 1995; Jalink et al., 1999; Sinnecker, 2002).

A presença de grãos esverdeados, além de reduzir o valor comercial (descontos) pode ainda trazer maiores problemas na comercialização de grãos para exportação. Essa hipótese se fundamenta no fato de que para promover as relações de comercialização da soja entre produtores e compradores, tanto nos mercados nacionais como nos internacionais, cada país desenvolveu suas próprias normas quanto aos procedimentos de padrões de classificação. No Brasil, os limites de tolerância no padrão básico de classificação são menos rigorosos sendo aceitos até 10% de grãos esverdeados. Entretanto, nos Estados Unidos os padrões para grãos de cores que não a amarela é de apenas 1%. O mercado nacional pode se tornar restritivo aos grãos verdes e isto ser relevante frente ao volume de exportação da soja brasileira (Sinnecker, 2002).

A produção de sementes é outro setor muito prejudicado com a degradação parcial da clorofila, que dependendo das nuances (variações da tonalidade) do verde remanescente nas sementes pode influir de forma negativa na qualidade fisiológica das mesmas.

No Estado de Mato Grosso, quantidades expressivas de lotes de sementes de soja são descartadas para a indústria, devido o decréscimo de poder germinativo e vigor que afetam, de forma significativa, o estabelecimento de estandes iniciais, devido as sementes esverdeadas apresentarem dificuldades para emergir. Esse tipo de semente pode apresentar mudanças durante o armazenamento que associadas ao processo de deterioração são responsáveis pela menor longevidade. Ou seja, podem perder seu potencial fisiológico com o passar do tempo.

O impacto do pigmento verde sobre a qualidade fisiológica é maior quanto mais elevado for o índice de sementes esverdeadas e quanto maior a intensidade da tonalidade do verde incidindo nos cotilédones das sementes presentes no lote.

O conhecimento sobre a fisiologia e a bioquímica de degradação da clorofila é muito restrito. Sabe-se que inicia na senescência, sofre influência do genótipo e pode ser desencadeada por estresse hídrico, redução de luz ou elevada intensidade luminosa, mudanças de temperatura, aumento no teor de etileno, aumento da permeabilidade de membrana e mudanças no pH. A degradação completa da clorofila somente pode ser obtida se a soja for colhida a partir do estágio R7 e pode ser afetada pelo estágio de maturação, pelas condições de secagem, por condições climáticas e por produtos químicos dessecantes. (Ward et al., 1992 e 1995; Heaton & Marangoni (1996); Sinnecker 2002).

Nos estudos de Sinnecker (2002), o mecanismo de degradação do pigmento verde pareceu ser um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico não-enzimático, que resultou num aumento de feofitinas e outros derivados fitilados.

O desenvolvimento de sementes está correlacionado com o amarelecimento das vagens e das folhas, fazendo parte da síndrome da senescência monocárpica, a degeneração que conduz à morte do organismo inteiro, no final da fase reprodutiva (Guiamét et al. ,1991; Noodén, 1984)

Muitos fatores ambientais que ocorrem durante o desenvolvimento da planta de soja são determinantes para a qualidade de suas sementes. Os efeitos fundamentais da água no desenvolvimento e metabolismo sugerem que esta pode tomar lugar de maior papel na evolução de vários mecanismos fisiológicos que regulam o padrão de desenvolvimento da planta. Uma drástica redução no conteúdo de água, com a aproximação da maturidade, explica a inibição de desenvolvimento e o declínio associado à atividade metabólica (McIntyre, 1987). A degradação da clorofila ocorre de forma simultânea, com a maturação das sementes. A clorofila é fotossinteticamente inativa devido à interrupção do metabolismo (Jalink et al., 1998).

A região dos cerrados, de acordo com Assad et al. (1993) é afetada por veranicos (períodos de interrupção da precipitação que ocorrem durante a estação chuvosa) e, de forma geral, essa estiagem atinge as culturas em sua fase reprodutiva e pode ter maior ou menor frequência de duração, conforme sua localização. Somando-se a isso, altas temperaturas do ar podem, indiretamente, induzir um déficit hídrico na planta e, caso isto aconteça durante a fase de deposição de reservas, essa pode ser antecipada e provocar a dessecação e o início de maturação, período em que as clorofilas são degradadas (Sionit & Kramer, 1977; Cure et al., 1983; Adams et al., 1983; Ketring, 1984; Egli, 1990). Como, de maneira constante, na região Centro-Oeste ocorre deficiência hídrica, devido irregularidade na distribuição de chuvas, associada em muitas situações a solo arenoso e elevadas temperaturas do ar, torna-se compreensível o surgimento de conseqüências, a exemplo de sementes esverdeadas que minimizam a qualidade dos lotes formados, oriundos de campos prejudicados por estes estresses ambientais.

Adams et al., (1983) consideraram a temperatura e a umidade relativa do ar influenciando no processo de maturação, época em que as clorofilas são degradadas e observaram também que, sementes de soja sofrendo desidratação de maneira rápida, não perdem a clorofila no mesmo grau como as sementes desidratadas de forma lenta. Informações corroboradas por Ward et al. (1992), em sementes de canola, nas quais, uma rápida perda de umidade, na câmara de secagem, aparentemente interrompeu

a degradação de clorofila, devido ao baixo grau de umidade das sementes, resultando em altos níveis de clorofila.

Além dos efeitos distintos na degradação da clorofila, sob influência do genoma, no processo de maturação, as sementes de oleaginosas que sofrem desidratação lenta produzem enzimas específicas de germinação, isocitrato liase e malato sintase, que atuam na via do glioxalato, no ciclo do ácido cítrico (Krebs). No entanto, foi observado por Adams et al., 1983, sementes que sofreram maturação rápida, não produzindo as duas enzimas. O ciclo do glioxalato, nos registros de Lehninger et al. (1995) é uma via metabólica exclusiva que permite a conversão de gorduras armazenadas em carboidratos, durante a germinação.

A maturidade das sementes pode ser importante para reduzir a possibilidade da clorofila produzir radicais livres, os quais podem causar danos oxidativos (Jalink et al., 1999) determinantes na longevidade das sementes. As reações oxidativas são em parte responsáveis pela deterioração das sementes armazenadas e envolvem enzimas que podem funcionar em baixa atividade de água (Vertucci & Leopold, 1987).

Diante a dificuldade de informações em literatura sobre sementes esverdeadas e com o propósito de averiguar a influência que a clorofila exerce sobre a qualidade fisiológica e, avaliar protocolos que sejam adjuvantes em determinar a qualidade de sementes esverdeadas de soja, foi desenvolvido este estudo.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Depois de dominados os mecanismos genéticos que controlam o início da floração da soja, viabilizando o seu cultivo em regiões tropicais, os cientistas brasileiros aprimoraram os sistemas de produção, permitindo a expressão de seu potencial (Vidor & Gazzoni, 2002). Os autores continuam a exposição citando que a saga da soja pelo Centro-Oeste brasileiro transformou em metrópoles cidades de porte médio e fez surgir cidades do nada ou de pequenos conglomerados urbanos, transformando a

paisagem e a economia dos estados da região. O Mato Grosso, para dar um exemplo, em apenas 25 anos, viu a soja transformar-se de uma curiosidade botânica, para o principal negócio do Estado.

No entanto, a grande evolução tecnológica e biológica que tem ocorrido na agricultura trouxe maior responsabilidade para o setor sementeiro, porque o veículo utilizado como transportador de toda a tecnologia é a semente, passando, dessa forma, a ser o insumo de muita relevância.

Nesse sentido, alguns percalços estão ocorrendo para obtenção de sementes de alta qualidade fisiológica. Em Mato Grosso, na safra 1998/1999, foram descartados expressiva quantidade de lotes de sementes de soja, que sofreram redução de vigor e germinação, em função das condições climáticas desfavoráveis (estresse hídrico associado elevadas temperaturas), nas regiões produtoras de sementes do Estado, em fases de enchimento de grãos e/ou, durante maturidade fisiológica e colheita.

Nessas condições citadas ocorrem, normalmente, danificações mecânicas nas sementes prejudiciais à qualidade porque proporcionam formação de plântulas anormais no momento de germinação. Porém, além de danos mecânicos, os efeitos desses estresses têm se tornado ainda mais preocupantes, em razão do surgimento de sementes com cotilédones esverdeados. Esse fenômeno, quase sem esclarecimento, acarreta um enorme prejuízo financeiro em toda cadeia produtiva da soja porque, além de prejudicar o vigor e a germinação das sementes, também, a indústria apresenta problemas decorrentes de recebimento de grãos esverdeados.

Revisando a literatura, escassos são os artigos referentes ao assunto. Dentro do contexto, foram pesquisados artigos que relataram os problemas oriundos de estresses climáticos e abordagens sobre senescência e a degradação da clorofila, esse último um tema ainda pouco elucidado.

### **Respostas fisiológicas das sementes de soja**

Na produção vegetal, a água desempenha papel fundamental, de maneira que sua deficiência ou seu excesso afeta de forma decisiva o crescimento e o desenvolvimento das plantas. E, a seqüência de modificações no teor de água da semente vem se constituindo em parâmetro relativamente eficiente

para caracterizar o desenvolvimento da semente, empregado, com freqüência, na determinação da maturidade fisiológica (Villela & Marcos-Filho, 1998).

Durante a fase inicial de formação da semente, os tecidos estão no nível de hidratação superior a 41% ( $> -1,5\text{Mpa}$ ), e o metabolismo é possível, permitindo a formação das partes constituintes da semente e o acúmulo das substâncias de reserva, as quais, no caso de soja, os nutrientes resultantes da quebra das substâncias do endosperma são absorvidos pelas células de transferência que se diferenciam na epiderme mais externa dos cotilédones. À medida que os cotilédones iniciam a sua expansão, inicia-se também a deposição de reservas como, proteínas, lipídios, carboidratos (Bryant, 1989; Villela & Marcos-Filho, 1998; Guimarães, 1999). Enquanto o teor de massa de matéria seca vai aumentando, o grau de umidade da semente tende a diminuir. Na maturidade fisiológica a semente apresenta-se entre teores de água de 33% ( $-4\text{Mpa}$ ) e 41% ( $-1,5\text{Mpa}$ ), permitindo ocorrer com esses níveis de hidratação, determinados processos de síntese protéica, necessária à germinação. Também neste nível de hidratação a germinação, de forma geral, é impedida ou por deficiência de umidade ou por algum fator endógeno à semente, como dormência. Nesta fase ocorre o desligamento da semente com a planta-mãe e acentua-se a perda de água, com uma tendência natural da semente estabelecer o equilíbrio higroscópico com o ambiente (Vertucci, 1990; Vertucci & Farrant, 1995; Guimarães, 1999).

Nas considerações de alguns autores citados por Adams et al (1983), a maturação em sementes de soja é a fase final da produção. Ela ocorre naturalmente quando a semente alcança o máximo de peso seco num estágio descrito como maturidade fisiológica. Todavia, a maturação não depende apenas da planta-mãe ou apenas do estágio de desenvolvimento da semente. A maturação é uma fase metabolicamente ativa, envolvendo proteína, utilização de amido e produção de açúcares solúveis. Muitas outras mudanças fisiológicas provavelmente ocorrem durante a maturação da semente, embora, haja pouca informação das exigências para a produção de sementes maduras e viáveis.

Para McIntyre (1987), a drástica redução do conteúdo de água nas sementes, com a aproximação da maturidade, torna-se suficiente para explicar a inibição do crescimento e o declínio

associado na atividade metabólica. Egli (1990) encontrou dados sugerindo que o acúmulo de matéria seca pelas sementes de soja pode continuar enquanto houver uma rede de absorção de água para dirigir a expansão celular. Na ausência dessa rede, um acúmulo contínuo de matéria seca causa a dessecação que desencadeia a maturação. Também apontou mecanismos da semente, os quais desencadeiam o final de seu desenvolvimento, podendo operar independentemente de mudanças na disponibilidade de assimilados.

Adams et al. (1983) mostraram, a maturação, por meio de desidratação lenta, sendo um processo necessário para produção de sementes de soja viáveis, para obter distintos efeitos na degradação de clorofilas e na influência do genoma para permitir a produção das enzimas específicas de germinação, a malato sintase e a isocitrato liase. Em sementes de soja, essas enzimas são chaves na regulação do ciclo do glioxalato, onde os lipídios insolúveis das sementes são convertidos em açúcares solúveis (sacarose) forma em que são deslocados para os meristemas radiculares e apicais (Cioni et al., 1981; Bewley & Black, 1994)

Jalink et al. (1998) apontaram o estado da maturidade como um importante aspecto da qualidade de sementes e que as sementes imaturas ou não totalmente maduras são geralmente de menor qualidade que as sementes maduras. Os autores estudaram a intensidade da fluorescência em tegumentos de sementes de repolho (*Brassica oleracea*) classificados de acordo com a intensidade da fluorescência (baixa, média, alta e muito alta). Obtiveram resultados que indicaram a existência de uma relação inversa entre a magnitude da fluorescência e a qualidade das sementes, expressa pelas porcentagens de germinação, plântulas normais, taxa de germinação ( $T_{50}$  - número de dias para alcançar 50% de germinação máxima) e uniformidade de germinação ( $T_{75} - T_{25}$ , número máximo de dias entre 25% e 75% de germinação máxima). Com esses dados propuseram a fluorescência da clorofila do tegumento de sementes como um método não destrutivo para a determinação da maturidade e da qualidade das sementes. Os autores explanaram sobre as vantagens do método por expressar alta sensibilidade, não destruir a semente, pela rapidez com que a fluorescência é avaliada e

pela especificidade por um único elemento, a clorofila. Outros pigmentos ou substâncias, que podem alterar a coloração da semente, mas não apresentam a emissão da fluorescência no comprimento de onda de excitação e emissão da clorofila, não contribuem para a identificação.

De acordo com Guiamét et al. (1990), o desenvolvimento de sementes está correlacionado com o amarelecimento das vagens e das folhas, fazendo parte da senescência monocárpica.

### **Processo de senescência**

A bioquímica precisa do processo de senescência é incerta (Noodén, 1984). O autor realizou uma mini-revisão para verificar a integração do desenvolvimento de vagem e a senescência monocárpica, assim como, formulou hipóteses na seqüência das mudanças fisiológicas e na correlação do controle que coordena as diferentes partes. Considerou o desenvolvimento de diferentes partes de uma planta de soja como obviamente bem integrada, ainda assim a coordenação sendo pouco compreendida. Sumarizou e integrou dois aspectos do desenvolvimento reprodutivo em soja: a) desenvolvimento de vagem e b) senescência monocárpica (degeneração que conduz a morte do organismo inteiro, no final da fase reprodutiva), com ênfase particular, no controle. Concluiu que em soja, a senescência monocárpica está proximamente associada com o desenvolvimento de vagem e ambas são sujeitas a uma série de controles correlativos. Os controles correlativos também funcionam num estágio precoce do desenvolvimento reprodutivo (floração e início de formação de vagem). A natureza desses controles não está amplamente conhecida, contudo, os hormônios, assim como os fluxos de nutrientes parecem estar envolvidos.

Etileno e clorofila em semente foram positivamente correlacionados durante o amarelecimento de semente, mas altos níveis de etileno, não parecem controlar a taxa de degradação da clorofila. O pico da produção de etileno iniciou depois que a perda de umidade e degradação da clorofila tinham começado, sugerindo que etileno endógeno, não foi quem desencadeou estes eventos (Ward et al., 1995).

McIntyre (1987) formulou a hipótese de que a senescência das folhas é uma consequência direta de uma redução do conteúdo de água dos tecidos e o começo é desencadeado quando a perda de água reduz o turgor das células abaixo de um certo nível crítico. Desde que os efeitos de injúrias da senescência na membrana celular aumentam a taxa de transpiração, o processo de senescência, uma vez iniciado, tende a ser auto-manter.

Guiamét et al., (1991) citando vários autores apontou a degradação da clorofila a mais notável das mudanças que ocorrem durante a senescência foliar e é frequentemente usada como um indicador deste processo. O desenvolvimento de embriões de soja, tegumentos da semente, parede das vagens e folhas, normalmente, são verdes e tornam-se amarelos durante a maturação da semente. O desenvolvimento das sementes está correlacionado com o amarelecimento das paredes das vagens e das folhas, as quais são partes da síndrome da senescência monocárpica. Todavia, para Noodén (1984) devido o desenvolvimento de vagens e a senescência foliar estar proximamente entrelaçados, muitas vezes é difícil distinguí-los.

Sendo os cotilédones essencialmente folhas modificadas, representando as primeiras folhas da planta, então mudanças de pigmentação durante a maturação da semente podem estar ligadas ao processo de amarelecimento na senescência foliar (Thomas & Smart, 1993; Raven et al., 2001). Durante a senescência a clorofila desaparece e os produtos finais do catabolismo parecem não ser pigmentados (Thomas & Smart, 1993).

### **Degradação de clorofila.**

Pouco é conhecido sobre a fisiologia de degradação da clorofila (Ward et al., 1992).

Na fotossíntese, a energia luminosa é convertida em energia química e o carbono é fixado em compostos orgânicos. A primeira etapa da fotossíntese é a absorção de energia luminosa pelas moléculas dos pigmentos. O cloroplasto é o sítio da fotossíntese em organismos eucarióticos. As reações de captação de luz ocorrem nos tilacóides, onde a clorofila e outros pigmentos são encontrados.

A seqüência de reações através das quais a energia é usada para sintetizar os compostos contendo carbono ocorre no estroma, matriz que circunda os tilacóides (Raven et al., 2001). Nas considerações de Sinnecker (2002), as clorofilas e as enzimas requeridas para reações luminosas encontram-se incrustadas nas membranas tilacóides, associadas a proteínas.

Sinnecker (2002), revisando o assunto verificou que as clorofilas são ésteres, solúveis na maioria dos solventes orgânicos (etanol, acetona, benzeno, éter e clorofórmio), mas não são solúveis em água. São extremamente lábeis, sensíveis à luz, ao calor, ao oxigênio e à degradação química. As clorofilas são fluorescentes quando estão em solução. Todas as plantas verdes contêm, clorofila a e clorofila b. Ambas as clorofilas a e b, são derivadas da dehidroporfirina quelada com um átomo de magnésio, localizado no centro da molécula. Todas as clorofilas são porfirinas. O átomo central de magnésio é facilmente removido da clorofila, principalmente em condições ácidas, sendo substituído por hidrogênio, formando as feofitinas. A hidrólise do grupo fitol da feofitina com ácido ou álcali, origina os feoforbídeos. A clivagem do grupo fitol sem remoção do íon magnésio é geralmente catalisada de forma enzimática pela clorofilase endógena, produzindo os clorofilídeos.

O mecanismo proposto para a degradação da clorofila em tecidos vegetais por Heaton & Marangoni (1996) compreende as seguintes etapas: ocorre a conversão da clorofila – feofitina – feoforbídeo ou, em clorofila – clorofilídeo – feoforbídeo. Ocorre a perda primária do íon magnésio, em meio ácido, com formação de feofitina, seguida da clivagem da cadeia fitol para formar feoforbídeo; ou, ocorre clivagem do grupo fitol, pela ação de enzima clorofilase, formando clorofilídeo, que também pela remoção de seu íon magnésio pode ser convertido em feoforbídeo. A especificidade enzimática pode aumentar com pequenas variações de pH para remoção da molécula de clorofilídeo das ligações de proteína com a clorofila a e com clorofila b e, provavelmente, remover o átomo de magnésio do centro. Essa remoção do magnésio pode também ser propiciada pela enzima magnésio-dequelatase. Embora, sua existência ainda não ter sido confirmada, as evidências sugerem que essa enzima exerça um papel no catabolismo da clorofila. As seguintes etapas ocorrem: com a clivagem do anel de

porfirina, de forma provável, pela ação da enzima oxigenase, formando compostos fluorescentes e incolores. A ação dessa enzima requer um redutor como cofator (glucose-6-fosfato). Os compostos são exportados dos cloroplastos para os vacúolos, local que são convertidos em compostos não fluorescentes “rusty pigments”. Uma mudança da localização das duplas ligações leva a perda de fluorescência. Não é conhecido, se nesse momento, os compostos não fluorescentes são ainda degradados dentro do vacúolo ou se permanecem estáveis até a morte da célula.

Com o objetivo de estudar a degradação da clorofila Sinnecker (2002) estabeleceu um planejamento experimental consistindo de: a) estudar o perfil dos pigmentos (clorofila e derivados coloridos) em grãos de soja de três cultivares, em seis estádios de maturação R<sub>6</sub> a R<sub>8</sub> (com a adição temporal de três estádios intermediários R<sub>6</sub>-R<sub>7</sub>(I); R<sub>6</sub>-R<sub>7</sub>(II); R<sub>6</sub>-R<sub>7</sub>(III), visando possibilitar a identificação dos compostos intermediários da degradação da clorofila), em dois anos alternados; b) identificar e caracterizar os produtos de degradação da clorofila das sementes após submetê-las a três condições de secagem (temperatura ambiente a 25<sup>0</sup>C e em estufa nas temperaturas de 40<sup>0</sup>C e 75<sup>0</sup>C) e, c) propor possíveis mecanismos químicos e/ou bioquímicos envolvidos na degradação da clorofila. O autor concluiu que tanto na maturação no campo, como na secagem a temperatura de 25<sup>0</sup>C, o mecanismo de degradação pareceu ocorrer por via enzimática, com possibilidades de ser mediada pela enzima oxigenase, com formação de compostos incolores. Na temperatura de 40<sup>0</sup>C, houve retenção da cor verde e o mecanismo pareceu ocorrer por duas vias: a via enzimática, mediada pelas enzimas clorofilases, evidenciado pelo acúmulo de derivados defetilados (clorofilídeos e feoforbídeos) e uma segunda, a via química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas. Na temperatura de 75<sup>0</sup>C, foi observado também o acúmulo de clorofilas e feofitina, que de forma provável se deu pela inativação de todas as enzimas e favorecimento da feofetização. Ponderou ainda o autor que em soja, a degradação completa da clorofila somente pode ser obtida quando colhida a partir do estádio R<sub>7</sub> e que a degradação em sementes oleaginosas é função do estádio de maturação, do teor de umidade e da temperatura de secagem.

A quantidade de clorofila para maioria das espécies decresce no tegumento da semente, durante a maturação, ao mesmo tempo a cor da semente muda de verde para uma cor que depende da espécie e varia com a cultivar. Esse processo é chamado “degreening” (Ward et al., 1995; Jalink et al., 1998).

O “degreening” da semente pode ser importante para reduzir a possibilidade da clorofila produzir elétrons livres, os quais podem causar danos oxidativos. A deterioração de sementes durante o armazenamento, freqüentemente, tem sido relatada mediando danos oxidativos de radicais livres em proteínas, ácidos nucleicos e membranas (Jalink et al., 1999).

### **Participação de mutantes na degradação de clorofila**

Moreno-Martinez et al. (1994) enfatizaram o genótipo sendo o fator intrínseco mais importante nas sementes. Dentro do contexto de fatores potenciais contributivos na degradação de clorofila, Weis (1970) observou ligações genéticas entre alguns tipos de mutantes, com resultados envolvendo genes que condicionam a coloração verde e amarela dos cotilédones de soja. Para Thomas & Smart (1993) os caracteres de coloração estão associados com variações no padrão de senescência das folhas. Guiamét et al. (1990) registraram que genes mutantes podem modificar a senescência. No entendimento de Chao et al. (1995), poucos são os estudos ultraestrutural, fisiológico e genético que têm focado sobre mutantes que retém clorofila.

Em soja, Young & Roos (1978) numa abrangente revisão, apontaram cotilédones verdes resultando da retenção de clorofila controlada pela combinação de dois genes recessivos  $d_1$  e  $d_2$ . Guiamét et al. (1990) notaram que os genes  $d_1d_2$ ,  $Gd_1d_2$  e *CytG* pareceram alterar a resposta de senescência e, ainda observaram que *CytG* forneceu a primeira indicação de que genes que regulam a senescência podem residir no genoma do cloroplasto. Mas, consideraram os autores, a existência de pouco conhecimento a respeito da fisiologia das mudanças produzidas por genes mutantes e suas ações primárias. Os eventos mutacionais ocorrem aleatoriamente a qualquer momento e em qualquer célula. Em mutações condicionais, um alelo causa um fenótipo mutante em apenas determinado ambiente,

além de permitirem a determinação de um período sensível do desenvolvimento, no qual o gene atua em uma época específica (Griffiths et al., 1996).

Num estudo ultraestrutural do impacto de mutações causadoras de retenção de clorofila, durante a embriogênese de soja, Chao et al. (1995) verificaram que o mutante nuclear duplo-recessivo ( $d_1d_1d_2d_2$ ) e um mutante citoplasmático ( $CytG_1$ ), os quais foram identificados por seus tegumentos e sementes verdes, mostraram ter elevados níveis de clorofila em sementes maduras. Consideraram genes da fotossíntese continuando a se expressar por um maior período, em sementes em desenvolvimento, uma provável explicação para a retenção de clorofila nestes mutantes. Observaram ainda que, os cloroplastos ficaram retidos por todo o desenvolvimento do embrião e explicaram que evidências acumuladas sugerem os plastídeos produzindo um fator essencial para a manutenção da transcrição do gene da fotossíntese, sendo possível que as mutações alterem um passo no sinal do caminho de transdução. Esse estudo ultraestrutural revelou não haver membranas internas na linhagem testemunha, porém, numerosas membranas tilacóides empilhadas foram detectadas nas linhagens mutantes,  $d_1d_2$  e  $CytG_1$ . Nock et al. (1992) observaram a degradação da clorofila ser acompanhada por perdas de proteínas, do estroma e de membranas tilacóides.

De acordo com Sinnecker (2002), a estabilidade da membrana tilacóide diminui com o aumento da polaridade da molécula de clorofila provocado pela remoção do grupo fitol, um mecanismo de degradação do pigmento verde. Isso resulta em ruptura das interações proteína-lipídio e, possivelmente, em desnaturação das associações clorofila-proteína. A ruptura da membrana pode também liberar plastoquinonas e carotenóides e, assim, reduzir o transporte de elétrons e a habilidade de suprimir radicais livres, respectivamente. O aumento de radicais livres pode causar alterações conformacionais nas pontes de proteínas com a clorofila a e a clorofila b, desse modo, aumentar a susceptibilidade ao ataque proteolítico.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C. & RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v.23, n.2, p.265-267, 1983.
- ASSAD, E.D.; SANO, E.E.; MASUTOMO, R.; DE CASTRO, L.H. & DA SILVA, F.A.M. Veranicos na região dos cerrados brasileiros freqüência e probabilidades de ocorrência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.9, p.993-1003, 1993.
- BRYANT, J.A. **Fisiologia da Semente**. (1.ed.). São Paulo: Editora EPU. 1989. 85p.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v.2, 374p.
- CHAO, W.S.; LIU, V.; THOMSON, W.W.; PLATT, K. & WALLING, L.L. The impact of chlorophyll-retention mutations, d1d2 and cyt-G1, during embryogeny in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, n.1, p.253-261, 1995.
- CIONI, M.; PINZAUTI, G. & VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.70, n.1, p.1-26, 1981.
- CURE, J.D.; RAPER-Jr., D.; PATTERSON, R.P. & JACKSON, W.A. Water stress recovery in soybean as affected by photoperiod during seed development. **Crop Science**, Madison, v.23, n.1, p.110-115, 1983.
- EGLI, D.B. Seed water relations and the regulation of the duration of seed growth in soybean. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.223, p.243-248, 1990.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. **Annals of Botany**, New York, v.59, n.1, p.23-29, 1987.

- ENDO, Y.; USUKI, R. & KANEDA, T. The photooxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.4, p.985-989, 1984.
- HEATON, J.W. & MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescence plant tissues. **Trends Food Science Technology**, Amsterdam, v.7, n.1, p.8-15, 1996.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.I.; LEWOTIN, R.C. & GELBART, W.M. **Introdução à Genética**. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 1996. 856p.
- GUIAMÉT, J.J.; TEERI, J.A. & NOODÉN, L.D. Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.31, n., p.1123-1130. 1990.
- GUIAMÉT, J.J.; SCHWARTZ, E.; PICHERSKY, E. & NOODÉN, L.D. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding proteins during senescence in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.1, p.227-231, 1991.
- GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes**. Lavras: UFLA/FAEP, 1999. 132p.: In: (Curso de Especialização Pós-Graduação “Lato Sensu” Ensino à Distância – Produção e Tecnologia de Sementes).
- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R. FRANDAS, A. & VAN PIJLEN, J.G. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, New York, v.8, n.4, p. 437-443, 1998.
- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; BIRNBAUM, Y.E. & BINO, R.J. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.504, n.12, p. 219-228, 1999.
- KETRING, D.L. Temperature effects on vegetative and reproductive development of peanut. **Crop Science**, Madison, v.24, n.1, p.877-882, 1984.

- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. (2.ed.). São Paulo: editora Sarvier. 1995. 839p.
- McINTYRE, G.I. The role of water in the regulation of plant development. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n.7, p.1287-1298, 1987.
- MORENO-MARTINEZ, E.; VAZQUEZ-BADILLO, M.E.; NAVARRETE, R. & RAMIREZ-GONZALES, J. Effect of fungi and chemical treatment on viability of maize and barley seeds with different storage characteristics. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.22, n.3, p.541-549, 1994.
- NOCK, L.P.; ROGERS, L.J. & THOMAS, H. Metabolism of protein and chlorophyll in leaf tissue of *Festuca pratensis* during chloroplast assembly and senescence. **Phytochemistry**, New York, v.31, n.5, p.1465-1470, 1992.
- NOODÉN, L.D. Integration of soybean pod development and monocarpic senescence. **Physiology Plant**, Copenhagen, v.62, fasc.2, p.273-284, 1984.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. (6.ed.) Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001. 906p.
- ROBERTS, E.H. Loss of seed viability: chromosomal and genetics aspects. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.515-527, 1973.
- SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja**. São Paulo: USP. 2002. 103p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.
- SIONIT, N. & KRAMER, P.J. Effect of water stress during different stages of growth of soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, n.2, p.274-278, 1977.
- STECKEL, J. R.A.; GRAY, D. & ROWSE, H.R. Relationships between indices of seed maturity and carrot seed quality. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.114, n.1, p.177-183, 1989.

- THOMAS, H. & SMART, C.M. Crops that stay green. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.123, n.1, p.193-219, 1993.
- USUKI, R.; ENDO, Y. & KANED, T. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.4, p.991-994, 1984.
- VERTUCCI, C.W. & LEOPOLD, A.C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, Michigan, v.84, n.4, p.1038-1043, 1987.
- VERTUCCI, C.W. Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. **Biophysical Journal**, London, v.58, n.5, p.1463-1471, 1990.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J. & GALILI, G. (Ed.). **Seed Development and Germination**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p.237-271.
- VIDOR, C. & GAZZONI, D.L. Apresentação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2. 2002, Foz do Iguaçu. **Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 393p. (Documentos 181).
- VILLELA, F.A. & MARCOS-FILHO, J. Estados energéticos e tipos de água na semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.20, n.2, p.317-321, 1998.
- WARD, K.; SCARTH, R. DAUN, J. & McVETTY, P.B.E. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.72, n.3, p.643-649, 1992.
- WARD, K.; SCARTH, R. DAUN, J. & VESSEY, J.K. Chlorophyll degradation in summer oilseed rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.75, n.2, p.413-420, 1995.
- WEISS, M.G. Genetic Linkage in Soybeans: Linkage Groups II and III. **Crop Science**, Madison, v.10, n.3, p.300-303, 1970.

YOUNG, L.D. & ROSS, J.P. Resistance evaluation and inheritance of a nonchlorotic response to brown spot of soybean. **Crop Science**, Madison, v.18, n. , p.1075-1077. 1978.

## CAPÍTULO 1

### PRESENÇA DE SEMENTES ESVERDEADAS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SOJA<sup>1</sup>

MARIA DE FÁTIMA ZORATO<sup>2</sup>, SILMAR TEICHERT PESKE<sup>3</sup>, CLAUDIO TAKEDA<sup>4</sup> E JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO<sup>5</sup>

**RESUMO** - Sementes de soja, sobretudo, no Estado de Mato Grosso, região dos cerrados, têm apresentado cotilédones com degradação parcial de clorofila. A consequência direta desse fenômeno é o descarte de muitos lotes, resultado de sua baixa qualidade. Com o objetivo de averiguar a influência exercida pela clorofila na qualidade fisiológica, em soja, foi desenvolvido este estudo. Foram utilizados dois lotes comerciais (A e B) da cultivar MG/BR46-Conquista, ciclo precoce com 11,8% e 37,4%, de sementes esverdeadas, segmentados em três amostras: sementes sem manipulação (lote original), sementes esverdeadas e sementes amarelas. Cada amostra consistiu de um tratamento. Através dos testes de germinação, envelhecimento acelerado (24 horas), emergência em areia, tetrazólio, comprimento de raiz e plântula, peso de mil sementes, condutividade elétrica e emergência em campo, foi realizada a avaliação da qualidade das sementes, no momento de semeadura. As sementes esverdeadas apresentaram menores germinação, viabilidade e vigor; maiores desuniformidade de plântulas, taxa de deterioração e quantidade de lixiviados; menores comprimento de plântulas e peso de mil sementes e baixa capacidade de emergência em campo, indiferente ao índice porcentual de cotilédones com pigmentação verde, porém, o prejuízo foi maior no lote B, com 37,4% de sementes esverdeadas. Pode-se inferir que clorofila é indicativo de redução da qualidade em sementes de soja.

Termos para indexação: *Glycine max*, cotilédones esverdeados, senescência, deterioração, clorofila.

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em: / / ; parte da tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, FAEM, UFPel.

<sup>2</sup> Bióloga, bolsista do CNPq, Depto de Fitotecnia, FAEM, UFPel, Coordenadora Geral, Aprosmat, Cx. Postal, 81, 78745-280, Rondonópolis, MT; e-mail: [fzorato@terra.com.br](mailto:fzorato@terra.com.br)

<sup>3</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D., Prof. Titular, Depto de Fitotecnia, FAEM, UFPel; e-mail: [peske@ufpel.tche.br](mailto:peske@ufpel.tche.br)

<sup>4</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Dr., Coordenador de melhoramento, Fundação MT; e-mail: [takeda@fundacaomt.com.br](mailto:takeda@fundacaomt.com.br)

<sup>5</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D., Pesquisador, Embrapa Soja; e-mail: [franca@cnpsobrpa.br](mailto:franca@cnpsobrpa.br)

## GREEN SOYBEAN SEED IN THE PHYSIOLOGICAL QUALITY

ABSTRACT – Soybean seed, mainly from the state of Mato Grosso, savannah (cerrado) region, has presented cotyledons with partial degradation of chlorophyll. The consequence of this phenomenon has been the discarding of many seed lots, as result of their low quality. This study was developed with the objective of investigating the influence played by chlorophyll, over the physiological quality of soybean seed. Two commercial seed lots (A and B) of the cultivar MG/BR46-Conquista, early maturing cycle, with 11,8% and 37,4% of green seeds, respectively. Were segmented into three samples: original seed, green seed and yellow seed. Each sample composed one treatment. Seed quality evaluation was determined by the germination test, accelerated aging (24 hours), seedling emergence in sand, a tetrazolium test, seedling and radicle length, weight of a thousand seeds, electric conductivity, field emergence, all test performed at the time of planting. Green seed presented lower germination, viability and vigor, and a lower level of uniformity between the seedlings, a faster rate of deterioration, higher quantity of leachate, shorter plant length, lower one thousand seed weight, and a lower germination capacity in the field, independent of the quantity of the percentage of cotyledons with green pigmentation. However these losses were higher in the lot with 37,4% green seeds. It can be concluded that chlorophyll is an indication of reduction quality in soybean seeds.

Index terms: *Glycine max*, green cotyledons, senescence, deterioration, chlorophyll.

## INTRODUÇÃO

A produção brasileira de soja, sobretudo no Centro-Oeste, região dos cerrados, tem sido afetada por um fenômeno também preocupante em outros países, a retenção de clorofila. Os cotilédones apresentam vestígios do pigmento verde e a consequência verificada na produção de sementes é o decréscimo do vigor e da viabilidade.

Sementes esverdeadas no Estado de Mato Grosso têm propiciado prejuízos na emergência em campo, dificultando a formação de estandes recomendados para as diferentes cultivares, assim como, muito descarte de lotes de sementes, no momento de semeadura, resultado de sua baixa qualidade fisiológica, principalmente vigor.

A indústria, outro segmento da cadeia da soja, do mesmo modo, tem apresentado problemas decorrentes de recebimento de grãos ou sementes esverdeadas, em razão da clorofila ser uma molécula prooxidante, reduzir a estabilidade oxidativa do óleo, além de diminuir a velocidade do processo de hidrogenação devido a clorofila bloquear os centros ativos do catalisador (Endo et al., 1984; Usuki et al., 1984; Ward et al., 1992 e 1995; Jalink et al., 1999; Sinnecker, 2002).

O teor de clorofila em sementes de soja é determinado pelo genótipo e sofre uma variação significativa entre as cultivares. Esse nível pode ser afetado, tanto pelo estágio de maturação como pelas condições de secagem, ou pelas condições climáticas que podem interferir no amadurecimento normal em campo (Sinnecker, 2002).

Abordagens são registradas causadoras de sementes verdes em lavouras de soja, a exemplo da desuniformidade de maturação, ataque de insetos, principalmente, percevejos que causam a retenção de hastes verdes (Câmara & Heiffig, 2000). Porém, na discussão específica deste trabalho, não são estes os aspectos encontrados nos campos de produção de sementes, em Mato Grosso.

A partir do estágio R<sub>7</sub> (maturidade fisiológica) até R<sub>8</sub> (colheita), não se evidenciam distúrbios na fenologia, ou seja, a planta sofre a senescência, seguindo um padrão de coloração normal de

maturação, em relação ao total da população. Entretanto, na debulha de vagens, pode se observar algumas sementes com os cotilédones visivelmente esverdeados, sendo a localização destas sementes aleatória, tanto na planta quanto na vagem (Figuras 1 e 2).

A hipótese que, de forma provável justifica a alteração de fisiologia das sementes na região dos cerrados, é a ocorrência de estresse hídrico, associado às condições do microclima, a exemplo da alta temperatura do ar (acima de 30°C), baixa umidade relativa (abaixo de 50%), elevada intensidade luminosa, baixa retenção de umidade nos diferentes solos, principalmente, os arenosos e alta taxa de evaporação, no período considerado fundamental para a degradação da clorofila, o qual de acordo com Fukushima & Lanfer-Marquez (2000), transcorre na passagem do estágio R<sub>6</sub> para o estágio R<sub>7</sub>.

Adams et al. (1983), estudando soja, e Ward et al. (1992) e (1995), canola, observaram em campo, que quando a colheita foi realizada em condições de alta temperatura e baixa umidade relativa, com rápida perda de umidade, ou quando foram aplicados produtos químicos dessecantes na cultura para acelerar o amadurecimento, houve a ocorrência de sementes verdes. De acordo com Sinnecker, (2002), as clorofilas são ésteres, extremamente lábeis, sensíveis à luz, ao oxigênio e à degradação química.

Nos estádios finais de maturação ocorre uma brusca perda de umidade devido à interrupção de translocação de água e matéria orgânica para as sementes, quando a planta, a partir desse ponto, inicia a senescência e perde água por evaporação (Sinnecker, 2002). A drástica redução no conteúdo de água, com a aproximação da maturidade, explica a inibição de desenvolvimento e o declínio associado à atividade metabólica (McIntyre, 1987). De acordo com Guiamét et al. (1991), o desenvolvimento de sementes está correlacionado com o amarelecimento das vagens e das folhas, fazendo parte da síndrome da senescência monocárpica, que Noodén (1984) definiu como sendo a degeneração que conduz à morte do organismo inteiro, no final da fase reprodutiva.

De forma simultânea, com a maturação das sementes, ocorre a degradação da clorofila presente, a síntese de açúcares solúveis e modificações nas proteínas solúveis (Adams et al., 1983; Steckel et al.,

1989; Ward et al., 1992 e 1995). No momento da aquisição de tolerância à dessecação, a clorofila é fotossinteticamente inativa, devido ao metabolismo das sementes ser interrompido (Jalink et al., 1998). Todavia, pouco é o conhecimento sobre a fisiologia e a bioquímica de degradação da clorofila (Ward et al., 1992 e 1995).

As sementes desidratadas de maneira rápida, não perdem a clorofila no mesmo grau como as sementes desidratadas de forma lenta, que apresentam 1  $\mu\text{g}$  clorofila/semente. As sementes permanecem visivelmente verdes quando desidratadas rapidamente, chegando a apresentar até 29  $\mu\text{g}$  clorofila/semente (Adams et al., 1983). Corroborando com essas informações, Sinnecker, (2002) observou em campo, no avanço da maturação em soja ou em sementes colhidas antes do período de maturidade fisiológica, submetidas à secagem lenta à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ), um sistema enzimático envolvendo as enzimas oxigenases, que atuaram degradando o pigmento verde para compostos incolores. Entretanto, observou, também, sementes que ainda não tinham completado seu ciclo quando expostas à secagem rápida em estufa, na temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , o mecanismo de degradação da clorofila parecendo ter ocorrido por duas vias: via enzimática, mediada por clorofilases, formando pigmentos defitilados (clorofilídeos e feoforbídeos); e via química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas (pigmento acessório do tipo clorofila que não possui íon magnésio).

A secagem reduz o teor de água, evitando a deterioração por reações enzimáticas ou por desenvolvimento de microrganismos, que produzem lipases hidrolíticas, tendo, como consequência, o teor de ácidos graxos livres aumentados (Pritchard, 1983; Sinnecker, 2002).

Ensaio de Jalink et al. (1999) denotaram a maturidade das sementes sendo importante para reduzir a possibilidade da clorofila produzir elétrons livres os quais podem causar injúria oxidativa. No relato dos autores, a deterioração das sementes durante o armazenamento tem, de forma freqüente, se relacionado a radicais livres, mediando prejuízos oxidativos às proteínas, aos ácidos nucléicos e às membranas.

Existe diversidade de situações em que a clorofila, pigmento verde que funciona como receptor da energia luminosa no processo de fotossíntese, se transforma em parâmetro negativo, propiciando redução de vigor e do poder germinativo em sementes de soja.

Com escassa informação na literatura e denotando importância cada vez maior de conhecimento dos mecanismos de ação das sementes esverdeadas, foi desenvolvido este estudo para averiguar a influência que a clorofila exerce na qualidade fisiológica em sementes de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois lotes comerciais de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivar MG/BR46-Conquista, ciclo precoce, produzidos na safra agrícola 1999/2000, na região sul do Mato Grosso. Os lotes foram previamente selecionados de acordo com a presença visual de sementes esverdeadas, os quais apresentaram 11,8% e 37,4% e foram denominados de Lote A e Lote B, respectivamente. Para cada lote foram trabalhadas três amostras, segmentadas conforme a seguinte ordem: sementes representativas do lote original, sem manipulação e, sementes que foram escolhidas e retiradas do lote original e classificadas como: sem sinais visuais de pigmentação verde, consideradas sementes amarelas e sementes com nuances (diferentes tons) de pigmentos verdes, consideradas sementes esverdeadas. Cada amostra consistiu em um tratamento, sendo essa composta de aproximadamente 1,2 kg de sementes.

O critério utilizado para a obtenção da média porcentual de sementes esverdeadas nos lotes originais foi o seguinte: sob lupa circular de 6 aumentos (6x) foram separadas 10 subamostras de 100 sementes cada, em quatro repetições, e contabilizada a presença ou a ausência de pigmento verde nos cotilédones das sementes, que não foram expostas a nenhum tratamento, a exemplo de pré-umedecimento. Foi considerada toda e qualquer nuance de pigmento nos cotilédones da semente, então retirada para contagem (Figuras 3 e 4). Em caso de dúvida, foi retirado o tegumento da semente para melhor visualização e confirmação de vestígio (sinal) verde. Os resultados, expressos em números inteiros, foram computados para as 10 subamostras e realizada a média porcentual para cada repetição.

Na época de semeadura (novembro), no laboratório da Associação de Produtores de Sementes de Mato Grosso – APROSMAT, Rondonópolis-MT, no laboratório de Tecnologia de Sementes da Embrapa Soja, Londrina-PR e no campo da Fazenda Girassol, Pedra Preta-MT, as sementes que permaneceram armazenadas em câmara controlada à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa 50%, no período de maio a novembro/2000, foram submetidas aos seguintes testes:

**Teste de germinação (G)** – foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes em cada tratamento, por repetição. A semeadura foi realizada em rolo de papel-toalha, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e colocado em germinador sob temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram efetuadas no quinto dia após instalação e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais, conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

**Envelhecimento acelerado (EA)** – foram utilizadas 200 sementes, para cada tratamento, por repetição, distribuídas em camada uniforme sobre uma tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica tipo gerbox, funcionando como um compartimento individual (mini-câmara). Em cada mini-câmara foram adicionados 40 mL de água e colocadas a seguir, em câmara tipo BOD, regulada a  $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas (Marcos Filho, 1999). Após o período de exposição, duas subamostras de 100 sementes, para cada tratamento, por repetição, foram semeadas em areia.

**Emergência em areia (EAR)** – foram semeadas duas subamostras de 100 sementes, para cada tratamento, por repetição em bandejas de plástico (27cm x 32cm x 6cm), contendo areia umedecida a 60% da capacidade de retenção e deixadas para emergir em ambiente não controlado. A avaliação foi efetuada no quinto dia após a instalação do teste, removendo as plântulas e contabilizando plântulas normais e anormais e sementes deterioradas e/ou mortas. Os resultados foram expressos em porcentual de plântulas normais, conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

**Teste de tetrazólio (TZ)** – foi realizado empregando duas subamostras de 50 sementes, em cada tratamento, por repetição. As sementes foram pré-umedecidas em papel-toalha com água por 16 horas, à temperatura média de  $25^{\circ}\text{C}$ . Após o período, as sementes foram colocadas em copos plásticos, submersas em solução 0,05% de sal de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, por 150 minutos, à temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em estufa. Vencido o período de coloração, a solução foi drenada e as

sementes foram lavadas em água corrente. As avaliações de vigor e viabilidade, assim como os principais danos fisiológicos das sementes, foram efetuadas de acordo com critérios de França-Neto et al. (1998) e Zorato (2001).

**Comprimento de plântula (CP)** – foi efetuado com quatro subamostras de 10 sementes em cada tratamento, por repetição. A disposição das sementes foi no terço superior da folha de papel-toalha, marca Germitest, com o hilo voltado para a parte inferior, posição que facilita o desenvolvimento retilíneo da raiz e do hipocótilo. O substrato foi umedecido 2,5 vezes seu peso seco em água e os rolos foram colocados inclinados ( $45^0$ ) em germinador, em ausência de luz, a  $25^0\text{C} \pm 1^0\text{C}$ , durante cinco dias (Nakagawa, 1999). No final desse período, foram consideradas apenas as plântulas normais, de acordo com Brasil (1992) e medidas em centímetros (extremidade da raiz até o ponto de inserção dos cotilédones).

**Peso de mil sementes (PMS)** – foram empregadas oito subamostras de 100 sementes, em cada tratamento, por repetição, de acordo com critérios das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

**Condutividade elétrica (CE)** – teste realizado no laboratório de tecnologia de sementes, na Embrapa Soja, Londrina-PR, com uma subamostra de 100 sementes, para cada tratamento, por repetição. Colocadas para embeber em recipientes plásticos contendo uma célula para cada semente submersa em água destilada, por período de 24 horas à temperatura de  $20^0\text{C}$ . Após esse período, seguiu-se a leitura em condutivímetro modelo ASA 610, sendo o resultado expresso em porcentagem de viabilidade, tendo como referência o ponto de partição  $90 \mu\text{A}/\text{semente}$ .

**Emergência em campo (EC)** – teste realizado na Fazenda Girassol, município de Pedra Preta-MT, solo do tipo Latossolo Vermelho escuro distrófico, textura argilosa, utilizando 400 sementes (quatro subamostras de 100 sementes), em cada tratamento, por repetição. Semeadas em linhas de 1,50m de comprimento, espaçadas de 0,50m e 0,03m de profundidade. No período após semeadura e início de emergência foram utilizadas irrigações. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas emergidas, avaliadas ao décimo segundo dia após a semeadura.

**Procedimentos estatísticos** - o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. Os dados em porcentagens foram transformados em arc seno da raiz quadrada de  $x/100$ . As análises estatísticas foram executadas através do Sistema de Análise Estatística – SANEST (Zonta & Machado, 1986).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos foi constatada a presença de pigmentos verdes interferindo em vigor e poder germinativo das sementes. Porém, ficou bem estabelecido na cultivar estudada, que sua influência é maior, quanto mais elevado for o porcentual de sementes esverdeadas presentes no lote e, no caso específico, o lote B que apresentava 37,4%, em relação ao lote A com 11,8%. Também foi possível evidenciar a tendência de redução da qualidade, nos testes efetuados, nos tratamentos que apresentavam todas as sementes com nuances da cor verde nos cotilédones (sementes com aparência em diferentes tons de verde), quando comparados com sementes originais (lotes sem manipulação) e com as sementes amarelas (retiradas as sementes esverdeadas).

No teste de germinação (Tabela 1), que nos relatos de Marcos-Filho (1999), fornece informações sobre o potencial de uma amostra sob condições ótimas de ambiente, o porcentual de plântulas normais nos tratamentos com sementes esverdeadas foi inferior, quando relacionado aos tratamentos com sementes originais e sementes amarelas. Houve também, nos dois lotes A e B, diferença significativa entre os tratamentos de sementes amarelas e de sementes originais, em razão dessas últimas apresentarem influência do pigmento verde.

As sementes com cotilédones esverdeados demonstraram baixa capacidade germinativa e desuniformidade quanto ao desempenho de plântulas (referente ao tamanho de plântula e formação do sistema radicular). No entanto, as sementes amarelas originaram plântulas que se caracterizaram, visualmente por sistemas radiculares mais desenvolvidos, crescimento homogêneo e maior porcentagem de plântulas normais (Figuras 5 e 6). Esses resultados reiteram os obtidos por Jalink et al. (1998), quando compararam baixo, médio e alto sinal de fluorescência de clorofila e verificaram na amostra de alto sinal, desempenho significativamente reduzido em quase todos os aspectos, como exemplo, germinação, plântulas normais, taxa e uniformidade de germinação. Medina et al. (1997), também encontraram os índices de germinação superiores nos tratamentos em que foram retiradas as

sementes esverdeadas e verdes. Jalink et al. (1999), observaram em sementes que fisiologicamente não completaram a maturação, baixo número de plântulas normais.

No teste de envelhecimento acelerado (Tabela 1), as sementes amarelas expressaram maior porcentual de plântulas normais, uniformidade nos tamanhos das plântulas e melhor desenvolvimento do sistema radicular, embora, não se diferenciando estatisticamente quando comparadas às sementes originais, nos dois lotes. Já o efeito do envelhecimento sobre sementes com pigmento verde foi mais acentuado mostrando taxa de deterioração avançada, nos dois lotes estudados, e diferiram de forma significativa das sementes originais e das sementes amarelas. Todavia, esta deterioração foi mais elevada no lote B com 37,4% de sementes esverdeadas, apresentando comprometimento quase total das células cotiledonares. Nos relatos de Mendonça et al. (2000), sementes de menor qualidade se deterioram de forma mais rápida do que as mais vigorosas, quando expostas às condições adversas de alta temperatura e umidade relativa no teste de envelhecimento acelerado.

De acordo com Endo et al. (1984), os produtos de oxidação da clorofila podem ter efeitos prooxidantes ou atividades fotooxidativas e a clorofila pode reagir com compostos intermediários de peroxidação de lipídios e peróxidos. Wilson & McDonald (1986) foram consistentes no relato de que a peroxidação de lipídios é uma das causas de deterioração das sementes e está correlacionada com o declínio de vigor e viabilidade.

Ainda em seus estudos Endo et al. (1984) observaram que a clorofila foi oxidada pela enzima lipoxigenase na presença de ácidos graxos insaturados. Oxidações de ácidos graxos insaturados são apontadas como reação primária no processo de envelhecimento, por produzirem radicais livres que atacam posteriormente lipídios, proteínas e ácidos nucleicos numa reação em cadeia (Harrington, 1973; Vertucci & Leopold, 1987). Reações de oxidações, no processo de envelhecimento envolvem enzimas, tal como lipoxidase e, enzimas oxidativas podem funcionar em baixa atividade da água (Vertucci & Leopold, 1987). Fatos estes que tornam mais compreensível o declínio do potencial fisiológico das sementes esverdeadas com o período de armazenagem.

No teste de tetrazólio (Tabela 2), o decréscimo da qualidade foi notório em sementes com cotilédones esverdeados, que são caracterizados no teste como deterioração por umidade (DU) corroborando com os relatos de Costa et al., 2001. O indicativo de altos percentuais de deterioração por umidade na subclasse DU 4-5 - fator principal diferenciando os índices de vigor e viabilidade (Zorato, 2001), fornece subsídios quanto ao potencial de armazenagem ou mesmo redução do potencial fisiológico no momento da sementeira. Com a manifestação de um dano de processo evolutivo, é possível justificar a redução da qualidade, principalmente de vigor, com o passar do tempo de armazenagem.

Ficou nítido que a abrangência da deterioração por umidade é preocupante nas diferentes regiões das sementes esverdeadas, desde que observadas as variabilidades nas tonalidades de verde. Existe a concordância da importância vital do eixo embrionário (plúmula e radícula) nas sementes, porém, os cotilédones quando detentores de pigmento verde mais intenso ficam seriamente comprometidos, com grande quantidade de células deterioradas, o que pode provocar danos na translocação de reservas para o eixo embrionário, no momento da germinação. Nos apontamentos de Adams et al. (1983), a deterioração dos cotilédones pode implicar em prejuízos das enzimas isocitrato liase e malato sintase, que são consideradas enzimas específicas de germinação, devido ao seu exclusivo papel na via do glicoxalato. Essa via emprega enzimas e reações que ocorrem no ciclo do ácido cítrico (Krebs), para habilitar a síntese líquida de glicose a partir de triacilgliceróis armazenados. As duas enzimas específicas, não pré-existem numa forma inativa em cotilédones, mas são sintetizadas durante a germinação (Smith et al., 1974).

No teste de comprimento de plântulas (Figura 7), embora a análise estatística não tenha evidenciado diferença significativa entre os tratamentos, foi observado visualmente, prejuízo no desenvolvimento de plântulas, oriundas de sementes com maior porcentagem de sementes de pigmentação verde. Dan et al. (1987) verificaram maior comprimento de plântulas em lote de maior vigor e justificaram esse fato, em razão dessas plântulas serem mais hábeis na utilização de material de

reserva existente nos cotilédones. Sementes com cotilédones esverdeados podem sofrer efeitos deletérios causados por deterioração advinda da não-degradação de cloropigmentos, que de acordo com Fukushima & Lanfer-Marquez (2000) são susceptíveis a muitas reações de degradações como epimerização, pirólise, hidroxilação, oxidação, fotooxidação ou feofitinização.

A influência ambiental no teste de emergência em campo (Tabela 1), também foi observada e marcaram diferenças significativas entre os três tratamentos, porém, nos tratamentos com sementes esverdeadas, foi salientado o fator negativo da retenção de clorofila. As sementes com resíduos de pigmentos verdes apresentaram menor número de plântulas emergidas e, de forma visível, maior desuniformidade no crescimento das plântulas, em relação às sementes originais e amarelas. Cotilédones esverdeados mostraram sintomas típicos de deterioração e a extensão dessa, variou de parcial até quase total nas sementes. Dependendo dessa abrangência, a semente deteriorada originou plântula fraca, com possibilidades de não sustentar a continuidade do desenvolvimento da planta, ou quando não, se tornou uma planta dominada entre as demais. De acordo com Kagawa et al. (1973), sob condições normais as plântulas emergem e os cotilédones se expandem em folhas completamente funcionais, enquanto as reservas lipídicas são exauridas. Assim, o começo do metabolismo fotossintético está reciprocamente relacionado ao declínio do metabolismo do lipídio, que foi translocado dos cotilédones e usados até que a plântula se torne autotrófica. Na luz dessas observações, torna-se justificável a interrupção do desenvolvimento da plântula cuja origem foi de semente com cotilédones esverdeados, a qual apresentou o processo de deterioração avançado, inviabilizando sua continuidade. Observando que essa interrupção do desenvolvimento é dependente da nuance de clorofila nos cotilédones, ou seja, quanto mais intensa a coloração do pigmento, maior a possibilidade de deterioração rápida da semente.

A viabilidade, através da condutividade elétrica (Tabela 1), confirmou a expectativa de menor integridade de membranas das sementes que degradaram parcialmente a clorofila. O tratamento de sementes esverdeadas apresentou maior quantidade de lixiviados, em relação às sementes originais e

amarelas. Conforme visualizado por Adams et al. (1983), em sementes de soja que sofreram processo de maturação e secagem rápida e que não degradaram a clorofila, grande quantidade de fosfato inorgânico, açúcares e proteínas solúveis foram lixiviados durante a embebição, em relação às que secaram lentamente. Esses autores consideraram ainda que, a secagem rápida pode romper membranas celulares e estruturas internas. Como observado por Wilson & Leopold (1986) a clorofila pode reagir com compostos intermediários de peroxidação de lipídios e a consequência primária dessa peroxidação em tecidos pode ser a diminuição da competência respiratória, assim como, o declínio geral da integridade de membranas. Vieira & Krzyzanowski (1999) também relacionaram a quantidade de lixiviados na solução de embebição à integridade das membranas celulares. As membranas tornando-se permeáveis, pode não ocorrer a síntese de enzimas, a alongação celular e a divisão da célula (Harrington, 1973).

No peso de mil sementes (Tabela 1), a análise estatística computou diferenças significativas entre os tratamentos de sementes esverdeadas em relação às sementes amarelas, nos dois lotes estudados. Foram observados prejuízos em peso médio de 3,17 gramas (lote A) e 7,95 gramas (lote B), para as sementes com cotilédones esverdeados, valores esses que manifestam o elo da clorofila, além do aspecto fisiológico, também com o aspecto físico das sementes. Medina et al. (1997), também obtiveram menor peso em sementes de soja esverdeadas e verdes quando comparadas com as sementes amarelas. Jalink et al. (1998) verificaram que amostras com baixo sinal de fluorescência apresentaram maior peso e apontaram as explicações de que as sementes ganharam peso durante a última fase do processo de maturação ou, as sementes mais pesadas degradam a clorofila de forma mais efetiva, ou ainda, as sementes de baixo sinal de fluorescência estavam mais velhas na planta e tiveram desenvolvimento sob condições mais favoráveis. Egli (1975) observou o aumento de peso nas sementes relacionado à capacidade da comunidade de plantas fixar carbono durante o período de enchimento ou a translocação do carboidrato armazenado para outras partes da planta. Dornbos et al. (1989) evidenciaram que a massa da semente, um componente primário de produção, é determinada pela taxa

de desenvolvimento da semente e pela duração do período de enchimento. Consideraram, também, uma possível relação entre massa de semente e o vigor quando essa massa é reduzida pelo estresse ambiental. Fato esse, adequado para explicar menor vigor das sementes esverdeadas.

Com os resultados, abordagens e informações neste estudo, o que se pode enfatizar é a importância das condições ambientais, durante as fases reprodutivas, e de forma especial, na deposição de reservas das sementes e processos de amadurecimento, épocas que também as clorofilas são degradadas.

## CONCLUSÕES

- Diferentes quantidades de sementes esverdeadas interferem, em maior ou menor intensidade, na qualidade fisiológica de soja.
- Em sementes detentoras de pigmento verde, o índice de deterioração por umidade, na subclasse DU 4-5 do teste de tetrazólio, avalia o risco do potencial fisiológico do lote.
- Clorofila é indicativo de redução na qualidade fisiológica em sementes de soja.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C.& RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessit for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v.23, n.2, p.265-267, 1983.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CÂMARA, G.M.S.& HEIFFIG, L.S. Fisiologia, ambiente e rendimento da cultura da soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: G.M.S. CÂMARA, 2000. p.81-120.
- COSTA, N.P.; FRANÇA-NETO, J.B.; PEREIRA, J.E.; MESQUITA, C.M.; KRZYZANOWSKI, F.C. & HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n.2, p.102-107, 2001.
- DAN, E.L.; MELLO, V.D.C.; WETZEL, C.T.; POPINIGIS, F. & ZONTA, E.P. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, ano 9, n.3, p.45-55, 1987.
- DORNBOS, D.L.; MULLEN, R.E. & SHIBLES, R.M. Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigor. **Crop Science**, Madison, v.29, n.2, p.476-480, 1989.
- EGLI, D.B. Rate of accumulation of dry weigth in seed of soybeans and its relationship to yield. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.55, n.1, p.215-219, 1975.

ENDO, Y.; USUKI, R. & KANEDA, T. The photoxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.4, p.985-989, 1984.

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

FUKUSHIMA, P.S.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Chlorophyll derivates of soybean during maturation and drying conditions. **Proceedings of the Third International Soybean processing and utilization Conference**, Tsukuba, 2000, p.87-88.

GUIAMÉT, J.J.; SCHWARTZ, E.; PICHERSKY, E. & NOODÉN, L.D. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding proteins during senescence in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.1, p.227-231, 1991.

HARRINGTON, J.F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.2, p.453-461, 1973.

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

- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; BIRNBAUM, Y.E. & BINO, R.J. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.504, n.12, p. 219-228, 1999.
- KAGAWA, T.; MCGREGOR, D.I. & BEEVERS, H. Development of enzymes in the cotyledons of watermelon seedlings. **Plant Physiology**, Baltimore, v.51, n.1, p.66-71, 1973.
- MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceito e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.1.1-1.20.
- McINTYRE, G.I. The role of water in the regulation of plant development. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n.7, p.1287-1298, 1987.
- MEDINA, P.F.; LAGO, A.A.; RAZERA, L.F. & MAEDA, J.A. Composição física e qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja com incidência de sementes esverdeadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10. 1997, Foz do Iguaçu. **Resumos**. Curitiba: Informativo ABRATES, 1997. v.7, n.1/2, p.36.
- MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; FESSEL, S.A. & SADER, R. Teste de deterioração controlada em sementes de brócoli (*Brassica oleraceae* L.) var. *itálica*. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.22, n.1, p.280-287, 2000.

- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes**: conceito e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1-2.24.
- NOODÉN, L.D. Integration of soybean pod development and monocarpic senescence. **Physiology Plant**, Copenhagen, v.62, fasc.2, p.273-284, 1984.
- PRITCHARD, J.R. Oilseed quality requirements for processing. **Journal American Chemistry Society**, Champaign, v.60, n.2, p.174-184, 1983.
- SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de semente de soja**. São Paulo: USP. 2002. 103P. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.
- SMITH, R.H.; SCHUBERT, A.M. & BENEDICT, C.R. The development of isocitric lyase activity in germinating cotton seed. **Plant Physiology**, Baltimore, v.54, n.2, p.197-200, 1974.
- STECKEL, J. R.A.; GRAY, D. & ROWSE, H.R. Relationships between indices of seed maturity and carrot seed quality. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.114, n.1, p.177-183, 1989.
- USUKI, R.; ENDO, Y. & KANED, T. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.4, p.991-994, 1984.

VERTUCCI, C.W. & LEOPOLD, A.C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, Michigan, v.84, n.4, p.1038-1043, 1987.

VIEIRA, R.D. & KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceito e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.1.1-1.26.

WARD, K.; SCARTH, R. DAUN, J. & McVETTY, P.B.E. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.72, n.3, p.643-649, 1992.

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

WILSON, D.O.; McDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, p.296-300, 1986.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores – SANEST**. Pelotas: UFPel, Instituto de Física e Matemática. 1986. 150p.

ZORATO, M.F. Teste de tetrazólio modificado. **SEED News**, Pelotas, ano V, n.4, p.21, 2001.

**TABELA 1. Médias obtidas nos testes de germinação, envelhecimento acelerado 24 horas, emergência em campo, condutividade e peso de mil sementes, em dois lotes de sementes de soja A e B com 11,8% e 37,4%, respectivamente de sementes esverdeadas, segmentados em: semente original, semente amarela e semente esverdeada.**

Tratamentos	Germinação		Env. acelerado 24 horas		Emergência em campo (%)		Condutividade (90 $\mu$ A/semente) Viabilidade (%)		Peso de mil sementes (gramas)	
	Plântulas normais (%)		Plântulas normais (%)							
	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B
Semente amarela	86 A	69 A	84 A	66 A	88 A	76 A	86 A	71 A	160,25 A	160,78 A
Semente original	78 B	56 B	77 A	51 A	81 B	56 B	82 A	49 B	159,30 AB	154,85 B
Semente esverdeada	51 C	31 C	41 B	26 B	60 C	34 C	53 B	25 C	157,08 B	152,83 B
CV (%)	3,01	4,91	6,88	9,46	3,64	2,93	6,80	7,21	0,88	0,90

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Lote A (original): 11,8% de sementes esverdeadas e Lote B (original): 37,4% de sementes esverdeadas.

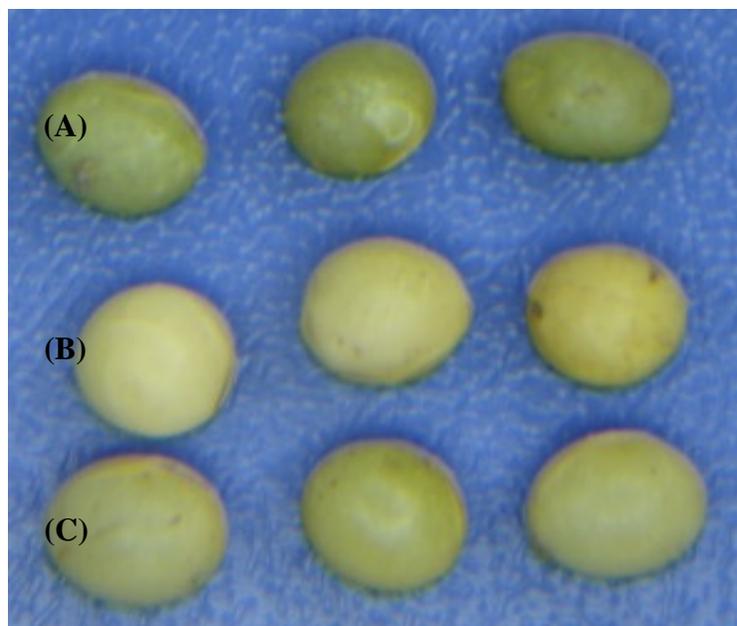
**TABELA 2. Médias obtidas de vigor, viabilidade e deterioração por umidade na subclasse DU 4-5, no teste de tetrazólio, em dois lotes de sementes de soja A e B com 11,8% e 37,4%, respectivamente de sementes esverdeadas, segmentados em: semente original, semente amarela e semente esverdeada.**

Tratamentos	Tetrazólio (%)					
	Vigor		Viabilidade		DU 4-5	
	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B
Semente amarela	68 A	46 A	81 A	68 A	8 B	16 A
Semente original	60 A	36 A	78 A	60 AB	12 B	17 A
Semente esverdeada	44 B	18 B	68 A	45 B	20 A	22 A
CV (%)	4,90	9,27	6,60	9,45	12,05	10,94

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Lote A (original): 11,8% de sementes esverdeadas e Lote B (original): 37,4% de sementes esverdeadas.



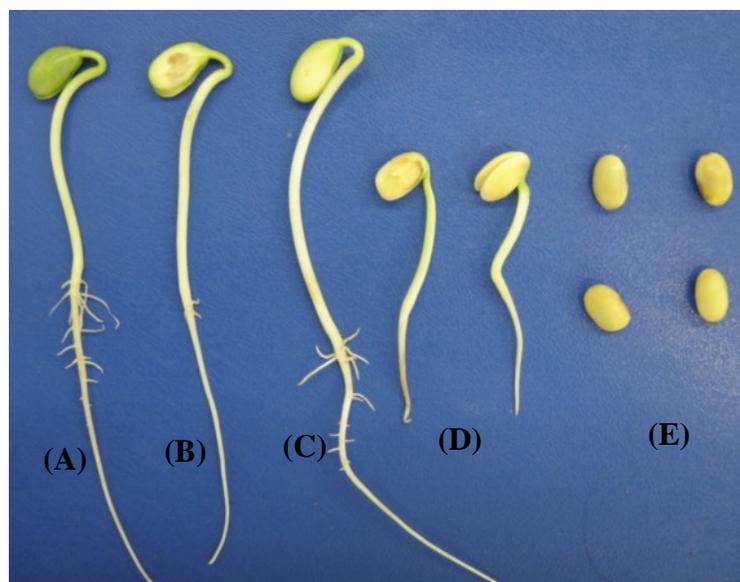
**FIGURA 1.** Vagem com semente visivelmente esverdeada e outra semente de cor normal (amarela).



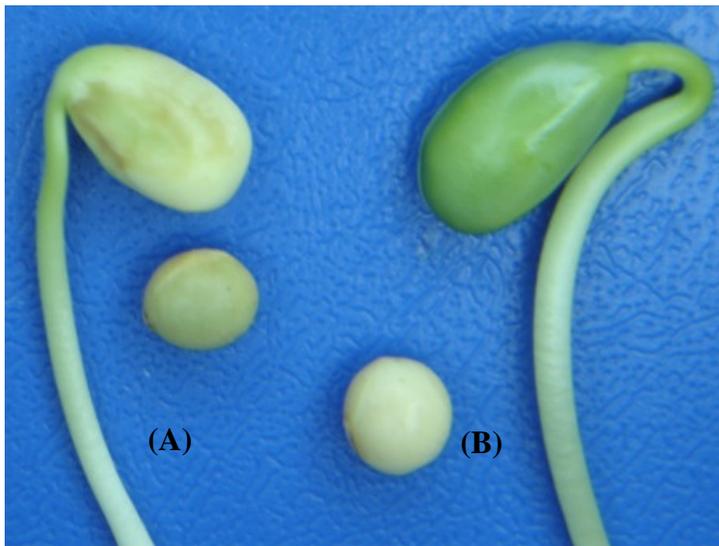
**FIGURA 2.** (A) Sementes com maior intensidade de cor verde; (B) sementes de coloração normal de amadurecimento; (C) sementes com cor verde menos intensa.



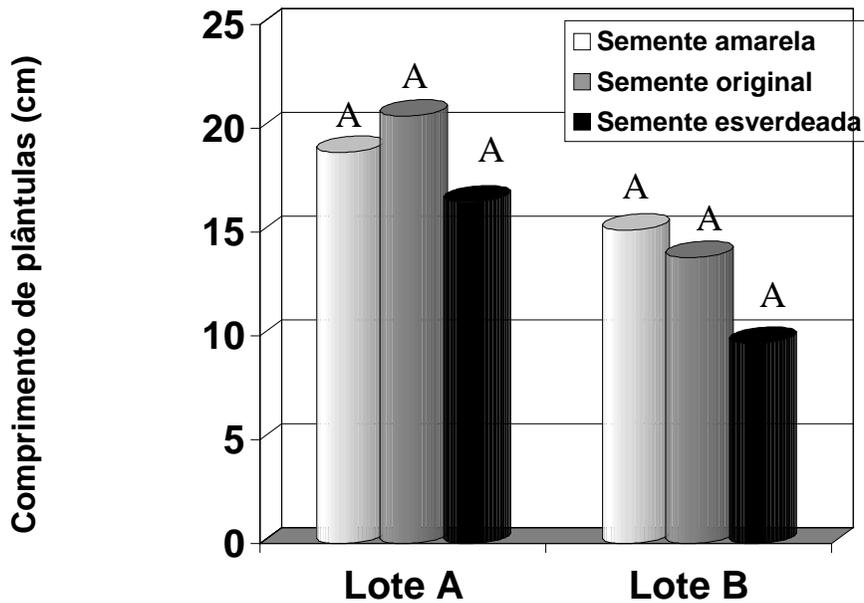
**FIGURA 3.** Sementes que foram retirados os tegumentos para observação das diferentes nuances de cor verde (clorofila) presentes nos cotilédones.



**FIGURA 4.** Teste de germinação: (A) sementes de coloração normal (amarela); (B) sementes com intensidade de cor verde mediana; (C) sementes com cotilédono esverdeado menos intenso; (D) sementes com cotilédono esverdeado mais intenso; (E) sementes com cotilédones de tonalidade verde muito intensa.



**FIGURA 5.** Teste de germinação: (A) plântula oriunda de semente com cotilédones esverdeados; (B) plântula oriunda de semente com cotilédones de coloração normal (amarela).



**FIGURA 6.** Dados médios em porcentagem de comprimento de plântulas (cm), em dois lotes de sementes de soja A e B com 11,8% e 37,4%, respectivamente de sementes esverdeadas, segmentados em: semente original, semente amarela e semente esverdeada.

CV (%) Lote A = 10,91 e Lote B = 21,62

## CAPÍTULO 2

### SEMENTES ESVERDEADAS EM SOJA: TESTES ALTERNATIVOS PARA DETERMINAR SUA QUALIDADE<sup>6</sup>

MARIA DE FÁTIMA ZORATO<sup>7</sup>, SILMAR TEICHERT PESKE<sup>8</sup>, CLAUDIO TAKEDA<sup>9</sup> E JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO<sup>10</sup>

RESUMO – A comercialização antecipada de soja é uma realidade em Mato Grosso. Isso implica na necessidade de testes rápidos, confiáveis e que permitam minimizar riscos futuros, principalmente, quando existe um agente complicador a armazenabilidade, como é o caso de sementes com retenção de clorofila. Mudanças associadas à deterioração com conseqüente perda de vigor e viabilidade são notadas nesse tipo de semente, fazendo-se necessário o conhecimento da localização e abrangência dos pontos deteriorativos. Objetivando avaliar testes que sejam factíveis e tenham potencial de determinar a qualidade de sementes esverdeadas, foi realizado este estudo. FMT-Tucunaré, ciclo semi-precoce, e E-313, FMT-Arara Azul e M-SOY 9350, ciclo tardio, que apresentavam 25,7%, 26,8%, 22,6% e 15,6%, respectivamente, de sementes esverdeadas, foram as cultivares estudadas. Para cada cultivar foi utilizada uma amostra testemunha, isenta de pigmento verde. Cada amostra constituiu um tratamento. A qualidade foi avaliada em duas épocas (inicial, maio/2001 e final, novembro/2001), através dos testes de germinação, tetrazólio, emergência em areia, envelhecimento acelerado (24 horas e 48 horas) utilizando tetrazólio em substituição à germinação e massa seca de plântulas. No teste de tetrazólio, a subclasse DU 4-5 indica a deterioração por umidade, como principal problema fisiológico evolutivo e o tetrazólio em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado, 24 horas, pode avaliar o risco do potencial fisiológico do lote, em sementes esverdeadas.

Termos para indexação: *Glycine max*, deterioração, clorofila, vigor.

---

<sup>6</sup> Aceito para publicação em: / / ; parte da tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, FAEM, UFPel.

<sup>7</sup> Bióloga, bolsista do CNPq, Depto de Fitotecnia, FAEM, UFPel, Coordenadora Geral, Aprosmat, Cx. Postal, 81, 78745-280, Rondonópolis, MT; e-mail: [fzorato@terra.com.br](mailto:fzorato@terra.com.br)

<sup>8</sup> Eng<sup>c</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D., Prof. Titular, Depto Fitotecnia, FAEM, UFPel; e-mail: [peske@ufpel.tche.br](mailto:peske@ufpel.tche.br)

<sup>9</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Dr., Coordenador Melhoramento, Fundação MT; e-mail: [takeda@fundacaomt.com.br](mailto:takeda@fundacaomt.com.br)

<sup>10</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D., Pesquisador, Embrapa Soja; e-mail: [franca@cnpso.embrapa.br](mailto:franca@cnpso.embrapa.br)

## **GREEN SOYBEAN SEED: ALTERNATIVE TESTS TO DETERMINE THE QUALITY**

**ABSTRACT** – The anticipation of the commercialization of soybean seed in the Mato Grosso is a reality. This implies the necessity of a reliable quick testing method for seed, which will minimize and help future risk control, principally when there is a complicating agent to storage, such is the case with seed that has chlorophyll retention. Changes associated with deterioration, and the consequent loss of vigor and germination are noticeable in this type of seed, and as a consequence there is a necessity to know the location and extension of these deteriorative points. Focusing on the objective of evaluation with feasible tests, that have the potential to determine the green seed quality, this study was carried out using: FMT-Tucunare, with an early maturing cycle, E-313, FMT-Arara Azul, and M-Soy 9350, with late maturing cycles, which presented 25,7%, 26,8%, 22,6% and 15,6%, respectively, of green seed were the cultivars in this study. As a control, within each cultivar, there was a lot without green pigmentation, and a new lot with each treatment. The quality of the seed was evaluated in two periods (initial, may/2001 and final, November/2001) through germination tests, tetrazolium, emergence in sand, accelerated aging (24 hours and 48 hours) using tetrazolium to replace germination, plus of dry matter. In the tetrazolium test, the subclass DU 4-5 indicated that the deterioration due to humidity, the main physiological problem that evolves in green seeds. The tetrazolium test, in substitution to accelerated aging germination test, 24 hours can be utilized in determining the quality of green seeds.

Index terms: *Glycine max*, deterioration, chlorophyll, vigor.

## INTRODUÇÃO

O comércio de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem sido realizado de forma antecipada em Mato Grosso. Isso implica na necessidade de programas de verificação da qualidade que sejam hábeis na utilização de testes rápidos, confiáveis e que permitam minimizar riscos futuros.

Na região dos cerrados tem surgido um agente complicador a armazenabilidade de sementes de soja. Trata-se do declínio de clorofila e seus derivados nos cotilédones, que nas observações de Noodén (1984) sofre a interferência das condições ambientais durante a fase de maturação.

Os cotilédones são considerados essencialmente folhas modificadas representando as primeiras folhas da planta (Raven et al., 2001). Portanto, as mudanças na pigmentação durante a maturação das sementes podem estar ligadas ao processo de amarelecimento na senescência foliar, que compreende um número de alterações fisiológicas e bioquímicas (Thomas & Smart, 1993). Entretanto, o processo bioquímico não é bem conhecido e, devido ao desenvolvimento de vagens e a senescência foliar estar proximamente entrelaçados, muitas vezes, torna-se difícil separá-los (Noodén, 1984). A degradação de clorofila está ligada a um uso forçado de todos os componentes do processo de senescência, tais como, degradação de proteína, mudanças na atividade de enzimas e nos padrões de izoenzimas (Thomas & Stoddart, 1975).

À medida que os cotilédones iniciam sua expansão, inicia-se também a deposição de reservas e, sendo parte do embrião, é um tecido vivo que dispõe de todo aparato enzimático necessário para promover a degradação e o transporte de suas próprias substâncias de reserva, visando nutrir o crescimento do eixo embrionário na germinação (Carvalho & Nakagawa, 2000). Ao mesmo tempo em que as reservas estão sendo depositadas no embrião em desenvolvimento, o conteúdo de DNA e RNA aumenta durante essa fase de expansão e também ocorre a deposição das moléculas de RNA mensageiro (mRNA), codificando as enzimas que degradarão as reservas armazenadas, durante o processo de germinação. Quando o embrião alcança seu tamanho máximo e a deposição de reservas é

completada tem-se, então, o início da maturação e da desidratação das sementes (Bryant, 1989; Bewley & Black, 1994).

Adams et al. (1983) colocaram alto grau de importância no processo de maturação de sementes de soja, sob a desidratação lenta com efeitos distintos na degradação de clorofila, situação essa que permite a produção de isocitrato liase e malato sintase, enzimas específicas de germinação, em razão de seu papel no ciclo do glioxalato. Nesse ciclo, os lipídios insolúveis das sementes são convertidos em açúcares solúveis (sacarose), forma em que são deslocados para os meristemas radiculares e apicais (Cioni et al., 1981).

Algumas mudanças associadas com deterioração tais como, diminuição de germinação, redução da taxa de crescimento de plântulas, diminuição da tolerância às condições adversas de ambiente e perda de germinabilidade, ocorrem quando as sementes ficam armazenadas (Anderson, 1973). Para avaliar essas mudanças é realizado o teste de envelhecimento acelerado, que prediz o potencial de armazenamento dos lotes, submetido à ambiente adverso de temperatura e umidade relativa, com base na velocidade de deterioração das sementes (Marcos-Filho, 1999). Embora, Priestly & Leopold (1983) observaram o mecanismo de envelhecimento acelerado sendo diferente do envelhecimento fisiológico natural em sementes de soja.

Os sintomas do envelhecimento das sementes podem ser medidos baseados no progresso desse envelhecimento, resultados de mudanças em reações bioquímicas que ocorrem nas sementes com o passar do tempo (Harrington, 1973). Para observações de alterações bioquímicas nos tecidos, diversos testes foram desenvolvidos para medir um ou um grupo de reações que declinam em atividade com a idade das sementes. O teste de tetrazólio, que mede a atividade das enzimas desidrogenases é o mais comumente usado (Harrington, 1973; França Neto et al., 1998). O grau de atividade das desidrogenases é a base de um teste *in situ* para a viabilidade das sementes em poucas horas de embebição (Chauhan, 1985).

Pontos de crescimento (meristema da radícula e plúmula) do eixo embrionário são altamente susceptíveis aos efeitos do envelhecimento em termos de reação do tetrazólio e, logo, concebidas como regiões de “células chaves” que representam uma pequena fração do total da semente e essenciais para a preservação da viabilidade da mesma (Roberts, 1973; Banerjee, 1978; Purkar & Negi, 1982). Quando o processo deteriorativo nas “células chaves” excedem um certo limiar, resulta num estado de não-retorno e a semente inteira é incapaz de germinar, apesar da disponibilidade da reserva alimentícia (Chauhan, 1985). Harrington (1973) considerou somente o eixo embrionário, incluindo células meristemáticas da radícula e plúmula, sendo essencial para uma semente produzir uma plântula e, caso essas células estejam mortas ou não-funcionais, nenhuma quantidade de células de outras partes da semente possibilitará desenvolvimento de uma plântula normal.

Baseando-se nos princípios dos testes de envelhecimento acelerado e de tetrazólio é possível uma associação de protocolos que estabeleça a localização e a seqüência dos pontos de deterioração nas sementes, num intervalo de tempo menor que o rotineiro, no qual se utiliza o teste padrão de germinação.

Em soja envelhecida de forma artificial e imediatamente submetida ao tetrazólio, os órgãos mais sensíveis ao envelhecimento foram plúmula e radícula, enquanto os cotilédones foram altamente resistentes (Chauhan, 1985).

A visualização dos pontos deteriorativos iniciais, que conduzem à morte das células nas regiões vitais das sementes e à redução do período utilizada para obtenção de resultados no envelhecimento acelerado, seguido por tetrazólio, além de soja, tem sido estudada em várias espécies. Em cebola e cevada, Banerjee (1978) observou a deterioração se iniciando no eixo embrionário e avançando em direção à porção mediana, região em que a morte dos tecidos condiciona a perda total da capacidade germinativa das sementes. Em trigo e ervilha, Purkar & Negi (1982) verificaram a primeira indicação de deterioração começando no ápice da raiz e progredindo pela região do hipocótilo e mesocótilo. Quase simultaneamente, começou a deterioração no par de cotilédones que também progrediu através

do mesocótilo. Em sorgo, os primeiros tecidos apresentando deterioração foi na extremidade do escutelo (Krishnasamy, 1985) e, em arroz (Krishnasamy & Seshu, 1989) a deterioração se iniciou no coleóptilo e progrediu para o epiblasto, escama lateral, escama ventral, coleoriza, plúmula, radícula, mesocótilo e escutelo.

A redução do período pode se traduzir em decisões rápidas e mais confiáveis na produção de sementes de soja, caso seja evidenciado os efeitos dos pigmentos verdes no potencial fisiológico. A execução do teste de envelhecimento, em soja, de acordo com Costa et al. (1984) é de sete dias. Entretanto, no envelhecimento acelerado empregando-se o teste de tetrazólio em substituição à germinação, os resultados podem ser alcançados em dois dias (48 horas). Em milho, Bittencourt (1999) observou ser possível a redução de oito para três dias, o tempo necessário para finalização do teste, além de possibilitar informações semelhantes às fornecidas pelo teste de germinação.

A qualidade fisiológica de sementes esverdeadas demanda informações sobre vigor e viabilidade que sejam compatíveis com a emergência em campo, na época de semeadura.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a sensibilidade de interação dos testes de envelhecimento acelerado e do tetrazólio usado em substituição à germinação, assim como, aplicar e dar amplitude a técnicas com protocolos descritos em literatura, que sejam factíveis e possam determinar a qualidade das sementes de soja apresentando sinais de clorofila nos cotilédones.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com lotes comerciais em sementes de soja de cultivares pertencentes aos grupos de maturação semi-precoce (FMT-Tucunaré) e tardio (E-313, FMT-Arara Azul e M-Soy 9350), produzidas na safra agrícola 2001/02, oriundas de campos de produção da região Sul do Estado de Mato Grosso.

A escolha de lotes foi baseada na presença visual de pigmentação verde existente nos cotilédones das sementes: 25,7%; 26,8%; 22,6% e 15,6% respectivamente, nas cultivares descritas acima. Outras fontes de base foram os resultados de verificação da qualidade inicial, através do teste de tetrazólio e do teste de germinação. Para testemunha, utilizou-se para cada cultivar, amostra de um lote de sementes oriundo de campo que não produziu sementes esverdeadas. Portanto, não prejudicado com estresse ambiental durante as fases de deposição de reservas ( $R_6$ ) e de maturação fisiológica ( $R_7$ ), períodos considerados importantes na degradação da clorofila.

As amostras testemunhas e as amostras com sementes esverdeadas constituíram os tratamentos e esses continham aproximadamente 1,2 kg de sementes cada um.

O critério utilizado para a obtenção da média porcentual de sementes esverdeadas nos lotes foi a seguinte: sob lupa circular de seis aumentos (6x), foram separadas 10 subamostras de 100 sementes cada, em quatro repetições, e contabilizada a presença de sementes com pigmento verde nos cotilédones (sem nenhum tratamento, a exemplo de pré-umedecimento). Foi considerada toda e qualquer nuance de pigmento nos cotilédones e então, retirada a semente para contagem. Em caso de dúvida, foram retirados os tegumentos para melhor visualização e confirmação dos vestígios (sinais) verdes (Figuras 1 e 2). Os resultados, expresso em números inteiros, foram computados para as 10 subamostras e realizada a média porcentual para cada repetição.

Os tratamentos foram submetidos às análises de qualidade no laboratório da Associação dos Produtores de Sementes de Mato Grosso – APROSMAT, Rondonópolis-MT, em duas épocas distintas:

início de armazenamento, quando da formação de lotes, correspondente à fase de pós-beneficiamento, em maio/2001, e época final de armazenamento, correspondente ao período de semeadura, em novembro/2001. As sementes permaneceram armazenadas em condições controladas de temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa (50%).

As avaliações da qualidade das sementes foram através dos seguintes testes:

**Teste de germinação (G)** – realizado na época final/novembro e utilizadas quatro subamostras de 50 sementes em cada tratamento, por repetição. A semeadura foi realizada em rolo de papel-toalha, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e colocado em germinador sob temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram efetuadas no quinto dia após a instalação do teste, seguindo critérios de Brasil (1992) e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais.

**Teste de tetrazólio (TZ)** – realizado nas duas épocas (inicial e final), nas quais foram empregadas duas subamostras de 50 sementes, em cada tratamento, por repetição. As sementes foram pré-umedecidas em papel-toalha, por 16 horas à temperatura média de  $25^{\circ}\text{C}$ . Após o período de embebição, as sementes foram colocadas em copos plásticos, submersas em solução 0,05% de sal de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, por 150 minutos, à temperatura de  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em estufa. Vencido o período de coloração, a solução foi drenada e as sementes foram lavadas em água corrente. As avaliações de vigor e viabilidade, assim como os principais danos fisiológicos nas sementes, foram realizados de acordo com os critérios de França-Neto et al. (1998) e Zorato (2001).

**Envelhecimento acelerado (EA) + tetrazólio (TZ)** – realizados na época inicial (maio), em dois períodos: 24 horas e 48 horas. No envelhecimento acelerado foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, por repetição, distribuídas em camada uniforme sobre uma tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica tipo gerbox, funcionando como um compartimento individual (mini-câmara). Em cada mini-câmara foram adicionados 40 mL de água e colocadas a seguir, em câmara tipo BOD,

regulada a  $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Marcos Filho, 1999). Após os períodos de exposição, duas subamostras de 50 sementes, para cada período (24 horas e 48 horas), para cada tratamento, por repetição, foram submetidas à emergência em areia. Outras duas subamostras de 50 sementes, para cada período (24 horas e 48 horas), para cada tratamento, por repetição, foram colocadas diretamente na solução de TZ (protocolo descrito anteriormente, desconsiderando o pré-umedecimento).

**Emergência em areia (EAR)** – realizado em duas situações: na época inicial e final, nas quais foram utilizadas duas subamostras de 100 sementes, para cada tratamento, por repetição, nas duas épocas. As sementes foram semeadas em bandejas de plástico (27cm x 32cm x 6 cm), contendo areia umedecida a 60% da capacidade de saturação de água. E na época inicial (maio), após o envelhecimento acelerado, duas subamostras de 50 sementes, para cada período (24 horas e 48 horas), para cada tratamento, por repetição, foram semeadas. As avaliações foram efetuadas no quinto dia após a instalação do teste e os resultados expressos em porcentual de plântulas normais (Brasil, 1992), sendo essas também classificadas em porcentual de plântulas fortes, de acordo com Nakagawa (1999).

**Massa seca das plântulas (MS)** – realizado na época final (novembro), determinado com quatro subamostras de 10 sementes em cada tratamento, por repetição. A disposição das sementes foi no terço superior do papel-toalha, marca Germitest, com o hilo voltado para a parte inferior, posição que facilita o desenvolvimento retilíneo da raiz e do hipocótilo. O substrato foi umedecido 2,5 vezes seu peso seco em água e os rolos colocados inclinados ( $45^{\circ}$ ) em germinador, em ausência de luz, a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante cinco dias. No final desse período, as plântulas normais de cada tratamento e repetição foram retiradas e com auxílio de um bisturí, foram removidos os cotilédones, para a extração dos eixos embrionários. Esses foram colocados em recipientes de alumínio previamente pesados e, a seguir, colocados para secar em estufa termoeletrica regulada a  $80^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Após o período, as amostras foram colocadas para resfriamento de 15 minutos em dessecador. As repetições,

pós-resfriamento, foram pesadas em balança de precisão com quatro casas decimais e determinada a massa seca, expresso em mg/plântula (Nakagawa, 1999).

**Procedimentos estatísticos** - O delineamento experimental foi de blocos casualizados e os testes efetuados com quatro repetições. Os dados obtidos em cada teste foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade e teste de correlação linear simples. Para a realização das análises foi utilizado o programa estatístico SAS - Statistics Analysis System (1985).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre sementes esverdeadas de soja com a qualidade foi destacada nos resultados obtidos nos diferentes testes e épocas realizadas.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 constam os coeficientes de correlação simples entre os testes, nas épocas inicial, entre inicial e final e na final, respectivamente. Houve correlação significativa entre os testes nas épocas estudadas. Na tentativa de compreender o mecanismo de atuação das sementes esverdeadas (SE) no decorrer do tempo, foram correlacionadas as épocas inicial e final e foi obtida significância entre todas as avaliações efetuadas.

A Tabela 4 demonstra, de modo geral, já na fase de pós-beneficiamento (maio), a qualidade inferior das sementes com cotilédones esverdeados, as quais diferiram significativamente em relação às testemunhas, correspondentes às sementes normais (SN) - sementes sem a presença do pigmento verde, nas quatro cultivares, em quase todas as variáveis analisadas. Embora, o potencial fisiológico da testemunha da cultivar M-Soy 9350 tenha se apresentado menor e oscilante, desde a fase inicial, em função de outros tipos de problemas como, incidência de percevejos e deterioração por umidade ocasionada por instabilidade climática na época de colheita.

Na Tabela 5 encontram-se resultados da fase final, momento de semeadura (novembro), quando os tratamentos de sementes com sinais de clorofila tenderam a queda mais acentuada das porcentagens de plântulas normais e plântulas fortes nos testes de emergência em areia e germinação, assim como, do vigor e da viabilidade do teste tetrazólio (Figura 3), comparativamente aos tratamentos testemunhas. Isto demonstrou o efeito deteriorante da clorofila em sementes de soja, espécie que possui, de acordo com Bordingnon & Mandarino (1994), entre 15% a 25% de lipídios. A peroxidação de lipídios foi considerada uma das causas de deterioração das sementes de soja (Wilson & McDonald, 1986) e a clorofila pode reagir com compostos intermediários de peroxidação dos lipídios (Endo et al., 1984).

Priestly & Leopold (1983) observaram a peroxidação ocorrendo ao longo do tempo de armazenamento com mecanismos de envelhecimento acelerado diferentes fisiologicamente do envelhecimento natural.

Um fator observado que contribuiu para dificultar a homogeneidade e tendência de dados, nas fases estudadas, residiu na quantidade de sementes com cotilédones esverdeados presente nas subamostras, no momento de efetuar os diferentes testes. Exemplificando, para obtenção da média de 22,6% na cultivar FMT-Arara Azul, entre as 10 subamostras de 100 sementes, dentro da mesma repetição, a variação na quantidade de sementes que, visualmente apresentavam pigmentação verde, oscilou entre 7% a 39%. Ou seja, numa subamostra de 100 sementes apenas 7 sementes apresentavam esverdeamento, já numa outra subamostra, dentro da mesma repetição, 39 das 100 sementes eram de cotilédones esverdeados. Portanto, com estas variações detectadas, algumas oscilações de resultados foram compreensíveis porque a probabilidade, no momento da instalação das subamostras nos testes, foi a mesma tanto para semente normal quanto para semente esverdeada. E, sementes esverdeadas demonstraram ser potencialmente desfavorável à qualidade de sementes.

O teste de tetrazólio, como um teste topográfico, delineou melhor a variabilidade referida entre subamostras, a qual foi estratificada em três principais níveis de qualidade. Grande proporção de sementes esverdeada foram enquadradas na classe 3 (vigor médio) e na subclasse DU 4-5 (viabilidade) - subclasse essa indicativa de razão principal da diferença existente entre o vigor e a viabilidade da amostra e, no caso específico, deterioração por umidade (interpretação de Zorato, 2001). Por fim, grande parte de sementes já deterioradas e mortas foram atribuídas na classe 7 (Figura 4).

A atribuição das sementes na subclasse DU 4-5 (viabilidade) ocorreu em função da abrangência das lesões provocadas pela deterioração de umidade nos cotilédones e pontos dessa deterioração, localizados na região do eixo embrionário (plúmula, hipocótilo e radícula). O índice obtido na subclasse, normalmente apresenta potencial para prever que o tratamento (amostra), pode perder a viabilidade com o decorrer da armazenagem e/ou, caso as condições de temperatura do ar ou umidade do solo forem inadequadas no momento de semeadura, principalmente se a deterioração estiver

localizada na extremidade da radícula com quantidade de células que excedem determinado limite, comprometendo ou impedindo a divisão celular e o desenvolvimento do órgão.

Conforme já mencionado, o principal dano propiciando perda de qualidade nas sementes esverdeadas foi a deterioração por umidade. Quando a superfície dos cotilédones apresentava pigmentação mais abrangente e numa tonalidade mais forte de verde, foi notada a deterioração generalizada dos cotilédones e isso pode ter representado relevante perda do potencial fisiológico, de forma mais acentuada, o vigor da semente. Costa et al. (2001), consideraram razoável a hipótese de sementes verdes serem detentoras de elevados índices de deterioração por umidade e argumentaram que, dependendo da intensidade da região afetada, ocorre redução de vigor e germinação de lotes.

Ainda com referência aos resultados da subclasse DU 4-5, no tetrazólio, na fase inicial (maio), estes revelaram diferenças significativas nas cultivares FMT-Tucunaré e E-313, quando comparadas as sementes esverdeadas com as sementes normais. O mesmo não ocorreu com as cultivares FMT-Arara Azul e M-Soy 9350, fato que sugere, a variação na quantidade de sementes esverdeadas entre subamostras e problemas com outros tipos de danos fisiológicos, respectivamente, como explicação plausível. Quando analisados os dados de DU 4-5, na época final de armazenamento (novembro), os valores se mostraram, de maneira geral, significativos em três das quatro cultivares estudadas, quando comparadas as sementes testemunhas e as sementes esverdeadas sinalizando processo contínuo de deterioração em células com pigmentação verde. Indicativo esse que tende a ser relevado no setor de sementes, haja vista, a propensão de problemas no momento de emergência de plântulas e a conseqüente redução de estandes recomendados para as cultivares.

Com relação à associação de teste, a utilização do tetrazólio em substituição à germinação no envelhecimento acelerado, o período de 24 horas (época inicial) demonstrou correlação significativa, tanto no vigor ( $r = 0,94$ ) quanto na viabilidade ( $r = 0,91$ ), com a emergência de plântulas em areia na época final. Estes dados são considerados importantes porque o teste de emergência em areia acredita-se simular as condições mais próximas da realidade do campo, local que representa o destino final das

sementes, além da redução de período para respostas da qualidade. Embora a correlação tenha sido significativa foi observada expressiva quantidade de tecido lesionado pela deterioração por umidade em células da radícula-hipocótilo, principalmente nas sementes esverdeadas (Figura 5). Esta é uma região de “células chaves”, cuja morte de tecidos condiciona a perda total da qualidade das sementes, apontou Roberts (1973). Talvez na análise tenha sido super estimada a quantidade de tecidos lesionados no cilindro central, o que demanda ajustes para adequação dessa associação de testes que possibilita a fundamental redução do período para a avaliação dos pontos da deterioração em sementes esverdeadas. Apesar desta associação de testes ter se mostrado uma alternativa promissora e mais rápida devem ser considerados necessários mais estudos, assim como treinamentos adequados para delimitar a deterioração nos pontos de crescimento, principalmente na extremidade da radícula (células iniciais do cilindro central) visando resultados consistentes.

No tetrazólio, nos dois tempos de exposição, assim como na metodologia usual, em sementes esverdeadas, além da sensibilidade da plúmula e radícula foi observada nos cotilédones (Figura 6), saliente deterioração, o que contrapõe os resultados de Chauan (1985), que verificou resistência dos cotilédones de soja envelhecida artificialmente, contudo, tenha estudado semente sem a presença de pigmento verde. Outro aspecto discordante se refere ao apontamento de Harrington (1973), no qual considerou somente células meristemáticas da radícula e plúmula essenciais para produzir uma plântula normal. Em sementes apresentando resíduos de clorofila (pigmento verde), algumas vezes, nas células dos órgãos vitais não foram encontrados pontos de deterioração, todavia, suas células cotiledonares estavam completamente deterioradas e, mesmo se estas sementes iniciassem o processo de germinação, porque tinham células viáveis no eixo embrionário, ocorria a descontinuidade do processo, em função das reservas dos cotilédones estarem completamente comprometidas (Figura 7). Como nos cotilédones se concentram os substratos e enzimas necessárias para o início da divisão celular e crescimento do embrião, no caso de sementes esverdeadas, as evidências sugeriram um metabolismo prejudicado com o nível muito elevado de deterioração. Bryant (1989) postulou que se houver bloqueio na síntese de

mRNA, as enzimas específicas de degradação das reservas não serão sintetizadas e as reservas estocadas e depositadas durante o desenvolvimento incluindo, proteínas, carboidratos e lipídios não serão hidrolisadas para fornecer nutrientes ao embrião em crescimento, até que ele se estabeleça como uma plântula independente.

Dentre os testes realizados na fase final de armazenagem, próxima da sementeira (Tabela 5), o teste de germinação e emergência de plântulas em substrato de areia, revelaram-se eficientes e compatíveis nas informações, conferindo os desempenhos esperados para os tratamentos testemunhas e de sementes esverdeadas, de acordo com as duas situações. O fator negativo destes testes é o tempo necessário para obtenção dos resultados (120 horas). Por outro lado, o tetrazólio como teste bioquímico, apresentou principalmente para sementes esverdeadas, viabilidades superiores em relação à germinação e emergência de plântulas, no entanto, os valores encontrados na subclasse DU 4-5, quando subtraídos das referidas viabilidades indicavam os tratamentos sujeitos à provável declínio da qualidade, compatibilizando com os dois testes citados.

Um outro considerável efeito da pigmentação verde foi verificado na massa seca de plântulas. As sementes esverdeadas diferiram significativamente em relação às normais (testemunhas), nas quatro cultivares estudadas, demonstrando decréscimo em sua massa seca. De acordo com Dan et al. (1987), a habilidade da transformação de reservas armazenadas nos cotilédones, em componentes solúveis utilizados na formação de novos tecidos e a incorporação desses pelo eixo embrionário se relacionam ao vigor das sementes. Explicação factível para o diminuído vigor encontrado em sementes com degradação parcial da clorofila.

## CONCLUSÕES

- O teste de tetrazólio em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado (24 horas), pode detectar riscos em lotes de soja com presença de sementes esverdeadas.
- A subclasse DU 4-5 (viabilidade), no teste de tetrazólio é adjuvante na avaliação da qualidade, em sementes com retenção de clorofila, pois indica o processo de deterioração por umidade, um dano evolutivo que pode acarretar perdas irreparáveis no potencial fisiológico com o transcorrer da armazenagem,.
- Em sementes esverdeadas os testes de germinação e emergência de plântulas em areia, apesar do tempo de execução, têm potencial para determinar índices confiáveis, quando realizado próximo da sementeira.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C.& RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessit for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v.23, n.2, p.265-267, 1983.
- ANDERSON, J.D. Metabolic changes associated with senescence. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.2, p.401-416, 1973.
- BANERJEE, S.K. Observations on initiation of seed deterioration and its localization in barley and onion. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.6, n.4, p.1025-1028, 1978.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v.2, 374p.
- BITTENCOURT, S.R.M. **Uso do teste de tetrazólio na avaliação de resultados do teste de envelhecimento acelerado em sementes de milho**. Jaboticabal, 1999. 146p. (Tese).
- BORDINGNON, J.R. & MANDARINO, J.M.G. **Soja: composição química, valor nutricional e sabor**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. 32p. (Documentos, 70).
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRYANT, J.A. **Fisiologia da Semente**. (1.ed.). São Paulo: Editora EPU. 1989. 85p.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. (4.ed.). Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CHAUHAN, K.P.S. The incidence of deterioration and its localization in aged seeds of soybean and barley. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.3, p.769-773, 1985.

CIONI, M.; PINZAUTI, G. & VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.70, n.1, p.1-26, 1981.

COSTA, N.P.; PEREIRA, L.A.G.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A. A. KRZYZANOWSKI, F.C.; BARRETO, J.N. & PRADERI, J.E.V. Padronização do teste de envelhecimento precoce. EMBRAPA-CNPSo. **Resultados de Pesquisa de soja 1983/84**. P.119-120. 1984.

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

DAN, E.L.; MELLO, V.D.C.; WETZEL, C.T.; POPINIGIS, F. & ZONTA, E.P. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, ano 9, n.3, p.45-55, 1987.

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

HARRINGTON, J.F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.2, p.453-461, 1973.

KRISHNASAMY, V. Sequence of senescence in sorghum seed during accelerated aging. **Current Science**, Bangalore, v.54, n.1, p.150-151, 1985.

KRISHNASAMY, V. & SESHU, D.V. Sequence of deterioration in rice embryos during accelerated ageing of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.1, p.19-23, 1989.

LAZARINI, E.; DE SÁ, M.E. & FERREIRA, R.C. Acúmulo de matéria seca em plantas de soja durante os estádios reprodutivos e qualidade fisiológica de sementes colhidas em diferentes fases do desenvolvimento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.153-162, 2000.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceito e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.2, p.2.1-2.24.

MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceito e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.1, p.1.1-1.20.

NOODÉN, L.D. Integration of soybean pod development and monocarpic senescence. **Physiology Plant**, Copenhagen, v.62, fasc.2, p.273-284, 1984.

- PRIESTLEY, D.A. & LEOPOLD, A.C. Lipids changes during natural aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, n.1, p.467-470, 1983.
- PURKAR, J.K. & NEGI, H.C.S. Inicitation of seed deterioration and its localization in peas and wheat. **Seed Research**, New Delhi, v.10, n.2, p.196-200, 1982.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. (6.ed.) Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001. 906p.
- ROBERTS, E.H. Loss of seed viability: chromosomal and genetics aspects. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.515-527, 1973.
- SAS Intitute Inc. **SAS User's Guide: statisytics.Version 5**. Cary, NC, 1985. 956p.
- THOMAS, H. & SMART, C.M. Crops that stay green. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.123, n.1, p.193-219, 1993.
- THOMAS, H. & STODDART, J.L. Separation of chlorophyll degradation from other senescence processes in leaves of a mutant genotype of meadow fescue (*Festuca pratensis* L.). **Plant Physiology**, Maryland, v.56, n.3, p.438-441, 1975.
- WILSON, D.O. & McDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.14, p.296-300, 1986.
- ZORATO, M.F. Teste de tetrazólio modificado. **SEED News**, Pelotas, ano V, n.4, p.21, 2001.

**TABELA 1. Correlação linear simples (r) entre os testes de avaliação da qualidade efetuados no início de armazenagem, em quatro cultivares de soja (FMT-Tucunaré, FMT-Arara Azul, E-313 e M-SOY 9350), com presença e ausência de sementes esverdeadas.**

Época inicial		Época inicial														
		Emergência em areia		Env. Acelerado (24 horas)		Env. acelerado (48 horas)		Tetrazólio			Envelhecimento acelerado (24 horas) + tetrazólio			Envelhecimento acelerado (48 horas) + tetrazólio		
		%PN	%PF	%PN	%PF	%PN	%PF	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5
Em. areia	% PF	0,99**														
Env. acel.	%PN	0,88**	0,88**													
24 h.	%PF	0,89**	0,90**	1,00**												
Env.	%PN	0,87**	0,86**	0,90**	0,90**											
Acel.48h.	%PF	0,84**	0,84**	0,88**	0,89**	0,99**										
	VG	0,90**	0,90**	0,81**	0,82**	0,82**	0,80**									
TZ (%)	VB	0,80**	0,81**	0,65**	0,65**	0,65**	0,61**	0,94**								
	DU 4-5	-0,60**	-0,58**	-0,71**	-0,71**	-0,77**	-0,80**	-0,67**	-0,40*							
EA + TZ	VG	0,91**	0,93**	0,86**	0,87**	0,83**	0,80**	0,91**	0,86**	-0,53**						
(24 h.)	VB	0,89**	0,91**	0,80**	0,82**	0,80**	0,76**	0,91**	0,88**	-0,51**	0,98**					
(%)	DU 4-5	-0,85**	-0,87**	-0,89**	-0,90**	-0,84**	-0,82**	-0,83**	-0,74**	0,59**	-0,91**	-0,83**				
EA + TZ	VG	0,87**	0,89**	0,86**	0,87**	0,86**	0,83**	0,84**	0,71**	-0,66**	0,88**	0,84**	-0,85**			
(48 h.)	VB	0,88**	0,88**	0,81**	0,81**	0,84**	0,81**	0,88**	0,79**	-0,62**	0,87**	0,84**	-0,83**	0,92**		
(%)	DU 4-5	-0,48**	-0,51**	-0,55**	-0,58**	-0,51**	-0,50**	-0,39*	-0,24 <sup>ns</sup>	0,43*	-0,47**	-0,46**	0,47**	-0,66**	-0,32 <sup>ns</sup>	

\*\* - significativo no teste F, a 1% de probabilidade; \* - significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns - não significativo.

EA + TZ - tetrazólio (TZ) em substituição à germinação no teste de envelhecimento Acelerado (EA); PN - plântulas normais; PF - plântulas fortes; VG - vigor; VB - viabilidade; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

**TABELA 2. Correlação linear simples (r), entre os testes de qualidade realizados no início de armazenamento e os testes efetuados na época final do armazenamento, em quatro cultivares de soja (FMT-Tucunaré, FMT-Arara Azul, E-313 e M-SOY 9350), com presença e ausência de sementes esverdeadas.**

Época final		Época inicial														
		Emergência em areia		Envelhecimento acelerado (24 horas) (%)		Envelhecimento acelerado (48 h.)		Tetrazólio (%)			Envelhecimento acelerado (24 horas) + Tetrazólio (%)			Envelhecimento acelerado (48 horas) + Tetrazólio (%)		
		%PN	%PF	%PN	%PF	%PN	%PF	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5
Emerg.	%PN	0,90**	0,91**	0,88**	0,89**	0,92**	0,90**	0,90**	0,80**	-0,66**	0,94**	0,91**	-0,89**	0,90**	0,90**	-0,48**
Areia	%PF	0,89**	0,91**	0,86**	0,87**	0,92**	0,91**	0,92**	0,80**	-0,70**	0,94**	0,91**	-0,88**	0,91**	0,90**	-0,51**
	VG	0,86**	0,86**	0,86**	0,87**	0,91**	0,90**	0,90**	0,78**	-0,72**	0,89**	0,88**	-0,86**	0,87**	0,86**	-0,48**
Tz (%)	VB	0,81**	0,82**	0,76**	0,77**	0,78**	0,76**	0,88**	0,84**	-0,56**	0,90**	0,92**	-0,79**	0,80**	0,82**	-0,37*
	DU 4-5	-0,67**	-0,66**	-0,77**	-0,77**	-0,85**	-0,87**	-0,63**	-0,42*	0,78**	-0,61**	-0,57**	0,71**	-0,73**	-0,66**	0,57**
Germ.	%PN	0,84**	0,83**	0,81**	0,81**	0,90**	0,87**	0,84**	0,76**	-0,61**	0,86**	0,83**	-0,81**	0,86**	0,89**	-0,37*

\*\* - significativo no teste F, a 1% de probabilidade; \* - significativo no teste F, a 5% de probabilidade.

TZ – tetrazólio; PN – plântulas normais; PF – plântulas fortes; VG – vigor; VB – viabilidade; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

**TABELA 3. Correlação linear simples (r) entre os testes de qualidade, efetuados na época final de armazenamento, em quatro cultivares de soja (FMT-Tucunaré, FMT-Arara Azul, E-313 e M-SOY 9350) com presença e ausência de sementes esverdeadas**

		Época final				
		Emergência em Areia (%)		Tetrazólio (%)		
		PN	PF	VG	VB	DU 4-5
Emergência em Areia	%PF	0,99**				
Tetrazólio (%)	VG	0,92**	0,93**			
	VB	0,88**	0,87**	0,93**		
Germinação	DU 4-5	-0,72**	-0,75**	-0,82**	-0,57**	
	%PN	0,92**	0,90**	0,89**	0,87**	-0,68**

\*\* - significativo no teste F, a 1% de probabilidade.

PN – plântulas normais; PF – plântulas fortes; VG – vigor; VB – viabilidade; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

**TABELA 4. Médias obtidas no início da armazenagem nos testes de emergência em areia, envelhecimento acelerado 24 horas, tetrazólio, tetrazólio em substituição ao teste de germinação em dois períodos (24 horas e 48 horas), em quatro cultivares de soja, em lotes com presença de sementes esverdeadas (SE) e lotes testemunhas, sementes normais (SN).**

Testes		Tratamentos (Cultivares)								CV (%)
		FMT-Tucunaré		FMT-Arara Azul		E-313		M-Soy 9350		
		SN	SE	SN	SE	SN	SE	SN	SE	
Emergência em areia (%)	Pl. normais	96 A	86 A	86 A	77 B	96 A	81 B	69 A	49 B	5,48
	Pl. fortes	96 A	84 B	82 A	71 B	93 A	75 B	65 A	44 B	5,44
Envelhecimento acelerado / 24 horas (%)	Pl. normais	97 A	74 B	90 A	74 B	94 A	77 B	60 A	45 B	8,54
	Pl. fortes	95 A	71 B	88 A	70 B	92 A	72 B	55 A	40 B	8,50
Envelhecimento acelerado / 48 horas (%)	Pl. normais	89 A	56 B	87 A	63 B	95 A	70 B	55 A	30 B	5,54
	Pl. fortes	84 A	48 B	82 A	57 B	93 A	65 B	51 A	28 B	5,81
Tetrazólio (%)	Vigor	82 A	66 B	61 A	57 A	81 A	65 B	60 A	36 B	7,95
	Viabilidade	92 A	87 A	74 A	72 A	88 A	81 B	82 A	58 B	5,08
	DU 4-5	7 B	18 A	10 A	13 A	4 B	11 A	16 A	16 A	20,45
Envelhecimento acelerado + tetrazolio (24 horas) (%)	Vigor	83 A	70 B	64 A	49 B	77 A	52 B	50 A	18 B	7,75
	Viabilidade	90 A	85 B	77 A	68 B	89 A	75 B	69 A	50 B	4,54
	DU 4-5	6 B	15 A	12 B	17 A	8 B	19 A	19 B	29 A	23,12
Envelhecimento acelerado + tetrazolio (48 horas) (%)	Vigor	79 A	52 B	59 A	55 A	66 A	49 B	42 A	28 B	6,80
	Viabilidade	88 A	72 B	74 A	73 A	85 A	69 B	72 A	49 B	5,78
	DU 4-5	5 B	17 A	12 B	17 A	16 A	15 A	27 B	18 A	18,30

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, para cada tratamento (cultivar), não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pl. – Plântulas; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

**TABELA 5. Médias obtidas no final da armazenagem nos testes de emergência em areia, germinação, tetrazólio e peso de massa seca, em quatro cultivares de soja, em lotes com presença de sementes esverdeadas (SE) e lotes testemunhas, sementes normais (SN).**

Testes		Tratamentos (Cultivares)								CV (%)
		FMT-Tucunaré		FMT-Arara Azul		E-313		M-Soy 9350		
		SN	SE	SN	SE	SN	SE	SN	SE	
Emergência em areia (%)	Pl. normais	96 A	73 B	83 A	65 B	95 A	67 B	67 A	38 B	5,33
	Pl. fortes	92 A	64 B	72 A	58 B	92 A	61 B	59 A	31 B	6,17
Germinação (%)	Pl. normais	96 A	72 B	89 A	77 B	95 A	75 B	76 A	34 B	4,63
Tetrazólio (%)	Vigor	87 A	61 B	69 A	58 A	88 A	69 B	59 A	36 B	6,21
	Viabilidade	93 A	84 B	81 A	76 A	93 A	83 B	79 A	58 B	5,06
	DU 4-5	3 B	18 A	6 B	13 A	3 B	10 A	16 A	17 A	25,26
Peso da massa seca (mg/plântula)		0,4265 A	0,1753 B	0,4148 A	0,0928 B	0,2908 A	0,0760 B	0,1970 A	0,0348 B	13,46

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, para tratamentos (cultivares), não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pl. – Plântulas; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).



**FIGURA 1.** Presença de sementes no lote, com cotilédones esverdeados apresentando diferentes nuances de cor verde (retenção de clorofila).



**FIGURA 2.** Visual de sementes sem os tegumentos para confirmação da presença de clorofila nos cotilédones.



**FIGURA 3.** Aspecto visual de sementes esverdeadas e da deterioração obtidos pelos testes de tetrazólio e emergência em areia. Cotilédones deteriorados.



**FIGURA 4.** Sementes esverdeadas (secas) e o visual destas sementes completamente deterioradas no teste de tetrazólio.



**FIGURA 5.** Semente esverdeada com comprometimento da radícula-hipocótilo com a utilização do teste de tetrazólio, em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado.



**FIGURA 6.** Semente esverdeada com processo de deterioração nos cotilédones, no teste de tetrazólio. É um processo evolutivo. As células verdes que permanecem nas sementes se oxidam com o período de armazenamento.

## CONCLUSÃO GERAL

Para as condições em que este estudo foi desenvolvido, pode-se concluir que:

- Clorofila é indicativo de redução da qualidade fisiológica em sementes de soja e, diferentes porcentagens de sementes esverdeadas interferem em maior ou menor intensidade na qualidade, sendo possível avaliar o risco do potencial fisiológico do lote, através da subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade) e do teste de tetrazólio em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado no período de 24 horas.