

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**LIGNINA NO TEGUMENTO DE SEMENTE DE SOJA:
DETERIORAÇÃO POR UMIDADE E DANO
MECÂNICO E TAMANHO DE AMOSTRA PARA O
TESTE DE TETRAZÓLIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Huth

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**LIGNINA NO TEGUMENTO DE SEMENTE DE SOJA:
DETERIORAÇÃO POR UMIDADE E DANO MECÂNICO E
TAMANHO DE AMOSTRA PARA O TESTE DE
TETRAZÓLIO**

Caroline Huth

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Sidinei José Lopes

**Santa Maria, RS, Brasil.
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**LIGNINA NO TEGUMENTO DE SEMENTE DE SOJA:
DETERIORAÇÃO POR UMIDADE E DANO MECÂNICO E TAMANHO
DE AMOSTRA PARA O TESTE DE TETRAZÓLIO**

Elaborado por
Caroline Huth

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Sidinei José Lopes
(Presidente/orientador)

Prof. Dr. Ubirajara Russi Nunes (UFSM)

Prof. Dra. Liliane Marcia Mertz Heninng (EMBRAPA Soja)

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais Noemi e Lonir Huth, pelo amor, educação, ensinamentos, apoio e por terem sido exemplo de honestidade, dedicação e ética.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Soja, pelo auxílio na disponibilidade de espaço, equipamentos e funcionários.

A pesquisadora da EMBRAPA Soja Liliane Marcia Mertz Henning, pela orientação, pelos ensinamentos, paciência e amizade antes e durante a realização desse curso.

Ao professor Sidinei José Lopes, pela orientação, paciência, ensinamentos e exemplo profissional.

Aos professores Ubirajara Russi Nunes e Luciane Almeri Tabaldi pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto e pela presteza e disponibilidade do espaço.

A minha família, pelo apoio e exemplo de honestidade, humildade e perseverança.

Ao meu noivo, Alison Thomas, pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao responsável técnico do Laboratório de Análise de Sementes, Nilson Matheus Mattioni, pela amizade, paciência, disponibilidade de espaço e material, e ajuda na condução dos trabalhos.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Análise de Sementes, Alberto, Nicéia, Cariane e Jaine, pela amizade e auxílio durante a condução do trabalho.

Ao pesquisador Fernando Henning, a funcionária Agnes da EMBRAPA Soja, e ao estudante de doutorado Cristian da UEL, pela ajuda na condução dos experimentos e por momentos de descontração.

Aos amigos e colegas do Laboratório Didático e de Pesquisa em Sementes e de Experimentação Vegetal da UFSM: Ana Paula Barbieri, Fernando Haesbaert, Gerusa M. Conceição, Manoela Beche, Humberto Zen, Fabrício Fuzzer e Vinicius Alende, pela colaboração fundamental na realização dos trabalhos, pela disponibilidade e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial a Roger, João e Ildo, pela ajuda nas atividades do campo.

A minha colega de apartamento, Marina Segala, pelas caminhadas até a UFSM, amizade e paciência durante os períodos de muito estudo.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e não estão nominalmente citados.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

LIGNINA NO TEGUMENTO DE SEMENTE DE SOJA: DETERIORAÇÃO POR UMIDADE E DANO MECÂNICO E TAMANHO DE AMOSTRA PARA O TESTE DE TETRAZÓLIO

Autor: Caroline Huth

Orientador: Sidinei José Lopes

Data: Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015.

A soja é a principal aleuro-oleaginosa cultivada no mundo, e entre os fatores que dificultam a produção de sementes de soja de elevada qualidade, está a ocorrência frequente de chuvas durante os períodos de maturação e pré-colheita. Características das sementes, tal como, o conteúdo de lignina do tegumento, podem refletir em maior ou menor suscetibilidade à deterioração por umidade e dano mecânico. Assim, embora existam dados e evidências de que o teor de lignina confere resistência à deterioração por umidade, faltam experimentos com metodologias as quais se assemelhem com as condições climáticas adversas que as sementes permanecem expostas em campo. Diante disso, desenvolveu-se esse estudo com o objetivo de avaliar a relação entre o conteúdo de lignina do tegumento da semente de soja, com a tolerância à deterioração por umidade e dano mecânico. O trabalho consiste primeiramente de uma breve revisão bibliográfica, capítulo I, e de mais dois capítulos. O capítulo II consta do trabalho que tem por objetivo avaliar a relação entre o conteúdo de lignina do tegumento das sementes de soja, com a tolerância à deterioração por umidade e dano mecânico. O capítulo III, para qualificar os experimentos da área, objetivou-se estimar o tamanho ideal de amostra, em número de sementes, necessário para o teste de tetrazólio, em sementes de soja com elevado dano por umidade. As cultivares CD 208 e CD 215, com os maiores teores de lignina no tegumento, 4,19% e 2,64%, respectivamente, apresentaram maior vigor após o estresse com a chuva simulada. Além disso, a cultivar CD 208, também se mostrou menos suscetível ao dano por umidade e ao dano mecânico. O estresse oxidativo na parte aérea e raízes das plântulas foi demonstrado através da atividade da enzima Guaiacol Peroxidase, o qual aumentou nas cultivares CD 215, CD 202 e BRS 184, com teores de lignina no tegumento menor que 3%. Já nas sementes, a cultivar BRS 184, com menor teor de lignina, 1,69%, apresentou um maior estresse oxidativo devido a maior atividade da enzima Guaiacol Peroxidase e da peroxidação lipídica. O tamanho de amostra em número de sementes, para avaliar os danos por umidade por meio do teste de tetrazólio em sementes de soja é dependente da qualidade fisiológica das cultivares, recomendando-se para o maior nível de precisão 200 sementes por lote, e para um nível menor, porém aceitável, de precisão, 0,5% de IC, 121 sementes.

Palavras-chave: *Glycine max.* deterioração de campo. qualidade de sementes. dimensionamento amostral. teste de tetrazólio.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

LIGNIN ON SOYBEAN SEED COAT: DETERIORATION IN HUMIDITY AND MECHANICAL DAMAGE AND SAMPLE SIZE FOR TETRAZOLIUM TEST

Author: Caroline Huth

Adviser: Sidinei José Lopes

Date: Santa Maria, fevereiro 20th, 2015

Soybeans are the main oilseed grown in the world, and among the factors that hinder the production of high-quality soybeans, is the frequent rainfall during periods of maturation and preharvest. Characteristics of seeds as the seed coat lignin content may reflect a greater or lesser susceptibility to deterioration from humidity and mechanical damage. Thus, although there are data and evidence that the lignin content confers resistance to deterioration from humidity, there is a lack of experiments with methods which are similar to the adverse weather conditions that the seeds remain exposed in the field. Therefore, this study was developed in order to evaluate the relationship between the lignin content of soybean seed coat, with tolerance to deterioration from humidity and mechanical damage. The work primarily consists of a brief literature review, Chapter I, and two more chapters. Chapter II contains the work that evaluates the relationship between seed coat lignin content of soybean seeds with tolerance to deterioration from humidity and mechanical damage. Chapter III, to qualify the experiments in the area, is aimed to estimate the ideal sample size, in number of seeds required for the tetrazolium test for soybean seeds. The CD 208 and CD 215 cultivars, with higher lignin content in seed coat, 4.19% and 2.64%, respectively, had higher vigor after stress with simulated rainfall. Furthermore, the cultivar CD 208, was also less susceptible to damage from humidity and mechanical damage. Oxidative stress in shoots and roots of the seedlings was demonstrated by the enzyme peroxidase activity Guaiacol, which increased the cultivars CD 215, CD 202 and BRS 184, with lower lignin content in seed coat than 3%. About the seeds, the cultivar BRS 184 with lower lignin content, 1.69%, showed a higher oxidative stress due to increased activity of the enzyme Guaiacol Peroxidase and lipid peroxidation. The sample size in number of seeds, to assess humidity damage through the tetrazolium test in soybean seeds is dependent on the physiological quality of cultivars, recommending to the highest level of precision 200 seeds per lot, and for a below level and acceptable accuracy, 0.5% CI, 121 seeds.

Index terms: *Glycine max.* field deterioration. seeds quality. sample dimension.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Médias das temperaturas média, máxima e mínima, em Graus Celsius (°C), na casa de vegetação da Embrapa Soja, Londrina-PR, onde foram produzidas sementes de soja das cultivares CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184. UFSM, Santa Maria, 2015.....32
- Tabela 2 – Caracterização inicial através das médias do teor de lignina no tegumento (LG%), de germinação (G %), envelhecimento acelerado (E %), dano de umidade (DU%) e dano mecânico (DM%) para sementes de quatro cultivares de soja. UFSM, Santa Maria, 2015.....40
- Tabela 3 – Germinação (G %) e dano por umidade (DU %) em sementes de quatro cultivares de soja, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU obtido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.....41
- Tabela 4 – Média da porcentagem de dano mecânico (DM%), média e coeficiente de variação (CV%) nas classes de avaliação do teste de tetrazólio, em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes de teor de lignina no tegumento, submetidas ao teste do pêndulo. UFSM, Santa Maria, 2015.....45
- Tabela 5 – Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) (U mg⁻¹ proteína) e da superóxido dismutase (SOD) (U mg⁻¹ proteína), e peroxidação lipídica (TBARS nmol MDA mg⁻¹ proteína) na parte aérea e em raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores discrepantes do teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.....48
- Tabela 6 – Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) (U mg⁻¹ proteína) e da superóxido dismutase (SOD) (U mg⁻¹ proteína), e peroxidação lipídica (TBARS nmol MDA mg⁻¹ proteína) nas sementes de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes de teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.....51

CAPÍTULO III

- Tabela 1 – Vigor (VG %), viabilidade (VB%) e dano de percevejo (DP %), determinado através do teste de tetrazólio, em sementes de cinco cultivares de soja. UFSM, Santa Maria, 2015.....64
- Tabela 2 – Germinação (G %) e dano por umidade (DU %) em sementes de cinco cultivares de soja, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU)

e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.....63

Tabela 3 – Tamanho de amostra, em número de sementes, para diferentes IC 95% (0,3; 0,5; 1,0 e 1,5%), entre os percentis 2,5% e 97,5% (AP) de 2000 reamostragens para estimativas da média do resultado do teste de Tetrazólio de cinco lotes de sementes de soja, submetidos a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.....66

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Multiplicação das cultivares CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184 em vaso, na casa de vegetação, da EMBRAPA Soja, Londrina-PR. UFSM, Santa Maria, 2015.....31
- Figura 2 – Média do teor de umidade das cultivares BMX Potencia RR e BMX Turbo RR, nos diferentes períodos de chuva, 1, 2, 3, 4 e 5, os quais correspondem respectivamente à 0, 20, e 40 minutos e 1, 2, 3, 4 e 5 horas, para determinação do período de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.....35
- Figura 3 – Simulação de chuva, com a utilização de aspersores, sobre as vagens das cultivares de soja CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, em casa de vegetação da EMBRAPA Soja, Londrina-PR. UFSM, Santa Maria, 2015.....36
- Figura 4 – Danos de umidade visualizados através do teste de tetrazólio nas sementes de soja das cultivares CD 208 e CD 202. UFSM, Santa Maria, 2015.....43
- Figura 5 – Análise dos danos mecânicos visualizados através do teste de tetrazólio nas sementes da cultivar CD 208. UFSM, Santa Maria, 2015.....46

CAPÍTULO III

- Figura 1 – Valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo de 2000 reamostragens para estimar diferentes tamanhos de amostra para identificação de danos por umidade, no teste de tetrazólio, em sementes das cinco cultivares de soja (A=NK 7059; B=CD 208; C=CD 215; D=CD 202; E=BRS 184), sem estresse de deterioração por umidade (testemunha). UFSM, Santa Maria, 2015.....68
- Figura 2 - Valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo de 2000 reamostragens para estimar diferentes tamanhos de amostra no teste de tetrazólio em sementes de soja com elevado dano de umidade (tratamento com estresse de deterioração por umidade), de cinco cultivares de soja (A=NK 7059; B=CD 208; C=CD 215; D=CD 202; E=BRS 184). UFSM, Santa Maria, 2015.....69

LISTA DE ANEXOS

- Anexo A – Análise de variância para o teste de germinação (G %) em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....80
- Anexo B – Análise de variância para o teste de envelhecimento acelerado (E %) em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento. UFSM, Santa Maria, 2015.....81
- Anexo C – Temperatura (C^0) e umidade relativa do ar (%) na casa de vegetação da EMBRAPA Soja, Londrina-PR, no período compreendido entre 20 a 23 de fevereiro de 2014. UFSM, Santa Maria, 2015.....82
- Anexo D – Análise de variância para o teste de tetrazólio, para a variável dano de umidade (DU %), em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....83
- Anexo E – Análise de variância das classes do teste de tetrazólio, para avaliar a variável dano mecânico (DM %), em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas ao teste do pêndulo. UFSM, Santa Maria, 2015.....84
- Anexo F – Análise de variância da variável enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....85
- Anexo G – Análise de variância da variável enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....86
- Anexo H – Análise de variância da variável peroxidação lipídica (TBARS) na parte aérea de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....87
- Anexo I – Análise de variância para a variável enzima guaiacol peroxidase (POD) nas raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....88

Anexo J – Análise de variância da variável enzima superóxido dismutase (SOD) nas raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	89
Anexo K – Análise de variância da variável peroxidação lipídica (TBARS) nas raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	90
Anexo L – Análise de variância da variável enzima superóxido dismutase (SOD) nas sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	91
Anexo M – Análise de variância da variável enzima guaiacol peroxidase (POD) nas sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	92
Anexo N – Análise de variância da variável peroxidação lipídica (TBARS) nas sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	93
Anexo O – Análise de variância para o teste de germinação (G %) em sementes de cinco cultivares de soja, utilizadas na análise de tamanho de amostra para o teste de tetrazólio, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	94
Anexo P – Análise de variância para o teste de tetrazólio, para a variável dano de umidade (DU %), em sementes de cinco cultivares de soja, utilizadas na análise de tamanho de amostra para o teste de tetrazólio, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.....	95

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO I.....	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
A cultura de soja.....	16
Qualidade de semente.....	18
Tegumento da semente de soja.....	22
Teor de lignina no tegumento das sementes de soja.....	24
CAPÍTULO II.....	27
SUSCETIBILIDADE À DETERIORAÇÃO POR UMIDADE E AO DANO MECÂNICO EM SEMENTES DE CULTIVARES DE SOJA COM VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE LIGNINA NO TEGUMENTO.....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	28
Material e métodos.....	31
Resultados e discussão.....	39
Conclusão.....	53
Referências.....	53
CAPÍTULO III.....	58
TAMANHO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE SOJA.....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	59
Material e métodos.....	62
Resultados e discussão.....	63
Conclusão.....	70
Referências.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	80

INTRODUÇÃO

A soja é uma das espécies mais cultivadas no mundo, sendo destinada tanto para a alimentação humana como animal, além da produção de biocombustíveis. É a cultura agrícola brasileira que apresentou maior crescimento nas últimas décadas, ocupando aproximadamente 54% da área cultivada do país, sendo a maior produção da soja no Estado do Mato Grosso, em segundo o Paraná, e em terceiro o Rio Grande do Sul. Na safra 2014/15, a área semeada com a oleaginosa no Brasil está prevista para 31,6 milhões de hectares, apresentando um incremento de 4,8% em relação à safra anterior (CONAB, 2015). O aumento da área de cultivo de soja foi influenciado pelo excelente desempenho nas cotações dessa *commodity* no mercado internacional e no mercado interno.

Dentre os fatores que afetam o desempenho da cultura está o uso de sementes de qualidade, capazes de garantir o estabelecimento adequado do estande de plantas, refletindo na produtividade da cultura. A semente de soja, para ser considerada de alta qualidade, deve preservar os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, ou seja, estar livre de misturas varietais ou de sementes de espécies invasoras, isenta de patógenos e apresentar altas taxas de germinação e vigor (FRANÇA NETO; HENNING; KRZYZANOWSKI, 2010; MARCOS FILHO, 2005).

Existem diversos fatores que podem afetar a qualidade das sementes de soja, dentre esses estão as condições climáticas durante as fases de desenvolvimento, maturação e pré-colheita das sementes. Em campo, problemas relativos à deterioração por umidade (deterioração em campo) podem causar acentuadas reduções de qualidade, podendo essa ser apontada como uma das principais causas da deterioração das sementes (COSTA et al., 2001; CUNHA et al., 2009; FRANÇA NETO et al., 2000; TERASAWA et al., 2009). No Brasil, em regiões onde predomina o cultivo da soja, como na região dos cerrados, as precipitações concentram-se no período de primavera-verão, quando se intensificam as atividades agrícolas, porém, podem ocorrer irregularidades da ocorrência de precipitação, podendo advir sequências de dias secos durante o período chuvoso ou vice e versa, o que interfere negativamente na produtividade das culturas e na qualidade do produto final (SOUSA, 1998). Segundo Giurizatto et al. (2003), na região sul do Mato Grosso do Sul existem dificuldades de se produzir sementes de soja de elevada qualidade, principalmente para as cultivares precoces, devido à ocorrência de chuvas no período próximo à colheita.

A deterioração por umidade resulta da exposição das sementes de soja aos ciclos alternados de elevada e baixa umidade antes da colheita, devido à ocorrência de chuvas, ou às flutuações diárias de umidade relativa do ar. Desencadeada por um processo de alterações físicas, a deterioração por umidade pode resultar em ruptura do tegumento e comprometimento dos tecidos embrionários. Organelas, como as mitocôndrias, são particularmente afetadas por tal processo, dificultando a respiração de manutenção e havendo menor produção de energia para a germinação (FRANÇA NETO et al., 2000).

A deterioração das sementes em decorrência de alta temperatura associada a alta umidade relativa intensificam o processo respiratório das sementes, podendo causar estresse oxidativo, levando a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres nas sementes (APEL; HIRT, 2004; ÁVILA; ALBRECHT, 2010). Para eliminar essas espécies reativas de oxigênio, as plantas apresentam sistemas enzimáticos antioxidantes, que constituem uma importante defesa primária contra os radicais livres gerados sob condições de estresse (GREGGAINS et al., 2000). Dessa forma, a atividade dessas enzimas pode ser alterada em função do processo de deterioração das sementes.

Para avaliação do dano por umidade em sementes de soja o teste de tetrazólio é o mais utilizado. É um teste versátil e confiável, e fornece resultados precisos e baseia-se na análise da condução de cada semente individualmente. Além de fornecer o diagnóstico de danos por umidade, avalia a viabilidade e o vigor dos lotes de sementes, danos mecânicos e danos de percevejo. No Brasil, em 1981, foi publicado o primeiro manual do teste de tetrazólio específico para a soja (FRANÇA NETO, 1981). O comprometimento da qualidade fisiológica das sementes de soja pelo processo de deterioração por umidade pode ser relacionado às características do tegumento da semente (MERTZ, 2007). O tegumento de soja é o principal modulador das interações entre as estruturas internas das sementes e o ambiente externo, tendo como principais funções: a resistência das sementes à deterioração (DASSOU; KUENEMAN, 1984); proteção ao eixo embrionário e ao tecido de reserva (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000); regulação das trocas gasosas entre a semente e o meio; e o controle da velocidade de hidratação da semente (DUKE; KAKEFUDA, 1981).

Assim, características do tegumento da semente, tais como a semi-permeabilidade à água, e o elevado teor de lignina, podem contribuir para a obtenção de sementes de soja de elevado potencial fisiológico. Os programas de melhoramento genético de soja têm buscado desenvolver materiais com características, tais como: resistência as doenças e pragas, elevados teores de óleo e proteína, e alto teor de lignina no tegumento da semente (COSTA et al., 2001).

A lignina é um complexo polímero fenólico, importante para suporte mecânico, transporte de água, e de defesa nas plantas vasculares, e faz parte dos compostos do tegumento da semente (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996; LEWIS; YAMAMOTO, 1990). Essa deposição de lignina é importante não só para conferir a rigidez e resistência aos tecidos vegetais da planta, tais como, caule e folhas, mas especificamente para o tegumento da semente de soja, e desta forma está correlacionada com a resistência ao dano mecânico (PANOBIANCO, 1997). Essa característica do tegumento da semente está intimamente relacionada com fatores genéticos (CARBONELL, 1991).

O tegumento de semente de soja é fino e seu conteúdo de lignina muitas vezes é baixo oferecendo pouca proteção para a radícula (GLORIA; CAMELLO-GUERREIRO, 2006). Diversos autores relatam que a resistência da semente de soja ao dano mecânico está relacionada com os níveis de lignina encontrados no tegumento (ALVAREZ et al., 1997; DANTAS, 2012; GRIS, 2009; MENEZES et al., 2009; PANOBIANCO et al., 1999).

A lignificação do tegumento das sementes de soja confere menor perda em sua qualidade no momento da colheita, e maior resistência aos danos na semente, e protege a parede celulósica do ataque de microrganismos, atribuindo maior qualidade as mesmas (OBANDO-FLOR et al., 2004). França Neto et al. (2007) observaram que a utilização de genótipos de soja com mais de 5% de teor de lignina no tegumento das sementes favoreceu a produção de sementes de maior qualidade. A lignina, além de ter proporcionado maior tolerância das sementes às injúrias mecânicas (OBANO-FLOR et al., 2004), conferiu menor velocidade de hidratação das sementes (SANTOS et al., 2007).

Embora existam dados e evidências de que o teor de lignina confere alguma resistência a deterioração por umidade, faltam dados mais detalhados e metodologias as quais se assemelhem com as condições climáticas adversas que as sementes ficam expostas em campo. Neste sentido, torna-se fundamental confrontar a qualidade fisiológica das sementes, em função da semi-permeabilidade do tegumento, condicionado pelo teor de lignina, e a resistência a impactos mecânicos das sementes. E, mesmo todo o procedimento para a condução do teste de tetrazólio para sementes de soja esteja estabelecido e produza resultados confiáveis, a possibilidade de redução do número de amostras de sementes para a condução do teste pode trazer agilidade na sua condução mantendo o grau de precisão.

Dessa forma, esse trabalho contribui não só para estudar a relação entre tolerância à deterioração e o teor de lignina no tegumento das sementes de soja, mas também contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia que permita detectar essa característica.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura de soja

A soja (*Glycine max*) é uma planta autógama e anual, pertence a família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, gênero *Glycine* L., subgênero *soja* (Moench) F. J. Germ. e a espécie *Glycine max* (L.) Merrill. Sua origem e domesticação provêm do nordeste da Ásia (China e regiões adjacentes) (CHUNG; SINGH, 2008) e a sua disseminação do Oriente para o Ocidente ocorreu através de navegações, no final do século XV. No início do século XX, começou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos, com um rápido crescimento no desenvolvimento de cultivares comerciais (CONWAY, 2003).

O primeiro relato sobre o surgimento do cultivo de soja no Brasil foi em 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000). Em seguida, foi levada por imigrantes japoneses para São Paulo, e somente, em 1914 a soja foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul (BONETTI, 1981). Porém a expansão da soja em todo Brasil se deu nos anos 70, com o interesse crescente na indústria de óleos e a demanda do mercado internacional. Até 1974 toda a produção de soja era realizada com técnicas e cultivares dos Estados Unidos, e só produzia bem, em escala comercial, nos estados do sul, onde as cultivares americanas melhor se adaptaram às condições edafoclimáticas, semelhantes às de sua origem. A soja passou a ser cultivada também no centro oeste, nordeste e norte brasileiro, devido à criação de inúmeras cultivares adaptadas para o clima tropical destas regiões.

A cultura de soja vem se destacando na economia mundial, devido o uso dos grãos pela agroindústria, indústria química e de alimentos, bem como, fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO; ROSSI, 2000). A proteína de soja origina produtos comestíveis, tais como: ingredientes de padarias, massas, produtos de carnes, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentação para bebês, confecções e alimentos dietéticos. São utilizados também pela indústria de adesivos, nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel e emulsão de água para tintas. A soja integral é utilizada pela indústria de alimentos em geral e o óleo cru se transforma em óleo

refinado e lecitina, que dá origem a vários outros produtos (CONWAY, 2003). Seu elevado teor em proteínas (40%) faz dela a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais e apesar do seu baixo teor de óleo (cerca de 19%) disputa com o dendê a posição de maior fonte do produto (EMBRAPA, 2009).

A crescente necessidade de produção tanto de biocombustíveis quanto de óleo e alimentos de qualidade exige melhor nível tecnológico, incluindo, a utilização de sementes de qualidade que garantam o estabelecimento da cultura.

Entre os grandes produtores mundiais (Estados Unidos o maior produtor, Brasil o segundo e o terceiro a Argentina), o Brasil apresenta a maior capacidade de multiplicar a atual produção, tanto pelo aumento da produtividade, quanto pelo potencial de expansão da área cultivada. Até 2020, o Brasil pode assumir a liderança mundial na produção do grão, devendo ultrapassar a barreira dos 100 milhões de toneladas (VENCATO et al., 2010).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2013/14 o Brasil alcançou a produção de 86,12 milhões de toneladas em 30,17 milhões de hectares cultivados de soja. Na safra 2014/15 a soja pode atingir uma produção em torno de 95,91 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 31,62 milhões de hectares, e um aumento de 6,3% em produtividade (Kg.ha^{-1}), comparado à safra anterior (CONAB, 2015).

O crescimento da cultura de soja no país esta associado aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor agrícola e industrial. A mecanização e a criação de cultivares altamente produtivas adaptadas às diversas regiões, o desenvolvimento de tecnologias relacionadas ao manejo de solos, ao manejo de adubação e calagem, manejo de pragas e doenças, além da identificação e solução para os principais fatores responsáveis por perdas no processo de colheita, são fatores promotores desse avanço (FREITAS, 2011).

Todo esse avanço na cultura da soja partiu também do melhoramento genético na produção de cultivares com característica de interesse agrônomo, aliado a utilização de sementes de alta qualidade, conferindo além de elevado potencial produtivo, resistência a doenças e insetos praga, o que contribui para que altos níveis de produtividade sejam alcançados (KRZYZANOWSKI et al., 2008).

Qualidade de semente

As pesquisas visando à qualidade de sementes são responsáveis por grande parte da evolução da agricultura brasileira. As altas produtividades obtidas nas lavouras de soja estão diretamente relacionadas com o sucesso do estabelecimento das plantas no campo, que depende dentre outros fatores da utilização de sementes de alta qualidade. Assim, sementes viáveis e vigorosas resultam em plântulas vigorosas, bem desenvolvidas e que se estabelecem em condições adversas do meio ambiente, com maior velocidade de emergência e de desenvolvimento das plantas, e desta forma podem expressar ao máximo seu potencial genético (BOTELHO, 2012; FRANÇA NETO et al., 2010).

A qualidade da semente é caracterizada pelo somatório dos atributos de qualidades genética, física, fisiológica e sanitária, ou seja, estar livres de misturas varietais ou de sementes de espécies invasoras, isenta de patógenos e apresentar altas taxas de germinação e vigor, conferindo a garantia de um desempenho agrônomico, que é a base fundamental do sucesso para uma lavoura tecnicamente bem instalada (KRZYZANOWSKI et al., 2008).

A consolidação desses atributos para a determinação da qualidade final das sementes é adquirida durante todo o processo de produção, desde os fatores genéticos, condições climáticas em todo o ciclo da cultura, técnicas utilizadas na colheita, secagem, beneficiamento, armazenamento, transporte e semeadura. No caso da soja, as sementes são altamente susceptíveis as condições ambientais, sendo que a perda mais frequente da qualidade é no campo, principalmente nos períodos de maturação e pré-colheita (FRANÇA NETO et al., 2000; GIGLIOLI; FRANÇA NETO, 1982; HARTWIG; POTTS, 1987; PESKE; PEREIRA, 1983).

A pureza genética é importante para que a cultivar possa expressar em sua plenitude todos os seus atributos de qualidade agrônomico, como ciclo, produtividade, resistência a doenças e insetos, tipo de grão, qualidade organoléptica e de semente (KRZYZANOWSKI et al., 2008).

A qualidade sanitária da semente de soja é fundamental, já que afeta negativamente a qualidade fisiológica da semente, bem como a sanidade da lavoura, pois diversos fungos como *Phomopsis* spp., *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium* spp. (fitopatógenos), e *Aspergillus* spp. (fungos de armazenamento), que ao infectarem a semente, contribuem para a redução do vigor e da germinação (HENNING, 2005a). Além disso, a semente pode ser o veículo de disseminação e introdução de patógenos para áreas livres de doenças, sejam esses

infestando ou infectando as sementes como também, através da disseminação por esclerócitos misturados as sementes mal beneficiadas, e por meio de torrões de solo. Esses fatores ressaltam a necessidade da utilização de sementes certificadas ao invés de sementes “piratas” ou sementes próprias, que geralmente não são beneficiadas adequadamente (HENNING et al., 2005b).

A semente de soja é afetada principalmente no campo, pelos problemas relativos à deterioração por umidade, também conhecidos por deterioração de campo. Podem causar acentuadas reduções de qualidade, podendo ser apontada como uma das principais causas da deterioração das sementes quando comparado aos demais danos associados à semente de soja, como os danos por percevejos, patógenos e o mecânico. Resulta da exposição de sementes de soja a ciclos alternados de elevada e baixa umidade antes da colheita, devido à ocorrência de chuvas frequentes, ou às flutuações diárias de umidade relativa do ar (FRANÇA NETO et al., 2007).

A deterioração por umidade é desencadeada por um processo específico de alterações físicas. A semente de soja é higroscópica, e têm o seu grau de umidade condicionado pelas condições de umidade do ambiente, então as sucessivas expansões e contrações do volume das sementes ocasionam a formação de enrugamento no tegumento, principalmente na região oposta ao hilo. Ocorre o cansaço físico dos tecidos, que pode resultar em ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, comprometendo o desempenho das membranas aos níveis celular e sub-celular. A deterioração por umidade também pode elevar o índice de danos mecânicos na colheita, uma vez que sementes deterioradas são extremamente vulneráveis aos impactos mecânicos (FRANÇA NETO et al., 2000; 2007).

Além disso, o processo de deterioração das sementes em decorrência de altas temperaturas associada à elevada umidade relativa intensifica o processo respiratório das sementes, podendo causar estresse oxidativo, levando a formação espécies reativas de oxigênio e radicais livres nas sementes (APEL; HIRT, 2004; ÁVILA; ALBRECHT, 2010). Nas células que compõe as sementes de soja estes radicais livres podem causar alterações, agindo diretamente sobre as membranas celulares que as compõe, tais como o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto ($^1O_2^*$) são produzidos (JALEEL et al., 2007). Estas moléculas desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos poliinsaturados que fazem parte da membrana celular, denominadas de peroxidação lipídica, a qual afeta a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (ÁVILA; ALBRECHT, 2010).

Para eliminar essas espécies reativas, as plantas apresentam sistemas enzimáticos antioxidantes, que constituem uma importante defesa primária contra os radicais livres gerados sob condições de estresse, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , a catalase (CAT) e as peroxidases (PX) que podem quebrar o H_2O_2 em H_2O e O_2 (GREGGAINS et al., 2000). Dessa forma, a atividade dessas enzimas pode ser alterada em função do processo de deterioração das sementes, afetando diretamente a qualidade fisiológica.

A qualidade física da semente de soja no que se refere a sua pureza física, uniformidade de tamanho e dano mecânico, é importante para o estabelecimento da lavoura. A pureza indica o padrão de qualidade do lote quanto à sua composição, ou seja, a percentagem de sementes de soja e de material inerte (impurezas), número de sementes de outras espécies cultivadas, silvestres e de plantas nocivas toleradas. Esses parâmetros são estabelecidos em padrões para as diferentes classes de sementes existentes no sistema de certificação de sementes brasileiro (KRZYZANOWSKI et al., 2008).

A integridade física da semente de soja é fundamental para o seu desempenho no campo. Sementes sem danos mecânicos constituem um pré-requisito muito importante, pois os danos, principalmente quando ocorrem na região do eixo embrionário, afetam a qualidade fisiológica da semente, ocasionando redução no vigor e no poder germinativo. A colheita mecânica e o beneficiamento são as principais fontes de danos mecânicos em sementes de soja. Na colheita, a semente fica particularmente susceptível ao dano mecânico, imediato ou latente (PAIVA et al., 2000; KRZYZANOWSKI et al., 2008). Este dano pode ser reduzido através da regulação adequada das máquinas que serão usadas desde a colheita até o armazenamento, manuseio cuidadoso das sementes em todas as operações até a comercialização e o uso de secagem quando necessário, para manter a umidade da semente compatível com a preservação da qualidade física, fisiológica e sanitária (PESKE; BAUDET, 2006).

O grau de umidade das sementes de soja, quando estas atingem a maturidade fisiológica, é de aproximadamente, 50% (LACERDA et al., 2003), dificultando e/ou inviabilizando a colheita mecânica. Assim, a faixa recomendada para colheita, para evitar danos na semente e perda de sua viabilidade e vigor, é quando as sementes reduzem pela primeira vez a sua umidade para a faixa de 15 a 18% (PESKE et al., 2004). Dessa forma, se reduz o tempo que as sementes permanecem no campo, ficando expostas a condições climáticas muitas vezes desfavoráveis para sua conservação, como chuvas, altas temperaturas, incidência de pragas e patógenos (GIURIZATTO et al., 2003). Para aquelas sementes

colhidas com baixo grau de umidade, há perdas na qualidade, por estarem mais sujeitas ao ataque de patógenos, ao rompimento dos tecidos do tegumento e perda da viabilidade (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Um dos métodos eficientes para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja é o teste de tetrazólio, aonde a deterioração por umidade e o dano mecânico são bem caracterizados, além do dano por percevejo (FRANÇA NETO et al., 1998). Esse teste oferece agilidade, versatilidade e confiabilidade. Avalia a viabilidade e vigor dos lotes de sementes, além de fornecer o diagnóstico das possíveis causas responsáveis pela redução da sua qualidade (danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejos) (KRZYZANOWSKI et al., 2008).

O teste de tetrazólio está fundamentado na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs (AOSA, 1983). Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos. Quando a semente de soja é imersas na solução incolor de TCT, esta é difundida através dos tecidos, ocorrendo nas células vivas a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não difusível, conhecido por trifenilformazan. Quando o TCT é reduzido indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, há viabilidade celular e do tecido. Portanto, a coloração resultante da reação é uma indicação positiva da viabilidade através da detecção da respiração a nível celular (FRANÇA NETO et al., 1998).

Sendo o tecido vigoroso, haverá a formação de um vermelho carmin claro; os tecidos em processo adiantado de deterioração são coloridos mais intensamente de vermelho, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de TCT pelas membranas celulares comprometidas de tais tecidos; se o mesmo não é viável, a redução do sal não ocorrerá, e o tecido morto contrastará como branco com o tecido colorido viável. A observação destas diferenças de cor, juntamente com o conhecimento de diversas características das sementes, permite a determinação da presença, da localização e da natureza dos danos que podem ocorrer nos tecidos embrionários (FRANÇA NETO et al., 1998; MOORE, 1973).

Tegumento da semente de soja

A composição química da semente de soja está relacionada com fatores genéticos, mas pode sofrer influência do meio ambiente (BURTON et al., 1995; WESTGATE et al., 1995). O tegumento, responsável pela proteção dos órgãos internos da semente, normalmente apresenta-se na cor amarela, todavia pode sofrer variações de tonalidades através de mutação natural, podendo se apresentar marrom ou preto (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

O tegumento é o envoltório da semente que exerce funções de proteção ao eixo embrionário e ao tecido de reserva contra choques e abrasões, mantém a união entre as partes internas da semente, impede à entrada de microorganismos e insetos, controla a velocidade de hidratação e de trocas gasosas entre a semente e o meio, e regula a germinação por intermédio da dormência (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Também protege o embrião de ruptura celular e perda de substâncias intracelulares, durante a embebição (DUKE; KAKEFUDA, 1981).

O tegumento da semente é proveniente dos integumentos do óvulo, e o integumento externo ou secundina dá origem à testa, enquanto o integumento interno ou primina origina o tégma (ESAU, 1977; MILLER et al., 1999). A espessura do conjunto das quatro camadas da testa da semente de soja pode variar de 70 a 100 μm , e pode haver variação entre cultivares (CAVINNESS; SIMPSON JUNIOR, 1974). Essa característica é constante dentro de cada cultivar e é controlada geneticamente (LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

A primeira barreira de embebição da semente de soja é a cutícula, que é uma fina camada externa do tegumento, a qual apresenta estrutura variável (RAGUS, 1987).

Em um corte transversal da testa de uma semente de soja, podem ser distinguidas quatro camadas a partir da sua superfície: cutícula, epiderme (células epidérmicas em paliçada ou macroesclerídeos), hipoderme (células em ampulheta, ou células pilares ou osteoesclerídeos) e células parenquimatosas (parênquima lacunoso) (GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Células esclerenquimatosas, chamadas macroesclerídeos formam a camada de células epidérmicas em paliçada, a qual aparece de uma forma contínua por todo o tegumento, com exceção da região do hilo, onde há duas camadas de células em paliçada. A camada de células em paliçada mais interna provém do funículo, enquanto a mais externa, do integumento externo do óvulo (EVERT, 2006).

Os materiais hidrofóbicos na camada de células em paliçada (epiderme) é que determinam as diferenças no grau de permeabilidade da testa. Em sementes duras ou

impermeáveis, a presença de lipídeos ocorre em grande quantidade na base das células da camada em paliçada, chegando a penetrar entre as paredes celulares, enquanto nas sementes de testa permeável a sua presença pode ser verificada por toda a camada (CAVARIANI et al., 2009).

Também, estudos comprovaram a existência de depósitos em forma de material granular localizados na superfície do tegumento. Foram encontradas evidências, que levam a concluir que esses depósitos são compostos por material hidrofílico. Removendo-se esses compostos, foi possível ainda, observar a presença de poros na superfície do tegumento, os quais se apresentavam em três formatos: circular, alongado e curto (MA et al., 2004).

Conforme Asiedu; Powell (1998), a cor do tegumento das sementes é uma característica associada com a permeabilidade à água. A pigmentação do tegumento das sementes também está correlacionada com a baixa taxa de absorção de água das sementes em algumas espécies de *Fabaceae*. Comparando-se tegumentos com e sem pigmentação, esses autores observaram uma maior taxa de embebição nas sementes que não apresentavam acúmulo de pigmentos.

Segundo Mertz (2007), sementes com tegumento preto apresentaram qualidade fisiológica superior em relação às sementes com tegumento amarelo, e ainda quanto ao vigor, testando dois genótipos de soja, o genótipo com tegumento semi-permeável (coloração preta) apresentou maior vigor, 82%, em relação ao com tegumento permeável (coloração amarela), 52%. Porém, Giurizatto et al. (2003), utilizando cultivares de soja com tonalidades diferentes de tegumento, verificaram que algumas cultivares com sementes de tegumento amarelo apresentavam qualidade fisiológica superior ao das cultivares com sementes de tegumento marrom e preto.

Sementes de soja com tegumento amarelo apresentam o alelo dominante do gene *I*, gene responsável pela coloração do tegumento. A presença desse alelo dominante inibe o acúmulo de antocianina nas paredes da epiderme do tegumento amarelo. Sementes de soja com tegumento preto não possuem esse alelo dominante e, portanto, apresentam acúmulo de antocianina nas paredes da epiderme. Em tegumentos pretos, nos estádios iniciais de desenvolvimento, há presença de antocianinas vacuolares como cianidina e pelargonidina. Já em tecidos de tegumentos maduros verifica-se a presença dos flavonóides cianidina, pelargonidina e delphinidina (TODD; VODKIN, 1993).

Teor de lignina no tegumento das sementes de soja

O termo lignina é utilizado para designar um grupo de substâncias com unidades químicas semelhantes. A estrutura química da lignina é muito complexa e ainda não é muito bem definida (PANOBIANCO, 1997). Silva (1981) refere-se à lignina como um polímero 3-metóxi-fenil-propenol e 3-5-di-metóxi-fenil-propenol, ligados em proporções variadas e em sequência casualizada, originando grande variedade de produtos, o que dificulta a sua exata definição. Segundo Esau (1976), a lignina constitui-se de uma substância ou mistura de substâncias orgânicas de elevado conteúdo de carbono, mas diferente dos carboidratos, e que se encontra associada à celulose nas paredes de numerosas células.

A lignina pode ser classificada em core e não core, com base em sua susceptibilidade relativa à hidrólise. A lignina não core consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular por hidrólise, que é representada por ácidos *p*-hidroxicinâmico ésterligados. Já lignina core consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem (LAPIERRE, 1993).

Ligninas são formadas através de acoplamento oxidativo de monômeros de álcool hidroxicinâmico, com a participação de peroxidase (LAPIERRE, 1993). Os mais importantes são os três diferentes alcoóis de fenilpropanóides, denominados de monolignos: ligninas originadas do álcool coniferil são conhecidas como Ligninas G, Ligninas S são originadas do álcool coniferil sinapil, e Ligninas H do álcool *p*-cumaril, todos sintetizados a partir da fenilalanina mediante vários derivados do ácido cinâmico. Esses álcoois formam um polímero pela ação de enzimas que geram radicais livres intermediários. As proporções dos álcoois de fenilpropanóides na lignina variam entre as espécies, os órgãos vegetais e, mesmo, as camadas de uma única parede celular (TAIZ; ZEIGER, 2013). Gimnospermas polimerizam principalmente álcool coniferílico, dicotiledôneas, o álcool sinapílico e monocotiledôneas, todos os três tipos de alcoóis (DEWICK, 1997). A grande variedade estrutural destas substâncias se deve ao fato de estar ligados a grupos hidroxilas, metoxilas ou conjugados com açúcares (HEIM et al., 2002).

A lignina é impermeável à água, muito resistente à pressão e pouco elástica. Depois da celulose é o polímero vegetal mais abundante, sendo encontrada na parede celular em maior quantidade (60 a 90%) (EGG MENDONÇA, 2001). É na testa das sementes de soja que está

presente a lignina, polímero natural, que varia conforme a cultivar e pode sofrer influência do meio ambiente (LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

A inserção de lignina na parede tem origem na lamela média, partindo em direção ao interior da parede secundária. Inicialmente ocorre o crescimento da parede primária que corresponde à fase em que a célula aumenta de tamanho, e depois o crescimento da parede secundária, fase em que a parede celular torna-se progressivamente mais espessa, a partir da borda interna da parede primária, em direção ao centro da célula, ocorrendo a deposição de polímeros de lignina. O efeito deste padrão de deposição de lignina torna a região da lamela média/parede celular primária mais intensamente lignificada (JUNG; ALEN, 1995).

Segundo Mcdougall et al. (1996), a impermeabilidade ao tegumento conferida pela lignina exerce efeito significativo sobre a capacidade e velocidade de absorção de água através deste, interferindo desse modo, na quantidade de lixiviados liberados para o meio externo durante a fase de embebição no processo de germinação de sementes.

O tegumento de semente de soja é muito fino e seu conteúdo de lignina é baixo o que oferece pouca proteção para a radícula (GLORIA; CAMELLO-GUERREIRO, 2006). Diversos autores relatam que a resistência da semente de soja ao dano mecânico está relacionada com os níveis de lignina encontrados no tegumento (ALVAREZ et al., 1997; DANTAS, 2012; GRIS, 2009; MENEZES et al., 2009; PANOBIANCO et al., 1999).

Segundo França Neto et al. (2000), o incremento no teor de lignina no tegumento da semente de soja confere menor permeabilidade ao tegumento, o que reduz o efeito das flutuações de umidade do ambiente sobre a semente, principalmente nas fases de maturação e pré-colheita e torna as sementes menos suscetíveis à deterioração. Além disso, a semi-permeabilidade do tegumento, pode refletir em maior resistência mecânica, resultando também em maior potencial de armazenamento e menor índice de ocorrência de danos causados por percevejos.

De acordo com França Neto; Henning (1984), a semente de soja é muito sensível ao dano mecânico, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário (radícula, hipocótilo e plúmula) estão situadas sob um tegumento pouco espesso.

Diferenças no teor de lignina entre genótipos de soja foram observadas por diversos autores (FRANÇA NETO et al., 2007; OBANDO-FLOR et al., 2004; SANTOS et al., 2007), os quais concluíram que os genótipos de soja com maior teor de lignina no tegumento conferiram maior resistência a danos na semente, favorecendo a produção de sementes de maior qualidade. O maior teor de lignina pode influenciar na tolerância à deterioração por umidade, por reduzir velocidade de hidratação das sementes.

Também foi observado por França Neto et al. (1999), maior quantidade de lignina nos tegumentos de linhagens com sementes de coloração escura, 12,18%, e nas linhagens de tegumento amarelo menor quantidade de lignina, 4,75%. Foi observado também que as sementes com maior quantidade de lignina apresentaram melhor qualidade das sementes.

Em um estudo realizado por Alvarez (1994), avaliou-se a resistência ao dano mecânico das sementes de três cultivares de soja, com diferentes teores de lignina presente no tegumento. A cultivar FT-2, com 6,19% de lignina teve maior resistência ao dano mecânico, FT-10, com 5,28%, e IAC-2, com 4,21%, apresentaram média e menor resistência, respectivamente. Carbonell; Krzyzanowski (1995) utilizaram o "teste do pêndulo" para caracterizar genótipos quanto à resistência a danos mecânicos. Através da queda livre de um pêndulo de aço sobre sementes individualizadas, os autores constataram maior resistência da cultivar FT-2 em relação as cultivares FT-10 e IAC-2.

Alvarez et al. (1997) relacionaram a maior tolerância aos danos mecânicos com o maior teor de lignina no tegumento da semente de soja, enquanto que a resistência à deterioração em campo relacionaram ao grau de permeabilidade do tegumento, ou seja, não apenas à lignina, e sim à todas características do tegumento.

CAPÍTULO II

SUSCETIBILIDADE À DETERIORAÇÃO POR UMIDADE E AO DANO MECÂNICO EM SEMENTES DE CULTIVARES DE SOJA COM VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE LIGNINA NO TEGUMENTO

Lignin content of the soybean seed coat and susceptibility to humidity deterioration and mechanical damage

Resumo

Objetivou-se nesse trabalho avaliar a relação entre o conteúdo de lignina do tegumento da semente de soja, com a tolerância à deterioração por umidade e com o dano mecânico. Foram utilizadas sementes de quatro cultivares: CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, com teores de lignina no tegumento, em média, de 4,2, 2,6, 2,0 e 1,7%, respectivamente. As sementes foram submetidas ao estresse de deterioração por umidade através de uma chuva simulada, em que as vagens das cultivares foram submetidas a irrigação por aspersão constante, durante 4 horas, e, posteriormente, foram secas em estufa com circulação de ar à 35°C por 37 horas. Esse procedimento foi repetido novamente, totalizando dois ciclos de umedecimento e secagem. Posteriormente as sementes foram submetidas aos testes e determinações e comparadas com o tratamento controle (sem exposição ao estresse). Os testes realizados para avaliação da qualidade fisiológica em laboratório foram: germinação, envelhecimento acelerado, teor de água e teste de tetrazólio quantificando a ocorrência de danos por umidade. Também foi medida a atividade de enzimas antioxidantes, Superóxido Dismutase e Guaiacol Peroxidase, e a peroxidação lipídica, nas plântulas e nas sementes. Para avaliar a tolerância ao dano mecânico utilizou-se o teste do pêndulo, somente nas sementes que não receberam o estresse de deterioração por umidade. As cultivares CD 208 e CD 215, com os maiores teores de lignina no tegumento, apresentaram maior vigor após o estresse com a chuva simulada. As sementes da cultivar CD 208, de maior teor de lignina no tegumento, apresentou-se menos suscetível ao dano por umidade ocasionado pela chuva simulada e ao dano mecânico. O estresse oxidativo na parte aérea e raízes das plântulas foi demonstrado através da maior atividade da enzima POD, a qual aumentou nas cultivares CD 215, CD 202 e BRS 184, com teores de lignina menores em relação a CD 208. Nas sementes, a cultivar BRS184, com menor teor de lignina, apresentou maior estresse oxidativo devido a maior atividade da enzima POD e peroxidação lipídica.

Palavras-chave: *Glycine max.* deterioração em campo. qualidade de sementes.

Abstract

This work aimed to evaluate the relationship between the lignin content of soybean seed coat, with tolerance to deterioration from humidity and mechanical damage. Four cultivars seeds were used, CD 208, CD 215, CD 202 and BRS 184, with the integument lignin, on average, 4.2, 2.6, 2.0 and 1.7%, respectively. The seeds were subjected to deterioration due to humidity stress through a simulated rainfall, wherein the pods cultivars were subjected to constant irrigation sprinkler for 4 hours, and then were dried in an oven with air circulation at 35°C for 37 hours. This procedure was repeated again, totaling two cycles of wetting and drying. Later the seeds were submitted to tests and measurements and compared to the control treatment (without exposure to stress). Tests conducted to evaluate the physiological quality laboratory were: germination, accelerated aging, water content and tetrazolium test quantifying the occurrence of humidity damage. It was also measured the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase and Guaiacol peroxidase, and lipid peroxidation in the seedlings and seeds. To evaluate the tolerance to mechanical damage the pendulum test was made, only with the seeds that did not receive the stress of deterioration. The cultivars CD 208 and CD 215, with higher lignin content in seed coat, had higher vigor after stress with simulated rainfall. The seeds of the cultivar CD 208, with higher lignin content in seed coat, appeared less susceptible to damage from humidity caused by simulated rain and mechanical damage. Oxidative stress in shoots and roots of the seedlings was demonstrated by increased activity of POD enzyme, which increased in cultivars CD 215, CD 202 and BRS 184, with lower lignin contents compared to CD 208. On seeds, the cultivar BRS184 with lower lignin content showed higher oxidative stress due to increased activity of POD enzyme and lipid peroxidation.

Index terms: *Glycine max.* field deterioration. seeds quality.

Introdução

O estabelecimento de uma lavoura com a população adequada de plantas é um dos fatores que mais contribui para assegurar o sucesso da produção e da obtenção de altos rendimentos e que depende da utilização de sementes de elevada qualidade. A semente de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) para ser considerada de alta qualidade deve ter características fisiológicas e sanitárias, que proporcionem altas taxas de germinação e vigor, bem como, possuam garantia de pureza física e varietal, estando livre de impurezas e contaminantes (MARCOS FILHO, 2005; KRZYZANOWSKI, 2004).

Devido as suas características morfológicas e químicas as sementes de soja destacam-se por serem bastante sensíveis à ação de fatores do ambiente (MARCOS FILHO, 1979).

Entre as causas responsáveis pela perda da qualidade em sementes de soja, destacam-se a deterioração por umidade, ocorrida em campo, principalmente na pré-colheita, momento em que as sementes permanecem em campo, sendo submetidas as condições climáticas adversas e ao ataque de pragas e microorganismos (COSTA et al., 2001; CUNHA et al., 2009; FRANÇA NETO et al., 2000; TERASAWA et al., 2009).

Na região sul do Mato Grosso do Sul, existem dificuldades de se produzir sementes de boa qualidade, principalmente para as cultivares precoces, devido à ocorrência de chuvas no período próximo da colheita (GIURIZATTO et al. 2003). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento Brasileira (CONAB), na safra 2012/13, na região Centro-Oeste, o atraso provocado pelo clima no início do plantio, principalmente no Mato Grosso e Goiás, e a ocorrência de chuvas coincidindo com a colheita, repercutiram nos níveis de produtividade da lavoura, reduzindo 3,8% e 5%, respectivamente (CONAB, 2013).

Conforme França Neto; Henning (1984), a deterioração das sementes em campo ocasiona alteração física no tegumento das sementes devido as sucessivas expansões e contrações do volume das mesmas, decorrentes da absorção de umidade em função das oscilações de umidade e/ou temperatura, e/ou ainda chuvas na fase de pré-colheita, que resultam na formação do enrugamento dos cotilédones, na região oposta ao hilo, devido à ausência da camada tegumentar composta por células em forma de "ampulheta" da hipoderme, de modo que as expansões e contrações não são atenuadas. Além disso, ocorre o cansaço físico dos tecidos, que pode resultar em ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, comprometendo o controle de permeabilidade das membranas, afetando organelas, com menor produção de energia, necessária para a germinação (MARCOS FILHO, 2005). A deterioração por umidade é um dano evolutivo e mais acentuado, quando comparado aos demais danos associados à semente de soja, como os danos por insetos, patógenos e o mecânico (FRANÇA NETO et al., 2007).

Os danos mecânicos provocados, principalmente, durante as operações de colheita e beneficiamento, também se destacam como fatores que promovem a perda de qualidade em sementes de soja. A semente de soja é muito sensível ao dano mecânico, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário (radícula, hipocótilo e plúmula) estão situadas sob um tegumento pouco espesso (FRANÇA NETO; HENNING, 1984). A susceptibilidade do tegumento da semente ao dano mecânico está intimamente relacionada com a variabilidade genética, devido a variação do teor de lignina e a espessura do tegumento, além da presença de materiais hidrofóbicos (CARBONELL, 1991; CAVINESS; SIMPSON JUNIOR, 1974; LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

A deterioração por umidade das sementes também pode intensificar o processo respiratório das mesmas, podendo causar estresse oxidativo, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres nas sementes (APEL; HIRT, 2004). Estes radicais livres podem causar alterações, agindo diretamente sobre as membranas celulares, como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1O_2^*$) (JALEEL et al., 2007). Estas moléculas podem desencadear peroxidação lipídica nas membranas celulares, alterando sua fluidez e permeabilidade (ÁVILA; ALBRECHT, 2010). As enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) são antioxidantes e desempenham papel fundamental na defesa contra as EROs (SIMOVA-STOILOVA et al., 2008). Como resultado destes distúrbios, os níveis intracelulares de EROs podem se elevar rapidamente (GILL; TUTEJA, 2010), dependendo do genótipo, intensidade e duração do estresse, bem como, da fase de desenvolvimento (HAMEED et al., 2011).

Características do tegumento da semente de soja tais como a semi-permeabilidade à água, e o elevado teor de lignina, podem contribuir para a obtenção de sementes de soja de qualidade. É na testa das sementes de soja que está presente a lignina, polímero natural, que varia em função das características genéticas da cultivar, mas que também pode sofrer influência do meio ambiente (LEWIS; YAMAMOTO, 1990). A lignina é impermeável à água, muito resistente à pressão e pouco elástica. Depois da celulose é o polímero vegetal mais abundante, sendo encontrada na parede celular em maior quantidade (60 a 90%) (EGG-MENDONÇA, 2001).

Segundo França Neto et al. (2007), a utilização de genótipos de soja com mais de 5% de teor de lignina no tegumento das sementes favorece a produção de sementes de maior qualidade. A lignina, além de proporcionar maior resistência das sementes às injúrias mecânicas, conferiu menor velocidade de hidratação das sementes (SANTOS et al., 2007).

Embora existam dados e evidências de que o teor de lignina confere alguma resistência a deterioração por umidade, ainda faltam dados mais detalhados, e metodologias as quais se assemelhem com as condições climáticas adversas que as sementes permanecem expostas em campo. Diante do contexto, estudou-se a relação entre o conteúdo de lignina do tegumento da semente de soja, com a tolerância à deterioração por umidade e com o dano mecânico.

Material e métodos

As cultivares de soja foram selecionadas a partir de dados prévios, obtidos com base em análises de rotina desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de Sementes e Grãos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja, em Londrina, PR. A partir desses dados, foram selecionados os materiais com melhor qualidade fisiológica, menor danos de percevejos, mecânico e umidade, e que apresentaram comportamento o mais distinto possível quanto ao teor de lignina no tegumento da semente, sendo selecionadas quatro cultivares, CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, com teores de lignina no tegumento, em média, de 4,19, 2,64, 2,03 e 1,69%, respectivamente.

As sementes foram multiplicadas em casa de vegetação na Embrapa Soja (Figura 1). Foram utilizados vasos com capacidade de 8L, preenchidos com substrato composto de solo:areia:composto orgânico na proporção (3:2:2). A semeadura foi efetuada em 07/10/2013, após a inoculação das sementes (*Bradyrhizobium japonicum*), em uma profundidade de 3 a 5 cm. Inicialmente foram semeadas quatro sementes por vaso, e posteriormente a emergência efetuou-se o raleio mantendo-se duas plantas por vaso. As condições ambientais da casa de vegetação (temperatura e umidade relativa do ar) foram monitoradas com equipamento HP 500 Instru Term (Tabela 1). Para cada cultivar, foi utilizado um total de 36 vasos (72 plantas). Efetuou-se a irrigação diária por meio do uso de aspersores por gotejamento. Os tratos culturais (aplicação de inseticidas e fungicidas) foram realizados conforme a necessidade.



Figura 1 – Multiplicação das cultivares CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, em vaso, na casa de vegetação, da EMBRAPA Soja, Londrina-PR. UFSM, Santa Maria, 2015.

Tabela 1 – Médias das temperaturas média, máxima e mínima, em Graus Celsius (°C), na casa de vegetação da Embrapa Soja, Londrina-PR, onde foram produzidas sementes de soja das cultivares CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184. UFSM, Santa Maria, 2015.

Período	Média	Máxima	Mínima
01 a 18/10/2013	27,2	38,12	13,1
19/10 a 01/11/2013	28,8	45,1	15,9
02 a 15/11/2013	28	42	17
16/11 a 11/12/2013	31,4	38,7	15
12/12 a 11/01/2014	29,8	39	16,8
12/01 a 20/02/2014	28,5	35,7	18,7

A colheita das sementes foi efetuada manualmente, após atingirem a maturidade. Posteriormente as mesmas foram encaminhadas ao Laboratório de Tecnologia de Sementes e Grãos da Embrapa Soja, e em seguida deixadas secar em ambiente ventilado. As amostras de cada cultivar foram debulhadas e divididas em três frações: uma fração destinada à caracterização inicial da qualidade fisiológica das sementes; uma fração para determinar a tolerância ao dano mecânico; e a outra fração, para determinar a tolerância das sementes à deterioração por umidade, conforme descrito abaixo:

Teste de germinação: oito repetições de 50 sementes, semeadas em rolos de papel umedecidos em água destilada a duas vezes a massa do papel seco e mantidos em germinador regulado à 25°C. As avaliações foram realizadas aos oito dias, após a instalação do teste, conforme recomendações das Regras para análise de sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

Teste de tetrazólio: valeu-se da metodologia publicada por Moore (1985) e descrita e aprimorada por França Neto et al. (1998), conduzida com 200 sementes por tratamento, distribuídas em quatro sub-amostras de 50 sementes, pré-condicionadas em papel umedecido, e incubadas por dezesseis horas à 25°C. Posteriormente as sementes foram acondicionadas em recipientes de vidro e imersas em solução do sal de tetrazólio (0,075%), mantidas em câmara escura à 40°C por três horas. Passado este período removeu-se a solução de tetrazólio e fez-se uma lavagem das sementes com água. Para a interpretação, logo após, cortaram-se as sementes longitudinalmente através do seu eixo embrionário, determinando-se o vigor, a viabilidade e o percentual de danos por umidade, mecânico e percevejos.

Teste de envelhecimento acelerado: constou-se de quatro repetições de 50 sementes para cada cultivar, aonde em caixas tipo *gerbox*, foram adicionados 40 mL de água e colocada uma tela de arame galvanizado, sobre a qual se distribuiu as sementes. As caixas foram fechadas com fita crepe e levadas a uma estufa incubadora por um período de 48 horas, a temperatura de 41°C, descrito em Marcos Filho (1999). Após, submeteu-se as sementes ao teste de germinação com quatro amostras de 50 sementes, realizando-se apenas uma contagem no quinto dia.

Após a avaliação da qualidade das sementes, foi determinado o teor de lignina do tegumento para confirmação da variabilidade no teor deste composto nas diferentes cultivares, o qual é descrito abaixo.

Determinação do conteúdo de lignina: utilizaram-se quatro repetições de 20 sementes de cada cultivar, as quais foram inicialmente imersas em água por 12 horas. Na sequência, o tegumento das sementes foi removido e seco em estufa a 105°C por 16 horas. A matéria seca obtida foi triturada, homogeneizada e submetida a sucessivas centrifugações (3300 rpm por quatro minutos) com diferentes soluções tampão (fosfato de sódio e potássio/ triton x-100/ NaCl 1,0 M/ acetona), para a obtenção da parede celular. Realizou-se a quantificação da lignina pelo método LTGA (ácido linotioglicólico) (CAPELETI et al., 2005).

Para testar a resistência ao dano mecânico, primeiramente uniformizou-se as sementes, as quais foram submetidas à análise visual para retirada de todas as sementes danificadas por percevejos, umidade, ou mecanicamente. Posteriormente, realizou-se um pré-condicionamento das sementes a fim de uniformizar o teor de água inicial das sementes na faixa de 13 a 14% CARBONELL (1991). Para isso, as sementes foram acondicionadas em caixas tipo *gerbox*, adicionados 40 mL de água e colocada uma tela de arame galvanizado, sobre a qual foram distribuídas as sementes, por um período de 3 horas, a temperatura de 41°C. Após cada amostra foi embalada em um saco plástico por 24 horas. Mediu-se o teor de água das sementes através de um analisador de umidade GAC 2100, AGROSYSTEM.

Teste do pêndulo: Seguindo a metodologia de CARBONELL (1991), as sementes, com teor de água entre 13 e 14%, foram distribuídas individualmente em alvéolos de um disco metálico onde ocorreu a queda livre de um pêndulo metálico de uma altura de 13 cm sobre as mesmas, o que corresponde a uma energia cinética, aplicada sobre a semente, de 0,3185 joule. Foram utilizadas 200 sementes de cada cultivar (duas subamostras de 100). Após este procedimento, para determinar a ocorrência do dano mecânico, foi realizado o teste de tetrazólio. Para determinar a tolerância das sementes à deterioração por umidade, realizou-se uma um procedimento de chuva simulada (Figura 3), por meio da utilização de aspersores,

no dia 20/02/2014 ao dia 22/02/2014. Para determinar o período em que as sementes ficaram expostas à chuva simulada, realizou-se um experimento prévio, no departamento de Fitotecnia, na safra 2012/13, e no Laboratório Didático e de Pesquisa em Sementes da Universidade Federal de Santa Maria, RS, descritos a seguir.

Determinação do período de chuva simulada: Foram utilizadas plantas de duas cultivares de soja, BMX Turbo RR e BMX Potência RR, em estágio R8 (ponto de colheita). Foram utilizadas três repetições de dez plantas, as quais foram distribuídas em vasos perfurados. Realizou-se uma simulação de chuva, por meio da utilização de aspersores, em casa de vegetação. As plantas foram submetidas à irrigação por aspersão constante, realizando-se amostragens nos períodos de 0, 20, e 40 minutos e 1, 2, 3, 4, e 5 horas. Em cada amostragem, foram coletadas três vagens por planta (30 vagens por repetição), provenientes do terço superior, médio e inferior da planta. Posteriormente, determinou-se o teor de água das sementes nos diferentes períodos: conduzido com quatro repetições, utilizando-se o método da estufa a 105°C por 24 horas, e cápsulas de alumínio nas quais foram colocadas as sementes, após pesadas, em seguida foram mantidas em estufa a 105 ±1°C, por 24 horas. Decorrido esse tempo, as cápsulas foram colocadas para esfriar em dessecador e, depois pesadas em balança analítica de precisão (0,001g). Para a determinação do teor de água das sementes utilizou-se a fórmula $U(\%) = (P_i - P_f) / (P_i - T) \times 100$, onde $U(\%)$ = grau de umidade, P_i = peso inicial das sementes, P_f = peso final das sementes e T = peso do recipiente (tara), conforme descrito nas Regras para análise de sementes – RAS (BRASIL, 2009), em delineamento inteiramente casualizado, com bifatorial (2x8), com quatro repetições. Foi realizada a análise de regressão, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2008), e o grau de regressão foi ajustado com dados transformados para atender os pressupostos. Adotou-se o período de 4 horas de chuva, pois de 4 até as 5 horas o teor de água das sementes permaneceu em torno de 20% (Figura 2).

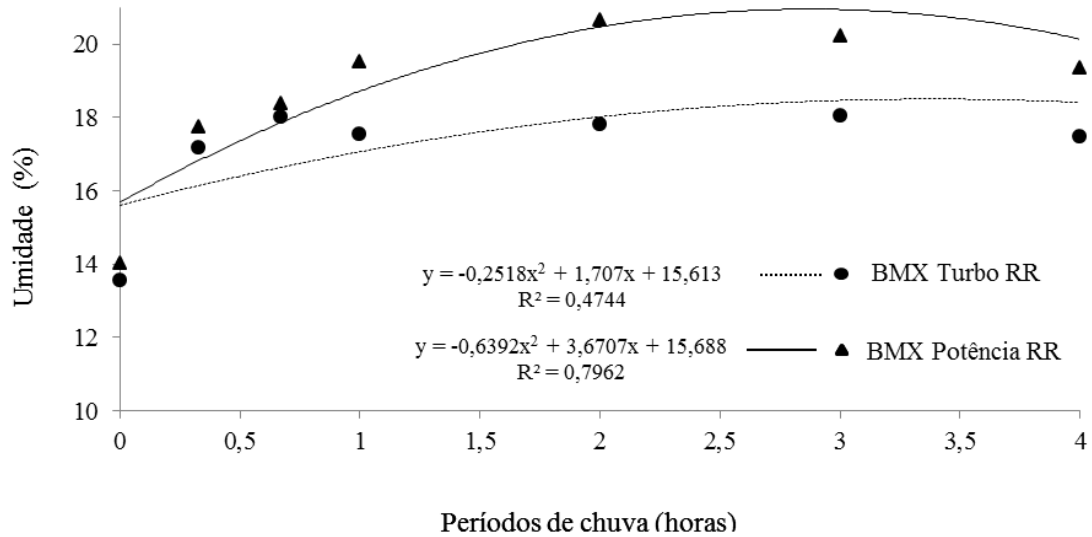


Figura 2 – Média do teor de umidade das cultivares BMX Potência RR e BMX Turbo RR, nos diferentes períodos de chuva, 0, 20, e 40 minutos e 1, 2, 3, 4, e 5 horas, para determinação do período de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.

Indução do estresse de deterioração por umidade: O experimento foi conduzido com vagens de quatro cultivares de soja, CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, em estádio R8 (ponto de colheita). Para cada cultivar foram utilizadas quatro repetições de 140 vagens em estádio R8, as quais foram distribuídas em peneiras, e distribuídas uniformemente sobre 11 aspersores, em uma casa de vegetação, de modo que todas as peneiras recebessem a irrigação. As vagens foram submetidas à irrigação por aspersão constante, pelo período de 4 horas. A temperatura e umidade relativa do ar foram monitorados com um Data Logger (Anexo C), e a quantidade de chuva medida através de um pluviômetro. Após, as vagens foram secas em estufa com circulação de ar à 35°C por 37 horas. Esse ciclo de chuva e secagem foi repetido novamente, totalizando dois ciclos de umedecimento e secagem.



Figura 3 – Simulação de chuva, com a utilização de aspersores, sobre as vagens das cultivares de soja CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, em casa de vegetação da EMBRAPA Soja, Londrina-PR. UFSM, Santa Maria, 2015.

Após os dois sucessivos ciclos de hidratação e desidratação, a amostra foi separada em três frações e debulhada manualmente.

A primeira fração de sementes foi destinada ao teste de tetrazólio, caracterizar a ocorrência de danos por umidade por meio do teste de tetrazólio, e a segunda fração foi submetida ao teste de germinação, ambos descritos acima, e realizados no laboratório didático e de pesquisa em sementes da Universidade Federal de Santa Maria, RS (UFSM). A terceira fração de sementes foi designada a caracterização bioquímica, executado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, departamento da Biologia, na UFSM, a fim de associar a deterioração por umidade com a ocorrência de estresse oxidativo nas sementes. Essas avaliações foram realizadas em sementes e também, plântulas, nos tratamentos controle e que sofreram estresse por deterioração por umidade.

A caracterização bioquímica foi determinada através das atividades de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica descrito a seguir:

Enzima guaiacol peroxidase (POD): Uma amostra das sementes foi homogeneizada em 3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 x g por 20 minutos à 4°C e o sobrenadante usado para a determinação da POD. A atividade da POD foi determinada pela absorbância da solução de reação a 560 nm, segundo Zeraik et al. (2008). Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína ($U\ mg^{-1}$ proteína).

Enzima superóxido dismutase (SOD): cerca de 0,5 g de sementes de soja foram homogeneizadas em 1,2 mL de tampão contendo TFNa (50 mM) (pH 7,8), EDTA (1 mM) e PVP (2%) (w/v). Os tubos foram agitados durante 20 segundos e, depois, centrifugados a 13000 g durante 20 min à 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. A mistura de ensaio consistiu de um volume total de 2 mL, contendo tampão glicina (pH 10,5), 17 μ L de epinefrina (60 mM) e material enzimático. O intervalo de tempo para formação do adrenocromo, de 10 segundos entre as leituras até 2 min foi espectrofotometricamente registrado em 480 nm (MC CORD; FRIDOVICH, 1969). Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína ($U\ mg^{-1}$ proteína).

Peroxidação de lipídios de membrana (TBARS): estimado seguindo o método de El-Moshaty et al. (1993), adaptado para sementes. Amostras das sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 20 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 6,5) contendo 0,5% de Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado por 15 min a 20.000 x g. Um mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de TCA 20% (w/v) contendo 0,5% (w/v) de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi aquecida a 95°C por 40 min e então resfriada por 15 min, sendo centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532 e 600 nm (para corrigir a turbidez não específica). A peroxidação lipídica foi expressa como nmol MDA mg^{-1} de proteína.

As plântulas também foram destinadas a caracterização bioquímica, após o teste de germinação, a fim de associar a deterioração por umidade com a ocorrência de estresse oxidativo nas plântulas. As plântulas foram separadas em parte aérea e raiz, e quantificadas as atividades de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica descrito a seguir.

Peroxidação lipídica (TBARS): O nível de peroxidação lipídica foi realizado através da medição da acumulação de malondialdeído (MDA), de acordo com El-Moshaty et al. (1993). O conteúdo de MDA foi determinado pela reação de TBA. Resumidamente, as amostras (0,1g) foram homogeneizadas com 1,5 mL de 0,2 M de tampão citrato-fosfato (pH 6,5) contendo 0,5% de Triton X-100. A mistura foi centrifugada a 20.000 g durante 15 min. Um mL da fração de sobrenadante foi adicionada a um volume igual de TCA a 20% contendo

0,5% (w / v) de TBA. Os tubos foram agitados durante 20 segundos, colocados em banho de água à 95°C durante 40min, e em seguida, imediatamente arrefecida em gelo durante 15 min. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 15 min. A absorvância do sobrenadante foi medida com um feixe duplo espectrofotômetro e este valor subtraído da absorvância inespecífica de leitura. As concentrações para as amostras de MDA foram calculadas e os valores foram expressos em nmol de MDA mg⁻¹ proteína.

Enzima Superóxido Dismutase (SOD): A atividade da SOD foi realizada de acordo com Mc Cord; Fridovich (1969). Cerca de 0,06 g de raiz e parte aérea de plântulas de soja foram homogeneizadas em 1,2 mL de tampão contendo TFNa (50 mM) (pH 7,8), EDTA (1 mM) e PVP (2%) (w/v). Os tubos foram agitados durante 20 segundos e, depois, centrifugados a 13000 g durante 20 min à 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. A mistura de ensaio consistiu de um volume total de 1 mL, contendo tampão glicina (pH 10,5), 17 uL de epinefrina (60 mM) e de material de enzima. O intervalo de tempo para formação do adrenocromo, de 10 segundos entre as leituras até 2 min foi espectrofotometricamente registrado em 480 nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg⁻¹ proteína).

Enzima Guaiacol Peroxidase (POD): Para a estimativa da POD, a parte aérea e as raízes das plântulas foram homogeneizadas em um meio constituído por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM e DTT 1 mM. Para a medição da atividade, utilizou-se uma solução (3 mL) contendo: tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 20 mM de guaiacol, 40 mM de H₂O₂ e 0,1 mL de material de enzima. A reação foi iniciada pela adição do material de enzima. O aumento na absorvância da solução de reação a 470 nm foi registrado após 20 segundos (ZERAİK et al., 2008). Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg⁻¹ proteína).

Todos os testes de laboratório foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para realização da análise estatística de todos os testes, foi verificado o atendimento aos pressupostos do modelo matemático utilizando o aplicativo Action, através dos testes de normalidade dos erros (Shapiro Wilks) e de homogeneidade das variâncias (Bartlett). As avaliações foram realizadas no delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial: chuva simulada x cultivares (2x4), com quatro repetições. As variáveis foram submetidas à análise de variância em 5% de probabilidade de erro. Os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, através do software Sisvar (FERREIRA, 2008). A apresentação dos resultados para variáveis transformadas foram realizadas com os valores originais.

Resultados e Discussão

A Tabela 2 refere-se à caracterização inicial dos lotes de sementes. O teor de lignina no tegumento das sementes mostrou-se distinto entre as cultivares, sendo a cultivar CD 208 com o maior teor, 4,19%, CD 215 e CD 202, com médio teor, 2,64% e 2,03%, respectivamente, e o mais baixo foi da BRS 184, com 1,69%.

Houve diferença significativa para a variável dano por umidade (DU), e para germinação (G) e envelhecimento acelerado (E) não houve diferenças significativas entre as cultivares. A qualidade fisiológica de todas as cultivares apresentou-se elevada, com G acima de 96% e plântulas normais acima de 88% no E, demonstrando serem lotes de elevada qualidade fisiológica, além das cultivares apresentarem 0% de dano mecânico (Tabela 2).

Mesmo os materiais tendo sido produzidos em casa de vegetação o intervalo entre a temperatura máxima e mínima foi alto (Tabela 1), o que pode ter contribuído para a ocorrência dos danos por umidade. Dessa forma as sementes com maior conteúdo de lignina no tegumento, CD 208 e CD 215, apresentaram níveis de dano por umidade significativamente mais baixa, comparando as sementes das cultivares CD 202 e BRS 184, com teor de lignina no tegumento menor (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização inicial através das médias do teor de lignina no tegumento (LG%), de germinação (G %), envelhecimento acelerado (E %), dano de umidade (DU%) e dano mecânico (DM%), para sementes de quatro cultivares de soja. UFSM, Santa Maria, 2015.

Cultivar	LG	G	E	DU	DM
CD 208	4,19	98 a	92 a	5 b	0 a
CD 215	2,64	99 a	97 a	7 b	0 a
CD 202	2,03	97 a	89 a	29 a	0 a
BRS 184	1,69	98 a	93 a	24 a	0 a
Média	2,63	98	93	16,13	0
CV%		7,98	7,81	25,18	

*Médias não seguidas da mesma letra na coluna diferem pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

Na análise de variância da variável germinação (G) (Anexo A), observou-se interação significativa entre cultivar e chuva simulada, assim como para o efeito somente da cultivar e da chuva.

No tratamento em que se aplicou o estresse de deterioração por umidade, as cultivares com maior teor de lignina, CD 208 e CD 215, apresentaram maior número de plântulas normais na G, diferindo significativamente das cultivares CD 202 e BRS 184, sendo que estas últimas apresentaram uma redução significativa na G, e a CD 202 obteve uma redução maior de plântulas normais, de 20% (Tabela 3).

Estes resultados de G estão de acordo com Obando Flor et al. (2004), em que no teste de germinação, de três cultivares (FT-2, FT-10 e IAC-2), as duas de maior teor de lignina (FT-2 e FT-10) no tegumento, respectivamente 6,19% e 5,28%, apresentaram potencial fisiológico superior. Pode-se observar que as cultivares utilizadas no presente trabalho possuem um teor de lignina abaixo de 5%, demonstrando que ainda um teor em torno de 4 a 3% de lignina no tegumento pode conferir uma melhor qualidade fisiológica de semente, comparada com teores de 2% ou menos.

Menezes et al. (2009) encontraram correlação negativa entre velocidade de germinação e teor de lignina, ou seja, quanto maior o teor de lignina, menor o tempo para a germinação, utilizando cultivares com teores de 3 a 5% de lignina no tegumento da semente, o qual justificam pela reparação mais rápida dos sistemas de membranas das sementes menos deterioradas (com maior teor de lignina) propiciaria uma emergência mais rápida das plântulas. Porém, Carvalho et al. (2014), também utilizando cultivares com teores entre 3 e 5% de lignina no tegumento da semente, encontraram resultados de vigor independente do teor de lignina no tegumento das sementes de soja, onde sementes de cultivares de soja com maiores teores de lignina no tegumento não apresentam necessariamente melhor qualidade fisiológica.

Tabela 3 – Germinação (G %) e dano por umidade (DU %) em sementes de quatro cultivares de soja, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU obtido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.

Cultivar	G		DU	
	T	EDU	T	EDU
CD 208	98 a A	97 a A	5 b B	26 a C
CD 215	99 a A	97 a A	7 b B	36 a C
CD 202	97 a A	77 b C	29 b A	69 a A
BRS 184	98 a A	85 b B	24 b A	50 a B
Média	98 a	89 b	16 b	45 a
CV %	7,98		25,18	

* médias não seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. * T: sem estresse de deterioração por umidade (testemunha); *EDU: com estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva.

A variável dano de umidade (DU) não apresentou interação entre cultivar e chuva simulada, mas foi significativo o efeito de ambos os fatores de forma isolada (Anexo D), ou seja, o efeito DU nas cultivares é independente do tratamento, com ou sem estresse de

deterioração por umidade. Todas as cultivares tiveram um aumento no teor de dano de umidade quando foram submetidas ao tratamento com chuva simulada (Tabela 3). Apesar da análise de variância não mostrar interação significativa, o Teste Scott-Knott formou grupos de cultivares diferentes quando na presença ou ausência de deterioração por umidade para a variável DU, sendo que a cultivar CD 208 obteve um menor aumento em percentagem de DU, 21%, e o maior aumento significativo foi na CD 202, 40%.

Esses resultados mostram que a cultivar com maior teor de lignina (CD 208) sofreu um teor menor de DU com o tratamento estresse de deterioração por umidade, em comparação as cultivares com menor teor de lignina no tegumento. Este resultado indica menor permeabilidade do tegumento para a cultivar com maior teor de lignina, ou ainda, pode estar relacionado com a espessura do parênquima lacunoso, o qual não foi determinado neste trabalho, pois essa cultivar já partiu de um dano menor de umidade. Além das cultivares CD 202 e BRS 184, com menor teor de lignina no tegumento da semente, terem partido de um DU maior em comparação as cultivares CD 208 e CD 215.

Esses resultados (Tabela 3) corroboram com Santos et al. (2007), os quais encontraram resultados positivos quanto ao teor de lignina em soja, em que as cultivares com cor marrom do tegumento apresentaram teor maior de lignina e essa característica afetou positivamente a qualidade fisiológica destas, e conferiu menor velocidade de hidratação das sementes.

Também, os resultados de maior dano por umidade demonstram que a metodologia utilizada nesse trabalho, com a indução da deterioração por umidade por meio de chuva simulada, conseguiu reproduzir uma situação semelhante com os danos por umidade que ocorrem no campo. Assim concordando com França Neto et al. (2000; 2007), os quais citam que a deterioração por umidade resulta da exposição das sementes de soja a ciclos alternados de elevada e baixa umidade antes da colheita, devido à ocorrência de chuvas, ou às flutuações diárias de umidade relativa do ar. As sucessivas expansões e contrações do volume das sementes ocasionam a formação de rugas no tegumento, na região oposta ao hilo, como pode-se observar na figura 4. Ocorre o cansaço físico dos tecidos, que pode resultar em ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, o qual caracteriza o dano por umidade identificado no teste de tetrazólio.

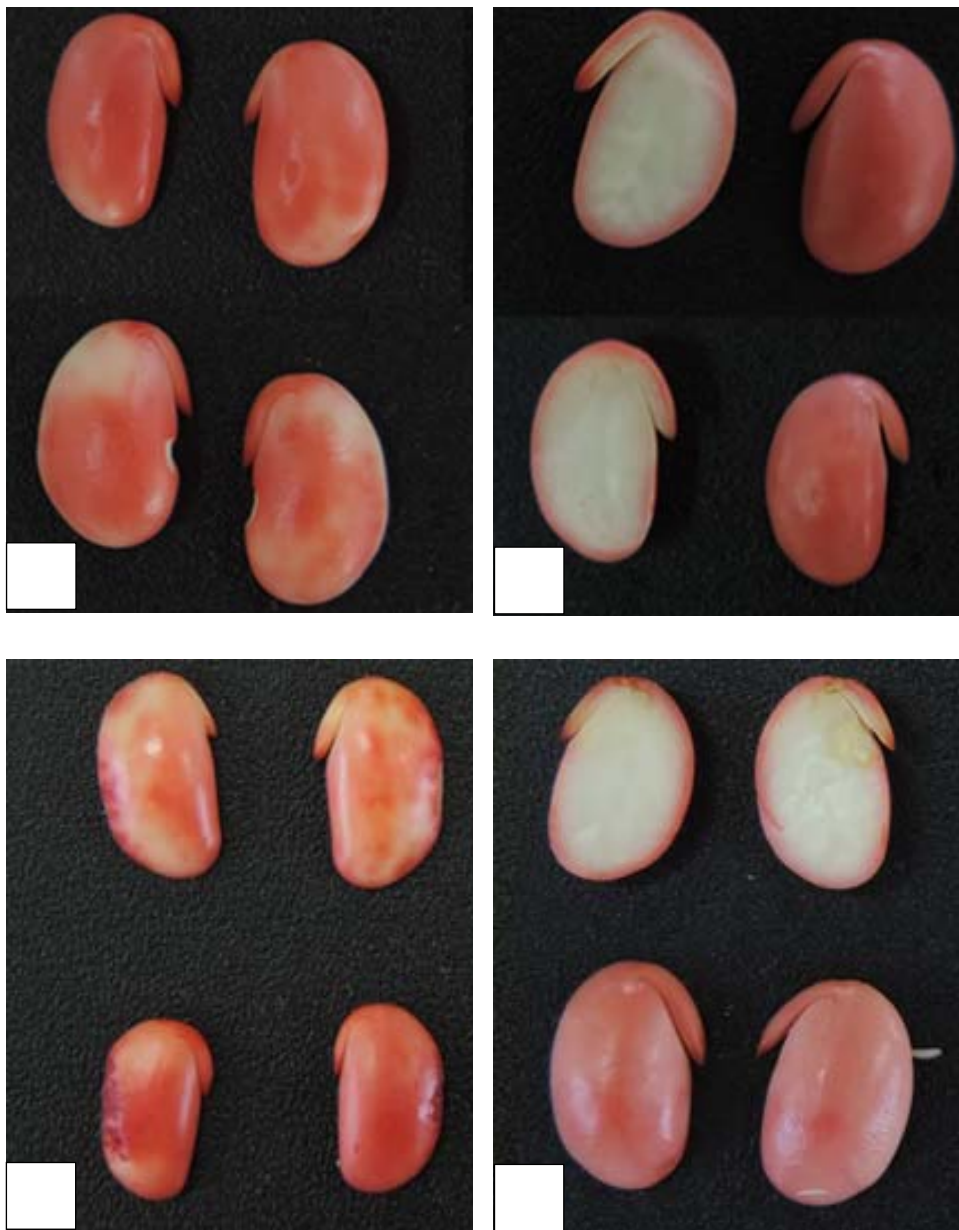


Figura 4 – Danos de umidade visualizados através do teste de tetrazólio nas sementes de soja das cultivares CD 208 e CD 202. UFSM, Santa Maria, 2015.

A=tratamento com estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva na CD 208; B= testemunha da CD 208; C= tratamento com estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva na CD 202; D= testemunha da CD 202.

A maioria dos trabalhos citados utilizou a embebição das sementes direta em água, o que não ocorreu na metodologia desse estudo, a qual foi simulada a chuva na vagem de soja e após uma secagem, para criar uma situação mais próxima da realidade em campo. Por isso, o fator que não foi mencionado é quanto ao legume da soja, o qual não foi determinado os

compostos do mesmo neste trabalho, mas que, possivelmente, é um importante aliado da semente, na manutenção da qualidade fisiológica, atuando como regulador da absorção de água, principalmente durante o processo final de maturação.

De acordo com os resultados acima, esse trabalho demonstrou que existe a relação dano de deterioração por umidade e lignina. Assim, pesquisas futuras utilizando um maior número de cultivares com grande variabilidade para o teor de lignina no tegumento e a avaliação do legume da soja e de outras características morfológicas da semente, poderão auxiliar para validar mais ainda a metodologia proposta neste estudo.

Nas sementes submetidas ao dano mecânico, a análise de variância foi significativa para o efeito de classe e para interação entre cultivar e classe, na variável dano mecânico (DM) (avaliado através das classes, ou condição, de cada semente individualmente pelo teste de tetrazólio) (Anexo E), demonstrando que as classes em que foram enquadradas as sementes com dano mecânico comportam-se de maneira distinta em cada cultivar. É observado maior vigor, com diferença significativa, na cultivar com maior teor de lignina, CD 208. Apesar da análise de variância não apresentar o efeito de cultivar significativo (Anexo E), o Teste Scott-Knott formou grupos de cultivares diferentes para a variável DM (Tabela 4).

Pode-se observar que na classe 4 a cultivar CD 208, com maior teor de lignina no tegumento, apresentou um menor número significativo de sementes com DM, em comparação as demais cultivares testadas, que se enquadram em sementes de vigor baixo, com DM na região vascular dos cotilédones da semente afetando a face interna e parte da região vascular, mas ainda são sementes viáveis. Também a mesma cultivar diferiu significativamente em maior número de sementes com DM na classe 2, que se enquadra em sementes de alto vigor, demonstrando pequenos DM sobre a superfície externa dos cotilédones e com uma profundidade máxima de 0,5 mm. A figura 5 mostra algumas sementes com danos mecânicos simulado com o teste do pêndulo, na cultivar CD 208.

Com base nesses resultados, podemos observar que a cultivar CD 208, com 4,19% de teor de lignina no tegumento da semente, conferiu resistência ao dano mecânico, comparada com as demais que possuem teores de lignina menores, e que estas cultivares não proporcionaram tolerância significativa a este dano, porém sua viabilidade (classes 1 a 5) e vigor (classes 1 a 3) permaneceram altos.

Tabela 4 – Média da porcentagem de dano mecânico (DM%), média e coeficiente de variação (CV%) nas classes de avaliação do teste de tetrazólio, em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes de teor de lignina no tegumento, submetidas ao teste do pêndulo. UFSM, Santa Maria, 2015.

Classe	Cultivar			
	CD208	CD215	CD202	BRS184
1	9 a C	6 a C	3 a C	5 a C
2	16 a B	2 b C	0 b C	5 b C
3	62 a A	63 a A	56 b A	63 a A
4	11 c C	29 a B	32 a B	22 b B
5	1 a D	1 a C	8 a C	5 a C
6	0 a D	0 a C	0 a C	0 a C
7	1 a D	1 a C	2 a C	2 a C
8	0 a D	0 a C	0 a C	0 a C
Média	12,5 a	12,5 a	12,44 a	12,56 a
CV (%)	33,61			

* médias não seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

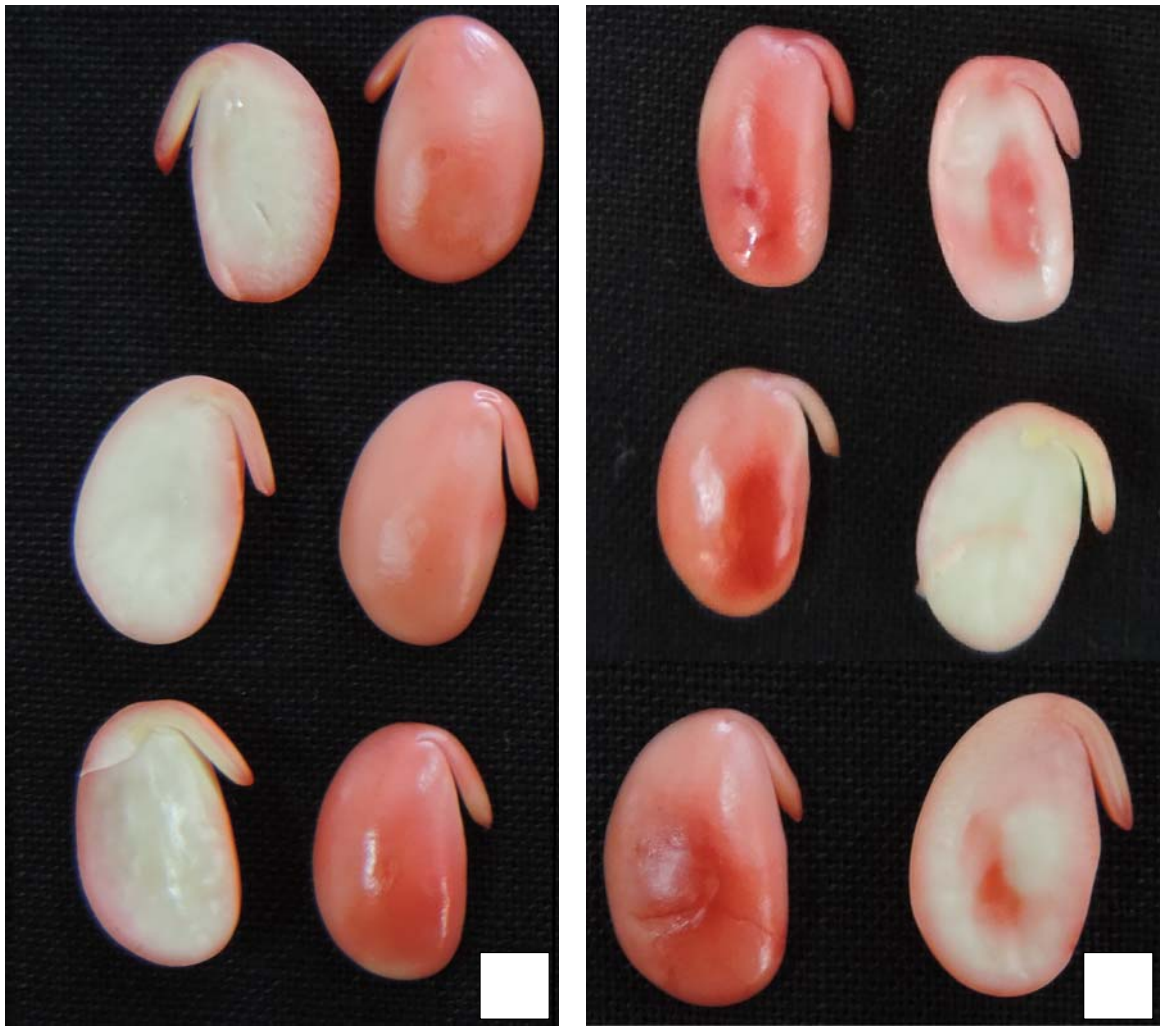


Figura 5 – Análise dos danos mecânicos visualizados através do teste de tetrazólio nas sementes da cultivar CD 208. UFSM, Santa Maria, 2015.

A= sementes sem dano mecânico internamente e externamente, enquadrando-se na classe 1; B= danos mecânicos internamente e externamente, enquadrando-se na classe 3 e 4.

Estes resultados concordam, em parte, com Alvarez et al. (1997), em que as sementes das cultivares de soja com teor de lignina no tegumento acima de 5,0% foram menos propensas a danos mecânicos. Já Andrade (2012), encontrou maior resistência ao dano mecânico na linhagem UnB 1125 com 17% de lignina em relação aos genótipos Conquista (3,76%) e P98Y51 (6,25%), sendo o dano avaliado visualmente e através do teste do hipoclorito de sódio. Porém, os trabalhos citados acima utilizaram um método diferente do usado no presente trabalho, para determinar o teor de lignina no tegumento da semente de soja, o que pode superestimar esse teor, dependendo do método utilizado, visto que o teor de

lignina encontrado por Andrade (2012) na cultivar UnB 1125 foi elevado, além de que as cultivares utilizadas não são materiais comerciais atuais.

Também, Obano-Flor et al. (2004), através do teste do pêndulo, encontraram maior tolerância ao dano mecânico nas cultivares de soja com teores de lignina de 6,19% e 5,28% em relação à 4,21%, analisado através do teste de raio X.

O método de avaliação do dano mecânico dos trabalhos citados acima não foi o teste de tetrazólio, e sim, o método de raio X e hipoclorito de sódio, o qual pode justificar a diferença não tão sinuosa encontrada de dano mecânico entre as cultivares no presente trabalho.

Em relação aos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nas plântulas, houve interação cultivar e chuva significativa para todas as variáveis avaliadas (Anexos F, G e H), exceto para as variáveis das raízes das plântulas (Anexos I, J e K), o que significa que a resposta das enzimas ao estresse ocasionado pela simulação de deterioração por umidade variou com as cultivares com diferentes teores de lignina apenas para a parte aérea das plântulas.

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea das plântulas da cultivar CD 208 não diferiu significativamente entre os tratamentos (Anexo F). Já para as demais cultivares, com menor teor de lignina no tegumento, a atividade da POD apresentou-se significativamente maior comparada com a testemunha, e, comparando as cultivares no mesmo tratamento, demonstraram o mesmo comportamento sem ou com estresse de deterioração por umidade, possuindo maior atividade da enzima na cultivar de menor teor de lignina e menor atividade na cultivar de maior teor (Tabela 5). De acordo com Karuppanapandian et al. (2011), a atividade da POD varia consideravelmente dependendo da espécie da planta e do tipo de estresse, e essa enzima possui ainda grande importância na biossíntese de lignina e na defesa contra estresses consumindo o peróxido de hidrogênio (BOGUSZEWSKA; ZAGDAŃSKA, 2012). A maior atividade da POD na parte aérea das cultivares com menor teor de lignina no tratamento com estresse de deterioração por umidade indica a ocorrência de estresse oxidativo nesses órgãos, o qual ocasionou a geração de grande quantidade de peróxido de hidrogênio e consequentemente ativação dessa enzima. Esses dados de estresse oxidativo corroboram com os dados de germinação e dano por umidade (Tabela 3) nas cultivares com menor teor de lignina.

O efeito do estresse de deterioração por umidade não foi significativo para a atividade da superóxido dismutase (SOD) na parte aérea das plântulas (Anexo G), porém diferiu significativamente para o efeito de cultivar. A cultivar BRS 184, de menor teor de lignina,

apresentou uma atividade da SOD menor no tratamento de estresse de deterioração por umidade. Já para a peroxidação lipídica (TBARS) da parte aérea das plântulas o efeito de cultivar não foi significativo (Anexo H), ou seja, as cultivares não apresentaram diferença significativa entre si no mesmo tratamento, mas foi significativo o efeito do estresse de deterioração por umidade, sendo a menor peroxidação lipídica nesse tratamento com estresse, comparada com a testemunha, para todas as cultivares.

Tabela 5 – Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) ($U\ mg^{-1}$ proteína) e da superóxido dismutase (SOD) ($U\ mg^{-1}$ proteína), e peroxidação lipídica (TBARS $nmol\ MDA\ mg^{-1}$ proteína) na parte aérea e em raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores discrepantes do teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.

Cultivar	-----Parte aérea-----					
	POD		SOD		TBARS	
	T	EDU	T	EDU	T	EDU
CD208	0,42 a D	0,52 a D	0,71 a A	0,73 a B	0,83 a A	0,26 b A
CD215	0,52 b C	0,93 a C	0,77 a A	0,82 a A	0,76 a A	0,28 b A
CD202	1,06 b B	2,09 a B	0,73 a A	0,71 a B	0,65 a A	0,42 b A
BRS184	1,68 b A	3,40 a A	0,66 a B	0,57 b C	0,77 a A	0,40 b A
Média	0,92 b	1,74 a	0,72 a	0,71 a	0,75 a	0,34 b
CV %	17,62		6,83		29,65	
Cultivar	-----Raiz-----					
CD208	0,66 b D	1,06 a D	0,53 a A	0,23 b B	2,43 a A	1,67 b A
CD215	1,58 b C	1,85 a C	0,56 a A	0,32 b B	2,79 a A	1,99 b A
CD202	2,25 b B	4,47 a B	0,61 a A	0,52 a A	2,54 a A	2,06 b A
BRS184	3,27 b A	5,86 a A	0,56 a A	0,45 b A	2,05 a B	1,70 a A
Média	1,94 a	3,31 b	0,57 a	0,38 b	2,45 a	1,85 b
CV %	21,81		14,79		18,13	

* médias não seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. * T: sem estresse de deterioração por umidade (testemunha); *EDU: com estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva.

Nas raízes, o efeito de cultivar e da chuva foi significativo para todas as variáveis testadas do estresse oxidativo, TBARS, POD e SOD (Anexos K, I e J). Para a POD, houve um aumento significativo da atividade dessa enzima nas raízes para todas as cultivares no tratamento de estresse de deterioração por umidade, indicando que esse tratamento gera estresse oxidativo, sendo que as cultivares com maior teor de lignina no tegumento apresentaram menor atividade desta enzima em relação as cultivares com menor teor, ou seja, quanto maior o teor de lignina, menor o estresse oxidativo gerado e menor a atividade dessa enzima, além de que indica que um sistema de defesa enzimático eficiente está trabalhando nas células da raiz. Já a atividade da SOD e a peroxidação lipídica (TBARS) foram menores significativamente com o tratamento de simulação de deterioração por umidade, comparado com a testemunha (Tabela 5). Isso indica que a deterioração por umidade de alguma forma está inibindo a enzima SOD, e que os danos oxidativos que ocasionaram menor número de plântulas normais na germinação (Tabela 3) podem estar ocorrendo em outros constituintes celulares, como proteínas de membrana e DNA.

Os resultados de estresse oxidativo medido através da parte aérea e raiz das plântulas (Tabela 5) demonstraram maior atividade da enzima POD quando as sementes foram submetidas ao tratamento de estresse de deterioração por umidade. A menor atividade desta enzima foi na cultivar com maior teor de lignina no tegumento. Já a peroxidação lipídica e a atividade da SOD diminuíram na raiz das plântulas quando as sementes foram submetidas à deterioração por umidade e a peroxidação lipídica apresentou atividade menor na parte aérea neste tratamento também, sugerindo então que a POD apresentou algum papel na proteção oxidativa. Esses resultados concordam com Maia et al. (2012), em que estudaram o estresse salino em feijão Caupi, e este reduziu a atividade da enzima SOD e a peroxidação lipídica, e causou aumento da atividade de POD nas raízes, juntamente com a redução no alongamento das raízes.

Também, Ribeiro et al. (2012), testando a tolerância ao alumínio em duas cultivares de arroz, encontrou redução dos níveis de peroxidação lipídica nas raízes e aumento da atividade de POX (Peroxidases) após o tratamento com alumínio.

Com o aumento do estresse, a formação de EROs é intensificada e sua eliminação deve ocorrer de forma constante para evitar o estresse oxidativo. Desta forma, a ação sincronizada das enzimas responsáveis pela remoção das EROs confere maior tolerância as plantas sob condições de estresse. A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apresentando atividade superior quando sob estresse, caracterizando uma

eficiente detoxificação das EROs (GRATÃO et al., 2005). Porém, a atividade da SOD nas plântulas dos genótipos de soja testados não apresentaram este comportamento. No entanto, a atividade da POD indica que um sistema de defesa enzimático eficiente trabalhou nas células tanto da parte aérea como nas raízes.

Considerando que a peroxidação lipídica (TBARS) tem sido usada como indicador de danos oxidativos em lipídios de membrana (BANDEOGLU et al., 2004; DIONISIO-SESE; TOBITA, 1998; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002), é possível que o estresse simulado com a chuva e a secagem não tenha acarretado peroxidação lipídica nas plântulas de soja, ou que esses danos não sejam em lipídios de membrana, e sim em outras partes da célula, como proteínas e DNA, ou ainda que a maior atividade da enzima POD tenha acarretado na quebra do H_2O_2 em H_2O e O_2 evitando a ocorrência da peroxidação lipídica. Além disso, durante a peroxidação lipídica, produtos são formados a partir de precursores poliinsaturados que incluem pequenos fragmentos hidrocarbonados tais como cetonas, malondialdeído (MDA), entre outros, e compostos relacionados a eles (GILL; TUTEJA, 2010). A técnica utilizada nesse trabalho determina somente a presença de malondialdeído, um dos produtos da peroxidação lipídica. Portanto, a peroxidação lipídica pode estar acontecendo nesses tratamentos, mas com a produção de outros hidroperóxidos lipídicos, os quais não foram determinados pela técnica do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

A remoção do H_2O_2 pela POD pode ter funcionado como estratégia para evitar o estresse oxidativo secundário, restringindo o crescimento celular como consequência. Porém, no presente trabalho não foi determinado a medida de crescimento das raízes e parte aérea, que pode estar relacionado à maior ou menor atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Estas enzimas podem restringir o crescimento celular por meio do espessamento da parede celular em decorrência da eliminação do H_2O_2 associada à polimerização dos precursores da lignina (PASSARDI et al., 2004). Como consequência, as peroxidases de fenóis (guaiacol peroxidase) de parede celular podem estar envolvidas na regulação do crescimento celular envolvendo o metabolismo do H_2O_2 . Assim sendo, as cultivares de soja testadas podem apresentar mecanismos eficientes para a renovação dos lipídios de membrana afetados e/ou para a remoção das EROs produzidas.

Na Tabela 6, os resultados dos parâmetros do estresse oxidativo determinado nas sementes apresentaram resultados diferentes das plântulas, indicando que os eventos bioquímicos são diferenciados entre sementes e plântula. A POD apresentou todos os efeitos significativos, inclusive interação cultivar e estresse de deterioração por umidade (Anexo M). A atividade da enzima POD diminuiu para a cultivar CD 208, de maior teor de lignina no

tegumento, enquanto as demais apresentaram uma maior atividade dessa enzima, quando submetidas à deterioração por umidade. Porém as sementes da CD 208 partiram, sem estresse de deterioração por umidade, de uma atividade maior da POD em comparação as demais cultivares. A cultivar que apresentou um maior aumento na atividade da POD após o estresse da deterioração por umidade foi a BRS 184, com menor teor de lignina.

Tabela 6 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) ($U\ mg^{-1}$ proteína) e da superóxido dismutase (SOD) ($U\ mg^{-1}$ proteína), e peroxidação lipídica (TBARS $nmol\ MDA\ mg^{-1}$ proteína) nas sementes de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes de teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.

Cultivar	POD		SOD		TBARS	
	T	EDU	T	EDU	T	EDU
CD 208	0,30 a A	0,24 b A	5,68 a A	4,66 b B	0,15 a A	0,15 a A
CD 215	0,17 b B	0,21 a B	4,75 b B	5,20 a A	0,16 a A	0,22 a A
CD 202	0,004 b C	0,08 a D	3,54 b C	4,70 a B	0,15 a A	0,20 a A
BRS 184	0,008 b C	0,10 a C	4,65 a B	4,65 a B	0,13 b A	0,27 a A
Média	0,12 b	0,16 a	4,65 a	4,80 a	0,15 b	0,21 a
CV %	5,98		5,41		33,47	

* médias não seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. * T: sem estresse de deterioração por umidade (testemunha); *EDU: com estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva.

A análise de variância da enzima SOD nas sementes (Anexo L) demonstrou significância para o efeito cultivar e para interação cultivar e estresse de deterioração por umidade, e, não foi significativo o efeito da deterioração por umidade. Novamente a cultivar CD 208 apresentou uma diminuição na atividade da enzima SOD quando submetida ao estresse da deterioração por umidade, e as cultivares CD 215 e CD 202, com teores médios de lignina, tiveram um aumento significativo neste tratamento, comparado com a testemunha. A cultivar de soja com menor teor de lignina, BRS 184, não diferiu entre os tratamentos. Senaratna et al. (1986), trabalhando com eixos embrionários de soja, afirmaram que a SOD é

o mais notável exemplo de neutralizador de radicais livres, pois é efetiva ao menor sinal de dano. Já Rosa et al. (2005), trabalhando com tolerância de sementes de milho ao estresse de altas temperaturas de secagem, não observaram diferença na atividade da SOD.

Comparando a atividade da enzima SOD nas plântulas de soja e nas sementes, podemos ver que a atividade desta aumentou nas sementes, o que concorda com Silva (2006), onde concluiu que a SOD é ativa durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja.

A variável TBARS nas sementes apresentou na análise de variância (Anexo N) efeito significativo apenas para o tratamento de estresse de deterioração por umidade, ou seja, somente com ou sem deterioração por umidade apresentou diferença nas cultivares, sem influencia dos diferentes teores de lignina das mesmas. Apenas as sementes da BRS 184, com menor teor de lignina, apresentaram diferença significativa, com um aumento na peroxidação lipídica quando submetidas ao estresse de deterioração por umidade (Tabela 6). A desestruturação de membranas sempre foi considerada como o primeiro evento degenerativo de sementes, porém, atualmente, é aceita a ideia de que danos moleculares e bioquímicos ocorram antes dos danos de membrana, sendo as avaliações de atividade enzimáticas um dos mais sensíveis.

A cadeia respiratória mitocondrial é uma das principais fontes de EROs. A fuga de elétrons da cadeia de transporte gera superóxido, e, subsequentemente, o H_2O_2 , por dismutação (MOLLER, 2001). Em condições normais, cerca de 2-3% do oxigênio utilizado pela mitocôndria pode ser convertido em superóxido e H_2O_2 (CHANCE et al., 1973; PUNTARULO et al., 1988). A quantidade de H_2O_2 produzido é diretamente proporcional à atividade respiratória (STANIEK; NOHL, 2000). Assim, as sementes ortodoxas, tem respiração intensa durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, mas diminui fortemente durante a fase de dessecação na planta mãe e torna-se nulo quando as sementes estão dormentes (BEWLEY; BLACK, 1994). Estima-se que a respiração mitocondrial cessa no conteúdo de água inferior a 0,25 g de peso seco (VERTUCCI; FARRANT, 1995). Como a germinação está associada com um aumento acentuado na atividade respiratória e produção de EROs, as sementes necessitam de um controle apertado por mecanismos antioxidantes para que não ocorra a peroxidação lipídica, como foi demonstrado nos tratamentos testados neste trabalho, onde a atividade das enzimas POD e SOD nas sementes de soja foram maiores quando submetidas ao tratamento com simulação de chuva e secagem das sementes. E as sementes da cultivar com maior teor de lignina no tegumento apresentou uma menor atividade das enzimas POD e SOD em relação as cultivares com menor teor (Tabela 6), ou seja, quanto maior o teor de lignina, menor o estresse oxidativo

gerado e menor a atividade dessa enzima, concordando com Bailly (2004), o qual diz que outros mecanismos de proteção não devem ser descartados, e as enzimas antioxidantes devem ser consideradas como uma parte de um arsenal mais amplo contra o estresse da perda de água.

Conclusão

O método utilizado para simular a ocorrência do estresse de deterioração por umidade foi eficiente na estratificação das cultivares quanto a tolerância a deterioração.

Sementes de cultivares de soja com maior teor de lignina no tegumento são menos suscetíveis ao dano por umidade ocasionado pelo estresse de deterioração por umidade e ao dano mecânico simulado pelo teste do pêndulo.

A atividade da enzima POD foi um indicativo eficiente da ocorrência do estresse oxidativo em sementes e plântulas, submetidas ao estresse de deterioração por umidade.

As cultivares com menor teor de lignina demonstraram estresse oxidativo na parte aérea e raízes das plântulas, demonstrado através da maior demanda da enzima POD.

As sementes da cultivar com maior teor de lignina, CD 208, apresentaram menor estresse oxidativo quando submetidas a deterioração por umidade, devido a menor demanda da atividade das enzimas POD e SOD, e por não apresentar peroxidação lipídica.

Trabalhos posteriores utilizando um número maior de cultivares poderão estabelecer padrões adequados quanto ao teor de lignina no tegumento da semente de soja, bem como, serão úteis para a validação da metodologia proposta nesse trabalho, visando a seleção de materiais com característica de resistência a deterioração de sementes.

Referências

ALVAREZ, P. J. C.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; MANDARINO, J. M. G.; FRANÇA NETO, J. B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 2, p. 209-214, 1997.

ANDRADE, E. R. **Caracterização e comparação da linhagem de soja UnB 1125 de tegumento preto com genótipos comerciais**. 2012. 40 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília 2012.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399. 2004.

ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, L. P. Isoflavonas e a qualidade das sementes de soja. **Informativo ABRATES**, v. 20, n. 1, p.15-29, 2010.

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

BANDEOGLU, E.; EYIDOGAN, F.; YUCEL, M. & OKTEM, H.A. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. **Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 9-77. 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds. **Physiology of development and germination**. New York, Plenum Press, ed. 2, 1994.

BOGUSZEWSKA, D.; ZAGDAŃSKA. B. ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions. In: **Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects**. Ed. Intech, p. 341-362. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, Brasília, 395 p. 2009.

CAPELETI, I.; FERRARESE, M. L. L.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FERRARESE FILHO, O. A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with the resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 33, p. 511-515, 2005.

CARBONELL, S. A. M. **Metodologia para seleção de genótipos de soja com semente resistente ao dano mecânico**. Londrina. 1991, 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1991.

CARVALHO, E. R.; OLIVEIRA, J. A.; CALDEIRA, C. M. Qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e transgênica RR produzidas sob aplicação foliar de manganês. **Bragantia**, Campinas, v.73, n. 3, jul./set. 2014.

CAVINESS, C. E.; SIMPSON JÚNIOR, A. M. **Influence of variety and location on seed coat thickness of mature soybean seed**. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts (AOSA), Lincoln, v. 64, p.102-108, 1974.

CHANCE, B.; BOVERIS, A.; OSHINO, N.; LOSCHEN, G. The nature of catalase intermediate and its biological function. In: KING, T.E.; MASON, H.S.; MORRISON, M. **OXIDASES AND RELATED REDOX SYSTEMS**. Baltimore, University Park Press, p. 350–353, 1973.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Grãos, safra 2012/13. Oitavo levantamento, Maio/2013. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_11_56_07_boletim_2_mai_o_2013.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

COSTA, N. P. da; MESQUITA, C. M. de; MAURINA, A. C.; FRANÇA NETO, J. B. de; PEREIRA, J. E.; BORDINGNON, J. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito da colheita mecânica da soja nas características físicas, fisiológicas e químicas das sementes em três estados do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p.140-145, 2001.

CUNHA, J. P. A. R.; OLIVEIRA, P.; SANTOS, C. M.; MION, R. L. Qualidade das sementes de soja após a colheita com dois tipos de colhedora e dois períodos de armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1420-1425, 2009.

DIONISIO-SESE, M.L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v. 135, p.1-9, 1998.

EGG-MENDONÇA, C. V. C. **Caracterização química e enzimática de famílias de feijões obtidas do cruzamento das linhagens Amarelinho e CI-107**. 2001. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

EL-MOSHATY, F.I.B.; PIKE, S.M.; NOVACKY, A.J.; SEHGAL, O.P. Lipid peroxidation and superoxide productions in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings virus or southern bean mosaic virus. **Journal Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p.109-119, 1993.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: A CULTURA DA SOJA NO BRASIL. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000. CD-Rom.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA – CNPSo, 1984. 39 p. (Circular Técnica, 9).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; SILVA, W. R. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA CNPSo, 1998. 72 p. (Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A. **Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 12 p., 2007. (Circular técnica, 40).

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

GIURIZATTO, M. I. K.; SOUZA, L. C. F.; ROBAINA, A. D.; GONÇALVES, M. C. Efeito da época de colheita e da espessura do tegumento sobre a viabilidade e o vigor de sementes de soja. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras. v. 27, n. 4, p. 771-779, jul./ago., 2003.

GRATAO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481–494, 2005.

- HAMEED, A.; BIBI, N.; AKHTER, J.; IQBAL, N. Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 178-185, 2011.
- JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 110-116, 2007.
- KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.; KIM, C.; Manoharan, K.; Kim, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 709-725, 2011.
- KRZYZANOWSKI, F. C. Desafios tecnológicos para a produção de semente de soja na região tropical brasileira. In: WORLD RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu: EMBRAPA-CNPSO, p. 1324-1335, 2004.
- LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-496, 1990.
- MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p. 342-349, 2012.
- MARCOS FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba, v.12, FEALQ, 2005. 496 p.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999b. cap. 3, p.1-24, 1999.
- MARCOS FILHO, J. **Qualidade fisiológica e maturação de sementes de soja** (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba, 1979. 180 f. Tese (Livre Docência) -Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1979.
- Mc CORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 6049-6055, 1969.
- MENEZES, M., PINHO, E. V. R. V.; ROVERI JOSÉ, S. C. B.; BALDONI, A.; MENDES, F. F. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.12, p.1716-1723, dez. 2009.
- MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591, 2001.
- OBANDO-FLOR, E. P.; CICERO, S. M.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 68-76, 2004.

- PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 534-540, 2004.
- PUNTARULO, S.; SANCHEZ, R. A.; BOVERIS, A. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. **Plant Physiology**, v. 86, p. 626–630, 1988.
- RIBEIRO, C.; CAMBRAIA, J.; PEIXOTO, P. H. P.; FONSECA, E. M. J. Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Brazilian Society of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes - RJ, v. 24, n. 2, p. 107-116, 2012.
- ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, E. V. R.; VIEIRA, E. S. N.; VEIGA, R. D.; VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.
- SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. **Plant Science**, v.162, p. 897-904, 2002.
- SANTOS, E. L.; PÓLA, J. N.; BARROS, A. S. R.; PRETE, C. E. C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2007.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A. C. **Membranes, metabolism and dry organisms**. London, p. 85-101, 1986.
- SILVA, P. A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural, durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja**. 2006. 66 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de Lavras, Lavras, 2006.
- SIMOVA-STOILOVA L. DEMIREVSKA; K.; PETROVA, T.; TSENOV, N.; FELLER, U. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. **Plant Soil Environmental**, v. 54, p. 529-536, 2008.
- STANIEK, K.; NOHL, H. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1460, p. 268–275, 2000.
- TERASAWA, J. M.; PANOBIANCO, M.; POSSAMAL, E.; KOEHLER, H. S. Antecipação da colheita na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 765-773, 2009.
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **SEED DEVELOPMENT AND GERMINATION**. New York, p. 237–271, 1995.
- ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, p. 731-734, 2008.

CAPÍTULO III

TAMANHO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE SOJA

Sample size for determining tetrazolium test in soybean seeds

RESUMO

O sistema de controle de qualidade na indústria de sementes de soja deve ser ágil, versátil e confiável, fornecendo resultados precisos. O teste de tetrazólio tem se destacado para a soja, devido à sua rapidez, precisão e também pelo grande número de informações fornecidas pelo mesmo. Os problemas relativos à deterioração por umidade, ou deterioração em campo, podem ser apontados como uma das principais causas da deterioração das sementes, e é detectado pelo teste de tetrazólio. A possibilidade de redução do número de amostras de sementes para a condução do teste de tetrazólio em sementes de soja, sem prejudicar sua eficiência, pode trazer mais agilidade na sua condução. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar o melhor tamanho de amostra, em número de sementes de soja, necessário para o teste de tetrazólio, em sementes de soja com elevado dano por umidade. Foram utilizadas sementes de cinco cultivares de soja, NK 7059, CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184. As vagens das sementes, em estádio R8, sofreram uma simulação de deterioração por umidade, através de uma chuva simulada por aspersores e posterior secagem, sendo esse ciclo de chuva e secagem repetido mais uma vez, totalizando duas chuvas simuladas e duas secagens. Os lotes foram avaliados pelo teste de germinação e tetrazólio. Realizou-se um processo iterativo de 2000 reamostragens, com reposição, utilizando diferentes tamanhos de amostras, iniciando com duas sementes e acrescentando uma semente em cada iteração até o tamanho máximo de 200 sementes. Obtendo assim, 2000 médias de danos por umidade e para cada um dos 199 tamanhos de amostras utilizados. A partir desses dados de médias do teste de tetrazólio estimaram-se as estatísticas: valor mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e valor máximo e a amplitude do intervalo de confiança de 95% foi determinada pela diferença entre os percentis 97,5% e 2,5%. O dimensionamento amostral foi estimado de forma a fornecer informações para diferentes condições de precisão. O tamanho de amostra em número de sementes, para avaliar os danos por umidade por meio do teste de tetrazólio em sementes de soja é dependente da qualidade fisiológica das cultivares, recomendando-se, para o maior nível de precisão, 0,3% de IC, 200 sementes por lote, e para um nível aceitável de precisão, 0,5% de IC, 121 sementes.

Termos para indexação: *Glycine max* (L.). amostragem. qualidade fisiológica.

ABSTRACT

Quality control system in soybean seed industry must be agile, versatile and reliable, providing accurate results. The tetrazolium test has been distinguished for soybeans due to its speed, accuracy and also the large number of information provided by the same. Problems relating to deterioration from humidity or deterioration in the field can be identified as a major cause of deterioration of seeds and is detected by tetrazolium test. The possibility of reducing the number of seed samples for driving the tetrazolium test in soybean seeds without harming its efficiency can bring more agility in your driving. The objective of this study was to estimate the best sample size in number of soybean seeds needed for the tetrazolium test for soybean seeds with high humidity damage. Five soybean cultivars seeds were used, NK-7059, CD 208, CD 215, CD 202 and BRS 184. The seed pods, in R8 stage, passed by a simulation of humidity deterioration through a simulated rain from sprinklers and further drying, and this cycle repeated rain and drying once again, totaling two simulated rainfall and two dryings. The lots were evaluated by germination and tetrazolium test. It held an interactive process 2000 resampling, with replacement using different sample sizes, starting with two seeds and adding a seed in every interaction to a maximum size of 200 seeds, obtaining this way 2000 averages humidity damage and for each of the 199 samples sizes used. From these data the mean tetrazolium test statistics were estimated: minimum value percentile 2.5%, average 97.5% percentile and maximum amplitude value and 95% confidence interval was determined by the difference between percentiles 97.5% and 2.5%. The sample design was estimated in order to provide information for different precision conditions. The sample size in number of seeds, to assess humidity damage through the tetrazolium test in soybean seeds is dependent on the physiological quality of cultivars, recommending to the highest level of precision, 0.3% IC 200 seeds per lot, and to an acceptable level of accuracy, 0.5% CI, 121 seeds.

Index terms: *Glycine max* (L.). sampling. physiological quality.

Introdução

A produção e a utilização de sementes de alta qualidade são fatores básicos da maior importância para o sucesso da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Para que tais requisitos sejam alcançados, o sistema de controle de qualidade na indústria de sementes deve ser ágil, versátil e confiável, fornecendo resultados precisos e de maneira rápida (FRANÇA NETO et al., 1998). O teste de tetrazólio é destacado no Brasil, principalmente para a soja, em razão do grande número de informações fornecidas, e por ser uma técnica rápida e pouco dispendiosa, permitindo obter resultados, de modo geral, em menos de 24 horas, da qualidade da semente. Além da importância do referido teste na avaliação do vigor e viabilidade, fornece o diagnóstico de danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejo,

que são os problemas que mais comumente afetam a qualidade fisiológica da semente de soja (COSTA; MARCOS FILHO, 1994; DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1988; KRYZANOWSKI et al., 1999).

O teste de tetrazólio é uma técnica baseada na reação que ocorre entre o sal de tetrazólio e as enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel nos tecidos vivos da semente. O mesmo não se processa em tecidos inviáveis, que permanecem na cor original. O teste fundamenta-se na análise da condução de cada semente individualmente, onde é classificada como viável ou não viável, e os tipos de danos são anotados juntamente. Cada semente é qualificada em sistema de classes, de 1 a 8, onde 1 a 5 são viáveis, de 6 a 8 não viáveis, e de 1 a 3 são vigorosas, e ainda 1 é a nota de semente sem dano. A presença, a localização e o tipo de dano, além das condições físicas das estruturas embrionárias são utilizadas nesse sistema de classificação (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1998).

Os danos de secagem, de estresse hídrico e de geada podem também ser facilmente visualizados pelo teste de tetrazólio. Além de apontar os problemas de redução de qualidade das sementes, os dados obtidos através do teste auxiliam no processo de controle de qualidade durante as etapas de colheita, transporte, beneficiamento e armazenamento de sementes de soja (CARVALHO, 1986; FRANÇA NETO et al., 1998).

A divulgação do teste de tetrazólio ocorreu pela primeira vez nos Estados Unidos em 1945, mediante investigações realizadas pelo Exército Americano, após a II Guerra Mundial, sobre atividades de pesquisa na Alemanha (MOORE, 1976). Avanços significativos sobre o teste ocorreram nos anos 50, de diversas universidades Americanas. Na década de 60, a Universidade Estadual do Mississippi publicou o primeiro manual sobre o teste, que abordava a metodologia para um grande número de espécies (DELOUCHE et al., 1962). Em 1970, a utilização do teste foi aceita pela AOSA (Associação Oficial dos Analistas de Sementes), através da publicação do Manual do Teste de Tetrazólio (GRABE, 1970).

No Brasil, o teste foi aprimorado para a soja pelos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, da Embrapa, que publicaram, em 1981, o primeiro manual específico para a soja (FRANÇA NETO, 1981). O referido manual foi atualizado e colocado em uma forma mais didática, sendo lançado alguns anos após (FRANÇA NETO et al., 1988), e a última atualização foi em 1998. Hoje, o teste é rotineiramente utilizado em todos os

laboratórios de análise de sementes que trabalham com soja no Brasil (FRANÇA NETO et al., 1998).

Os problemas relativos à deterioração por umidade podem ser apontados como uma das principais causas da deterioração das sementes, pois trata-se de um dano progressivo e mais acentuado, quando comparado aos demais danos associados à semente de soja, como os danos por insetos, patógenos e o mecânico (COSTA et al., 2001; CUNHA et al., 2009; FRANÇA NETO et al., 2007; TERASAWA et al., 2009). O dano por umidade é detectado por poucos testes, como o teste de microscopia eletrônica e o mais acessível, e versátil, teste de tetrazólio.

A determinação do tamanho da amostra necessária para a estimação da média de uma variável é importante para qualificar os experimentos, sendo este tamanho diretamente proporcional à variabilidade dos dados e à confiabilidade desejada na estimativa. Assim, quanto maior o tamanho de amostra, maior será a precisão do experimento, e quando o tamanho de amostra for pequeno a precisão experimental será menor (FERNANDES; SILVA, 1996).

Com o desenvolvimento tecnológico e o surgimento de computadores com grande capacidade de processamento, tornou-se possível o desenvolvimento de novas metodologias para o estudo da amostragem. A utilização de intervalos de confiança, obtidos por reamostragem com objetivo de dimensionamento amostral é uma técnica adequada para esta finalidade e tem a vantagem de não depender da distribuição de probabilidade dos dados (FERREIRA, 2009). Essa técnica vem sendo utilizada na determinação do tamanho de amostra para diversas culturas como cana-de-açúcar (LEITE et al., 2009) feijão de porco e de mucuna cinza (CARGNELUTTI FILHO et al., 2012).

Embora todo o procedimento para a condução do teste de tetrazólio para sementes de soja esteja estabelecido e produza, teoricamente, resultados confiáveis, sempre há espaço para aprimoramento da metodologia. A possibilidade de redução do número de amostras de sementes para a condução do teste de tetrazólio em sementes de soja, com confiabilidade conhecida da estimativa, pode trazer mais precisão e agilidade na sua condução.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar o melhor tamanho de amostra, em número de sementes de soja, necessário para o teste de tetrazólio, em sementes de soja com elevado dano por umidade.

Material e métodos

Foram utilizadas sementes provenientes da EMBRAPA Soja, produzidas em casa de vegetação, onde foram cultivadas cinco cultivares de soja, NK 7059, CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184.

Realizou-se um estresse de deterioração por umidade, induzido por meio de simulação de chuva, em casa de vegetação da EMBRAPA Soja, por meio da utilização de aspersores em delineamento inteiramente casualizado, descrito a seguir.

Indução do estresse de deterioração por umidade da simulação de chuva: O experimento foi conduzido com vagens de cinco cultivares de soja, NK 7059, CD 208, CD 215, CD 202 e BRS 184, em estádio R8 (ponto de colheita). Para cada cultivar, foram utilizadas quatro repetições de 140 vagens em estádio R8, as quais foram distribuídas em peneiras, e estas distribuídas uniformemente sobre 11 aspersores, em uma casa de vegetação. As vagens foram submetidas à irrigação por aspersão constante, por um período de 4 horas. Para determinar o período em que as vagens ficaram expostas à chuva simulada, utilizou-se os dados anteriores (capítulo II). A temperatura e umidade relativa do ar foram monitorados com um Data Logger (Anexo F), e a quantidade de chuva medida através de um pluviômetro. Após, as vagens foram secas em estufa com circulação de ar à 35°C por 37 horas. Esse ciclo de chuva e secagem foi repetido mais uma vez, totalizando duas chuvas simuladas e duas secagens.

Após os dois sucessivos ciclos de hidratação e desidratação, a amostra foi separada em duas frações, sendo a primeira destinada ao teste de tetrazólio, descrito a seguir, para caracterizar a ocorrência de danos por umidade, danos por percevejo, vigor e viabilidade. A segunda fração foi destinada ao teste de germinação e primeira contagem, descrito abaixo. Ambos os testes foram realizados no laboratório didático e de pesquisa em sementes da UFSM.

A qualidade das sementes foi avaliada por meio dos testes e determinações a seguir:

Teste de tetrazólio: valeu-se da metodologia descrita por França Neto et al. (1998), conduzida com 200 sementes por tratamento, distribuídas em quatro sub-amostras de 50 sementes, pré-condicionadas em papel umedecido, e incubadas por dezesseis horas à 25°C. Posteriormente as sementes foram acondicionadas em recipientes de vidro e imersas em solução do sal de tetrazólio (0,075%), mantidas em câmara escura à 40°C por três horas. Passado este período removeu-se a solução de tetrazólio e fez-se uma lavagem das sementes

com água. Para a interpretação logo após, cortaram-se as sementes longitudinalmente através do seu eixo embrionário, determinando-se o vigor, a viabilidade e o percentual de danos por umidade e por percevejo.

Teste de germinação: com oito repetições de 50 sementes, semeadas em rolos de papel umedecidos a duas vezes a massa do papel seco e mantidos em germinador regulado à 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco e aos oito dias, após a instalação do teste, conforme recomendações das Regras para análise de sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

Os testes de tetrazólio e germinação foram realizados também na testemunha, ou seja, as sementes que não foram submetidas ao tratamento de estresse de deterioração por umidade.

Com os dados do tetrazólio, das 200 sementes de cada uma das cultivares, realizou-se um processo iterativo com 2000 reamostragens, com reposição, utilizando diferentes tamanhos de amostras (n), iniciando com duas sementes e acrescentando uma semente em cada iteração até o tamanho máximo de 200 sementes. Obtendo, assim, 2000 médias de danos por umidade e danos totais para cada um dos 199 tamanhos de amostras utilizados. A partir desses dados de médias de danos por umidade e totais, estimaram-se as estatísticas: valor mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e valor máximo. A amplitude do intervalo de confiança de 95% foi determinada pela diferença entre o percentil 97,5% e o 2,5% e, representado graficamente no eixo das abscissas, o tamanho de amostra e, no eixo das ordenadas, as estatísticas descritivas das 2000 médias de porcentagem de dano por umidade e danos totais. Para melhor visualização dos dados nos gráficos, optou-se por plotar os dados de tamanho de amostra (n) em intervalos de vinte sementes, iniciando com n igual a zero sementes. Utilizou-se o software R (R CORE TEAM, 2012) para simular as reamostragens e confecção dos gráficos.

Resultados e discussão

A qualidade fisiológica inicial de todas as cultivares apresentou-se elevada, com germinação (G) acima de 97%, média de vigor (VG) de 85%, demonstrando serem lotes de elevada qualidade fisiológica (Tabela 1 e 2). O tratamento com estresse de deterioração por umidade resultou em maior dano por umidade, das sementes de todas as cultivares, comparado com a testemunha (sem chuva). Na variável G, apenas as cultivares CD 208 e CD

215 não diferiram significativamente entre os tratamentos (Tabela 2). As cultivares partiram de danos de percevejo (DP) distintos, sendo que a CD 215 teve menor DP significativamente comparado às cultivares NK 7059 RR, CD 208 e BRS 184, seguida da cultivar CD 202 com maior DP (Tabela 1). Essa variabilidade dos lotes é importante para buscar resultados que sejam válidos para sementes em diferentes condições de qualidade fisiológica.

Tabela 1 – Vigor (VG %), viabilidade (VB%) e dano de percevejo (DP %), determinado através do teste de tetrazólio, em sementes de cinco cultivares de soja. UFSM, Santa Maria, 2015.

Cultivar	VG	VB	DP
NK 7059 RR	86 b	96 a	33 b
CD 208	91 b	95 a	35 b
CD 215	99 a	100 a	9 c
CD 202	65 c	86 b	53 a
BRS 184	83 b	96 a	41 b
Média	84,80	94,5	33,8
CV%	5,09	4,36	20,95

Tabela 2 – Germinação (G %) e dano por umidade (DU %) em sementes de cinco cultivares de soja, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.

Cultivar	G		DU	
	T	EDU	T	EDU
NK 7059 RR	95 a A	80 b C	31 a A	41 a B
CD 208	98 a A	97 a A	4,5 b B	25 a C
CD 215	99 a A	97 a A	7 b B	35,5 a C
CD 202	97 a A	77 b C	29 b A	69 a A
BRS 184	98 a A	82 b B	24 b A	49 a B
Média	97 a	87 b	19,10 b	44,10 a
CV %	8,5		26,35	

* médias não seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem pelo teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. * T: sem estresse de deterioração por umidade (testemunha); *EDU: com estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva.

Na Tabela 3, encontram-se valores de tamanho de amostra, em número de sementes, para diferentes IC 95% (0,3; 0,5; 1,0 e 1,5%), entre os percentis 2,5% e 97,5% (AP) de 2000 reamostragens para estimativas da média do resultado do teste de Tetrazólio de cinco lotes de sementes de soja, submetidos a dois tratamentos, com e sem estresse de deterioração por umidade. Verificou-se grande variabilidade para os valores de tamanho de amostra, quando a precisão desejada é maior. Para as cultivares CD 208 e CD 215, o tamanho de amostra dimensionado para um Intervalo de Confiança (IC) de 0,3%, que foi a maior precisão, é de no mínimo 21 e 14 sementes, respectivamente, já para a cultivar NK 7059 RR a amostragem mínima é de 172 sementes, a CD 202 é de 184 sementes e a BRS 184 a amostragem é de 125 sementes, nessa amplitude.

Tabela 3 – Tamanho de amostra, em número de sementes, para diferentes IC 95% (0,3; 0,5; 1,0 e 1,5%), entre os percentis 2,5% e 97,5% (AP) de 2000 reamostragens para estimativas da média do resultado do teste de Tetrazólio de cinco lotes de sementes de soja, submetidos a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade (EDU) e testemunha (T), sendo o EDU induzido por meio de simulação de chuva. UFSM, Santa Maria, 2015.

IC %	Lotes				
	NK7059	CD208	CD215	CD202	BRS184
	----T----				
1,5	7	2	2	7	4
1	17	3	3	17	12
0,5	62	9	7	63	42
0,3	172	21	14	184	125
	----EDU----				
1,5	9	10	6	12	10
1	21	21	14	27	26
0,5	83	88	58	121	90
0,3	199	199	165	199	199

*IC (%): Intervalo de Confiança.

Essa diferença de tamanhos de amostras para os lotes se deve as características dos mesmos, sendo que os lotes com menor número de plântulas normais no teste de germinação, maior percentagem de dano por umidade e dano de percevejo, exigirão maiores tamanhos de amostra, é o caso das cultivares CD 202 e NK 7059 RR, que apresentaram a menor percentagem de plântulas normais na G, assim requerem maior tamanho de amostra (Tabelas 1 e 2). Já a cultivar CD 215 exige menor número de amostra, e apresentou a menor percentagem de DP, partiu de um menor DU, e maior VG e G. Comparando os dois tratamentos, testemunha e os lotes submetidos ao estresse de deterioração por umidade, pode-se notar que esse último requer um maior tamanho de amostra de sementes para identificar os danos por umidade no teste de tetrazólio, já que esses lotes apresentam uma qualidade fisiológica inferior à testemunha (Tabelas 1, 2 e 3). Esses resultados corroboram com Haesbaert (2013), que ao estimar o tamanho de amostra, em número de sementes, para a condutividade elétrica individual de sementes de girassol, encontrou grande variabilidade entre lotes, dependente do tempo de embebição das sementes e de diferentes padrões de qualidade, sendo que os lotes com menor vigor exigirão maiores tamanhos de amostra.

Na Figura 2, encontra-se a disposição gráfica dos valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo de 2000 reamostragens para estimativas de diferentes tamanhos de amostra para identificação de danos por umidade, no teste de tetrazólio, em sementes das cinco cultivares de soja (A=NK 7059; B=CD 208; C=CD 215; D=CD 202; E=BRS 184), sem estresse de deterioração por umidade (testemunha). Verifica-se que na testemunha, com uma menor porcentagem de dano por umidade, as cultivares com G e VG mais alto, CD 208 e CD 215, começaram a estabilizar sua precisão com um número de sementes menor, a partir de 148 sementes começou a ocorrer pouco aumento na precisão. Já as cultivares NK 7059 RR, CD 202 e BRS 184 começaram a ocorrer um menor aumento na precisão em torno de 180 sementes.

Os valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo de 2000 reamostragens para estimar diferentes tamanhos de amostra no teste de tetrazólio em sementes de soja com elevado dano de umidade (tratamento com estresse de deterioração por umidade), de cinco cultivares de soja (A=NK 7059; B=CD 208; C=CD 215; D=CD 202; E=BRS 184), estão na figura 3. Nesse lote onde o dano de umidade apresentou-se mais elevado, as cultivares começaram a estabilizar sua precisão com um número de sementes semelhantes entre si, em torno de, e a partir de 170 sementes começaram a ocorrer pouco aumento na precisão.

Para uma mesma precisão, diferentes tamanhos de amostra deveriam ser utilizados conforme o vigor e viabilidade do lote, no entanto, na prática, recomenda-se o tamanho de amostra para o lote de menor qualidade fisiológica, que será suficiente para estimar a média de danos dos demais lotes com qualidade superior. Então pode-se dizer que estes resultados concordam com a metodologia do teste de tetrazólio utilizado, conforme França Neto et al. (1998), onde utilizam uma amostra de 200 sementes para a identificação dos danos. Porém, como 0,5% de Índice de Confiança já é considerado alto, pode-se recomendar uma amostra de 121 sementes, que foi o resultado da cultivar de menor qualidade fisiológica, com o tratamento de simulação de dano por umidade, quando se deseja uma maior rapidez na análise do teste de tetrazólio.

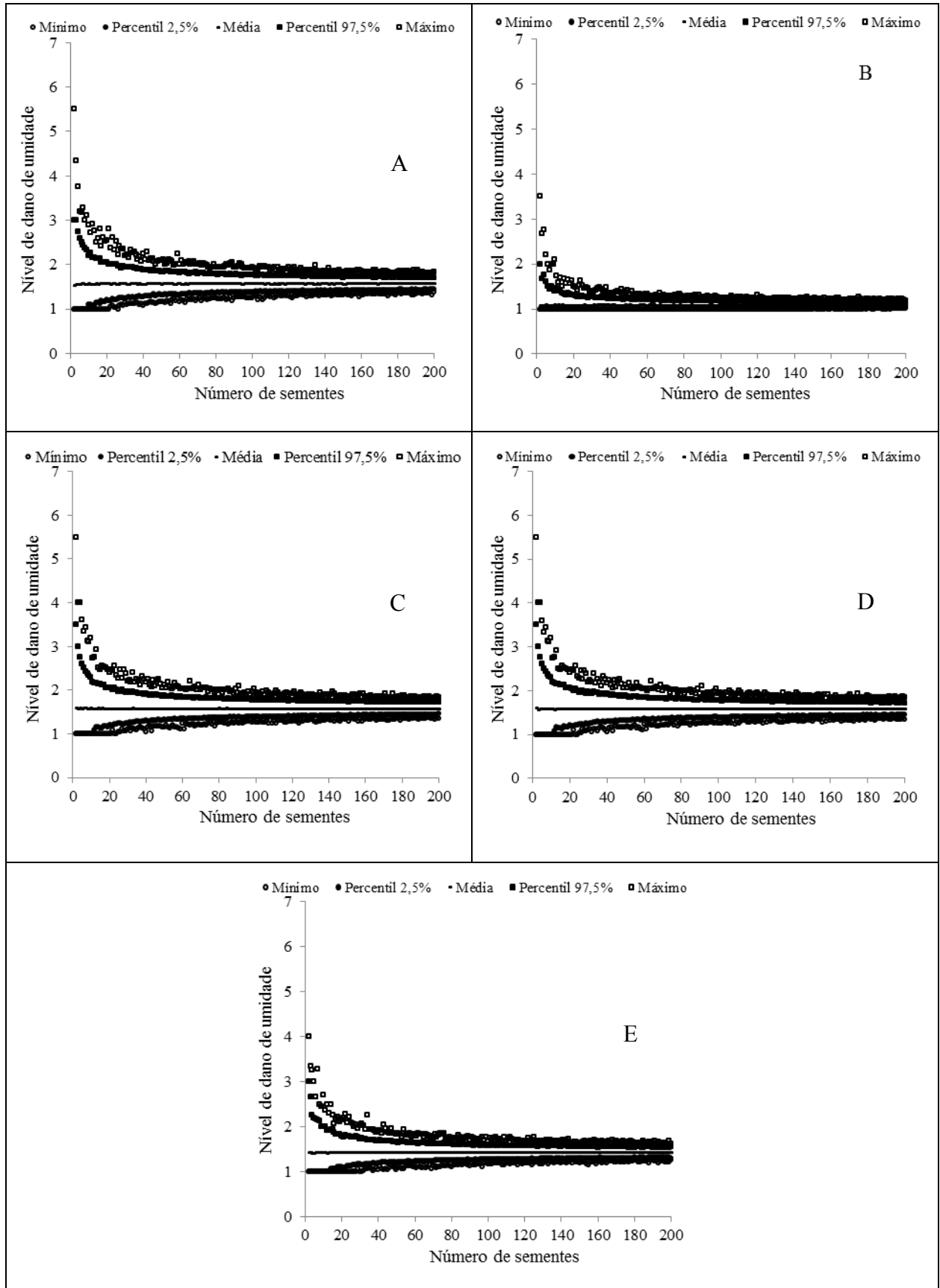


Figura 1 – Valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo de 2000 reamostragens para estimar diferentes tamanhos de amostra para identificação de danos por umidade, no teste de tetrazólio, em sementes das cinco cultivares de soja (A=NK 7059; B=CD 208; C=CD 215; D=CD 202; E=BRS 184), sem estresse de deterioração por umidade (testemunha). UFSM, Santa Maria, 2015.

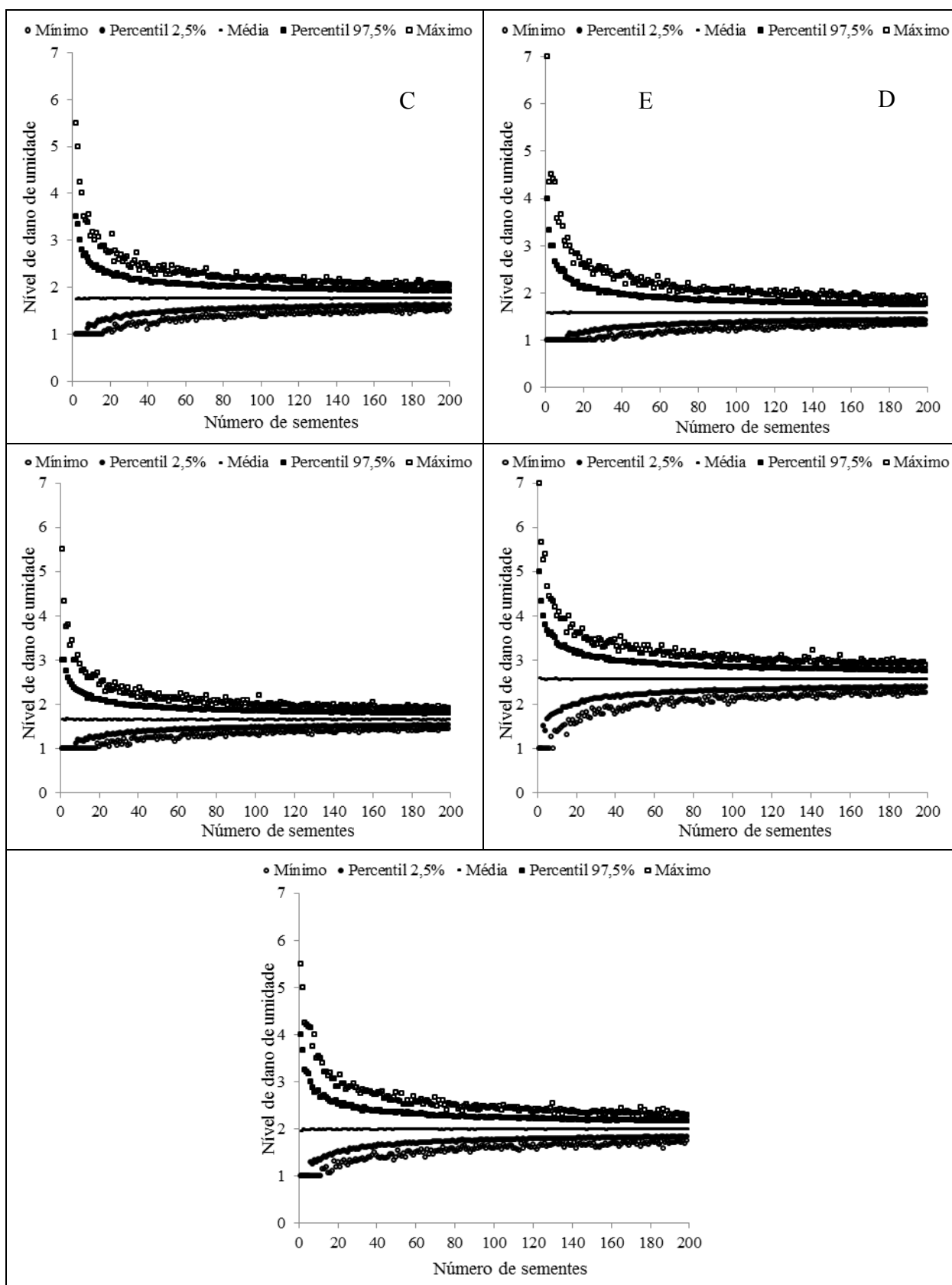


Figura 2 - Valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo de 2000 reamostragens para estimar diferentes tamanhos de amostra no teste de tetrazólio em sementes de soja com elevado dano de umidade (tratamento com estresse de deterioração por umidade), de cinco cultivares de soja (A=NK 7059; B=CD 208; C=CD 215; D=CD 202; E=BRS 184). UFSM, Santa Maria, 2015.

Conclusão

O tamanho de amostra em número de sementes, para avaliar os danos por meio do teste de tetrazólio em sementes de soja é dependente da qualidade fisiológica das cultivares.

Cultivares com alto vigor possibilitam utilizar os menores tamanhos de amostras.

Recomenda-se o tamanho de amostra de 200 sementes de soja por lote para avaliar os danos por meio do teste de tetrazólio em sementes de soja, na maior precisão, IC 0,3%.

Para uma precisão de IC 0,5% recomenda-se o tamanho de amostra de 121 sementes de soja por lote para avaliar os danos por meio do teste de tetrazólio em sementes de soja.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. The Seed Vigor Test Committee. Seed vigor testing handbook. [S.l], 1983. 88p. **The Handbook on Seed Testing** (Contribution n. 32).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, Brasília, 2009. 395 p. 2009.

CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Tamanho de amostra para a estimação da média do comprimento, diâmetro e massa de sementes de feijão de porco e mucuna cinza. **Ciência Rural**, v.42, n.9, set, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v42n9/a24612cr6535.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.doi: 10.1590/S0103-84782012005000057.

CARVALHO, N. M. Vigor de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO DE SEMENTES, Piracicaba. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, p. 207-223, 1986.

COSTA, N. P. da; MESQUITA, C. M. de; MAURINA, A. C.; FRANÇA NETO, J. B. de; PEREIRA, J. E.; BORDINGNON, J. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito da colheita mecânica da soja nas características físicas, fisiológicas e químicas das sementes em três estados do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p.140-145, 2001.

COSTA, N. P.; MARCOS FILHO, J. O emprego do teste de tetrazólio na avaliação da qualidade da semente de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 53-62, 1994.

CUNHA, J. P. A. R.; OLIVEIRA, P.; SANTOS, C. M.; MION, R. L. Qualidade das sementes de soja após a colheita com dois tipos de colhedora e dois períodos de armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1420-1425, 2009.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **The tetrazolium test for seed viability**. Mississippi: Mississippi State University, 63 p. 1962. (Technical Bulletin, 51).

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília, AGIPLAN, 103p. 1976.

FERNANDES, E. N.; SILVA, P. S. L. Tamanho da amostra e método de amostragem para caracteres da espiga do milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 20, n. 02, p. 252-256, 1996.

FERREIRA, D.F. **Estatística básica**. 2.ed. Lavras: UFLA, 664p. 2009.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: A CULTURA DA SOJA NO BRASIL. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2000. CD-Rom.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; SILVA, W. R. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA CNPSO, 72 p. 1998. (Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A. **Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade**. Londrina: EMBRAPA, CNPSO, 12 p., 2007. (Circular técnica, 40).

FRANÇA NETO, J. B. **Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja**. Curitiba: TECPAR, v.3, n.1, 14 p. 1981. (Boletim LASP).

FRANÇA NETO, J. B.; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 58 p. 1988 (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 32).

GRABE, D. F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed**. [S.l.], Association of Official Seed Analysts, 62p. 1970.

HAESBAERT, F. M. **Testes para análise de vigor em sementes de girassol**. Santa Maria. 2013, 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

LEITE, M.S.O. et al. Sample size for full-sib family evaluation in sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p. 1562-1574, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v44n12/v44n12a02.pdf>>. Acesso em: 212 out. 2012. doi: 10.1590/S0100-204X2009001200002.

MOORE, R.P. Tetrazolium seed testing developments in North America. **Journal of Seed Technology**, Beltsville, v.1, p.17-30, 1976.

R CORE TEAM.R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.(2012).

TERASAWA, J. M.; PANOBIANCO, M.; POSSAMAL, E.; KOEHLER, H. S. Antecipação da colheita na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 765-773, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nesses resultados podemos dizer que as cultivares com maior teor de lignina no tegumento das sementes proporcionaram uma tolerância à deterioração por umidade, resultando em um maior número de plântulas normais no teste de germinação, mais vigorosas e uma menor porcentagem de dano por umidade.

Já quanto a resistência ao dano mecânico, a cultivar com o maior teor de lignina no tegumento, 4,19%, foi a única que apresentou uma tolerância.

De uma maneira geral, as cultivares de soja com menor teor de lignina demonstraram estresse oxidativo causado pela simulação de deterioração por umidade, através da chuva. E a atividade das enzimas POD e SOD, além da peroxidação lipídica, nas sementes e nas plântulas não mostraram comportamentos idênticos.

As enzimas do estresse oxidativo nas plântulas, apesar de haver diferença estatística significativa para a maioria das situações, não foi observado um comportamento padrão de resposta. Além disso, não foi possível correlacionar esses dados com a medida de crescimento das raízes e parte aérea, que pode estar relacionado à maior ou menor atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, pois podem restringir o crescimento celular. Dessa forma, a tolerância a deterioração por umidade e ao dano mecânico condicionado pelo teor de lignina no tegumento das sementes de soja, podem estar relacionadas com o sistema antioxidante não enzimático (carotenóides, ácido ascórbico, tióis não protéicos) ou com as demais enzimas antioxidantes não analisadas neste trabalho (catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase) exigindo trabalhos futuros para explorar melhor essas respostas.

A metodologia utilizada para ocasionar a deterioração por umidade nas sementes de soja foi eficiente para simular os danos por umidade nas mesmas.

Quanto ao tamanho de amostra para a condução do teste de tetrazólio em sementes de soja, considerando sempre um lote de sementes com qualidade fisiológica baixa, os resultados concordam com a metodologia já existente, que são 200 sementes por lote, pelo maior nível de precisão e conseqüentemente menor erro amostral. Porém, ainda com um nível de precisão alto, pode-se recomendar uma amostra de 121 sementes, quando se deseja uma maior rapidez na análise do teste de tetrazólio, como 0,5% de Índice de Confiança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, P. J. C. **Relação entre o conteúdo de lignina no tegumento da semente de soja e sua relação ao dano mecânico**. 1994. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1994.
- AIVAREZ, P. J. C.; KRZYZANOWSKI, F. C.; MANDARINO, J. M. G.; FRANÇA NETO, J. B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 2, p. 209-214, 1997.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399. 2004.
- ASIEDU, E. A.; POWELL, A. A. Comparisons of storage potential of cultivar of cowpea (*Vigna unguiculata*) differing in seed coat pigmentation. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 211-221, 1998.
- ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, L. P. Isoflavonas e a qualidade das sementes de soja. **Informativo ABRATES**, v. 20, n. 1, p.15-29, 2010.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba: ESALQ, p.1-18, 2000.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, p. 1-6, 1981.
- BOTELHO, F. J. E. **Qualidade de sementes de soja com diferentes teores de lignina obtidas de plantas submetidas à dessecação**. Lavras, MG, 2012, 89 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Univerisdade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2012.
- BURTON, J. W.; ISREAL, D. W.; WILSON, R. F.; CARTER, T. E. Effects of defoliation on seed protein concentration in normal and high protein lines of soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 172, n. 1, p. 131-139, 1995.
- CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in lignin content and composition. **Plant Physiology**, New York, n. 110, p. 3-13, 1996.
- CARBONELL, S. A. M. **Metodologia para seleção de genótipos de soja com semente resistente ao dano mecânico**. Londrina. 1991. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1991.
- CARBONELL, S. A. M.; KRZYZANOWSKI, F. C. The pendulum test for screening soybean genotypes for seeds resistant to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 23, n. 2, p. 331-339, 1995.
- CARVALHO, N. M. & NACAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas, S.P.: Fundação Cargill, 424p. 1988.

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

CAVARIANI, C.; TOLEDO, M. Z.; RODELLA, R. A.; FRANÇA NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n.1, p. 31-39, 2009.

CAVINESS, C. E.; SIMPSON JÚNIOR, A. M. Influence of variety and location on seed coat thickness of mature soybean seed. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Lincoln, v. 64, p. 102-108, 1974.

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 27, n. 5, p. 295-341, 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, quarto levantamento, janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf> Acesso em: 28 de janeiro de 2015.

CONWAY, G. **Produção de alimentos no século XXI: biotecnologia e meio ambiente**. São Paulo: Estação Liberdade, 2003.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v.23, 4 p. 2000.

COSTA, N. P. da; MESQUITA, C. M. de; MAURINA, A. C.; FRANÇA NETO, J. B. de; PEREIRA, J. E.; BORDINGNON, J. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito da colheita mecânica da soja nas características físicas, fisiológicas e químicas das sementes em três estados do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p.140-145, 2001.

CUNHA, J. P. A. R.; OLIVEIRA, P.; SANTOS, C. M.; MION, R. L. Qualidade das sementes de soja após a colheita com dois tipos de colhedora e dois períodos de armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1420-1425, 2009.

DANTAS, I. B. **Influência do teor de lignina na qualidade e armazenabilidade de sementes de soja inoculadas com *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp.*** 2012. 110 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

DASSOU, S.; KUENEMAN, E. A. Screening methodology for resistance to field weathering of soybean seed. **Crop Science**, Madison, v. 24, p. 774-779, 1984.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a Biosynthetic Approach**. New York, 466 p. 1997.

DUKE, S. H.; KAKEFUDA, G. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of the legume seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 449-456, 1981.

EGG-MENDONÇA, C. V. do C. **Caracterização química e enzimática de famílias de feijões obtidas do cruzamento das linhagens Amarelinho e CI-107**. 2001. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil - 2009 e 2010.** Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, p. 262, 2009.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes.** São Paulo: E. Bluecher, 1976. 293p.

ESAU, K. **Anatomy of seeds plants.** New York: John Wiley, 1977.

EVERT, R. F. **Esau`s plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development.** 3 ed. New Jersey: John Wiley, 2006.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: A CULTURA DA SOJA NO BRASIL. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2000. CD-Rom.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja.** Londrina: EMBRAPA – CNPSO, 39 p. 1984. (Circular Técnica, 9).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; SILVA, W. R. **O teste de tetrazólio em sementes de soja.** Londrina: EMBRAPA CNPSO, 72 p. 1998. (Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. A importância do uso de sementes de soja de alta qualidade. **Informativo ABRATES**, Londrina – PR, v. 20, n.1, p. 37-38, 2010.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A. **Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade.** Londrina: EMBRAPA, CNPSO, 12 p. 2007. (Circular técnica, 40).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; WEST, S. H.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. Determinação do conteúdo de lignina nos tegumentos de sementes de soja com tegumento preto e amarelo. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 21., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 247 p. 1999. (Documento, 134).

FREITAS, M. C. M. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, p. 12, 2011.

GIGLIOLI, J. L.; FRANÇA NETO, J. B. Efeito da escarificação mecânica e do retardamento de colheita sobre a emergência de sementes de soja com tegumento impermeável. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1982, Brasília. **Anais...**Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. V.1. p. 601-609 (Documentos, 1).

GIURIZATTO, M. I. K.; SOUZA, L. C. F.; ROBAINA, A. D.; GONÇALVES, M. C. Efeito da época de colheita e da espessura do tegumento sobre a viabilidade e o vigor de semente de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 771-779, 2003.

GLORIA, B. A.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal.** 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2006.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W. E.; QUICK, W. P.; ATHERTON, N. M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability

in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v. 148, p. 267-276, 2000.

GRIS, C. F. **Qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e RR associada ao conteúdo de lignina**. 2009. 134f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de Lavras, Lavras, 2009.

HARTWIG, E. E.; POTTS, H. C. Development and evaluation of impermeable seed coats for preserving soybean seed quality. **Crop Science**, Madison, v. 27, n.3, p. 506-508, 1987.

HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, p. 572-584. 2002.

HENNING, A. A. **Patologia e Tratamento de Sementes: Noções Gerais**. Embrapa Soja, Londrina, PR.. Setembro de 2005a. 52p. 2005. (Documentos 264).

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V. SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T. COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de Identificação de doenças da soja**. Londrina: Embrapa Soja. 72p. 2005b. (Documentos, 256).

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 110-116, 2007.

JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plants cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2774-2790, 1995.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A.; COSTA, da N. P. **A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades**. Londrina, PR, Abril, 8 p. 2008. (Circular técnica 55).

LACERDA, A. L. S.; LAZARINI, E.; SÃ, M. E. Armazenamento de sementes de soja dessecadas e avaliação da qualidade fisiológica, bioquímica e sanitária. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 2, p. 97-105, 2003.

LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. et al. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, American Society for Agronomy. p.133- 163. 1993.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-496, 1990.

MA, F.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C. A.; GIJZEN, M. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. **Annals of Botany**, London, 2004.

MARCOS FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba, v.12, FEALQ, 2005. 496 p.

MCDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; HILLMAN, J. R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 70, n.2, p.133-150, Apr. 1996.

MENEZES, M.; PINHO, E. V. de RESENDE; JOSE, S. C. B. R.; BALDONI, A.; MENDES, F. F.. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1716-1723, 2009.

MERTZ, L. M. **Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de sDNA diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com permeabilidade constratante**. 2007, 60 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MILLER, S. S.; BOWMAN, LA.; GIJZEN, M.; MIKI, B. L. A. Early development of the seed coat of soybean. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 3, p. 297-304, sept.1999.

MOORE, R. P. Tetrazolium seed testing developments in North America. **Journal of Seed Technology**, Beltsville, v.1, p.17-30, 1976.

OBANDO-FLOR, E. P.; CICERO, S. M.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 68-76, 2004.

PAIVA, L. E.; MEDEIROS, S. F.; FRAGA, A. C. Beneficiamento de sementes de milho colhidas mecanicamente em espigas: efeitos sobre danos mecânicos e qualidade fisiológica. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, p. 846-856, 2000.

PANOBIANCO, M. Electrical conductivity of soybean seed and correlation with seed coat lignin content. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 27, n. 3, p. 945-949, 1999.

PANOBIANCO, M. **Variação na condutividade elétrica de sementes de diferentes genótipos de soja e relação com o conteúdo de lignina no tegumento**. 1997. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

PESKE, S. T.; HOFES, A.; HAMER, E. Seed moisture range in a soybean plant. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 120-124, 2004.

PESKE, S. T.; PERREIRA, L. A. G. **Tegumento da semente de soja**. **Tecnologia de Sementes**, Pelotas, v. 6, p. 23-34, 1983.

PESKE, S. T.; BAUDET, L. M. **Beneficiamento de sementes**. In: Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos, 454 p. 2006.

RAGUS, L. N. Role of water absorbing capacity in soybean germination and seedling vigour. **Seed Science and Technology**, v.15, p.285-296, 1987.

SANTOS, E. L.; PÓLA, J. N.; BARROS, A. S. R.; PRETE, C. E. C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2007.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG, Ed. UFV, 166 p. 1981.

SOUSA, S. A. V. Programa computacional para simulação da ocorrência de veranicos e queda de rendimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1952-1956, 1998.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 365-375, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre, Arthmed, 918 p. 2013.

TERASAWA, J. M.; PANOBIANCO, M.; POSSAMAL, E.; KOEHLER, H. S. Antecipação da colheita na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 765-773, 2009.

TODD, J. J.; VODKIN, L. O.; Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development. **Plant Physiology**, v. 102, p.663-670, 1993.

VENCATO, A. Z. **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul, Ed. Gazeta Santa Cruz, 144 p. 2010.

WESTGATE, M. E.; ORF, J.; SCHUSSLER, J. R.; SHUMWAY, C. Temperature regulation of uptake and metabolism of protein and oil precursors by developing soybean embryos. Madison: **American Soybean Association**, 106 p. 1995. (Agronomy abstracts).

Anexos

Anexo A – Análise de variância para o teste de germinação (G %) em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	833880984,62	833880984,62	112,377	0,000
Cultivar (B)	3	904142866,37	301380955,46	40,615	0,000
(A) X (B)	3	585419631,73	195139877,24	26,298	0,000
Erro	56	415542836,11	7420407,79		
Total	63	2738986319,00			
CV(%)	7,98				
Média geral	34150,93				

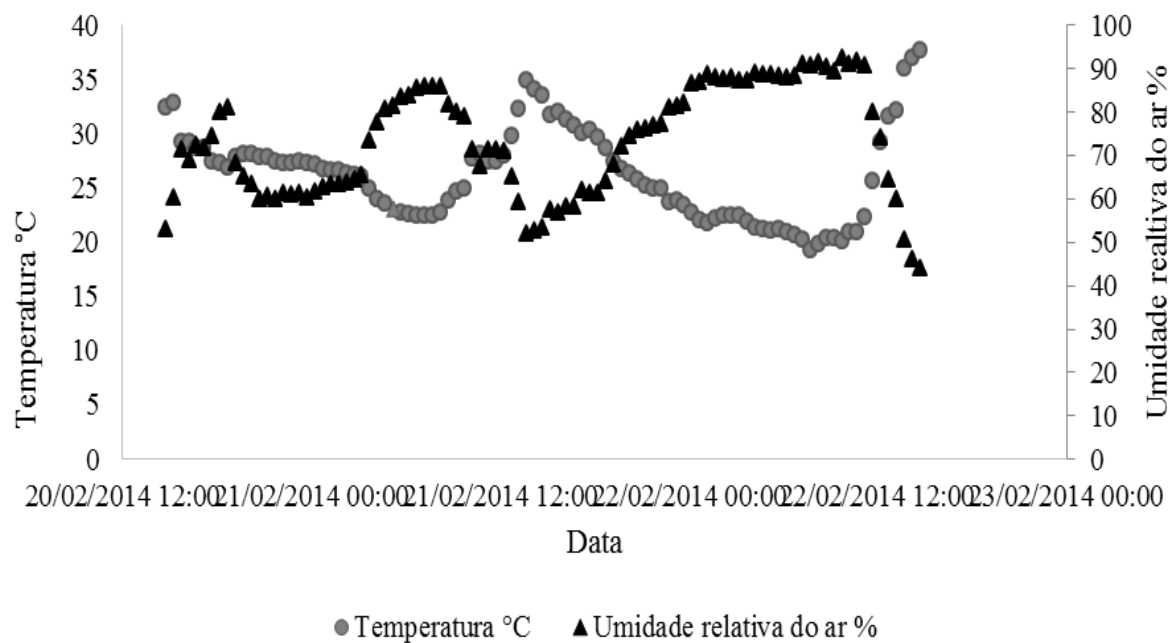
* Valores transformados segundo a metodologia Box-Cox.

Anexo B – Análise de variância para o teste de envelhecimento acelerado (E %) em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Cultivar	3	90002302,04	30000767,35	4,478	0,0249
Erro	12	80396535,55	6699711,29		
Total	15	170398837,58			
CV(%)	7,81				
Média geral	33127,11				

* Valores transformados segundo a metodologia Box-Cox.

Anexo C – Temperatura (C⁰) e umidade relativa do ar (%) na casa de vegetação da EMBRAPA Soja, Londrina-PR, no período compreendido entre 20 a 23 de fevereiro de 2014. UFSM, Santa Maria, 2015.



Anexo D – Análise de variância para o teste de tetrazólio, para a variável dano de umidade (DU %), em sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, e submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	6612,50	6612,50	112,076	0,000
Cultivar (B)	3	5657,00	1885,67	31,960	0,000
(A) X (B)	3	394,50	131,50	2,229	0,1108
Erro	24	1416,00	59,00		
Total	31	14080,00			
CV(%)	25,18				
Média geral	30,50				

Anexo E – Análise de variância das classes do teste de tetrazólio, para avaliar a variável dano mecânico (DM %), em sementes de quatro cultivares de soja, com valores discrepantes do teor de lignina no tegumento. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Cultivar	3	0,25	0,08	0,005	1,0000
Classe	7	49002,50	7000,36	396,714	0,0000
(A) X (B)	21	1959,25	93,29	5,287	0,0000
Erro	96	1694,00	17,65		
Total	127	52656,00			
CV(%)	33,61				
Média geral	12,5				

Anexo F – Análise de variância da variável enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	10,648	10,648	193,923	0,0000
Cultivar (B)	3	42,190	14,063	256,125	0,0000
(A) X (B)	3	6,076	2,025	36,886	0,0000
Erro	56	3,075	0,055		
Total	63	61,989			
CV(%)	17,62				
Média geral	1,329				

Anexo G – Análise de variância da variável enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	0,001	0,001	0,286	0,5979
Cultivar (B)	3	0,135	0,044	18,910	0,0000
(A) X (B)	3	0,023	0,008	3,341	0,0360
Erro	24	0,057	0,002		
Total	31	0,216			
CV(%)	6,83				
Média geral	0,71				

Anexo H – Análise de variância da variável peroxidação lipídica (TBARS) na parte aérea de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	2,709	2,709	103,353	0,0000
Cultivar (B)	3	0,036	0,012	0,460	0,7115
(A) X (B)	3	0,271	0,090	3,440	0,0228
Erro	56	1,468	0,026		
Total	63	4,485			
CV(%)	29,65				
Média geral	0,55				

Anexo I – Análise de variância para a variável enzima guaiacol peroxidase (POD) nas raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	4,28	4,28	68,464	0,0000
Cultivar (B)	3	26,47	8,82	141,033	0,0000
(A) X (B)	3	0,26	0,09	1,404	0,2512
Erro	56	3,50	0,06		
Total	63	34,52			
CV(%)	34,86				
Média geral	0,72				

* Valores transformados segundo a metodologia Box-Cox .

Anexo J – Análise de variância da variável enzima superóxido dismutase (SOD) nas raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	0,278	0,278	56,713	0,0000
Cultivar (B)	3	0,148	0,049	10,057	0,0002
(A) X (B)	3	0,058	0,019	3,965	0,0198
Erro	24	0,117	0,005		
Total	31	0,601			
CV(%)	14,79				
Média geral	0,473				

Anexo K – Análise de variância da variável peroxidação lipídica (TBARS) nas raízes de plântulas de quatro cultivares de soja, oriundas de sementes com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	12,74	12,74	43,018	0,0000
Cultivar (B)	3	5,98	1,99	6,732	0,0006
(A) X (B)	3	1,46	0,49	1,646	0,1892
Erro	56	16,59	0,30		
Total	63	36,77			
CV(%)	35,76				
Média geral	1,52				

* Valores transformados segundo a metodologia Box-Cox .

Anexo L – Análise de variância da variável enzima superóxido dismutase (SOD) nas sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	2,14	2,14	0,580	0,4572
Cultivar (B)	3	228,08	76,03	20,602	0,0000
(A) X (B)	3	240,34	80,11	21,710	0,0000
Erro	16	59,04	3,69		
Total	23	529,60			
CV(%)	11,75				
Média geral	16,35				

* Valores transformados segundo a metodologia Box-Cox .

Anexo M – Análise de variância da variável enzima guaiacol peroxidase (POD) nas sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	0,007	0,007	103,875	0,0000
Cultivar (B)	3	0,219	0,073	1055,826	0,0000
(A) X (B)	3	0,024	0,008	113,202	0,0000
erro	16	0,001	0,000		
Total	23				
CV(%)	5,98				
Média geral	0,14				

Anexo N – Análise de variância da variável peroxidação lipídica (TBARS) nas sementes de quatro cultivares de soja, com valores diferentes do teor de lignina no tegumento, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	0,029240	0,029240	8,080	0,0090
Cultivar (B)	3	0,012408	0,004136	1,142	0,3518
(A) X (B)	3	0,19433	0,006478	1,790	0,1759
erro	24	0,086846	0,003619		
Total	31	0,147927			
CV(%)	33,47				
Média geral	0,18				

Anexo O – Análise de variância para o teste de germinação (G %) em sementes de cinco cultivares de soja, utilizadas na análise de tamanho de amostra para o teste de tetrazólio, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	1368540277000000000,00	136854028000000000,00	188,662	0,0000
Cultivar (B)	4	1215447039000000000,00	303861759,76	41,89	0,0000
(A) x (B)	4	674092827,72	168523206,93	23,232	0,0000
Erro	70	507773725,62	7253910,37		
Total	79	3765853870000000000,00			
CV(%)	8,12				
Média geral	33164,61				

* Valores transformados segundo a metodologia Box-Cox .

Anexo P – Análise de variância para o teste de tetrazólio, para a variável dano de umidade (DU %), em sementes de cinco cultivares de soja, utilizadas na análise de tamanho de amostra para o teste de tetrazólio, submetidas a dois tratamentos, estresse de deterioração por umidade induzido por meio de simulação de chuva e testemunha. UFSM, Santa Maria, 2015.

FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor
Chuva (A)	1	6250,00	6250,00	90,144	0,000
Cultivar (B)	4	5850,60	1462,65	21,096	0,000
(A) X (B)	4	957,00	239,25	3,451	0,0196
Erro	30	2080,00	69,33		
Total	39	15137,60			
CV(%)	26,35				
Média geral	31,60				