

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS E
POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE SOJA.**

Bruno Guilherme Torres Licursi Vieira

Biólogo

Jaboticabal – SÃO PAULO – Brasil

Dezembro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS E
POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE SOJA.**

Bruno Guilherme Torres Licursi Vieira

Orientador: Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção e Tecnologia de Sementes).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNO GUILHERME TORRES LICURSI VIEIRA – Nasceu em Londrina, Paraná, em 29 de setembro de 1980, filho de Paulo Sergio Licursi Vieira e Sônia Maria Torres. Formou-se em Ciências Biológicas, em 2004, pelo Centro Universitário Filadélfia de Londrina (UNIFIL). De 2001 a 2004 durante a graduação, estagiou na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja, Londrina - PR, nas áreas de Produção, Tecnologia e Patologia de Sementes, Entomologia Agrícola e Biotecnologia Vegetal, onde trabalhou com qualidade fisiológica, genética e sanitária de semente, bem como o estudo da biologia de percevejos pragas da cultura da soja. Iniciou o mestrado, em março de 2005, em Agronomia, área de concentração em Produção e Tecnologia de Sementes na Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal. Obtendo o título de mestre em março de 2007, quando ingressou no curso de doutorado nesta mesma instituição. Durante o período de mestrado e doutorado foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

A DEUS, fonte de inspiração permanente,

À minha saudosa namorada Roberta, por ter estado ao meu lado nos diversos momentos desta jornada e, agora ao lado de DEUS,

À Dona Cida e Sr. Jacob, pelo carinho e disposição em ajudar,

Ao meu avô Ernane, pelo apoio e incentivo constante,

aos meu familiares, Joel, Teco, Nione, João, Alessandra, Clair, Cristina, Ivan e especialmente meu tio Quita, pelo apoio, incentivo e ajuda constante,

Ao Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira, pelas valiosas orientações neste trabalho, pela disposição dedicada, e principalmente pela amizade,

Ao amigo Dr. João Carlos, pelo auxílio nas análises de enzimas, principalmente pela paciência em suas explicações,

Ao Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro, pela co-orientação neste trabalho,

Ao Prof. Dr. Domingos Fornasieri Filho, pelos valiosos conselhos durante o doutorado,

À Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela excelência no ensino, um lugar para se guardar,

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual não seria possível chegar até aqui,

Aos pesquisadores da Embrapa Soja Dr. Ademir A. Henning, Dr. José de Barros França Neto, Dr. Nilton Pereira da Costa e Dr. Francisco Carlos Krzyzanowski, a base de tudo,

Às secretárias do Depto. de Produção Vegetal, Marisa e Mônica, pela disposição permanente em ajudar,

Ao amigo Dr. Camilo Plácido Vieira, pelos valiosos conselhos e oportunidades de trabalho,

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da UNESP “Gabi” e “Faro”, pelo apoio durante a realização deste trabalho,

Ao big boss da Wizard Jaboticabal, meu amigo Denis, pelo grande empreendedor que é, pessoa de bem,

Aos meus grandes amigos Fernando e Liliane, pela paciência e principalmente a amizade,

Aos amigos: César, Lilian, Disnei, Cristian, Franco, Marcelo, Danilo, Dani Sarti, Cláudia (portuga), Magnólia, Thais Frigeri, Michele Mutton, Jorge, Claudia Denise, Giselle, Gisele Sales, Camila (maritaca), Patrícia, Mariana, Clíssia, Juliana, Felipe, Josué, Wellington, Saulo, Daniel (nabo) e todos demais, por terem tornado o convívio mais prazeroso durante estes anos.

Aos meus pais, Paulo Sergio, Sônia Maria e Sueli Mello,
aos meus queridos irmãos Ivan Henrique, Mariana,
Poliana e Maria Luiza e meu querido avô Ernane (*in*
memória), pessoas sempre presentes em todos
momentos de minha vida.

Ofereço!

Ao meu amado filho Eduardo, pelos
momentos não dedicados a ele, minha
saudosa namorada, Roberta.

Dedico, Amo vocês.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	
1. Introdução.....	1
2. Deterioração de sementes.....	2
3. Atividade enzimática.....	6
CAPÍTULO 2 - ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE SEMENTES DE SOJA SOB DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA E ARMAZENAMENTO	
Resumo.....	12
1. Introdução.....	13
2. Material e métodos.....	14
3. Resultados e discussão.....	17
4. Conclusão.....	42
CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DE SEMENTES DE SOJA EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DE COLHEITA E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO	
Resumo.....	43
1. Introdução.....	44
2. Material e métodos.....	46
3. Resultados e discussão.....	49
4. Conclusão.....	55
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS E POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE SOJA

RESUMO - A deterioração de sementes de soja durante o período de armazenamento tem sido bastante estudada. O trabalho teve por objetivo monitorar a deterioração em sementes e tecidos embrionários de soja. Foi utilizada semente da cultivar de soja MGBR-46 Conquista colhidas em três épocas: maturidade fisiológica (estádio R7), R7+ 7 dias e R7 + 15 dias, foram armazenadas em câmara fria (10 °C, 45-50% UR do ar) e câmara climatizada (25 °C, 60-75% UR do ar). No primeiro experimento, com a finalidade de obterem-se informações a cerca dos danos estruturais e fisiológicos causados pelo armazenamento e época de colheita, as sementes de soja foram eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura, assim como o potencial fisiológico avaliado trimestralmente, utilizando-se os testes de germinação (rolo de papel e areia como substrato) e de vigor (condutividade elétrica, tetrazólio, envelhecimento acelerado, e emergência de plântulas em campo) e teor de água. No segundo experimento, foram avaliados os perfis de bandas das enzimas esterase, malato e glutamato desidrogenase. Para isso, foram extraídos 10 eixos embrionários das sementes de cada época de colheita para análise eletroforética. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que: o armazenamento sob condições adversas de sementes de soja no campo, após o estágio R7 e no armazém a 25 °C durante os 12 meses reduziu seu potencial fisiológico danificando a estrutura da testa; sementes de soja colhidas em diferentes épocas e com alto potencial fisiológico podem apresentar diferenças nos padrões izoenzimáticos em resposta ao armazenamento; as análises das enzimas foram sensíveis para avaliação do potencial fisiológico, indicando o início da deterioração em função do período de armazenamento e da época de colheita; a atividade das enzimas esterase, malato desidrogenase e glutamato desidrogenase são influenciadas pelo período e temperatura de armazenamento.

Palavras-Chave: *Glycine max*, qualidade fisiológica, vigor, semente, enzimas.

BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHANGES AND SOYBEAN SEED PHYSIOLOGICAL POTENTIAL

ABSTRACT - The soybean seed deterioration has been widely studied during the seed storage. The study was conducted in order to monitor the soybean embryonic tissue and seed deterioration. Soybean seed, cv. MGBR-46 Conquista harvested at three different times: physiological maturity (R7), R7 + 7days and R7 + 15 days and stored in cold room (10 °C, 45-50% of air RH) and climatic chamber (25 °C) were used. In the first experiment, in order to obtain information on the structural and physiological damage caused by storage and harvest, the soybean seeds were electromicrographed using an electron microscope scanning and the seed vigor evaluated quarterly using the germination (rolled paper towel and sand as substrate) and vigor (electrical conductivity, tetrazolium, accelerated aging and field seedling emergence) tests. Also the seed water content was determined. In the second experiment, the assessment profiles of the bands of esterase, malate and glutamate dehydrogenase enzymes were also quarterly evaluated. For that, 10 embryonic axes were extracted for each treatment to run electrophoretic analysis. According to the results obtained, it can be concluded that: soybean seeds stored under adverse conditions, in the field after R7 stage and stored at 25 °C for 12 months reduced their physiological potential, damaging the seed coat structure; soybean seeds harvested at different times with high vigor may influence isoenzymatic patterns in response to the storage; the enzyme analyses were sensitive to evaluate the physiological potential, indicating the begin of soybean seed deterioration in function of storage and harvest times; the activity of esterase, malate and glutamate dehydrogenase enzymes may be influenced by time and storage temperatures.

Palavras-Chave: *Glycine max*, physiological potential, vigor, seed, enzyme.

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O Brasil semeou na safra 2008/09 21,73 milhões de hectares. A produtividade nacional foi de 2,629 Kg.ha⁻¹ e a produção nacional ficou em torno de 57 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

Dentre os diversos fatores que contribuíram para o excepcional avanço da produção e produtividade da cultura da soja no Brasil e no mundo, o uso de sementes de alta qualidade teve papel de destaque. Constitui-se num dos insumos mais importantes para a agricultura, além de ser o principal veículo que leva ao agricultor todo potencial genético de uma cultivar com características superiores (KRZYZANOWSKI et al. 2006). Assim, a utilização de sementes de boa qualidade é base para o sucesso de todas as outras operações, necessárias na lavoura para que possa alcançar altos rendimentos.

Deve-se considerar que a qualidade da semente é influenciada por vários fatores durante as etapas de produção. Deste modo, empresas produtoras de sementes vêm buscando novas tecnologias para assegurar que os melhores lotes de sementes sejam comercializados e disponibilizados aos sojicultores.

Diante do exposto, programas de controle de qualidade sempre foram importantes, uma vez que o mercado de sementes em geral torna-se extremamente competitivo a cada dia, onde se destacam empresas preocupadas em assegurar ao agricultor cultivares modernas, geneticamente puras e principalmente, de alta qualidade fisiológica e sanitária, bem como, produtividade.

Contudo, um dos principais desafios da pesquisa sobre qualidade de semente refere-se à identificação de processos deteriorativos intimamente relacionados com a perda da capacidade germinativa que comprometem o estabelecimento de estande adequado de plantas, o qual pode interferir na produtividade da lavoura.

Dentro deste contexto, destaca-se o estudo de enzimas envolvidas no processo de deterioração, o que pode possibilitar a detecção dos estádios iniciais desse

processo, por meio da atividade de enzimas associadas com a degradação e oxidação de substâncias de reserva bem como biosíntese de novas substâncias.

Assim, a avaliação do vigor por meio de diferentes procedimentos e o uso de técnicas moleculares, pode ser ferramenta importante na avaliação do potencial fisiológico de semente.

Justifica-se assim a presente pesquisa que tem por objetivos avaliar alterações bioquímicas e histológicas em sementes de soja sob diferentes épocas de colheita a partir do estágio de maturidade fisiológica (R7, R7+7 e R7+15) e condições de armazenamento (10 °C e 25 °C) por meio de testes de vigor, análise estrutural (microscopia eletrônica de varredura) e análise izoenzimática.

2. Deterioração de semente

A maturidade fisiológica estabelece importante transição na vida da semente, pois, em período relativamente curto, vence a etapa que conduz ao máximo potencial de desempenho, revertida em seguida para outra, caracterizada por metabolismo degenerativo cuja consequência final e mais drástica é a perda da viabilidade.

Antes da maturidade fisiológica a composição bioquímica da semente é mais simples e, desta forma, a semente é capaz de embeber água rapidamente para iniciar a cadeia de reações enzimáticas necessárias para converter material de reserva em formas capazes de iniciar a germinação (AJAYI & FAKOREDE, 2000).

Neste contexto, a deterioração, quando considerada no plano de uma semente, evidencia-se a redução na velocidade de germinação (PERRY, 1978). Outras consequências imediatas da deterioração sobre a semente são o aumento na condutividade de soluções aquosas obtidas a partir de exsudados da semente em função da desorganização das membranas celulares, aumento das áreas mortas, conforme detectado pelo teste de tetrazólio, redução da capacidade de germinação (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999; FRANÇA NETO et al., 1999), decréscimo na tolerância a condições ambientais sub-ótimas durante a germinação, redução no crescimento e/ou vigor das plântulas, aumento do número de plântulas anormais, maior suscetibilidade a ataques de microrganismos patogênicos, emergência desuniforme,

modificações na coloração das sementes, diminuição do potencial de armazenamento, completa perda da capacidade germinativa e a morte das sementes (WILSON & McDONALD, 1986; BASAVARAJAPPA et al., 1991; DELOUCHE & BASKIN, 1973).

Uma vez considerado que o potencial fisiológico da semente é máximo por ocasião da maturidade; constata-se que a partir deste momento processos degenerativos e irreversíveis começam a ocorrer após a semente ter atingido seu nível de máxima qualidade mesmo antes que seja realizada a sua colheita (ABDUL-BAKI & ANDERSON, 1972), ainda considerado com alto teor de água; 50-55%.

A semente, como todo ser vivo, deteriora-se naturalmente com o passar do tempo. Em condições ambientais favoráveis para atividade metabólica (alta umidade relativa do ar e temperatura), o fenômeno da respiração é o principal responsável pela deterioração (STEELE et al., 1969).

Essas alterações, que podem ser de natureza física, fisiológica ou bioquímica, caracterizam a deterioração, sendo a perda da capacidade germinativa uma das suas consequências finais. Portanto, a manutenção da qualidade da semente durante o período de armazenamento é aspecto a ser considerado dentro do processo produtivo de qualquer cultura, visto que o sucesso da lavoura depende, principalmente, da utilização de semente com alto padrão de qualidade (VIEIRA et al., 1994; FREITAS et al., 2004). Além disso, as condições de temperatura e umidade relativa do ar, durante o armazenamento, são de grande importância na evolução da deterioração, a qual não pode ser evitada, mas pode ser minimizada no armazenamento sob condições adequadas, como controle de temperatura e umidade relativa do armazém (SANTOS et al., 2004). Inclusive COOLBEAR (1995) contesta a afirmação de que o processo degenerativo é irreversível. Segundo esse autor, para determinadas condições e nível de deterioração há possibilidade de atuarem mecanismos de auto-reparo.

Lotes de sementes com porcentagens de germinação semelhantes, mas com diferentes níveis de vigor, podem apresentar comportamentos diferenciados em relação ao armazenamento, em função do nível de vigor e dependendo das condições de armazenamento como observado em semente de algodão (PADUA & VIEIRA, 2001; 2002).

Neste sentido a detecção da deterioração de semente por intermédio de testes de vigor pode ser entendida como componente importante na avaliação do potencial fisiológico, contribuindo na solução de problemas da indústria de semente, tal como o armazenamento (WILSON & McDONALD, 1986; BERJAK & PAMMANTER, 2000).

Portanto, os testes empregados na avaliação do vigor de semente de soja são: teste de tetrazólio (FRANÇA NETO et al., 1999), condutividade elétrica (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999; AOSA, 2002), análise computadorizada de imagens (MARCOS FILHO et al., 2009), teste de deterioração controlada (KRZYZANOWSKI, 1999), teste de envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 1999).

Diante do exposto, os diferentes procedimentos supracitados, podem também auxiliar na detecção de danos que tenham estreita relação com a perda de controle da compartimentalização intracelular, o qual altera metabolismo, podendo causar a perda da viabilidade da semente (ROBERTS, 1972, MARCOS FILHO, 2005). Vários são os fatores que estão relacionados à permeabilidade das membranas, dentre os quais podem ser citados a idade da semente, sua condição fisiológica e física e, notadamente, a incidência de injúrias mecânicas (POWELL, 1986, VIEIRA et al., 2002).

Em se tratando de membranas celulares, vale ressaltar sua importância, ou seja, são fundamentais para vida. A membrana plasmática engloba a célula, define seus limites e matem as diferenças essenciais entre o citossol e o ambiente extracelular. Apesar das suas funções diferenciadas, todas as membranas biológicas têm uma estrutura geral comum (HENDERSON & STROUD, 2004).

Nas células, os ácidos graxos funcionam como uma reserva concentrada de alimento porque sua degradação produz cerca de seis vezes mais energia utilizável do que a degradação da glicose (relação peso/peso) e são armazenados na forma de gotículas de moléculas de trigliceróis, portanto, a função mais importante dos ácidos graxos em uma célula é participar na construção das membranas celulares (KOONIN & OLSON, 2004).

O processo de oxidação dos ácidos graxos presentes nas membranas celulares, particularmente dos insaturados, tem sido proposto como um dos principais mecanismos envolvidos no processo de deterioração de sementes de soja, uma vez que são ricas em lipídios (PRIESTLEY & LEOPOLD, 1983). O ataque oxidativo

geralmente inicia-se nos ácidos graxos polinsaturados (linoléico e linolênico) localizados na membrana plasmática e, desta forma, considera-se que o primeiro passo para a deterioração da semente seria a perda de integridade da membrana, levando ao aumento na sua permeabilidade e provocando o vazamento de solutos celulares durante o processo de embebição da semente (WILSON & McDONALD, 1986; BERJAK & PAMMANTER, 2000; TAIZ & ZAIGER, 2006).

Na presença de oxigênio, as cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos oxidam-se espontaneamente, produzindo radicais livres intermediários altamente reativos e grande variedade de outros produtos secundários resultantes da degradação dos hidroperóxidos, tais como aldeídos, ácidos, álcoois e cetonas (WILSON & McDONALD, 1986).

O aparecimento de radicais livres intracelulares é normal, durante o ciclo de vida das plantas, sendo essencial para muitos processos biológicos. São intermediários ou produtores de reações enzimáticas, principalmente na respiração e na fotossíntese e também fazem parte do evento em cascata formado em resposta a uma invasão microbiana (RICE-EVANS et al., 1991). No entanto, passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes antioxidantes.

Portanto, se a produção dos radicais não é controlada, eles podem tornar-se destrutivos para células e tecidos, podendo reagir com ácidos graxos insaturados das membranas e alterar a sua funcionalidade, além de diminuir a capacidade de fixação de carbono em cloroplastos e de promover peroxidação de lipídios, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucléicos (RICE-EVANS et al., 1991; SCANDALIOS, 1993; GOODMAN, 1994).

Além disso, pesquisas têm sido conduzidas com intuito de obter informações sobre as principais mudanças que ocorrem durante a deterioração (ABDEL SAMAD & PEARCE, 1978; McDONALD & WILSON, 1980; MATTHEWS & POWEL, 1981; DIAS & MARCOS FILHO, 1995).

3. Atividade enzimática

Todo organismo vivo é extremamente complexo e organizado. Cada parte tem um propósito ou função específica, seja esta uma estrutura complexa como um órgão ou aparelho, estruturas submoleculares ou mesmo moléculas individuais.

Os organismos vivos são capazes de extrair e utilizar energia do seu ambiente seja na forma de nutrientes orgânicos, seja na forma de luz solar. As células vivas são máquinas químicas muito complexas e organizadas, que funcionam a base de energia química. A energia utilizada por todo ser vivo pode vir de forma direta ou indireta. Os mais diferenciados organismos “fabricam” substâncias capazes de regular todo o seu conjunto complexo de reações químicas. As enzimas são capazes de realizar e controlar todos os processos bioquímicos que caracterizam um organismo vivo.

Enzimas são em sua maioria, proteínas com atividade catalítica. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Como catalisadores celulares extremamente poderosos, as enzimas aceleram a velocidade de uma reação, sem, no entanto participar dela como reagente ou produto (TAIZ & ZEIGER, 2006).

As enzimas atuam ainda como reguladoras deste conjunto complexo de reações. As enzimas são, portanto, consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular.

Na área de tecnologia de sementes várias pesquisas envolvendo alterações enzimáticas em semente de soja têm sido realizadas (ANDRADE & SOBRINHO, 1980; BRACCINI et al., 1997 e 2000; MAIA et al., 2000); visando evidenciar de modo claro e confiável o processo que levam as sementes de diferentes espécies à deteriorarem, bem como potencial fisiológico das mesmas. Um dos mecanismos exaustivamente estudados desde os primórdios da tecnologia de sementes sem duvidas são os testes de vigor, fundamentais para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, constituindo-se um dos fatores básicos para a tomada de decisão em programas de controle de qualidade de sementes conduzidos por empresas produtoras de sementes, com os resultados servindo como referência para locais e época de semeadura, descarte ou armazenamento (CARVALHO et al., 2000).

Levando em consideração o potencial fisiológico da semente, com máximo desempenho por ocasião da maturidade fisiológica; a partir deste momento processos degenerativos como degradação de reservas e deterioração de membrana, começam a mesmo antes que seja realizada a sua colheita (ABDUL-BAKI & ANDERSON, 1972). Redução do potencial fisiológico (germinação e vigor) de semente de soja após a maturidade fisiológica, particularmente devido ao retardamento de colheita já foi amplamente demonstrado pela pesquisa (SEDIYAMA et al., 1972; VIEIRA et al., 1982)

Dessa forma, pode-se dizer, que qualidade de um lote de sementes é o somatório de todos atributos envolvidos desde de sua formação, como destaca-se; físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários que resulta da interação de características que determinam o seu valor para semeadura (MARCOS FILHO, 1999; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Neste contexto, a eletroforese vem sendo utilizada no estudo de isoenzimas com relação não apenas às mudanças na qualidade fisiológica de sementes, mas também nas regulações gênica, bioquímica e ontogênica, entre outros (ISTA, 1992). Como excelentes catalisadores biológicos, as enzimas são ótimos indicadores de deterioração de sementes, visto que, aceleram a taxa das reações bioquímicas, contudo, as mesmas não se modificam com o processo (TAIZ & ZEIGER, 2006; MATHEWS & VAN HOLD, 1996 citados por TAIZ & ZEIGER, 2006). Toda via, as enzimas podem ser chamadas também de agentes da vida, termo muito importante, uma vez que controla quase todo ciclo vital do seres vivos (TAIZ & ZEIGER, 2006). As análises isoenzimáticas permitem uma avaliação dos eventos bioquímicos decorridos do processo de deterioração e durante a germinação (ALBUQUERQUE et al., 2009). O termo isoenzima foi relatado por MARKERT & MOLLER (1959) referindo-se às múltiplas formas moleculares de uma enzima, com afinidade para substratos idênticos ou similares, que ocorrem em um organismo.

Segundo WILSON Jr & McDONALD Jr (1986) em sementes deterioradas as células sofrem prejuízos em sua capacidade respiratória no início do processo germinativo. Isso ocorre devido à quebra do gradiente protônico necessário para manter o acoplamento respiratório em consequência de danos de membrana.

Portanto é comum o uso de marcadores bioquímicos na avaliação da qualidade fisiológica, genética ou sanitária de semente de diferentes espécies, sendo o mesmo recomendado pela Lei de Proteção de Cultivares conforme orientações de VIEIRA et al. (2009). Segundo esses autores, ressaltam que, para o emprego de descritores bioquímicos em testes de caracterização de cultivares, deve-se considerar o estado nutricional das plantas, o que garantirá a manifestação das características a serem avaliadas, minimizando o efeito ambiental.

O uso de enzimas para caracterização de lotes com diferentes níveis de deterioração, bem como à aplicação em sementes submetidas à diferentes testes, processos de secagem e instalação de campos de diferentes espécies cultivadas são amplamente utilizados, como: hidratação de sementes de ervilha (COSTA, et al., 2008), profundidade de semeadura de semente de arroz (MALONE, et al., 2007), identificação de cultivares de sementes de milho, feijão, algodão e soja (MENEZES et al., 2008) e secagem de semente de milho (JOSÉ et al., 2004).

A análise por isoenzimas é uma técnica acessível e que fornece ampla informação genética para diversas aplicações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Ela tem sido utilizada na avaliação de alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes armazenadas (CAMARGO et al., 2000; SANTOS et al., 2005). A atividade enzimática pode indicar transformações degenerativas nas sementes.

No sistema enzimático, relacionado com a deterioração de semente, merecem destaques as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) removedoras de radicais livres e de peróxidos, bem como a malato desidrogenase (MDH), fosfatase ácida (EC), glutamato desidrogenase (GDH) que funcionam como indicadores de deterioração, uma vez que estão envolvidas no metabolismo celular.

Entretanto, neste objeto de pesquisa, foi estudado apenas a malato desidrogenase, glutamato desidrogenase e esterase (EST)

ALBUQUERQUE et al. (2009) trabalhando com dois lotes de sementes de sucupira preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) colhidas em 2001 (Lote A) e 2003 (Lote B) e armazenados em temperatura ambiente e câmara tipo BOD respectivamente, observaram que a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não apresentou alteração no perfil enzimático para ambos os lotes. Uma vez que a superóxido

dismutase pode auxiliar na proteção dos efeitos deletérios da formação de radicais superóxidos livres, combatendo-os (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989, McDONALD, 1999). Os radicais superóxidos livres podem ser muito reativos e inferir na ação dos lipídios, ácidos nucleicos e membranas de tecidos vegetais e animais (LEHNINGER, 2006).

Já a catalase (CAT), é uma enzima intracelular, encontrada no glioxissoma nos vegetais, com capacidade de transformar formas reativas de oxigênio em formas inofensivas, bem como a decomposição do peróxido de hidrogênio (LEHNINGER, 2006). ALBUQUERQUE et al. (2009) relataram diferenças na atividade enzimática para essa enzima quando sementes de sucupira preta foram submetida à embebição, onde foi observado maior atividade enzimática para o lote B sendo a mesma reduzida à medida que as sementes avançavam no processo de germinação. Nas sementes do lote A observaram comportamento inverso da atividade enzimática, sugerindo-se uma recuperação da sua atividade ao longo da germinação. De acordo com JENG & SUNG (1994), quando a semente é envelhecida, ocorre maior peroxidação dos lipídios e redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos, sugerindo que a diferença observada entre os lotes está relacionada com a idade das sementes. Entretanto, MENEZES et al. (2008) trabalhando com atividade enzimática para identificação de cultivares, conseguiram separar por meio da atividade da catalase 11 híbridos de milho em seis grupos independente de sua qualidade fisiológica.

A peroxidase (POX), assim como a catalase, têm papel importante na desintoxicação celular ao eliminar o peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio (LEHNINGER, 2006).

A malato desidrogenase (MDH), atua com a fosfoenolpiruvato carboxilase para a redução de oxaloacetato à malato, tendo importante função no Ciclo de Krebs para a produção de *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH), além de participar do movimento da malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (TAIZ & ZEIGER, 2006; SANTOS et al., 2004). FERREIRA et al. (2007) trabalhando com bioestimulante em híbridos de milho, observaram pela análise dos padrões enzimáticos para malato desidrogenase (MDH), menor atividade da enzima nas sementes tratadas com a dose mais alta de bioestimulante seis meses antes da

semeadura, comparado aos padrões da testemunha e aos das tratadas na pré-semeadura, indicando menor atividade respiratória nessa condição.

A fosfatase ácida (EC) é uma hidrolase que participa em reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação destes lipídeos, o que está relacionado com decréscimo no número e ou intensidade de bandas quando submetidas ao envelhecimento acelerado, (SPINOLA et al., 2000), FREITAS et al. (2006), concluíram que o aumento do período de envelhecimento artificial promove decréscimos na viabilidade, no vigor e na atividade de fosfatase ácida. Outra enzima que também participa da hidrólise de ésteres, é a esterase (EST) SHATTERS et al. (1994) trabalhando com sementes de soja, observaram perda de 77% da atividade de duas esterases após 48 horas de envelhecimento e aumento da atividade total dessa enzima com desenvolvimento, já FERREIRA et al. (2007) observaram que a atividade da esterase foi maior nas sementes que receberam a maior dose de bioestimulante em sementes de híbrido de milho antes do período de armazenamento (seis meses). Por outro lado, SANTOS et al. (2004) constataram em diferentes lotes de semente de feijão envelhecido artificialmente que a atividade da enzima esterase no período zero foi mais elevada no lote 1, demonstrando que as sementes deste lote apresentavam maior peroxidação de seus lipídios de membrana, causando um aumento na permeabilidade das membranas e em processo deteriorativo maior do que o lote 2. A atividade desta enzima para os lotes 1 e 2 foi máxima, em 46 e 58 horas de envelhecimento, respectivamente, a partir dos quais ocorreu diminuição na atividade desta enzima. O lote 1 apresentou maior valor de atividade quando comparado ao lote 2.

Segundo SANTOS et al. (2004), alterações nos padrões da enzima esterase evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes à medida que são aumentados os níveis de fatores adversos de temperatura e teor de água das sementes no processo de envelhecimento, pois a esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios.

A atividade da glutamato desidrogenase (MDH), é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs, produção de NADPH e/ou na

redução do α -cetoglutarato para síntese de aminoácidos, VIEIRA et al. (2009), encontrou como promissores indicadores do estágio de deterioração de sementes de algodoeiro as variações eletroforéticas de proteínas e das enzimas glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase e 6-fosfogluconato. Segundo SANTOS et al. (2004) em trabalho realizado com sementes de feijão envelhecida artificialmente, constataram que a atividade da glutamato desidrogenase no período zero apresentou-se mais elevada no lote 1, demonstrando que a atividade respiratória das sementes de lote estava mais elevada, caracterizando um processo deteriorativo mais avançado, quando comparado ao lote 2. Portanto, a atividade desta enzima foi superior no lote 1 até 72 horas, no entanto, a partir desse período foi semelhante para os dois lotes. Esta enzima é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs, produção de NADPH e/ou na redução do α -cetoglutarato para síntese de aminoácidos (LEHNINGER, 2006). O estresse provocando pelo período de 96 horas de envelhecimento artificial não foi suficiente para diminuir a atividade desta enzima, em ambos os lotes, sendo esta a menos afetada pelos períodos de estresse, embora tendendo para a estabilização, sendo máxima após 87,5 horas, para o lote 1 e 90 horas para o lote 2. (SANTOS et al., 2004).

CAPÍTULO 2 – ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA TESTA DE SEMENTES DE SOJA SOB DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA E ARMAZENAMENTO

RESUMO - No campo, a semente está sujeita a diversos fatores que poderão prejudicar o potencial fisiológico antes e durante a colheita, na secagem, no processamento, no armazenamento e na semeadura. O objetivo deste trabalho foi monitorar a deterioração, bem como, analisar a morfologia da testa de sementes soja durante o armazenamento. Para tanto, foram utilizadas sementes da cultivar de soja MGBR-46 Conquista colhidas em três épocas: maturidade fisiológica-R7, R7+ 7 dias e R7 + 15 dias e armazenadas em câmara fria (10 °C, 45-50% UR do ar) e câmara climatizada (25 °C, 60-75% UR do ar). Decorrido o período de armazenamento, as sementes foram eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura, assim como se determinou o potencial fisiológico das sementes utilizando-se os testes de germinação (papel e areia) e de vigor (condutividade elétrica, tetrazólio, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo), bem como teor de água. Para realização das eletromicrografias foram realizados cortes transversais nas sementes, seguido de metalização com ouro. Os cortes da testa mostraram estruturas altamente organizadas, com cutícula, epiderme (células paliçádicas ou macroesclerídeos), hipoderme (células em ampulheta ou células pilares ou osteoesclerídeos) e células parenquimatosas. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que: o armazenamento sob condições adversas de sementes de soja no campo, após o estágio R7 e no armazém a 25 °C durante os 12 meses de armazenamento reduziu seu potencial fisiológico danificando a estrutura da testa; e o potencial fisiológico foi mantido a 10 °C (45-50% UR do ar) durante os 12 meses de armazenamento.

Palavras-Chave: Armazenamento, *Glycine max*, potencial fisiológico, semente, vigor.

1. Introdução

A maturidade fisiológica estabelece importante transição na vida da semente, pois, em período relativamente curto, vence a etapa que conduz ao máximo potencial de desempenho, reverte-se em seguida para outra, caracterizada pelo metabolismo degenerativo cuja consequência final e mais drástica é a perda total da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005).

No campo, as sementes estão sujeitas a diversos fatores que poderão prejudicar sua qualidade antes e durante a colheita, na secagem, no processamento, no armazenamento e na semeadura (COPELAND & McDONALD, 1995; FRANÇA NETO et al., 1999). Tais fatores abrangem extremos de temperatura durante a maturação, flutuações na umidade relativa do ar, deficiências na nutrição das plantas, presença de insetos que, de certa forma acarretam perda da compartimentalização celular, desintegração do sistema de membranas com descontrole no metabolismo e nas trocas de água e solutos entre as células e meio exterior, determinando a queda do potencial de desempenho da semente (MARCOS FILHO, 1999b; PESKE et al., 2006; KRZYZANOWSKI et al., 2008).

Sabe-se, que após a maturidade fisiológica, a semente pode ser considerada como armazenada em campo enquanto a colheita não se processa. Se as condições climáticas forem favoráveis desde a maturidade fisiológica até a época normal de colheita, os problemas de deterioração de certa forma são amenizados (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO 2005), entretanto, o que se tem verificado é a redução do potencial fisiológico (germinação e vigor) tendo em vista os efeitos do retardamento de colheita (SEDIYAMA et al., 1972ab; VIEIRA et al., 1982, 1983).

Neste contexto, a deterioração de semente pode ser vista como complexas mudanças que ocorrem a partir da maturidade fisiológica, causando prejuízos à sistemas e funções vitais, resultando na diminuição da capacidade de desempenho da semente até a morte total. A duração do processo de deterioração é determinada principalmente pela interação genética, teor de água da semente e temperatura (DELOUCHE, 2002).

Dentre as diferentes funções do tegumento, podem-se citar algumas de extrema importância, como, proteção do eixo embrionário e tecido de reserva, regular a velocidade de trocas gasosas e da velocidade de hidratação (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). A exposição da semente a ciclos alternados de elevada e baixa umidades (ciclos de hidratação) antes da colheita, devido a ocorrência de chuvas frequentes e assim, de flutuações diárias da umidade relativa do ar, resultará na sua deterioração por umidade. Como resultado ocorre a formação de rugas nos cotilédones, na região oposta ao hilo (FRANÇA NETO et al., 2007).

O corte transversal da testa da semente de soja permite distinguir quatro camadas a partir da sua superfície: cutícula, epiderme (células paliçádicas ou macroesclerídeos), hipoderme (células em ampulheta ou células pilares ou osteoesclerídeos) e células parenquimatosas (SWANSON et al., 1985 citado por SILVA et al., 2008). O conhecimento das células que compõem o tegumento torna-se importante porque é através dele que a água também pode atingir o embrião de semente de soja, passando principalmente através da testa, região hilar, dorsal e ventral (CHACHALIS & SMITH, 2000).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar alterações estruturais da testa de sementes de soja da cultivar MGBR-46 Conquista originárias de três épocas de colheita e submetidas a duas condições de armazenamento.

2. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal e de Microscopia Eletrônica de Varredura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Foram utilizadas sementes da cultivar de soja MGBR-46 Conquista semeadas numa área de 0,5 ha em meados de outubro do ano de 2007 na fazenda de ensino e pesquisa da UNESP, Câmpus de Jaboticabal (SP) e colhidas em três épocas a partir da maturidade fisiológica: Estádio de desenvolvimento R7, R7+ 7 dias e R7+15 dias. Após a colheita e debulha manual, as sementes foram limpas, classificadas, homogeneizadas

e acondicionadas em embalagem de papel multifoliado e armazenadas em câmara fria (10 °C 45-50% UR do ar) e câmara climatizada (25 °C 60-75% UR do ar) por 12 meses.

Os dados de precipitação pluvial e umidade relativa do ar (UR%), observados no período que o experimento estava no campo, encontram-se na Figura 1. Para a caracterização inicial da qualidade de semente, foram realizadas as seguintes determinações: teor de água, germinação (papel e areia) (BRASIL, 1992), condutividade elétrica (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999), teste de tetrazólio (vigor e viabilidade) (FRANÇA NETO et al., 1999), teste de envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 1999) emergência de plântulas em campo (NAKAGAWA, 1999), bem como à avaliação trimestral após armazenamento por meio dos testes supra citados e análise ultra-estrutural de semente.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por época de colheita e temperatura de armazenamento. A comparação entre o potencial fisiológico das sementes foram feitas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Na execução das análises estatísticas foi utilizado o programa computacional ASSISTAT - Assistência Estatística (SILVA & AZEVEDO, 2006).

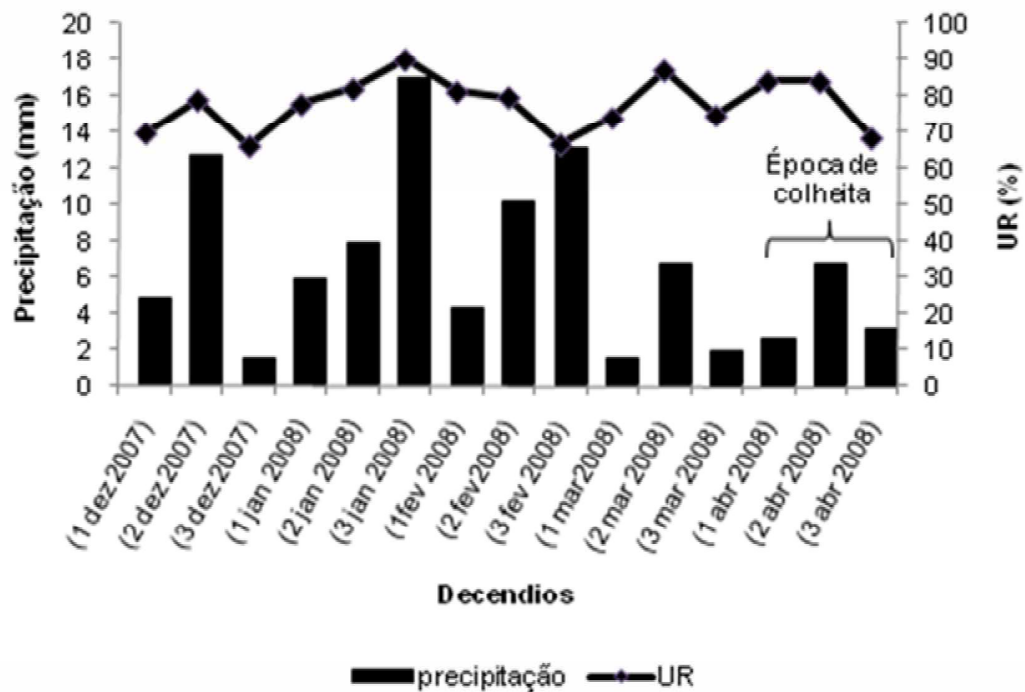


Figura 1. Dados meteorológicos por decêndios da fazenda de ensino e pesquisa da UNESP, Câmpus de Jaboticabal (SP), durante o período experimental.

Teor de água (base úmida): Foi determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 h, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Teste de tetrazólio: Foi conduzido em duas subamostras de 50 sementes para cada tratamento, pré-condicionadas em papel de germinação, tipo germitest, umedecidos e mantido nestas condições por 16 h a 25 °C. Posteriormente foram transferidas para copos plásticos (capacidade 50 mL) com solução de 2, 3, 5 trifetil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% e mantidas em câmara escura por 2 h e 30 min a 40 °C. Vencido este período, as sementes foram lavadas em água corrente e logo em seguida, avaliadas de forma individual com corte longitudinal ao eixo embrionário (FRANÇA NETO et al., 1999).

Teste de germinação: Foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, utilizando como substrato papel de germinação, tipo *germitest*, umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes seu peso seco e colocados em germinador previamente regulado a 25 °C. A avaliação foi realizada no quinto dia após semeadura (BRASIL, 1992).

Teste de germinação em areia: Foi conduzido em quatro repetições de 50 sementes para cada amostra, semeada em caixas de plástico com areia como substrato, mantidas em temperatura ambiente variando de 25–30 °C). A avaliação foi realizada no quinto dia após semeadura (BRASIL, 1992).

Teste de condutividade elétrica: Utilizou-se o método de condutividade elétrica de massa, com quatro repetições de 50 sementes puras para cada lote. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos plásticos (capacidade de 200 mL), contendo 75 mL de água desionizada, por 24 h a 25 °C. Vencido esse período, a condutividade elétrica da solução de embebição foi determinada em condutivímetro DIGIMED - DM 31 e os resultados expressos em $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

Teste de envelhecimento acelerado: Foram utilizados 42g de sementes, distribuídos em camada única sobre a tela de inox, no interior da caixa plástica de germinação, mantidas à temperatura de 41 °C e umidade relativa do ar de aproximadamente 100% por 48 h (MARCOS FILHO, 1999). Posteriormente as sementes foram posta a germinar, conforme relatado para o teste de germinação.

Teste de emergência de plântulas em campo: Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote. Antes da semeadura, foi efetuado o tratamento das mesmas com carbendazin + thiram na proporção de 2,5 mL do produto comercial, mais 2,5 mL de água para cada kg de sementes (HENNING, 2004). As sementes foram semeadas no espaçamento 0,45 m entre linhas, profundidade de 3-4 cm. A avaliação foi realizada no 21º dia após semeadura (NAKAGAWA, 1994).

Avaliação estrutural: Para a realização das eletromicrografias da testa, foram feitos cortes transversais na região mediana da semente circundando a região do hilo, com lâmina de aço. O material foi metalizado com ouro paládio, sem prévia fixação e desidratação, por apresentar-se seco. Para a realização das eletromicrografias, foi usado microscópio eletrônico de varredura, marca JEOL, modelo JFM 5410. Para cada período de armazenamento foram eletromicrografadas quatro sementes, sendo que de cada semente foi obtido corte da seção transversal com 350 vezes de aumento. Para cada uma das camadas, de cada semente eletromicrografada, foram feitas cinco medições, usando *Adobe photoshop* 5.0, registrando os valores em mm, posteriormente transformados em μm .

3. Resultados e discussão

Na Tabela 1 são apresentados resultados da caracterização inicial das sementes de soja, cultivar MGBR-46 conquista, quanto à germinação, emergência de plântulas em areia e em campo, condutividade elétrica (CE), tetrazólio (vigor), envelhecimento acelerado, bem como teor de água

Verificou-se que as sementes usadas no presente estudo apresentavam elevado potencial fisiológico, considerando os resultados dos testes de germinação, emergência de plântulas em campo e de CE em R7 e R7+7. Sementes de soja com CE até $70\text{--}80 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ têm sido consideradas como de alto vigor (VIEIRA et al., 1994) e VANZOLINI et al. (2006) em trabalho com sementes de soja, consideraram de baixo vigor CE de $90 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, indicando ainda, que valores de CE não seja acima deste valor. Já França Neto et al (1999) classifica como vigor muito alto, sementes de soja, avaliadas pelo teste de tetrazólio (TZ), cujo valor seja igual ou maior que 85% no nível 1-3 do referido teste. Somente as sementes colhidas em R7+15 não se enquadraram na categoria de alto vigor, exceto considerando os resultados do TZ (vigor) conforme recomenda FRANÇA NETO et al. (1999).

Nas Figuras 2 (A, B, C e D), são apresentados os dados referentes à espessura das camadas das sementes em ambiente controlado (10 e 25 °C) durante 12 meses de armazenamento.

Observa-se que houve decréscimo gradativo do teor de água (TA) durante os 12 meses de armazenamento nas diferentes épocas colheitas, em média de 3,7 pontos percentuais em 12 meses para sementes armazenadas à temperatura de 10 °C e 3,4 para aquelas armazenadas à 25 °C. A redução no teor de água em função do armazenamento ocorreu tendo em vista que os ambientes de armazenamento apresentavam baixa umidade relativa do ar, como câmara fria (45-50%). VANZOLINI et al. (2007) acreditam que variações a partir 0,7 pontos percentuais pode interferir nos resultados do teste. Segundo SOUZA & PESKE (1999) o TA aumenta quando as sementes de soja são armazenadas em ambiente com umidade relativa do ar entre 60-90%, nesse caso o teor de água passou de 9,2 para 12,0%. Esses mesmos autores (SOUZA & PESKE, 1999) afirmam também, que o TA influencia o comportamento da semente quando submetida a diferentes situações que acompanham as etapas de produção em campo e na pós-colheita, bem como, no armazenamento.

O TA após o envelhecimento acelerado apresentou variação dentro de parâmetros considerados adequados, com variação de 22,3 e 26,1% para os tratamentos avaliados no 9º e 12º mês à temperatura de 10 °C, respectivamente (Figura 3). Essa variação no teor de água da semente é consequência de uma combinação de fatores (VERTUCCI, 1989), a velocidade de penetração de água é controlada basicamente pelo TA na semente, temperatura ambiente e taxa de absorção de água. Isso pode, portanto determinar variações nos resultados do TA. Porém, MARCOS FILHO (1999a), afirma que variações de 3 a 4 pontos percentuais entre amostras são toleráveis, garantindo qualidade aos resultados da avaliação. Este fator não depende apenas do ambiente e inclui características intrínsecas da semente, provavelmente relacionadas à qualidade fisiológica.

Tabela 1. Teor de água (TA), germinação (G), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia e no campo, tetrazólio - vigor e viabilidade e condutividade elétrica (CE) de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, anterior ao armazenamento a 10 e 25 °C ⁽¹⁾.

Época de colheita	TA	G	Emergência			Tetrazólio		CE
			Areia	Campo	vigor	viabilidade		
----- %-----								
R7	12,1	98a	99a	96a	89a	93a	97 ^a	49,4b
R7+7	12,1	91a	92a	92a	89a	95a	97 ^a	53,2b
R7+15	12,2	75b	71b	78b	82a	92a	94 ^a	61,5a
CV%	-	7,4	4,5	4,5	6,20	3,64	2,93	5,35
DMS	-	12,8	7,8	7,9	10,6	6,7	5,5	5,8

⁽¹⁾ Média seguida pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

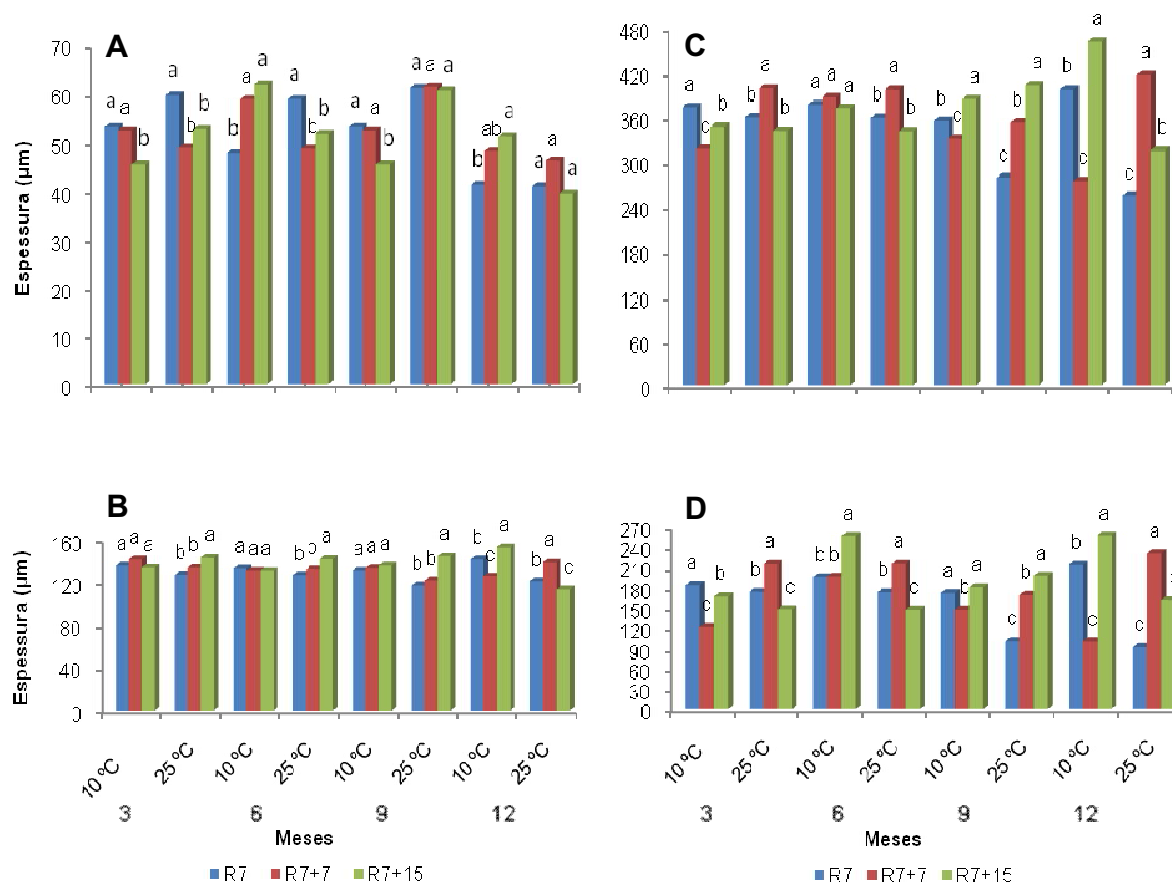


Figura 2. Espessura das camadas parenquimática (A), paliádica (B), total (C) e hipoderme (D) da testa de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, armazenadas às temperaturas de 10 °C e 25 °C avaliadas durante 12 meses. Médias seguidas pela mesma letra, entre colunas da mesma temperatura e armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com base nos dados da Figura 3, pode-se notar que ocorreram reduções expressivas do TA a partir dos seis meses de armazenamento, onde o estágio R7, armazenado a 25 °C apresentou 11,3% inicialmente e 25,9% após envelhecimento, contudo, aos 12 meses de armazenamento, o TA sementes apresentava-se entre 8,4 e 8,7% em média nas temperaturas de 10 e 25 °C respectivamente, não obstante, após envelhecimento esse mesmo material aos 12 meses de armazenamento, nas temperaturas de 10 e 25 °C também apresentaram teores de água, similares aos anteriores 28,0% e 26,5% respectivamente e 27,1% para o estágio R7+15 à

temperatura de 10 °C (Figura 3). VIEIRA et al. (2004) trabalhando com sementes de soja, verificaram teores de 8,1 a 11,3% antes do envelhecimento acelerado e de 25,1 a 27,4% após. Deve-se ressaltar que o teor de água em câmara de germinação tipo BOD apresenta padrão inferior aquele obtido em câmara de envelhecimento jaquetada de água, visto que a UR do ar internamente é maior na segunda câmara, conforme já observado por SCAPPA NETO et al. (2001) e VIEIRA et al. (2005).

Entretanto, deve-se salientar que sementes armazenadas à temperatura de 25 °C apresentaram perda de água de forma menos intensa em relação às sementes armazenadas a 10 °C, onde, durante nove meses, essas sementes apresentavam médias 12,2% de água (Figura 3). Logo, como parte do procedimento, as sementes que se encontravam armazenadas à temperatura de 25 °C foram transferidas para câmara fria, previamente regulada a 10 °C, onde, a partir daí, nota-se queda de 3,5 pontos percentuais no 12^o mês de armazenamento, reduzindo assim, a 8,7% em média o TA para sementes armazenadas nestas condições. De acordo com CARVALHO & NAKAGAWA (2000), mudanças na temperatura e umidade relativa do ar provocam constantes ajustes no teor de água das sementes armazenadas, alterando o equilíbrio higroscópico das mesmas. No caso particular, as condições da câmara fria eram dessecantes, o que ficou comprovado pelos resultados, já que as sementes estavam embalagens (saco de papel) que permitiam a troca de umidade com o meio.

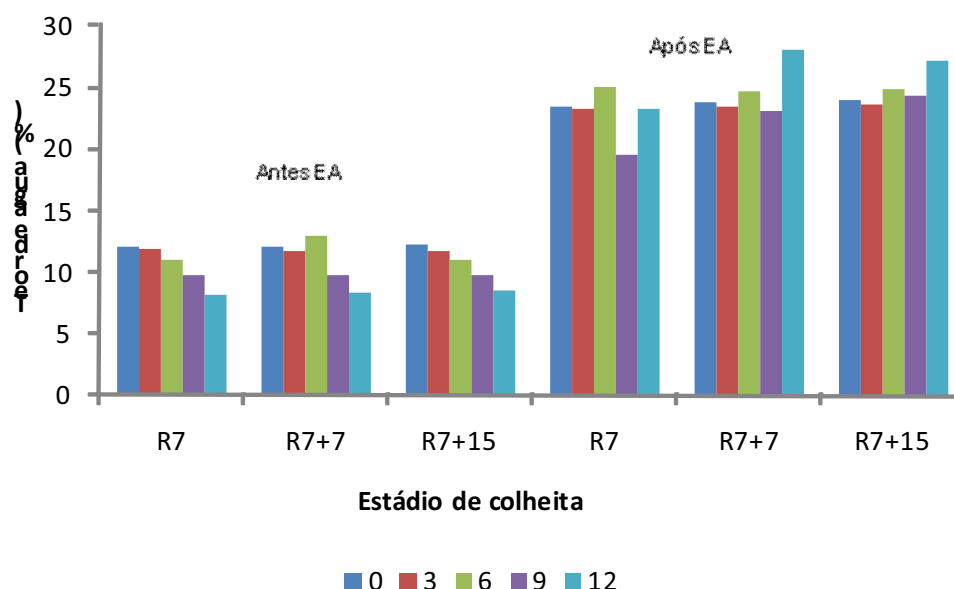


Figura 3. Teor de água antes e após envelhecimento acelerado (EA) de semente de soja, cultivar MGBR-46 Conquista durante 12 meses de armazenamento.

O tempo que as sementes demoram a alcançar ou manter equilíbrio higroscópico depende intimamente da permeabilidade da testa, bem como, da temperatura e umidade relativa do ar onde se encontram armazenadas. Algumas sementes são mais suscetíveis que outras. Sementes de soja são altamente sensíveis, contudo, o tegumento ou testa da semente possui a função de protegê-la fisicamente, bem como regular trocas gasosas e de umidade com o meio exterior (PESKE et al., 2006). De forma geral, a testa, derivada de um ou dos dois integumentos do óvulo, cuja estrutura pode auxiliar na proteção e regulação da entrada e saída de gases, bem como água.

A camada epidérmica mais externa na testa de sementes de soja madura é a camada paliçádica; os macroesclereídeos formam camada única de células de paredes espessas que são alongadas perpendicularmente à superfície da semente. Internamente à camada paliçádica encontra-se a hipoderme, camada única de células de paredes grossas, células em forma de ampulheta ou osteoesclerídeos. A porção mais interna da testa de semente de soja propriamente dita constitui-se de camada

multicelular de parênquima parcialmente achatada com considerável espaço intercelular (MILLER et al., 1999; SILVA et al., 2008; MERTZ et al., 2009).

Nas Figuras de 10 a 15, são apresentadas eletromicrografias de cortes transversais da testa de sementes de soja, cultivar MRBR-46 Conquista, em aumento de 350 vezes, onde se observa claramente as três camadas epidérmica (paliádica), hipoderme (ampulheta ou osteoesclerideos) e parênquimática, como observados por MERTZ et al (2009), contudo, nesse estudo, não foi possível avaliar a cutícula, que é a primeira camada do tegumento devido ao aumento utilizado pelos autores para observações, 40x.

Observando a Figura 2 (A, B, C e D), nota-se grande variação na espessura das três camadas e a espessura total em relação ao período de armazenamento e estágio de colheita, como por exemplo, camada paliádica (Figura 1B) a temperatura de 25 °C apresentou diminuição na espessura com o armazenamento, onde as sementes colhidas em R7 apresentou decréscimo de 10 µm, passando de 127,3 a 117,35 µm no nono mês e 121,3 µm no 12º mês de avaliação (Figura 13A, B,C,D).

A redução da espessura das camadas sugere a ocorrência de um colapso das células que compõem tais camadas, o que pode estar relacionado com a redução do potencial germinativo, ao se considerar o referido colapso como um dano físico às células e, conseqüentemente, à testa (SILVA et al., 2008). Existem diferenças entre as estruturas da testa de semente entre genótipos de soja, as quais podem estar relacionadas à permeabilidade da mesma e indiretamente relacionadas à qualidade de semente (SOUZA & MARCOS FILHO, 2001; MERTZ et al., 2009).

Nota-se, porém, diferença nos resultados quando se considera as colheitas aos 12 meses de armazenamento para camada paliádica, ocorrendo variação da espessura na temperatura de 10 °C, contudo, o maior valor registrado foi para estágio R7+15 153,3 µm seguido de R7 142,3 µm e por ultimo, R7+7 126,0 µm (Figura 2B; Figuras 10, 11, 12, e 13).

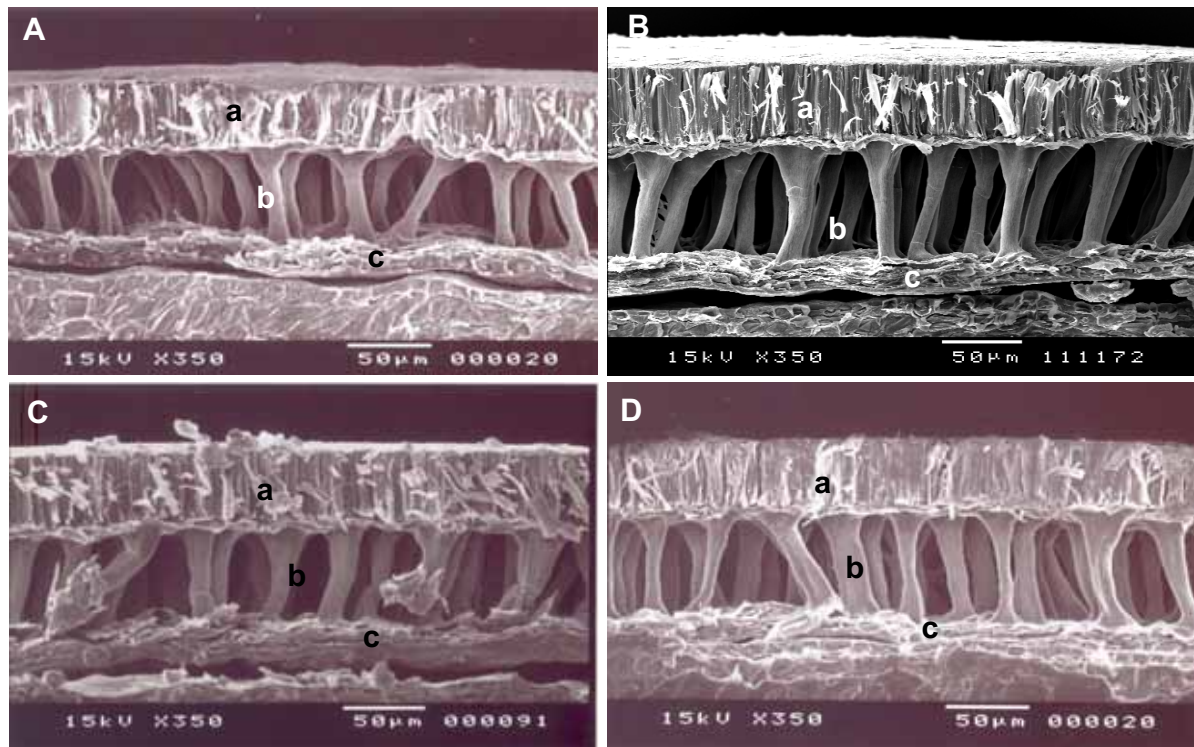


Figura 10. Eletromicrografias de varredura da testa de quatro (A, B, C e D) sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, colhidas no estágio de desenvolvimento R7, armazenadas a 10 °C, exibindo pouca alteração de espessura na camada hipodérmica, em A; camada hipodérmica de espessura menor, em B; camada hipodérmica de espessura maior, em C e D. (a=camada paliçádica; b= hipoderme e; c=parênquima lacunoso).

Diferentemente, de SILVA et al. (2008) e CAVARIANI et al. (2009), que encontraram valores próximos de espessuras nos respectivos trabalhos, esse fato não foi observado nesta pesquisa, uma vez que existe diferença na composição estrutural da semente, produzida em diferentes regiões, bem como a diferença entre genótipos, acessos, cultivares (PEREIRA & ANDREWS, 1985; NOODÉN et al., 1985; CAVARIANI et al., 2009; MERTZ et al., 2009). A alteração anatômica da camada hipodérmica de semente armazenada pode de alguma forma, estar relacionada com a redução do potencial fisiológico, pois o colapso das células da hipoderme pode ser visto como dano físico na testa (SILVA et al., 2008).

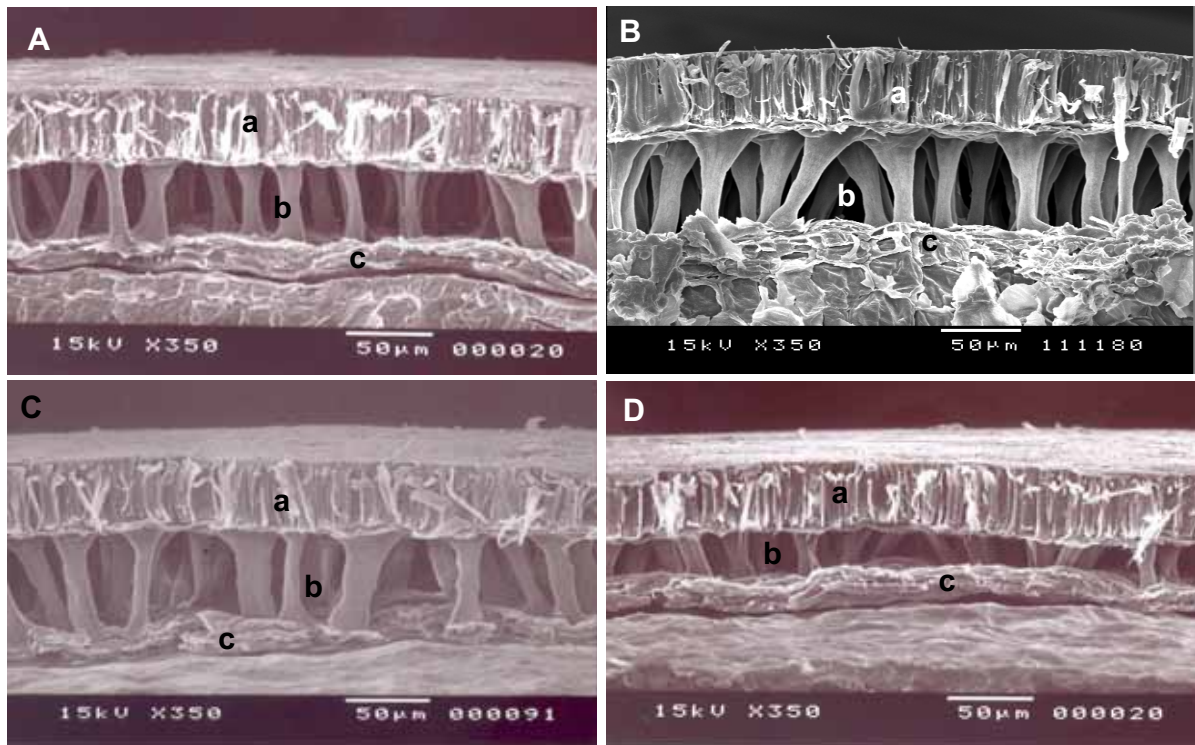


Figura 11. Eletromicrografias de varredura da testa de quatro (A, B, C e D) sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, colhidas no estágio R7+7, armazenadas 10 °C, exibindo pouca alteração de espessura na camada hipodérmica, em A e B; camada hipodérmica de espessura menor, em C e D. (a=camada paliçádica; b= hipoderme e; c=parênquima lacunoso).

A espessura da testa de semente apresenta variações entre espécies e entre cultivares na mesma espécie. Esta característica tem controle genético (CAVARIANI et al., 2009).

Já para a espessura total das camadas, apresentaram leve redução quando armazenadas à temperatura de 25 °C no 3º mês (Figura 2C), 6º mês para as três épocas de colheita e aos nove meses em R7 e R7+7. Entretanto no 12º mês a diminuição da espessura apresentou-se mais acentuada em semente colhida em R7 (Figura 14).

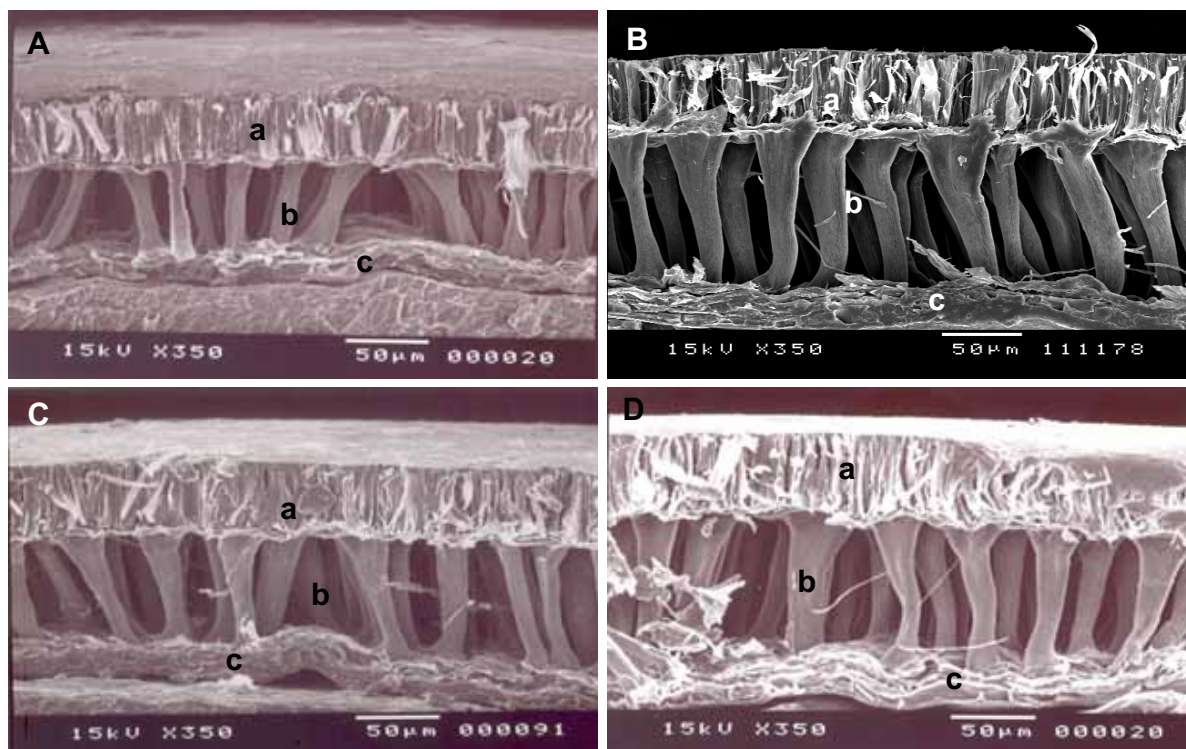


Figura 12. Eletromicrografias de varredura da testa de quatro (A, B, C e D) sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, colhidas no estágio R7+15, armazenadas a 10 °C, exibindo pouca alteração de espessura na camada hipodérmica, em A; camada hipodérmica de espessura menor, em B; camada hipodérmica de espessura maior, em C e D. (a=camada paliçádica; b= hipoderme e; c=parênquima lacunoso).

As sementes apresentaram altos valores para germinação, vigor (EA, TZ, CE) e emergência de plântulas até nove meses de armazenamento, quando colhidas em R7 e R7+7 e armazenadas às temperaturas de 10 e 25 °C (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Para a germinação aos 12 meses de armazenamento, foram observados para as sementes colhidas em R7 e armazenadas a 10 °C plântulas com hipocótilo “purulento”, porém, cotilédones e plúmulas intactos, não afetando a germinação, já para R7+7, observou-se hipocótilo partido, da mesma forma que o tratamento anterior, porém, não houve influência na avaliação final de plântulas normais.

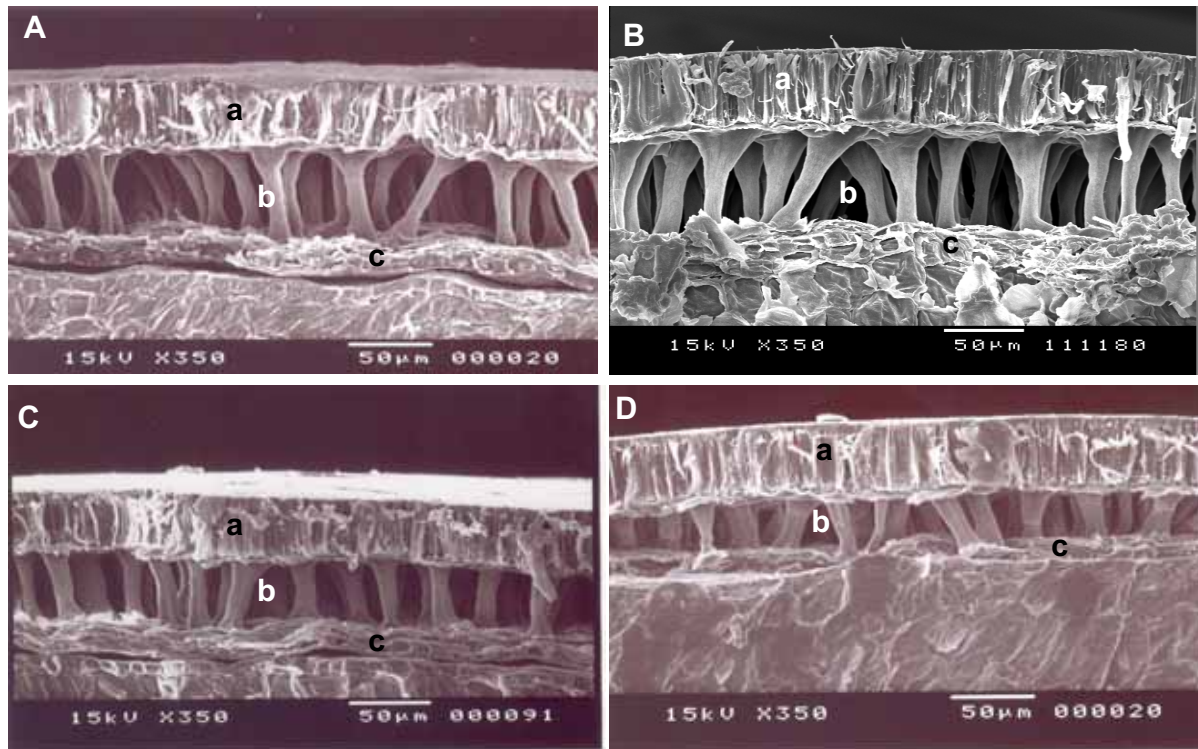


Figura 13. Eletromicrografias de varredura da testa de quatro (A, B, C e D) sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, colhidas no estágio R7, armazenadas a 25 °C, exibindo pouca alteração de espessura na camada hipodérmica, em A; camada hipodérmica de espessura menor, em B; camada hipodérmica de espessura menor, em C e D. (a=camada paliçada; b= hipoderme e; c=parênquima lacunoso).

Não diferente, aos nove meses de armazenamento, as plântulas oriundas de sementes armazenadas a 10 °C e colhidas em R7 apresentaram ótima germinação, acima de 95%, contudo, com plântulas classificadas como normais fracas, ou seja, com todas as estruturas essenciais e requeridas para ser uma plântula normal, porém, com tamanho reduzido (BRASIL, 1992). Diferentemente, as sementes colhidas em R7+15 apresentou alto índice de infecção, hipocótilo partido, apresentando padrão de germinação inferior a 80%, chegando a zero com 12 meses de armazenamento a 25 °C (Figura 4).

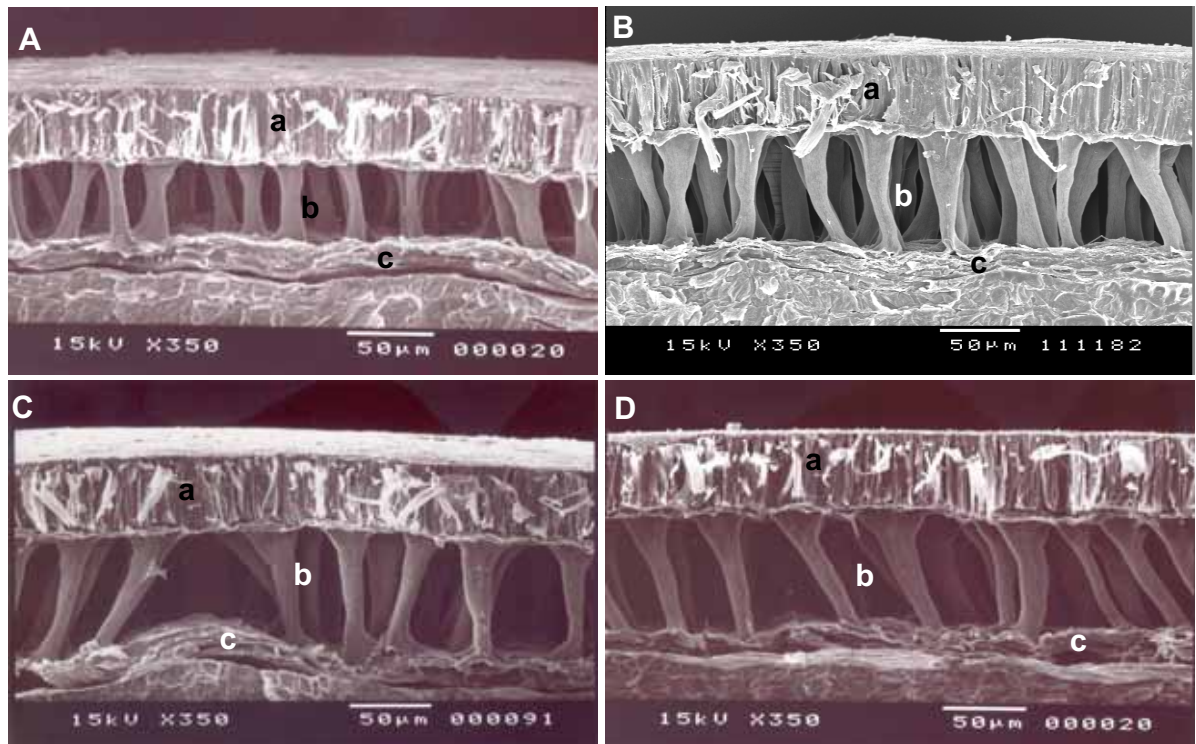


Figura 14. Eletromicrografias de varredura da testa de quatro sementes (A, B, C e D) de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, colhidas no estágio R7+7, armazenadas a 25 °C, exibindo pouca alteração de espessura na camada hipodérmica, em A; camada hipodérmica de espessura menor, em B; camada hipodérmica de espessura maior, em C e D. (a=camada paliádica; b= hipoderme e; c=parênquima lacunoso).

Em contrapartida, notam-se também na Figura 4, que sementes colhidas em R7+15 e armazenadas à temperatura de 25 °C apresentaram desenvolvimento insuficiente de raiz, variando de 0,5 a 4 cm (dados não apresentados) e qualidade inferior quando avaliadas pelo teste padrão de germinação comparado as sementes colhidas em R7 e R7+7 durante os 12 meses de armazenamento, mais acentuado, portanto, do 6º mês em diante, chegando a zero de germinação no 12º mês.

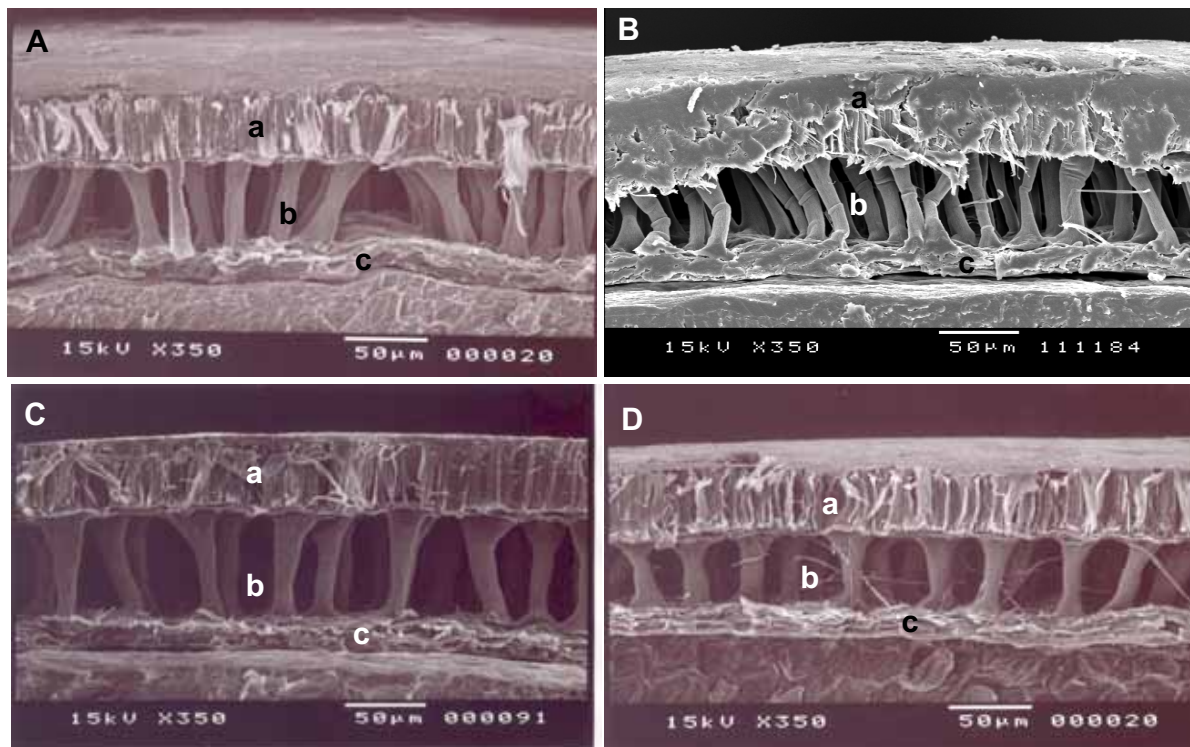


Figura 15. Eletromicrografias de varredura da testa de quatro sementes (A, B, C e D) de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, colhidas no estágio R7+15, armazenadas a 25 °C, exibindo pouca alteração de espessura na camada hipodérmica, em A; camada hipodérmica de espessura menor, em B; camada hipodérmica de espessura maior, em C e D. (a=camada paliádica; b= hipoderme e; c=parênquima lacunoso).

No teste de envelhecimento acelerado (Figura 5), constatou-se aborto radicular das plântulas oriundas de sementes armazenadas a 25 °C e colhidas em R7+7 e R7+15 no 6º mês de armazenamento, onde também, foram observados os menores valores para o tratamento R7+15, porém, com níveis baixos desde 3º mês de armazenamento, apresentando ainda, sementes altamente infectadas por fungos e bactérias.

Outra importante constatação está relacionada ao vigor avaliado pelo EA, praticamente, não houve grandes alterações no vigor das sementes colhidas em R7 e R7+7 durante os 12 meses de armazenamento na temperatura de 10 °C. O menor valor obtido foi 82% para sementes colhidas em R7+7 durante seis meses de armazenamento (Figura 5). Neste sentido, SOUZA & PESKE (1999) observaram que o vigor de semente de soja avaliado pelo EA, praticamente permaneceu inalterado até 90 dias de armazenamento para então decrescer, de forma acentuada.

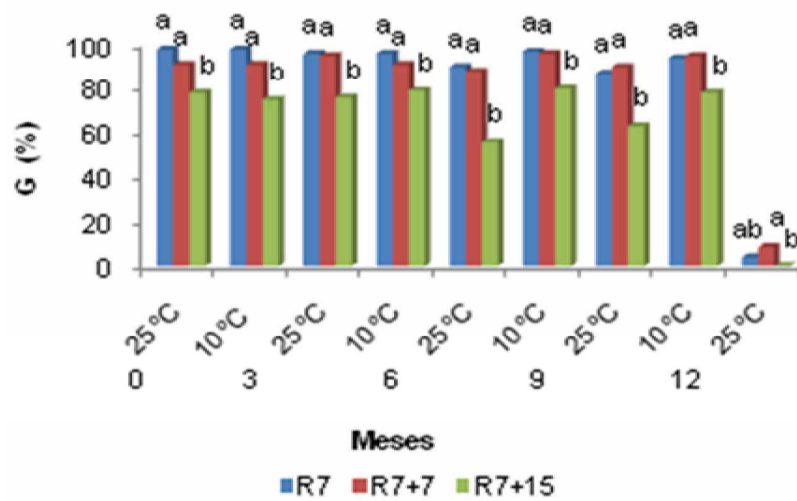


Figura 4. Germinação (G%) de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, durante 12 meses de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, entre colunas da mesma temperatura e armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

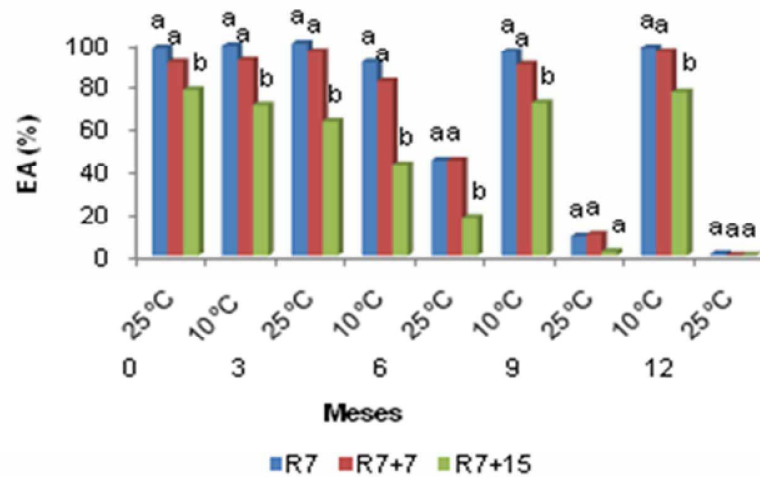


Figura 5. Vigor - envelhecimento acelerado (EA) de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, durante 12 meses de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, entre colunas da mesma temperatura e armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As sementes avaliadas pelo teste de tetrazólio (Figura 6) apresentaram ótimo potencial fisiológico inicial, acima dos 90% para as três épocas de colheita (R7, R7+7 e R7+15). Semente de soja com valores de vigor pelo tetrazólio superior a 90% são considerados muito alto, conforme FRANÇA NETO et al, (1999). Percebe-se ainda, para os três épocas de colheita, quando as sementes foram armazenadas a 10 °C, pequena redução do vigor, mantendo-se assim na mesma faixa de classificação, como mencionado anteriormente. O potencial de armazenamento vai depender da qualidade inicial da semente e do ambiente em que foram armazenadas. Sementes mais vigorosas comparadas às menos vigorosas, em condições idênticas e moderadamente desfavoráveis de armazenamento, deverão ao final do período apresentar melhor qualidade (PESKE et al., 2003). As observações desses autores são corroboradas pelos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que, sementes armazenadas a 25 °C (Figura 6) perderam gradativamente seu vigor, ou seja, temperatura de 25 °C, não é boa opção para armazenamento a longo prazo.

Ainda usando-se das informações obtidas pelo teste de tetrazólio, verificou-se para sementes colhidas em R7+15 e armazenadas por três e seis meses a 10 °C, pequenas rachaduras nos tegumentos e danos por umidade na extremidade do eixo hipocótilo/radicular, promovendo assim maior coloração dos tecidos, todavia, sem prejuízos para a avaliação.

AOSA, 2002). Segundo SILVA et al. (2008) o armazenamento prolongado causa maior permeabilidade da testa de sementes de soja, o que pode ser identificado por maiores valores de leitura de condutividade elétrica. Desta forma o colapso das células das camadas da testa pode facilitar o processo de embebição da semente, influenciando assim, a perda de lixiviados. COLETE et al. (2007) verificaram que os maiores valores de lixiviação corresponderam às menores porcentagens de germinação, mostrando ser este um bom indicador do potencial fisiológico de sementes. Resultados semelhantes foram encontrados por DIAS & MARCOS FILHO (1996), quando trabalharam com sementes de soja, os quais verificaram que maiores valores de lixiviação de solutos corresponderam às menores porcentagens de plântulas normais.

Todavia, é oportuno salientar, que inegavelmente, o aumento na leitura de condutividade elétrica esteja relacionado à deterioração das camadas da testa (Figuras 14 e 15; Figuras 2 (A, B, C e D), bem como o teor de água reduzido (Figura 3), neste sentido VANZOLINI et al. (2006) afirmam que o teste de condutividade elétrica pode ter seus resultados influenciados pelo teor de água das sementes e com isto mascarar resultados. Portanto, o teste de condutividade elétrica pode ser usado com sucesso na avaliação do vigor de semente de soja e na identificação de lotes com maior ou menor potencial de emergência de plântulas em campo (VIEIRA et al., 2004).

Pelo teste de emergência de plântulas em campo (Figura 8) semente armazenada a 10 °C, independente do estágio de desenvolvimento na colheita e período de armazenamento, apresentaram altos valores, mínimo de 82% para R7+15 no terceiro mês, e máximo de 98% para R7+7 no sexto mês de armazenamento, contudo, valores acima de 90% também foram encontrados no 9º e 12º mês de armazenamento, neste sentido, a expressão do potencial fisiológico das sementes, tanto no armazenamento como em campo, depende não só do histórico dos lotes como, principalmente, das condições do ambiente ao quais as sementes foram expostas (MARCOS FILHO, 1999b).

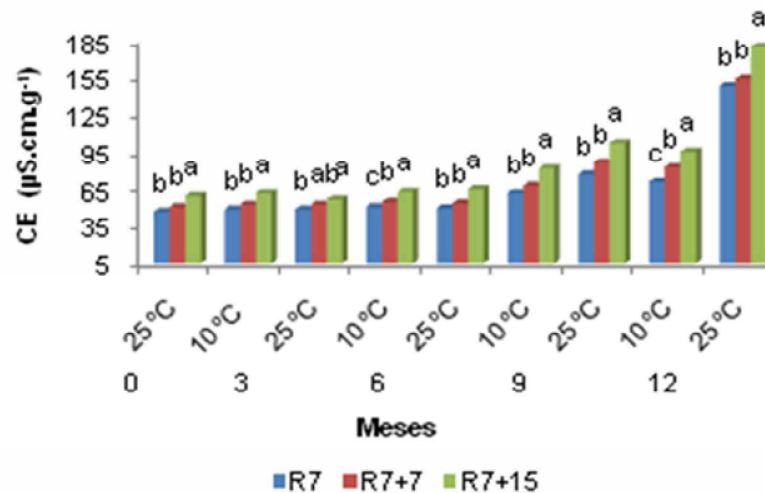


Figura 7. Vigor – Teste de condutividade elétrica (CE) de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, durante 12 meses de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, entre colunas da mesma temperatura e armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Entretanto, sementes armazenadas a 25 °C sempre apresentaram valores inferiores às armazenadas a 10 °C. A menor média observada foi de 72% para sementes colhidas em R7, no nono mês de armazenamento e 94% para R7+15 no 6º mês. Cabe salientar ainda, que no 9º mês de armazenamento, as plântulas oriundas de sementes armazenadas a 25 °C apresentaram boa emergência, entretanto porte inferior em relação às plântulas oriundas de sementes armazenadas a 10 °C. Diante disso, COLETE et al. (2007) concluíram que a condutividade elétrica da solução de embebição de sementes de soja pode ser ferramenta muito eficiente para estimar a emergência de plântulas em campo.

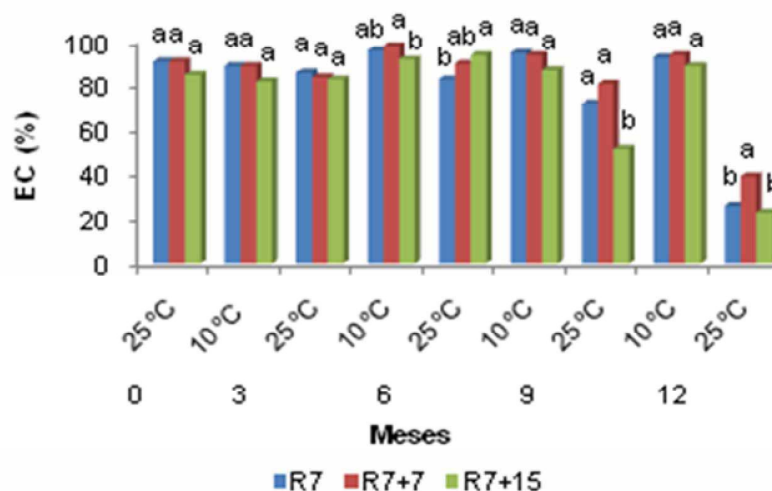


Figura 8. Vigor – Emergência de plântulas em campo (EC) proveniente de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, durante 12 meses de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, entre colunas da mesma temperatura e armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A avaliação de emergência de plântulas em areia (Figura 9) apresentou resultados negativos apenas em duas situações, uma; a partir do 6º e 9º mês de armazenamento e a segunda; no 12º mês de armazenamento para todas as épocas de colheita, armazenadas à temperatura de 25 °C. Portanto, nota-se estreita ligação entre período de armazenamento e a temperatura, onde foi observado sementes com bom desempenho fisiológico quando armazenada na temperatura de 10 °C.

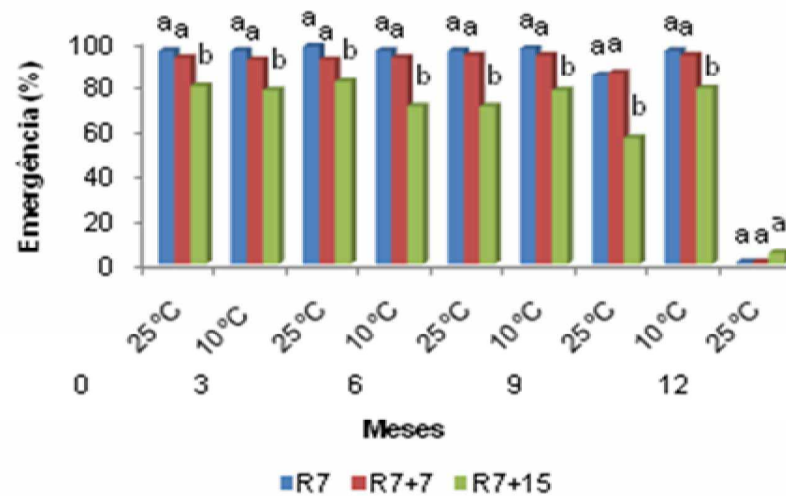


Figura 9. Emergência em areia de sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, durante 12 meses de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, entre colunas da mesma temperatura e armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O armazenamento sob condições adversas de sementes de soja no campo, após o estágio R7 e no armazém a 25 °C durante os 12 meses de armazenamento, reduziu seu potencial fisiológico danificando a estrutura da testa;
- O potencial fisiológico foi mantido a 10 °C (45-50% UR do ar) durante os 12 meses de armazenamento.

CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM SEMENTE DE SOJA EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DE COLHEITA E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO

RESUMO - O principal desafio das pesquisas sobre vigor de semente está na identificação de parâmetros relacionados à deterioração. A técnica da eletroforese de proteínas pode possibilitar a detecção das fases iniciais da deterioração, por meio da avaliação da atividade de enzimas associadas ao processo de degradação e oxidação de substâncias de reserva bem como biosíntese de novas substâncias. O objetivo deste trabalho foi monitorar a deterioração de sementes soja armazenada. Para tanto, foram utilizadas sementes da cultivar de soja MGBR-46 Conquista colhidas em três épocas; maturidade fisiológica-R7, R7+ 7 dias e R7 + 15 dias, e armazenada em câmara fria (10 °C, 45-50% UR do ar) e câmara climatizada (25 °C 60-75% UR do ar). Durante o período de armazenamento, as sementes foram avaliadas trimestralmente com intuito de se obter os perfis de bandas das enzimas esterase (EST), malato e glutamato desidrogenase (MDH e GTDH). Foram extraídos 10 eixos embrionários de cada tratamento para análise eletroforética. Pode-se verificar que a atividade da EST e MDH a partir do sexto mês, diminuiu a intensidade das bandas, ocorrendo assim o desaparecimento de bandas no 9º e 12º meses de armazenamento a 25 °C. Entretanto a atividade da GTDH apresentou menor intensidade nos perfis de bandas apenas no 9º e 12º mês de armazenamento a 25 °C. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que: sementes de soja colhidas em diferentes épocas e com alto potencial fisiológico podem apresentar acentuadas diferenças nos padrões izoenzimáticos em resposta ao armazenamento a de 10 °C e 25 °C; as análises das enzimas foram sensíveis para avaliação do potencial fisiológico, indicando o início da deterioração das sementes em função do período de armazenamento e época de colheita; a atividade das enzimas malato desidrogenase, glutamato desidrogenase e esterase são influenciadas pelo período e temperatura de armazenamento.

Palavras-Chave: *Glycine max*, potencial fisiológico, semente, vigor, enzima.

1. Introdução

O potencial de desempenho da semente de soja é fator principal no estabelecimento dessa cultura e com consequências futuras sobre sua produtividade. Portanto, dentre os diversos fatores que contribuíram para o avanço da produção e produtividade da cultura da soja no Brasil e no mundo, o uso de sementes de alta qualidade teve papel significativo. A semente é um dos insumos mais importantes para a agricultura, além de ser o principal veículo que leva ao agricultor todo potencial genético da cultivar com características superiores (KRZYZANOWSKI et al., 2006).

Perdas na qualidade das sementes de soja ocorrem durante todas as etapas do processo de produção, desde o período em que a cultura permanece no campo, exposta às condições adversas, até as etapas de colheita, secagem beneficiamento e armazenamento. A semente de soja é muito sensível à deterioração, onde, o processo pode ocorrer de modo significativo em apenas 12 meses de armazenamento (PRIESTLEY, 1986). Tudo dependerá da qualidade inicial e das condições de armazenamento da semente. Portanto, a detecção da deterioração de semente por intermédio de testes de vigor pode ser entendida como componente importante na avaliação do potencial fisiológico, contribuindo na solução de problemas ao longo de todo o processo de produção de semente.

Neste sentido, o principal desafio das pesquisas em vigor de semente está na identificação de parâmetros relacionados ao processo de deterioração, que precedam a perda da capacidade germinativa. A técnica da eletroforese de proteínas pode possibilitar a detecção das fases iniciais da deterioração, por meio da avaliação da atividade de enzimas associadas com ao processo de degradação e oxidação de substâncias de reserva bem como biossíntese de novas substâncias.

PRIESTLEY (1986) e BASAVARAJAPPA et al. (1991) associaram a perda de algumas formas de isoenzimas, tais como, a peroxidase, fosfatase ácida, desidrogenase, esterase e aminopeptidase com o envelhecimento severo de um grupo de espécies de sementes como arroz, cevada, trigo e milho, ou aumentada, como no caso das fosfolipases para milho. Também, VIEIRA (1996) encontrou como indicadores promissores do estágio de deterioração de sementes de algodoeiro as variações

eletroforéticas de proteínas e das enzimas glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase e 6- fosfogluconato. O monitoramento dessas mudanças pode ser feito com a ajuda de marcadores moleculares, pois, além de fornecerem dados úteis sobre a estrutura e diversidade genética das populações de plantas, possibilitam a visualização da atividade das enzimas nos diferentes estádios da planta (PRIESTLEY, 1986).

Embora existam na literatura estudos relacionados às alterações na composição enzimática durante a deterioração das sementes, ainda há muito a ser esclarecido neste processo. Diante disso, a eletroforese, por meio da detecção de alterações na composição protéica e de enzimas específicas, pode ser ferramenta eficiente para o acompanhamento da qualidade de semente durante o armazenamento (ISTA, 1992).

Estas enzimas caracterizam-se como excelentes catalisadores biológicos, visto que aceleram a taxa das reações bioquímicas, contudo, as mesmas não se modificam com o processo com tal reações (TAIZ & ZEIGER, 2006; MATHEWS & VAN HOLD, 1996 citados por TAIZ & ZEIGER, 2006).

Neste sentido, WILSON Jr. & McDONALD Jr. (1986) afirmaram que em sementes deterioradas, as células sofrem prejuízos em sua capacidade respiratória no início do processo germinativo. Isso ocorre devido à quebra do gradiente protônico necessário para manter o acoplamento respiratório em consequência de danos nas membranas celulares. Portanto, é comum o uso de marcadores bioquímicos na avaliação do potencial fisiológico, de sementes de diferentes espécies, sendo o mesmo recomendado pela Lei de Proteção de Cultivares (VIEIRA et al., 2009).

2. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal e de Microscopia Eletrônica de Varredura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Sementes da cultivar de soja MGBR-46 Conquista foram produzidas numa área 0,5 ha, no ano agrícola 2007/2008 na fazenda de ensino e pesquisa da UNESP,

Câmpus de Jaboticabal (SP) e colhidas em três épocas: estágio de desenvolvimento R7; R7+7 dias e R7+15 dias. Após colheita e debulha manual, as sementes foram limpas, classificadas, homogeneizadas e acondicionadas em embalagem de papel multifoliado e armazenadas em câmara fria (10 °C 40-45% UR do ar) e câmara climatizada (25 °C 60-75% UR do ar) por 12 meses.

Os dados de precipitação pluvial e umidade relativa do ar (UR%), observados no período que o experimento estava no campo, encontram-se na Figura 1 (capítulo 2). Para a caracterização inicial da qualidade das sementes, foram realizadas as seguintes determinações: teor de água, germinação (papel e areia) (BRASIL, 1992), condutividade elétrica (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999), teste de tetrazólio (vigor e viabilidade) (FRANÇA NETO et al., 1999), teste de envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 1999), emergência de plântulas em campo (NAKAGAWA, 1999), bem como à avaliação trimestral durante armazenamento por meio dos testes supra citados e análise estrutural das sementes. por meio da microscopia eletrônica de varredura.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por época de colheita e temperatura de armazenamento. A comparação entre o potencial fisiológico das sementes foram feitas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Na execução das análises estatísticas foi utilizado o programa computacional ASSISTAT - Assistência Estatística (SILVA & AZEVEDO, 2006).

Teor de água (base úmida): o teor de água inicial das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 1992).

Teste de tetrazólio: foi conduzido em duas subamostras de 50 sementes para cada tratamento, pré-condicionadas em papel tipo germitest, umedecido e mantido nestas condições por 16 horas a 25 °C. Posteriormente as sementes foram transferidas para copos de plásticos (capacidade 50 mL) com solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% e mantidas em câmara escura por duas horas e 30 minutos a 40 °C. Vencido este período, as sementes foram lavadas em água

corrente e, logo em seguida, avaliadas de forma individual com corte longitudinal no eixo embrionário (FRANÇA NETO et al., 1999).

Teste de germinação: foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, utilizando como substrato papel tipo germitest umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes seu peso seco e colocado em câmara de germinação a 25 °C. A avaliação foi realizada no quinto dia após semeadura, com a contagem das plântulas normais (BRASIL, 1992).

Teste de emergência de plântulas em areia: foi conduzido em quatro repetições de 50 sementes entre areia, com 60% da capacidade de retenção de água e colocado em temperatura ambiente, 25–30 °C. A avaliação foi realizada ao quinto dia após semeadura (BRASIL, 1992).

Teste de condutividade elétrica: utilizou-se o método de condutividade elétrica em massa, com quatro repetições de 50 sementes para cada lote. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos de plástico (capacidade de 200 mL), contendo 75 mL de água destilada e desionizada, durante 24 h a 25 °C. Vencido o período de exposição, a condutividade elétrica da solução de embebição foi determinada em condutivímetro DIGIMED - DM 31 e os resultados expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

Teste de envelhecimento acelerado: Foram utilizados 42 g de sementes, distribuídas em camada única sobre a tela de inox, no interior de caixas de plástico (11x11x3,3 cm), mantidas a 41 °C e umidade relativa do ar de aproximadamente 100% por 48 h (MARCOS FILHO, 1999). Posteriormente as sementes foram posta a germinar, conforme relatado para o teste de germinação.

Teste de emergência de plântulas em campo: Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote. Antes da semeadura, foi efetuado o tratamento das mesmas com carbendazin + thiram na proporção de 2,5 mL do produto comercial, mais

2,5 mL de água para cada kg de sementes (HENNING, 2004). As sementes foram semeadas no espaçamento 0,45 m entre linhas, profundidade de 3-4 cm. A avaliação foi realizada no 21º dia após semeadura (NAKAGAWA, 1994).

Atividade enzimática: a avaliação das alterações bioquímicas foi feita realizando-se eletroforese vertical em gel de poliacrilamida para as isoenzimas esterase, malato e glutamato desidrogenase, conforme descritas a seguir: Para obtenção do extrato, 10 sementes de soja de cada tratamento foram colocadas para germinar em caixas de plástico (11x11x3,5 cm) escuras por três dias à temperatura de 25 °C. Após esse período, destacaram-se os eixos hipocótilo-radícula, os quais foram macerados em almofariz em banho de gelo, utilizando-se tampão tris-glicina 0,1 M pH 8,3 na proporção 1:1 (p/v) e transferido para microtubos de 2,5 mL. Posteriormente, o material foi centrifugado a 24.70 xg por 15 minutos à temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas.

A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontinuo (10% gel de separação e 7% gel de concentração), em cubas tipo Protean II, por um período aproximado de 4 h a 4 °C sob tensão de aproximadamente 200 V constantes. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina 0,5M em pH 8,9. Aliquotas das amostras contendo 30 µL de extrato sem quantificar teor de proteína foram aplicados nos géis de isoenzimas (ALFENAS, 2006).

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados de forma específica para detecção das enzimas **Esterase (EST; EC 3.1.1.1)** e os géis mantidos incubados por uma hora no escuro com agitação lenta, à temperatura ambiente, em solução formada por: 40 mL de água destilada, 25 mL do tampão [fosfato de potássio monobásico 0,2 M pH 4,3], 5 mL do tampão [fosfato de potássio dibásico 0,2 M pH 9,2], 50 mg de fast blue BB salt. Filtrou-se essa solução e na mesma adicionou-se 1,5 mL de alpha naphtil acetato 1% em acetona 50%; **Malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37)**: Idem ao anterior, em solução contendo 4 mL de ácido málico 0,5 M (pH 8,0), 20 mg de NAD, 20 mg de MTT, 2 mg de PMS 100 mL de Tris 0,1M (pH 8,5); **Glutamato desidrogenase (GTDH; EC 1.4.1.3)**: Idem ao procedimento descrito para esterase, em solução

contendo 100 mL de Tris 0,1 M (pH 8,5), 400 mg de Glu, Na, 0,1 mL de CaCl_2 10 mM, 20 mg de NAD^+ 2 mg de PMS, 20 mg de MTT.

A avaliação dos perfis eletroforéticos foi realizada com base na presença, ausência e intensidade de bandas (ALFENAS, 2006).

3. Resultados e discussão

Na Tabela 1 (capítulo 2) são apresentados os resultados da caracterização inicial das sementes de soja, cultivar MGBR-46 Conquista, quanto à germinação, emergência de plântulas em areia e em campo, condutividade elétrica, tetrazólio (vigor), envelhecimento acelerado, bem como o teor de água.

No presente estudo foi verificado decréscimo na germinação e vigor tanto para semente armazenada a 10 °C como a 25 °C. Nas Figuras 1, 2 e 3 nota-se que a atividade das enzimas esterase e malato da desidrogenase, a partir do sexto mês de armazenamento, apresentaram menor intensidade de bandas, comprovando assim, efeito negativo do armazenamento prolongado em ambas as temperaturas estudadas. Entretanto, para enzima glutamato da desidrogenase, a intensidade de bandas permaneceu inalterada durante todo o período de armazenamento a 10 °C.

Nessas Figuras 1, 2, 3, estão apresentados os padrões eletroforéticos das enzimas esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) glutamato desidrogenase (GTDH) durante período de armazenamento e épocas de colheita.

Pelas análises eletroforéticas da EST pode-se observar na Figura 1 nos seis primeiros meses de armazenamento e nas temperaturas de 10 e 25 °C maior atividade da EST. Pode-se verificar também que a atividade da EST a partir do 6º mês, à medida que aumentou o período de armazenamento das sementes, diminuiu a intensidade das bandas, ocorrendo assim o desaparecimento de bandas no 9º e 12º meses de armazenamento, demonstrando que as sementes apresentavam maior peroxidação de seus lipídios de membrana celular, causando aumento na permeabilidade e consequentemente, no processo deteriorativo (Figura 1).

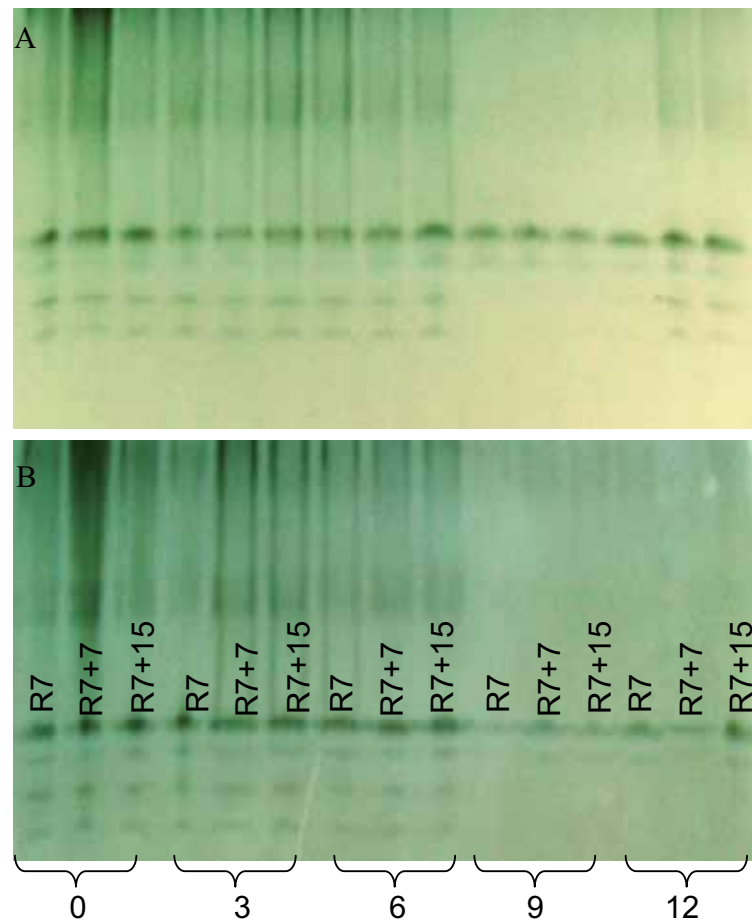


Figura 1. Perfis de bandas do sistema enzimático esterase (EST) extraídos de eixos embrionários de sementes de soja colhidas nos estádios R7, R7+7 e R7+15 e avaliados aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento nas temperaturas de 10 e 25 °C (A e B respectivamente).

A relação entre a redução da atividade da esterase e a perda da qualidade fisiológica das sementes detectada pelo teste de condutividade elétrica fortalece essa hipótese, visto que o teste de condutividade elétrica tem sido recomendado para quantificar substâncias lixiviadas para o meio de embebição, uma vez que sementes com baixo vigor apresentam desorganização na estrutura das membranas celulares, acarretando aumento na lixiviação de solutos, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, proteínas e substâncias fenólicas, e íons inorgânicos: K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} e Na^+ (AOSA, 2002; HAMPTON & TEKRONY, 1995; VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

Conseqüentemente, a redução da sua atividade impede que os fosfolipídios das membranas permaneçam eficientemente protegidos. Desse modo, com a desestruturação destes, verificou-se que o sistema de membranas das organelas entram em declínio, tornando-se mais suscetíveis aos efeitos deletérios do O_2 e permitindo maior produção de lixiviados, à medida que as sementes são envelhecidas (BEWLEY e BLACK, 1994).

Alterações nos padrões da EST evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução da germinação das sementes à medida que são aumentados os níveis de fatores adversos, temperatura e teor de água de semente no processo de envelhecimento, pois a esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios. A EST está envolvida tanto na hidrólise de ésteres quanto no metabolismo de lipídios, fonte de carbono para a síntese de novas moléculas em plântulas, uma vez que o processo de fotossíntese não está preparado para suprir toda a demanda de carbono requerida pela planta (BEWLEY & BLACK, 1994). Segundo BASAVARAJAPPA et al. (1991), sendo a peroxidação de lipídios um evento associado à danos de membrana de sementes, alterações podem denotar a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação de sementes à medida que é aumentado o fator salinidade.

O sistema isoenzimático esterase é constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas com ampla gama de substratos específicos (SCANDALIOS, 1969). As variantes destas proteínas encontradas em plantas, por exemplo, são geralmente monoméricas ou diméricas (WEEDEN & WENDEL, 1990), com alto nível de variabilidade (GILLESPIE & LANGLEY, 1974). Esterase é, desta forma, um dos sistemas isoenzimáticos mais polimórficos em plantas (WEEDEN & WENDEL, 1990).

Para o sistema isoenzimático malato desidrogenase (Figura 2), verificou-se que ocorreram alterações na expressão desta enzima do 9º ao 12º mês de armazenamento, para as três épocas de colheita, nas temperaturas de 10 e 25 °C de armazenamento das sementes. Durante a germinação das sementes, essa enzima também atua no processo de gliconeogênese, responsável pela geração de sacarose a partir de triacilgliceróis presentes no interior dos oleossomos, nos tecidos de reserva da semente

(SPINOLA et al., 2000). Em estudos com sementes de soja, SHATTERS et al. (1994) observaram que a atividade da MDH em sementes de soja foi menos afetada pelo período de exposição de 24 h no envelhecimento acelerado.

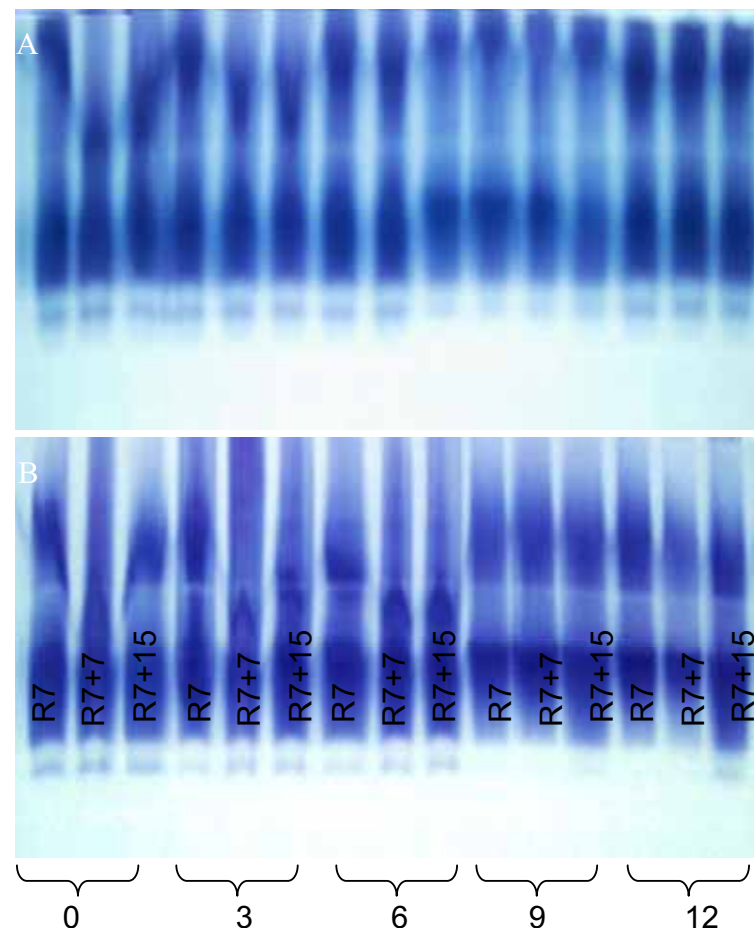


Figura 2. Perfis de bandas do sistema enzimático malato desidrogenase (MDH) extraídos de eixos embrionários de sementes de soja colhidas nos estádios R7, R7+7 e R7+15 e avaliados aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento nas temperaturas de 10 e 25 °C (A e B respectivamente).

A atividade da MDH permaneceu estável em sementes de feijão de maior potencial fisiológico (SANTOS et al., 2005). Em sementes de milho, a MDH manteve seus padrões isoenzimáticos inalterados com o avanço do processo deteriorativo (SPINOLA et al., 2000).

A MDH catalisa a conversão do malato a oxalacetato, tendo importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (TAIZ & ZAIGER, 2006). E as mitocôndrias constituem-se no centro da respiração, por isso fica evidente a importância dos efeitos da deterioração sobre o desempenho germinativo de semente quando são consideradas as modificações ocorridas nessa organela. Quando a via aeróbica é comprometida, a via anaeróbica da respiração é ativada e produtos tóxicos às células como acetaldeído e etanol são acumulados. No metabolismo anaeróbico, o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido para acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído é, então, reduzido para etanol pela álcool desidrogenase (ADH).

Conforme SALINAS et al. (1998) as mitocôndrias dos eixos embrionários são responsáveis pelo fornecimento de energia usada no alongamento dos eixos raiz/caule e, se a taxa respiratória diminui nos eixos, a emergência e crescimento das plântulas também diminuem.

Por se tratar de enzima importante na respiração celular, o aumento da expressão em diferentes compartimentos celulares e ou intensidade de coloração (indução da atividade da enzima) das bandas nos perfis eletroforéticos observados por BRANDÃO JUNIOR (1996) em sementes de milho envelhecida por 144 h e por VIEIRA (2009) em sementes de algodão quando submetidas aos maiores períodos de envelhecimento, pode ser devido ao aumento da respiração que ocorre em semente que se encontra em processo de deterioração avançado, uma vez que as enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em semente de qualidade reduzida (SHATTERS et al., 1994). Na mesma pesquisa, SHATTERS et al. (1994) observaram que em semente de soja, a atividade da MDH foi menos afetada pelo envelhecimento da semente. Portanto, é de se supor que o período de 120 h de envelhecimento acelerado empregado no estudo conduzido por BRANDÃO JUNIOR (1996) pode não ter sido suficiente para ocasionar alterações metabólicas suficientes para provocar alterações nos perfis eletroforéticos desta enzima. Possivelmente, devido aos danos nas membranas mitocondriais, sendo esta organela a mais suscetível à peroxidação. Pois, conforme WILSON & McDONALD (1986) e FERGUSON et al. (1990), a

membrana mitocondrial é rica em lipídios insaturados, o que aumenta a superfície exposta à peroxidação, elevando a permeabilidade das membranas e afetando a atividade respiratória aeróbica, por quebrar o gradiente protônico necessário para a manutenção do acoplamento respiratório, diminuindo a produção de ATP e absorção de oxigênio.

A GTDH permaneceu praticamente inalterada durante os 12 meses de armazenamento a 10 °C (Figura 5). Possivelmente, o acréscimo na atividade desta enzima está, também, relacionado com a oscilação da umidade relativa do ar durante o armazenamento e com as características próprias das cultivares. Todavia, semente de soja armazenada a 25 °C apresentou menor intensidade de bandas do 9º ao 12º mês de armazenamento (Figura 6).

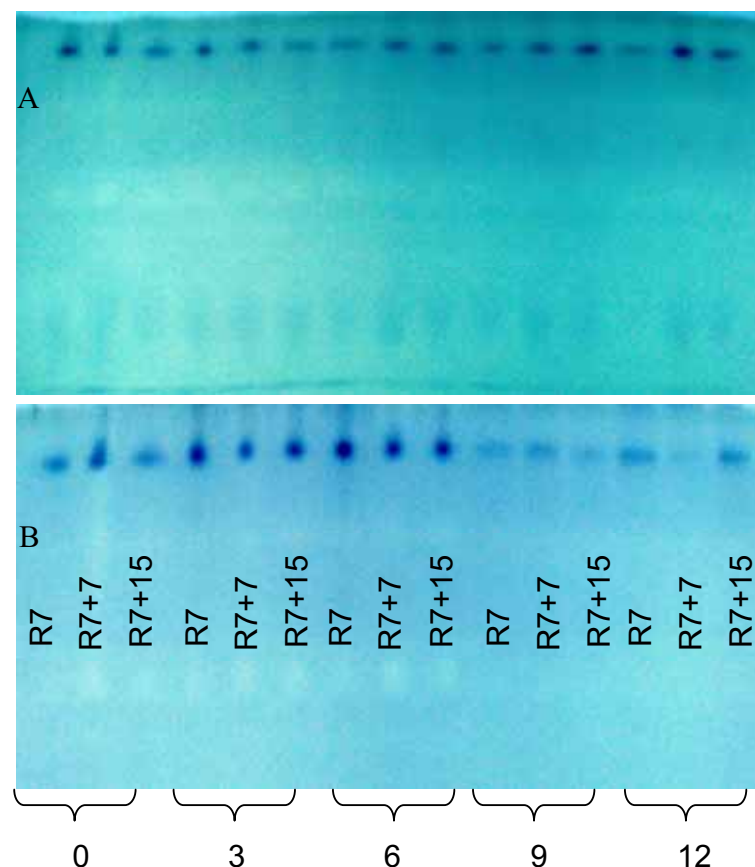


Figura 3. Perfis de bandas do sistema enzimático glutamato desidrogenase (GTDH) extraídos de eixos embrionários de sementes de soja durante colhidas nos estádios R7, R7+7 e R7+15 e avaliados aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento nas temperaturas de 10 e 25 °C (A e B respectivamente).

Esta enzima é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs, produção de NADPH e/ou na redução do α -cetoglutarato para síntese de aminoácidos. O estresse provocado pelo período de armazenamento à temperatura de 10 °C não foi suficiente para diminuir a atividade desta enzima, entretanto, para temperatura de 25 °C houve diminuição da atividade desta no 9º 12º mês de armazenamento. Apesar de esses resultados estarem de acordo com os encontrados por SHATTER et al. (1994) em sementes de soja, a perda da atividade dessa enzima só acontece em estágios mais avançados de deterioração (germinação variando de 40 a 50%), provavelmente em função de sua atuação, ou seja, ao nível de proteínas de reservas.

SANTOS et al. (2004) observaram que a atividade da GTDH no período zero de envelhecimento apresentou-se mais elevada em um grupo de sementes de feijão, demonstrando que a atividade respiratória das sementes estava mais elevada, caracterizando um processo deteriorativo mais avançado, quando comparado ao segundo grupo de sementes de feijão. A atividade da GTDH foi superior no primeiro grupo até 72 horas, no entanto, a partir desse período foi semelhante para os dois grupos.

O estresse provocado pelo período de armazenamento não foi suficiente para diminuir a atividade desta enzima, na temperatura de 10 °C, sendo esta a menos afetada pelo período de armazenamento em função da temperatura. Em plântulas de eucalipto envelhecidas artificialmente, CAMARGO et al. (2000) observaram aumento na atividade da GTDH, discordando dos dados encontrados neste trabalho, onde houve alteração na atividade de GTDH, apenas em sementes armazenadas a 25 °C após nove meses de armazenamento, discordando também dos dados encontrados por SHATTERS et al. (1994), os quais verificaram diminuição na atividade desta enzima em sementes de soja em função da deterioração causada pelo envelhecimento acelerado.

4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Sementes de soja colhidas em diferentes épocas e com alto potencial fisiológico podem apresentar acentuadas diferenças nos padrões izoenzimáticos em resposta ao armazenamento nas temperaturas de 10 °C e 25 °C;
- Análises das enzimas foram sensíveis para avaliação do potencial fisiológico, indicando o início da deterioração das sementes em função do período de armazenamento e época de colheita;
- A atividade das enzimas malato desidrogenase, glutamato desidrogenase e esterase são influenciadas pelo período e temperatura de armazenamento.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste projeto de pesquisa foram considerados o potencial fisiológico, a alteração estrutural e atividade de três enzimas em semente de soja colhidas em três épocas (R7, R7+7 e R7+15 dias) e armazenada sob duas temperaturas (10 e 25 °C). Esses assuntos foram abordados em dois capítulos da tese.

Pelo exposto, e tendo em vista a importância da manutenção da qualidade de sementes de soja, devem-se, portanto, buscar procedimentos cada vez mais detalhados de análise de sementes, como por exemplo, a combinação dos métodos tradicionais de avaliação da germinação e vigor de sementes, bem como, avaliar a atividade de enzimas que possam estar relacionadas com o processo de deterioração da semente, além da avaliação da estrutura do tegumento, considerando a época de colheita e o armazenamento da semente. Procurou-se com esses assuntos abordar o processo de deterioração da semente paralelamente ao desempenho da semente.

O termo qualidade na área de semente está intimamente ligado ao processo deteriorativo, todavia, de natureza complexa, uma vez que até o presente momento esse tema encontra-se em permanente discussão em tecnologia de sementes para diferentes espécies. Encontrar um procedimento que realizado em laboratório e que possa indicar ao futuro usuário o desempenho de um lote de sementes, continua sendo o grande desafio para pesquisadores da área. O desempenho da semente no campo tem estreita relação com as condições climáticas, particularmente umidade do solo e temperatura, além obviamente de sua integridade. Quanto melhor, maior será perspectiva para um bom desempenho em campo em ampla faixa de condições climáticas.

A apresentação de alterações estruturais e do potencial fisiológico de sementes de soja colhidas em três épocas e armazenadas em duas temperaturas (10 e 25 °C) (capítulo 1) abrangeu a relação dos danos estruturais da testa, comprovando desta maneira, a importância do armazenamento de sementes sob temperatura e umidade relativa do ar e, da época adequada de colheita. Observou-se, ainda, que houve decréscimo gradativo do teor de água (TA) de sementes durante os 12 meses de

armazenamento, independentemente da temperatura e da época de colheita. A redução no teor de água em função do armazenamento ocorreu tendo em vista que os ambientes de armazenamento apresentavam baixa umidade relativa do ar, fazendo-se com que o equilíbrio higroscópico da semente ocorresse com teor de água mais baixo do que no início do armazenamento.

Considerando que a maioria das sementes de espécies cultivadas possuem características ortodoxas, nas quais, aumento do conteúdo de água da semente ou da umidade relativa do ar, ou ainda, da temperatura de armazenamento, resulta em rápida perda da viabilidade (ROBERTS, 1973), reduzindo a porcentagem de emergência de plântulas em campo, além de diminuir o potencial de armazenamento (MATTHEWS, 1981).

Do ponto de vista ultraestrutural, nota-se, portanto, grande variação na espessura das três camadas na testa da semente e da espessura total em relação ao período de armazenamento e época de colheita. Existem diferenças entre a estrutura anatômica da testa de sementes entre genótipos de soja, as quais podem estar relacionadas à permeabilidade e indiretamente relacionadas à qualidade de sementes (SOUZA & MARCOS FILHO, 2001; MERTZ et al., 2009).

A exposição destes dados de certa forma contribui para melhor entendimento do assunto potencial fisiológico de semente.

De maneira similar, alterações bioquímicas em sementes de soja oriundas de diferentes épocas de colheita e condições de armazenamento (capítulo 3) expressam a real situação em que sementes deterioradas apresentam perda ou manutenção da atividade de certas enzimas em função do seu potencial fisiológico, temperatura e período de armazenamento. No presente estudo foram verificados decréscimos na germinação e no vigor de sementes armazenadas em duas condições de temperatura (10 e 25 °C), como também a atividade das enzimas esterase, malato desidrogenase a partir do 6º mês de armazenamento apresentam menor intensidade de bandas, comprovando assim, efeito negativo do armazenamento prolongado para as temperaturas estudadas. Isso demonstrou a redução de atividade dessas tendo em vista as condições adversas de produção e armazenamento. Diferentemente, para

enzima glutamato desidrogenase, a intensidade de bandas permaneceram inalteradas durante os meses de armazenamento a 10 °C.

Dentro de um contexto geral, torna-se importante o conhecimento dos diferentes mecanismos envolvidos com a perda e, ou manutenção do potencial fisiológico de sementes, como também de toda ferramenta capaz de mensurar diferentes alterações fisiológico-bioquímicas e que levam à redução no desempenho de sementes, contribuindo assim, de modo efetivo para o desenvolvimento da cultura da soja, permitido a obtenção de produtividades mais altas e, conseqüentemente, de resultados econômicos compatíveis e necessárias à atividade do produtor de soja.

REFERÊNCIAS

ABDEL SAMAD, I. M.; PEARCE, R.S. Leaching of ions, organic molecules, and enzymes from seeds of peanut (*Arachis hypogea* L.) imbibing without testa or with intact testa. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.29, n.112, p.1471-1478, 1978.

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T.T., ed. **Seed Biology**. New York, Academic Press, 1972. v2. p. 283-315.

AJAYI, S. A.; FAKOREDE, M. A. B. Physiological maturity effects on seed quality, seedling vigour and mature plant characteristics of maize in a tropical environment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 2, p. 301-319, 2000.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.

ANDRADE, R.N.B.; SOBRINHO, E.H. Caracterização de cultivares de soja através da técnica eletroforética. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 2, n. 3, p.97-104, 1980.

ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; ALMEIDA, I.F.; CLEMENTE, A.C.S. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n.1, p. 12-19, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln: AOSA, 2002. 105p. (Contribution, 32).

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição Especial.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 455p.

BRACCINI, A.L.; REIS, M.S.; MOREIRA, M.A.; SCAPIN, C.A. Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 433-447, 2000.

BRANDÃO JUNIOR, D.E. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho Lavras, 1996. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. SDA, Brasília, 2009. 399p.

CAMARGO, M.L.P.; MORI, E.S.; MELLO, E.J.; ODA, S.; LIMA, G.P. Atividade enzimática em plântulas de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.10, n2, p.113-122, 2000.

CARVALHO, M.A.C.; LAZARINI, E.; SÁ, M.E.; OLIVEIRA, A.L. Variações na metodologia do teste de frio para avaliação do vigor em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 22, n.1, p.74-80, 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal, 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**, Londrina, vol. 31, nº 1, p.31-39, 2009.

CHACHALIS, D.; SMITH, M.L. Imbibition behavior of soybean (*Glycine max* L. Merrill) accessions with different testa characteristics. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.28, p.321-331, 2000.

COLETE, J.C.F.; VIEIRA, R.D. ; PANOBIANCO, M.; DUTRA, A.S. Condutividade elétrica da solução de embebição de sementes e emergência de plântulas de soja. **Científica**, São Paulo, v. 35, p. 10-16, 2007.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration; In: BSRA, A.S. (ed.) **Seed quality: Basic mechanisms and agricultural implications**. New York:Food Products Press. 1995. p.223-277.

COPELAND, L.O.; MCDONALD M. B. **Seed Science and Technology** (ed 3). Chapman and Hall, NY. 409 p, 1995.

COSTA, C.J.; VILLELA, F.A.; BERTONCELLO, M.R.; TILLMMAN, M.A.A.; MENEZES, N.L. Expressão de isoenzimas após a pré-hidratação de sementes de ervilha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n.3, p. 130-138, 2008.

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

DIAS, M.C.L.L. & MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor baseados na permeabilidade de membranas celulares: I. Condutividade elétrica. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.5, n.1, p.26-36, 1995.

DIAS, M.C.L.L.; MARCOS-FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja. (*Glycine max* L. Merrill). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 31-42, 1996.

FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Changes during early soybean seed and axes deterioration: II. Lipids. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 179-182, 1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, 220p.

FERREIRA, L.A.; OLIVEIRA, J.A.; VON PINHO, E.V.R.; QUEIROZ, D.L. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n.2, p. 80-89, 2007.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.8, p. 1–28.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; PÁDUA, G.P.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Embrapa-CNPSO, Londrina, 2007. 22 p. (Embrapa-CNPSO, circular técnica, 40).

FREITAS, R.A.; DIAS, D.C.F.S.; DIAS, L.A.S.; OLIVEIRA, M.G.A. Testes fisiológicos e bioquímicos na estimativa do potencial de armazenamento de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.84-91, 2004.

FREITAS, R.A.; DIAS, D.C.F.S.; DIAS, L.A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; JOSÉ, I.C. Alteração fisiológica e bioquímica em sementes de algodão submetidas ao envelhecimento artificial. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n.1, p. 67-76, Jan/Abril 2006.

GILLESPIE, J.H., LANGLEY, C.H.A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Pittsburgh, v.76, n.4, p.837-887, 1974.

GOODMAN, B. A. The involvement of O_2 – derives free radical in plantpathogen interactions. In: CRAWOFOORD, R. M. M.; HENDRY, G. A. F.; GOODMAN, B. A. (Ed.) **Oxygen and environmental stress in plants**. Edinburgh: Royal Society of Edinburgh, 1994. p. 155-165. (Biological Sciences).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 86-123.

HAMPTON, J.G.; TEKRONY, B.M. Conductivity test. In: HAMPTON, J.G.; TEKRONY, B.M. (eds.) **Handbook of vigour methods**. 3.ed. Zürich: ISTA, 1995. p.22-34.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes**: Noções gerais. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p. (Documentos, 235)

HENDERSON, R.; STROUD, R. Estrutura da membrana. In: ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, ROBERTS, K.; WLTER, P (Ed). **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 583-614.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA. **Handbook of variety testing: electrophoresis testing**. Zürich: ISTA, 1992.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age penault seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

JOSÉ, S.C.B.R.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, E.G.; SILVEIRA, C.M. Padrões eletroforéticos da enzima α -amilase em sementes de milho submetidas a alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n.1, p. 77-83, 2004.

KOONIN, E.; OLSON, M. Química celular e biossíntese. In: ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, ROBERTS, K.; WALTER, P (Ed). **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 46-128.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. Deterioração controlada. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B.(Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.6.1-6.8.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. **O controle de qualidade agregando valor à semente de soja–Série Sementes**. Embrapa-CNPSo, Londrina, 2008. 12 p. (Embrapa-CNPSo, circular técnica, 54).

KRZYŻANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; FRANÇA-NETO, J.B.; COSTA, N.P. Tecnologias que valorizam a semente de soja. **Seed News**, Pelotas, ano X nº. 6, NOV/DEZ, p. 1-2, 2006.

LEHNINGER, A. L.; **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier, 2006. 1130 p.

MAIA, F.C.; MORAES, D.M.; MORAES, R.C.P. Atividade total da fosfatase ácida e da α -amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 22, n.1, p. 259-263, 2000.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; CASTRO, M.A.S.; PESKE, S.T. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n.1, p. 61-67, 2007.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005, 495 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, 1999a. p. 3.1- 3-24.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999b. p. 1.1-1-21.

MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, A.L.P.; LIMA, L.B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo a análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n1, p.102-112, 2009.

MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes; tissue; antogenetic, and species specific patters. **Proceedings of the national Academy Sciences USA**, Washinton, v. 45, p. 453-463, 1959.

MATTHEWS, S.; POWELL, A.A. Eletrical conductivity test. In: Perry, D. A. (Ed.) **Handbook of vigour test methods**. Zürich, Switzerland: ISTA, 1981. p. 37-42.

MENEZES, M.; VON PINHO, E.V.R.; PEREIRA, A.M.A.R.; OLIVEIRA, J.A. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n.2, p. 111-122, 2008.

MERTZ, L.M. HENNING, F.A.; CRUZ, H.L.; MENEGHELLO, G.E.; FERRARI, C.S.; ZIMMER, P.D. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n1, p. 23-29, 2009.

MILLER, S.S.; BOWMAN, L.A.; GIJZEN, M.; MIKI, B.L. Early development of the seed coat of soybean (*Glycine max*). **Annals of Botany**. Jaboticabal, V.84, n. 3, p. 297-304, 1999.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p. 1–24.

NOODÉN, L.D.; BLAKLEY, K.A.; GRZYBOWSKI, J.M. Control of seed coat thickness and permeability in soybean. **Plant Physiology**, v.79, p.543-545, 1985.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p.255-262, 2001.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D.; BARBOSA, J.C. Desempenho de sementes de algodão tratadas quimicamente e armazenadas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 2, p.212-219, 2002.

PEREIRA, L.A.G.; ANDREWS, C.H. Comparison of non-wrinkled and wrinkled soybean seed coats by scanning electron microscopy. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, p.853-860, 1985.

PERRY, D.A, Reporto f the vigour committe, 1974-1978. **Seed Science and Technology**. Zürich, v. 6, n. 1, p. 159-181, 1978.

PESKE, S.T.; BARROS, A.C.S.A. Produção de sementes. In: PESKE, S.T; ROSENTHAL, M.D; ROTA, G.M (Ed.) **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Gráfica Universitária - UFPEL, 2003, p. 14.

PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, O.A.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Gráfica Universitária – 2ª ed, 2006, 474 p.

POWELL, A.A. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. **Journal of Seed Technology**, v.10, p.81-100, 1986.

PRIESTLEY, D A. Seed aging, **Comstock Publ Assoc** ,Ithaca, New York, 1986.

PRIESTLEY, D.A.; LEOPOLD, A.C. Lipid changes during natural aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen. v.59, p.467-470. 1983.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers BV**, 1991. v. 22, 291 p.

ROBERTS, E.H. Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability. In: ROBERTS, E.H. (ed.). **Viability of seeds**. London: Chapman & Hall, 1972. p.253-306.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.3, n.2 p. 106-118, 1998.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.110-119, 2004.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1 Pelotas, 2005.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-39, 1969.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.

SCAPPA NETO, A., BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D.; VOLPE, C.A. Efeito do teor inicial de água de sementes de feijão e da câmara no teste de envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.4, p.747-751, 2001.

SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A.A.; VIEIRA, C. Testes preliminares sobre os efeitos do retardamento da colheita de soja, cultivar “Viçoja”. **Revista Ceres**, Viçosa, v.19, n.106, p.306-310, 1972a.

SEDIYAMA, C.S.; VIEIRA, C.; SEDIYMA, T.; CARDOSO, A.A.; ESTEVÃO, M.M. Influência do retardamento da colheita sobre a deiscência das vagens e sobre a qualidade do poder germinativo das sementes de soja. **Experientiae**, Viçosa, v.14, n.56, p.117-141, 1972b.

SHATTERS, R.G.JR.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, v.4, p.33-41, 1994.

SILVA, F.A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 35 4, Orlando-FL-USA: **Anais**. Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SILVA, M.A.D.; VIEIRA, R.D.; SANTOS, J.M. Influência do envelhecimento acelerado na anatomia da testa de sementes de soja, cv. Monsoy 8400. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n.2, p.91-99, 2008.

SOUZA, L.A.; PESKE, S.T. Absorção de água pela semente de soja e de milho durante o armazenamento¹. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, n.2, p.78-83, 1999.

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

SPINOLA, M.C.M.; CICERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

STEELE, J.L.; SAUL, R.A.; HUKILL, W.V. Deterioration of shelled corn as measured by carbon dioxide production. **Transaction of ASAE**. v. 12. N.5, p. 685-689. 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Energy and Enzymes. In:_____ (Ed.) **Plant physiology**. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. cap. 2, p.1-22.

VANZOLINI, S.; ARAKI, C.A.S.; SILVA, A.C.T.M.; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n.2, p. 90-96, 2007.

VANZOLINI, S.; SENEME, A. M.; SILVA, M. A. Teste de condutividade elétrica em sementes de soja tratadas com micronutrientes. **Revista Ceres**, v. 53, p. 590-596, 2006.

VERTUCCI, C.W. The kinetics of seed imbibition. In: CROP SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. **Seed moisture**. Madison, 1989. p.93-115. (CSSA. Special Publication, 14).

VIEIRA, B.G.T.L.; VIEIRA, R.D. Avaliação da condutividade elétrica de sementes de soja pelo método individual de análise. In: **IV CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, Londrina-PR, 2005.

VIEIRA, E.S.N.; VON PINHO, E.V.R.; CARVALHO, M.G.G.; SILVA, P.A. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 1, p. 86-94, 2009.

VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras, 1996. 114p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal:Funep. 1994. p.31-47.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.4.1–4.26.

VIEIRA, R.D.; PENARIOL, A.L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1333-1338, 2002.

VIEIRA, R.D.; SCAPPA NETO, A.; BITTENCOURT, S.R.M.; PANOBIANCO, M. Electrical conductivity of the seed soaking solution and soybean seedling emergence. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.2, p.164 -168, 2004.

VIEIRA, R.D.; SCAPPA NETO, A.; BITTENCOURT, S.R.M.; PANOBIANCO, M.; VOLPE, C.A. Envelhecimento acelerado em sementes de milho: teor de água da semente e variações na temperatura e umidade relativa do ar em função do tipo de câmara. **Científica**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.9-14, 2005.

VIEIRA, R.D.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R.F.; SEDIYAMA, C.S.; THIÈBAUT, J.T.L. Efeito do retardamento da colheita, sobre a qualidade de sementes de soja cv. UFV-2. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.4, n.2, p.9-22, 1982.

VIEIRA, R.D.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R.F.; SEDIYAMA, C.S.; THIÈBAUT, J.T.L. (1983) Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de quatorze cultivares de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]. **Revista Ceres**, Viçosa, v.30, n.172, p.408-418, 1983.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS D.E., SOLTIS P.S. (Ed). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p.46-72.

WILSON, D.O.; MCDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, p. 269-300, 1986.