

KARINA RENOSTRO DUCATTI

**VIGOR DE SEMENTES DE SOJA: ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES
RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Botucatu

2018

KARINA RENOSTRO DUCATTI

**VIGOR DE SEMENTES DE SOJA: ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES
RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura).

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido
Amaral da Silva

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

D824v	Ducatti, Karina Renostro, 1990- Vigor de sementes de soja: estudos fisiológicos e moleculares relacionados ao déficit hídrico / Karina Renostro Ducatti. - Botucatu: [s.n.], 2018 147 p.: fots. color., grafs. color., ils. color., tabs. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2018 Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva Inclui bibliografia 1. Soja - Sementes - Fisiologia. 2. Germinação. 3. Atividade enzimática. 4. Priming. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.
-------	---

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "VIGOR DE SEMENTES DE SOJA: ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO"

AUTORA: KARINA RENOSTRO DUCATTI

ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


Dr. FERNANDO AUGUSTO HENNING
Fitotecnia / Embrapa


Prof.ª Dr.ª MARIA LAENE MOREIRA DE CARVALHO
Agricultura / Universidade Federal de Lavras


Prof. Dr. ROGERIO DE ANDRADE COIMBRA
Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais / Universidade Federal de Mato Grosso

Botucatu, 07 de dezembro de 2018.

*Aos meus amados sobrinhos,
Luiz Antônio, Bernardo e Sofia,
dedico*

AGRADECIMENTOS

Àqueles que representam a base de tudo, família! Pai e mãe, obrigada pelo apoio incondicional, por todo amor e por sonhar os meus sonhos. Minha mana e mano queridos, Kassia e Lucas, pela amizade de sempre.

À Letícia, por todo amor e companheirismo. Com você tudo fica mais fácil e nenhum caminho é tão longo ou árduo que não possa ser percorrido. Obrigada por sempre acreditar em mim e por dividir sua vida comigo.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP (Faculdade de Ciências Agrônômicas), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Doutorado que possibilitou a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida para estágio de doutorado no Reino Unido.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade ao longo dos anos. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e me instigar a alçar voos mais altos.

Ao Prof. Dr. George Bassel, por ter me recebido tão gentilmente na Universidade de Birmingham. Obrigada pela orientação e ensinamentos durante meu estágio de doutorado no exterior.

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, um exemplo de profissional, por toda contribuição e disponibilidade em todos os momentos; toda minha admiração e apreço.

Ao Prof. Dr. Rogério de Andrade Coimbra, por todos os ensinamentos e encorajamento ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Roberto Alves Braga e ao Dr. Caio César Salgado da Universidade Federal de Lavras, pelo apoio a essa pesquisa e disponibilização dos laboratórios do Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA) para a realização das análises *biospeckle*.

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori pela colaboração nas análises estatísticas.

À Dra. Juliana Bravo, Dra. Andrea Akemi e ao Dr. Júlio Maia, pelos conhecimentos compartilhados e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, Prof. Dr. Marcelo de Almeida Silva e Dr. Fernando Augusto Henning, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Agricultura que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho. E um agradecimento especial à nossa querida técnica do Laboratório de Sementes, Valéria Giandoni, por acolher e abraçar a todos que chegam, você é uma mãezona! Sem você o laboratório não seria o mesmo.

À toda minha família, por todos os bons momentos e união, trago todos no meu coração. Em especial à minha prima Luana, por todo apoio, conselhos e por me inspirar a embarcar nessa jornada.

À minha família do coração, Analice, Mauro Jr. e Mauro Neto, por todo o carinho e por me acolherem tão bem.

Às minhas amigas queridas, Leticia e Victória, vocês foram indispensáveis ao longo desses anos. Obrigada por todo apoio e carinho nos momentos em que mais precisei.

Às amigas Bruna, Jussara, Maria Beatriz (Nunos) e Beatriz (Cuador). A amizade de vocês foi e é muito importante na minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Sementes: Daiani, Rubiana, Juliana, Thiago, Denise, Maria Rita, Fabiola, Gírlânio, Bárbara, Camila, Gilberto, Tiago Alexandre, Pedro, Leonel, Samara, Maurício, Larissa, Amanda, Rute, Natália e Carol; por toda ajuda, parceria e por tornarem essa jornada menos árdua.

Às meninas do time de futsal da UNESP, orgulho ter feito parte desse time!

Aos amigos do doutorado sanduíche, Cristiane, Pedro, Jaque, Vanessa e Felipe, vocês ajudaram a superar a saudade do Brasil e os tempos gelados da Inglaterra!

Aos queridos amigos de Birmingham, Bali e Albi, vocês estarão para sempre em meu coração! Sou muito grata por ter encontrado vocês!

Aos amigos distantes, mas sempre presentes, vocês fazem parte desta conquista!

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O vigor de sementes está associado a vários aspectos do desempenho de sementes, como velocidade e uniformidade de germinação e tolerância a condições adversas. Os eventos metabólicos ativados nas primeiras horas da embebição podem fornecer informações importantes para explicar as variações de comportamento entre sementes de diferentes níveis de vigor. O objetivo geral foi estudar o vigor de sementes de soja utilizando diferentes abordagens. As sementes de soja das cultivares BRS 133 e MG/BR 46 Conquista foram produzidas sob condições ideais e déficit hídrico (a partir de R5.5). No capítulo 1, as sementes foram submetidas a avaliação da qualidade fisiológica, análises bioquímicas, atividade *biospeckle* ao longo da embebição e estudos de expressão de genes relacionados ao vigor avaliados no eixo embrionário em 0, 6 e 10 horas de embebição. O capítulo 2 teve como objetivo estudar dois protocolos de hidrocondicionamento (imersão direta e entre papel) e avaliar os efeitos no desempenho fisiológico e na expressão gênica de sementes das sementes de soja produzidas no capítulo 1. No capítulo 1, o déficit hídrico durante a fase final de desenvolvimento e maturação de sementes não apenas reduz o vigor das sementes de soja produzidas, como também altera os níveis de atividade enzimática, de atividade *biospeckle* e de expressão gênica ao longo da embebição. Durante as primeiras horas de embebição, notam-se alterações significativas na expressão de genes relacionados a diversos processos, como no reparo ao DNA, combate ao estresse oxidativo, atividades respiratórias e alongamento celular. No capítulo 2, o hidrocondicionamento entre papel proporcionou maior porcentagem e velocidade de germinação, e início mais rápido da protrusão, especialmente em temperaturas subótimas. A análise de expressão de genes demonstrou que as sementes condicionadas, de ambas as cultivares e condições de produção, apresentaram maior expressão de transcritos envolvidos na respiração celular e mobilização de reservas, no alongamento e no remodelamento, modificação e síntese de parede celular, refletindo o efeito benéfico do hidrocondicionamento sobre o desempenho fisiológico das sementes.

Palavras-chave: *Glycine max*. Qualidade fisiológica. *Biospeckle*. Atividade enzimática. Condicionamento fisiológico. *Priming*.

ABSTRACT

Seed vigor is a multiple and complex trait associated with various aspects of seed performance, such as rate and uniformity of germination and tolerance to adverse conditions. The metabolic events activated in early imbibition may provide important information to explain behavior variations in seeds with different vigor levels. The objective was to study soybean seed vigor using different approaches. For this experiment, soybean seeds of cultivars BRS 133 and MG/BR 46 (Conquista) were produced under ideal conditions and under drought stress (from R5.5). In chapter 1, the seeds were submitted to physiological quality tests, biochemical analyzes, biospeckle activity during imbibition and expression of genes related to vigor evaluated in the embryonic axis at 0, 6 and 10 hours after imbibition. In chapter 2, the objective was to study two hydropriming protocols (soaking in water and between paper) and to evaluate the effects on the physiological performance and gene expression of soybean seeds produced in chapter 1. In chapter 1, the results indicated that the drought stress during seed development and maturation not only reduces the vigor of the soybean seeds produced, but also changes the levels of enzymatic activity, biospeckle activity and gene expression during imbibition. During early imbibition, there are significant changes in the gene expression of genes related to several processes, such as DNA repair, oxidative stress, respiratory activities, cell elongation and cell wall modification. In chapter 2, the hydropriming between paper provided higher percentage and speed of germination, and faster onset of the protrusion, especially in suboptimal temperatures. Gene expression analysis demonstrated that the primed seeds of both cultivars and production conditions showed higher expression of transcripts involved in cellular respiration and reserve mobilization, cell elongation, cell wall loosening and biosynthesis of cell wall, which may indicate the beneficial effects of priming on physiological performance in primed seeds during germination.

Keywords: *Glycine max.* Physiological quality. Biospeckle. Enzymatic activity. Physiological conditioning. *Priming*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1 - ABORDAGEM INTEGRADA DA FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA, EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE <i>BIOSPECKLE</i> PARA O ESTUDO DO VIGOR EM SEMENTES DE SOJA.....	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	22
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1.2.1 Produção de sementes.....	26
1.2.2 Caracterização das sementes.....	30
1.2.2.1 Teor de água.....	31
1.2.2.2 Peso de mil sementes.....	31
1.2.2.3 Curva de embebição.....	31
1.2.2.4 Protrusão radicular.....	32
1.2.2.5 Germinação.....	32
1.2.2.6 Comprimento e largura do hipocótilo.....	32
1.2.2.7 Comprimento e massa seca de plântulas, raiz e parte aérea.....	33
1.2.2.8 Emergência de plântulas a campo.....	33
1.2.2.9 Envelhecimento acelerado (100% UR).....	33
1.2.2.10 Envelhecimento acelerado com solução salina saturada de NaCl.....	34
1.2.2.11 Condutividade elétrica.....	34
1.2.2.12 Longevidade.....	34
1.2.3 Análises Bioquímicas.....	35
1.2.3.1 Quantificação de H ₂ O ₂	35
1.2.3.2 Estimativa da peroxidação de lipídeos.....	35
1.2.3.3 Extração das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX).....	36
1.2.4 Análises <i>Biospeckle</i>	36
1.2.5 Estudo molecular do vigor.....	38
1.2.5.1 Extração de RNA total.....	38
1.2.5.2 Síntese de cDNA.....	39

1.2.5.3	Desenho dos primers.....	40
1.2.5.4	Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real.....	43
1.2.6	Análise estatística.....	43
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
1.3.1	Caracterização inicial das sementes.....	44
1.3.2	Comportamento das sementes durante a embebição.....	53
1.3.3	Crescimento do hipocótilo.....	56
1.3.4	Atividade enzimática.....	57
1.3.5	Atividade <i>biospeckle</i> ao longo da embebição.....	61
1.3.6	Expressão de genes relacionados ao vigor.....	66
1.3.6.1	Reparo ao DNA.....	69
1.3.6.2	Combate ao estresse oxidativo.....	72
1.3.6.3	Genes envolvidos na respiração celular e mobilização de reservas.....	73
1.3.6.4	Expressão gênica de fatores de transcrição.....	76
1.3.6.5	Genes envolvidos no alongamento e expansão celular.....	81
1.4	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	87

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO HIDROCONDICIONAMENTO NO DESEMPENHO FISIOLÓGICO E NA EXPRESSÃO GÊNICA EM SEMENTES DE SOJA.....

	RESUMO.....	103
	ABSTRACT.....	104
2.1	INTRODUÇÃO.....	104
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.2.1	Hidrocondicionamento por imersão direta.....	107
2.2.2	Hidrocondicionamento entre papel.....	108
2.2.3	Isolamento dos eixos embrionários de soja.....	109
2.2.4	Extração de RNA total.....	110
2.2.5	Tratamento com DNase.....	110
2.2.6	Síntese de cDNA.....	111
2.2.7	Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real.....	111
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112

2.3.1	Comparação de métodos para o condicionamento fisiológico.....	112
2.3.2	Efeito do hidrocondicionamento entre papel sobre a qualidade fisiológica das sementes.....	116
2.3.3	Efeito do hidrocondicionamento entre papel sobre a qualidade fisiológica e expressão gênica de sementes.....	122
2.4	CONCLUSÃO.....	134
	REFERÊNCIAS.....	134
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
	REFERÊNCIAS.....	145

INTRODUÇÃO GERAL

A semente é responsável por veicular todos os avanços do melhoramento genético, conduzindo ao campo as características genéticas determinantes para o desempenho do cultivar e, ao mesmo tempo, é responsável pelo sucesso do estabelecimento do estande desejado, sendo essencial para alcançar altas produtividades (BETTEY et al., 2000; MARCOS FILHO, 2015). Nesse contexto, a qualidade de sementes é resultado da interação dos atributos genéticos, físicos, sanitários e fisiológicos que determinam o seu valor de semeadura (POPINIGIS, 1985).

Dentre os atributos da qualidade de sementes, o potencial fisiológico tem recebido maior atenção da pesquisa nos últimos anos e compreende o metabolismo da semente para desenvolver suas funções vitais, abrangendo a germinação (viabilidade), vigor e longevidade (POPINIGIS, 1985; BEWLEY et al., 2013). Esses três componentes são adquiridos durante o processo de desenvolvimento e maturação das sementes, sendo resultado da complexa interação entre genótipo e fatores bióticos e abióticos durante a produção (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Assim, o sucesso de todo o complexo de produção de soja é extremamente dependente das condições climáticas, especialmente da disponibilidade hídrica, responsável pelas oscilações anuais de produtividade, podendo afetar também a qualidade das sementes produzidas (PÁDUA et al., 2009; MORANDO et al., 2014). Os danos causados dependem da fase da cultura, tolerância do genótipo, intensidade e duração do estresse, definido como a condição ambiental que impeça a planta de atingir o seu desenvolvimento pleno (KRANNER et al., 2010).

De modo geral, a planta possui vários mecanismos sensores de estresse abiótico, que sinalizam a ocorrência de alteração das condições ambientais, promovendo uma resposta fisiológica através da modificação na expressão de genes ou de proteínas e enzimas já existentes (TAIZ et al., 2017). Como o processo de maturação de sementes é programado geneticamente, estresses durante esse período podem prejudicar a aquisição da qualidade fisiológica (PANOFF, 2016; LIMA et al., 2017; BASSO et al., 2018) e alterar os padrões dos mRNAs armazenados ao

final da maturação, necessários para o processo de germinação (WEITBRECHT; MÜLLER; LEUBNER-METZGER, 2011).

A germinação pode ser definida como a protrusão da raiz primária, do ponto de vista botânico (*strictu sensu*), e do ponto de vista da tecnologia de sementes, como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando sua capacidade de dar origem a uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis (BRASIL, 2009). O vigor reúne várias propriedades que determinam o desempenho das sementes, e sua definição reflete sua complexidade, sendo definido como o “conjunto de propriedades que determinam a atividade e o desempenho de lotes de sementes com alta germinação, sob ampla variação de condições do ambiente” (ISTA, 2015). E a longevidade se refere ao período de tempo em que a semente se mantém viável durante o armazenamento em condições ideais (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008).

O vigor engloba várias características relacionadas ao comportamento das sementes, como uniformidade e velocidade de germinação, crescimento de plântulas, emergência a campo, tolerância a condições adversas e capacidade de se manter viável durante o armazenamento (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). De modo geral, a eficiência e a intensidade com que o processo de transição entre a embebição e a protrusão radicular/desenvolvimento de plântulas ocorrem é que determina o desempenho da semente (WEITBRECHT; MÜLLER; LEUBNER-METZGER, 2011). Nesse ponto, a associação entre a qualidade fisiológica de sementes produzidas sob condições de estresse e a expressão gênica podem fornecer importantes informações acerca dos processos que ocorrem nas primeiras horas de embebição e sua relação com o vigor de sementes.

Diversos grupos de genes têm sido associados ao vigor, principalmente os genes envolvidos em processos ativados nas primeiras horas de embebição, como no reparo ao DNA (CHEN et al., 2012; WATERWORTH et al., 2010), no combate ao estresse oxidativo (YANG et al., 2009; ZHU et al., 2009; GRENNAN, 2011), na respiração celular e hidrólise de reservas (HOWELL et al., 2008; CORBINEAU, 2012; BELLINENY-RABELO et al., 2016). As fases subsequentes dependem, especialmente, da manutenção da integridade do DNA (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015), da eficiência do sistema antioxidante (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008) e da energia proveniente da respiração celular (BEWLEY et al., 2013).

Genes envolvidos no alongamento e expansão celular também têm sido relacionados ao vigor (WU et al., 2005; MAROWA; DING; KONG, 2016). Enzimas hidrolíticas, como as expansinas (EXP), xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH) e β -1,4-glucanase atuam aumentando a extensibilidade da parede celular e a adição de novos polímeros de PC, o que resulta no alongamento celular e, conseqüentemente, na protrusão radicular (COSGROVE, 2005). A sincronia entre esses processos reativados durante a embebição é determinante para a manifestação do vigor de sementes, de modo que compreender a relação entre a variação de expressão gênica entre sementes de diferentes níveis de vigor, pode ajudar a identificar genes relacionados a essa característica.

Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas para avaliação e estudo do vigor são fundamentais. Dentre as novas tecnologias que têm surgido para avaliar o comportamento das sementes, o *biospeckle* é uma técnica de análise de imagens promissora. Essa técnica consiste em estudar o fenômeno de interferência óptica, *speckle*, que ocorre quando um material heterogêneo é iluminado por um feixe de luz laser, interage com as heterogeneidades presentes no tecido e gera diferentes padrões de interferência (granulação) (RABAL; BRAGA, 2008). Como em tecidos biológicos as heterogeneidades variam com o tempo, os padrões de interferência observados são dinâmicos, sendo denominados *biospeckle*.

A técnica vem sendo utilizada na agricultura para diversas finalidades, como no monitoramento da qualidade e estágios de desenvolvimento de frutos, detecção de injúrias e de fungos, análise de sementes e monitoramento de processos fisiológicos de crescimento das plantas e deterioração (ZDUNEK et al., 2013). Na área de análise de sementes, estudos vêm buscando relacionar a atividade *biospeckle* com a qualidade de sementes, viabilidade, deterioração e o processo de germinação em si (BRAGA et al., 2001; FRACAROLLI, 2011; VIVAS et al., 2016).

Outra tecnologia disponível, o condicionamento fisiológico de sementes (*priming*) pode ajudar a compreender o vigor de sementes. Esse procedimento permite realçar e uniformizar o desempenho das sementes a campo, especialmente sob condições adversas. Baseado na hidratação controlada de sementes, permite o início do metabolismo pré-germinativo, sem que ocorra a protrusão radicular (HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975). Por meio dessa técnica, lotes de sementes de baixo vigor podem recuperar o seu desempenho.

O condicionamento fisiológico promove melhorias na germinação e principalmente no vigor, como na velocidade de germinação, comprimento de plântulas e resistência a estresses a campo (GIURIZATTO et al., 2008; SADEGHI et al., 2011; COSTA; BONASSA; NOVENBRE, 2013; COSTA et al., 2017). Como um dos componentes mais ligados aos efeitos benéficos do condicionamento, as respostas fisiológicas de sementes submetidas ao *priming* e as alterações na expressão de genes constituem uma pertinente fonte de informações sobre o vigor.

Desvendar esse traço da qualidade de sementes é essencial para o futuro da agricultura e poderá auxiliar na obtenção de cultivares que produzam sementes mais vigorosas e com melhor desempenho frente às adversidades climáticas, cada vez mais frequentes.

Diante do exposto, o objetivo foi estudar o vigor de sementes de soja sob diferentes aspectos, relacionando a qualidade fisiológica com análises bioquímicas, de atividade *biospeckle* e expressão gênica ao longo das primeiras horas de embebição. Para isso, sementes de soja foram produzidas sob condições de déficit hídrico e condições ideais para produzir sementes com diferentes níveis de vigor. O trabalho foi dividido em duas partes. No capítulo 1 foi realizada a caracterização fisiológica das sementes, análises bioquímicas e de *biospeckle* e a expressão de genes relacionados ao vigor. No capítulo 2, foi desenvolvido um protocolo de condicionamento fisiológico para as sementes de soja, com estudo dos efeitos na germinação e vigor e análise de expressão gênica das sementes.

CAPÍTULO 1

ABORDAGEM INTEGRADA DA FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA, EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE *BIOSPECKLE* PARA O ESTUDO DO VIGOR EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO

Apesar dos avanços na compreensão do vigor, as razões para a variação de comportamento e desempenho entre lotes de diferentes níveis de vigor permanecem pouco compreendidas. Por essa razão, o objetivo foi estudar o vigor adotando uma abordagem múltipla por meio de testes fisiológicos, da avaliação da atividade enzimática, da atividade *biospeckle* e da expressão de genes associados ao vigor em sementes de soja. As sementes de soja das cultivares BRS 133 e MG/BR 46 Conquista foram produzidas sob condições ideais e sob déficit hídrico, totalizando 2 cultivares e 2 regimes hídricos. As sementes foram avaliadas quanto ao peso de mil sementes, viabilidade, vigor, longevidade, parâmetros bioquímicos, atividade *biospeckle* ao longo da embebição e análise de expressão diferencial de genes relacionados ao vigor no eixo embrionário de sementes secas e após 6 e 10 h de embebição. A qualidade fisiológica, os níveis de atividade enzimática e atividade *biospeckle* foram afetados pelo déficit hídrico. Durante as primeiras horas de embebição, a expressão dos genes *N-glycosylase/DNA lyase*, *metallothionein-like protein 1*, *thiol protease aleurain-like* e aqueles envolvidos no relaxamento de parede celular e alongamento, especialmente as expansinas, *α -xylosidase 1-like*, *tubulin α -4 chain-like*, *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2*, *endo-1,4- β -mannanase* e *pectinesterase 3* apresentam relação com o vigor. A visão integrada sobre a fase inicial da germinação auxilia na compreensão dos mecanismos envolvidos e contribui para o avanço das pesquisas sobre vigor de sementes.

Palavras-chave: Longevidade. Viabilidade. Alongamento do hipocótilo. Atividade enzimática. Déficit hídrico.

ABSTRACT

Despite the advances in understanding seed vigor, the reasons for variation in this performance are complex and remain poor understood. Thus, the aim of this work was to study vigor in soybean seeds using a multiple approach through physiological tests, enzymatic activity, biospeckle activity and gene expression in seeds produced under drought stress. The soybean seeds of cultivars BRS 133 and MG/BR 46 Conquista were produced under optimal conditions and under drought stress, comprising 2 cultivars and 2 water regimes. The seeds were evaluated by thousand seed weight, viability, vigor, longevity, biochemical parameters, biospeckle activity during imbibition and differential gene expression analysis of genes related to vigor in the embryonic axis of dried seeds and 6 and 10 hours after imbibition. The physiological quality, enzymatic activity and biospeckle activity of seeds were affected by the drought stress. During early imbibition, expression levels of genes N-glycosylase/DNA lyase, metallothionein-like protein 1, thiol protease aleurain-like and genes involved in cell wall loosening and cell elongation, mainly expansins, α -xylosidase 1-like, tubulin α -4 chain-like, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2, endo-1,4- β -mannanase e pectinesterase 3 are related to seed vigor. An integrated view on the early phase of germination helps in understanding the mechanisms involved in seed vigor.

Keywords: Longevity. Viability. Hypocotyl elongation. Enzyme activity. Drought stress.

1.1 INTRODUÇÃO

A qualidade de sementes é estabelecida durante o desenvolvimento e maturação, sendo o resultado da complexa interação entre genótipo e fatores bióticos e abióticos durante a produção (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). O somatório dos atributos de qualidade genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários determinam o potencial de desempenho da semente a campo, garantindo o estabelecimento do estande adequado, indispensável para alcançar altas produtividades (MARCOS FILHO, 2015b).

Nesse contexto, o potencial fisiológico de sementes abrange a germinação (viabilidade), longevidade e vigor (POPINIGIS, 1985; BEWLEY et al., 2013). A aquisição dos componentes de qualidade é regulada geneticamente durante processo de desenvolvimento/maturação de sementes e envolve uma complexa via de sinalização hormonal, que pode ser afetado ou estimulado por sinais ambientais e endógenos (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Mudanças climáticas como o aumento da intensidade e frequência dos períodos de seca, associados com altas temperaturas, são os fatores abióticos que mais afetam o desenvolvimento das culturas agrícolas e a obtenção de sementes de qualidade (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007; STERNBERG, 2011; SHEFFIELD; WOOD; RODERICK, 2012). Sementes de soja submetidas a condições de déficit hídrico podem apresentar redução na germinação e vigor, no peso de mil sementes, no crescimento de plântulas e velocidade de germinação, com efeito variável de acordo com o estágio de desenvolvimento da cultura, intensidade e duração da escassez (DORNBOS JR.; MULLEN; SHIBLES, 1989; DORNBOS JR.; MULLEN, 1991; DESCLAUX; HUYNH; ROUMET, 2000; SAMARAH; MULLEN; ANDERSON, 2009; PADUA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2016).

Atualmente, a definição mais aceita de vigor é adotada pela *International Seed Test Association* (ISTA) como o “conjunto de propriedades que determinam a atividade e o desempenho de lotes de sementes com germinação aceitável, sob ampla variação de condições do ambiente” (ISTA, 2015). Devido a sua complexidade, está associado a vários aspectos do comportamento de sementes, como a velocidade e uniformidade de germinação de sementes, crescimento de plântulas e resistência a estresse durante a emergência e armazenamento (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

A partir do máximo vigor inicial da semente, adquirido durante a maturidade fisiológica, a semente está sujeita ao processo de deterioração, antes e após a colheita, bem como durante o armazenamento (DELOUCHE, 1963). Por esse motivo, testes de envelhecimento acelerado e deterioração controlada têm sido utilizados como base para explicar as diferenças de vigor entre lotes de sementes, considerando a deterioração como uma característica inversa ao vigor (PRIETO-DAPENA et al., 2006; WANG et al., 2012). No entanto, independente do estresse ao qual a semente foi exposta após atingir a maturidade fisiológica, o que influencia

diretamente as diferenças entre lotes de alto e baixo vigor e a dinâmica da redução do potencial fisiológico ao longo do tempo é a qualidade inicial da semente (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Além disso, as partes constituintes da semente não se comportam de maneira uniforme durante a deterioração e germinação. Os pontos de crescimento, como o eixo embrionário, e demais partes da semente diferem quanto à velocidade de hidratação (VILLELA; NOVENBRE; MARCOS FILHO, 2007), à sensibilidade a deterioração (FERGUSON; TEKRONY; EGLI, 1990), ao nível de atividade *biospeckle* (BRAGA et al., 2001), dentre outros aspectos. Também dentre diferentes regiões do eixo embrionário já foram documentadas variações de crescimento e alongamento durante a germinação (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009; SOUZA; TOPHAM; BASSEL, 2017).

Apesar dos avanços, as razões para a variação de comportamento e desempenho entre lotes de diferentes níveis de vigor permanecem pouco compreendidas. Nesse sentido, destaca-se a necessidade da compreensão dos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares relacionados ao vigor, como o estudo de perfis moleculares ao nível de genes transcritos, expressão de proteínas e atividades enzimáticas que possam estar correlacionadas com essa característica, visando compreender o vigor em diferentes níveis e desenvolver novas metodologias de avaliação ou integrá-las aos métodos tradicionais (VENTURA et al., 2012). O estudo de regiões específicas da semente também pode favorecer a obtenção de informações mais precisas e aprofundadas acerca do vigor (MARCOS FILHO, 2015b).

De modo geral, os principais grupos de marcadores moleculares para a avaliação do vigor de sementes envolvem os indicadores de danos (como acúmulo de espécies reativas de oxigênio), indicadores da eficácia do sistema de proteção/defesa (açúcares solúveis, proteínas *late embryogenesis abundant* - LEA, enzimas de defesa antioxidantes) e indicadores do processo de germinação (atividade respiratória, ciclo celular, atividade hidrolítica) (CORBINEAU, 2012). A eficiência desses mecanismos de proteção, desintoxicação e reparo é determinante para o processo de germinação e depende dos mRNAs armazenados ao final da maturação (WEITBRECHT; MÜLLER; LEUBNER-METZGER, 2011).

A germinação é um processo de transição entre semente e plântulas, com taxa e intensidade variáveis de acordo com uma série de eventos e pontos de

verificação que ocorrem ao longo da embebição (WEITBRECHT; MÜLLER; LEUBNER-METZGER, 2011). Durante a embebição, os transcritos armazenados são responsáveis pelos processos de reparo de DNA e organelas, reativação do metabolismo e enfraquecimento de parede celular, permitindo o alongamento e expansão celular do hipocótilo, culminando com a protrusão da raiz primária (WEITBRECHT; MÜLLER; LEUBNER-METZGER, 2011; BEWLEY et al., 2013).

Nesse contexto, sementes mais vigorosas completam mais rapidamente o programa de germinação do que as menos vigorosas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Estudos de transcriptoma revelam que sementes de soja secas contêm transcritos associados a mais de 13.000 genes (ROSSI, 2016), com variações significativas logo nas primeiras horas de embebição (BELLIENY-RABELO et al., 2016). Genes envolvidos no reparo ao DNA, como DNA ligases e glicosilases (WATERWORTH et al., 2010; CHEN et al., 2012), no combate ao estresse oxidativo, como metalotioneínas (YANG et al., 2009; ZHU et al., 2009; GRENNAN, 2011), na respiração celular e na hidrólise de reservas, como enzimas glicolíticas e proteases (HOWELL et al., 2008; CORBINEAU, 2012; BELLIENY-RABELO et al., 2016), no alongamento e expansão celular, como expansinas e xiloglucano endotransglicosilase-hidrolases (XTH) (WU et al., 2005; MAROWA; DING; KONG, 2016), têm sido associados com o vigor. Além disso, a expressão de fatores de transcrição (FTs) é acentuada no início da embebição, modulando a expressão de genes envolvidos nesses processos biológicos (BELLIENY-RABELO et al., 2016; ROSSI, 2016). Desse modo, a compreensão dos processos que ocorrem nas primeiras horas de embebição e os genes envolvidos podem fornecer importantes informações acerca do vigor de sementes.

Sob o mesmo ponto de vista, integrar novas tecnologias é fundamental para desvendar os processos envolvidos na germinação e vigor de sementes. Na área de análise de imagens, a técnica do *biospeckle* vem despontando como promissora para avaliação da atividade biológica de sementes e diversos estudos têm buscado relacionar a atividade *biospeckle* com a qualidade de sementes e o processo de germinação (BRAGA et al., 2001; FRACAROLLI, 2011; RABELO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2014; VIVAS et al., 2016). Todas essas informações combinadas podem preencher a lacuna deixada pela biologia tradicional, desvendando processos envolvidos na eficiência do processo de germinação e vigor de sementes (AGRAWAL; RAKWAL, 2012).

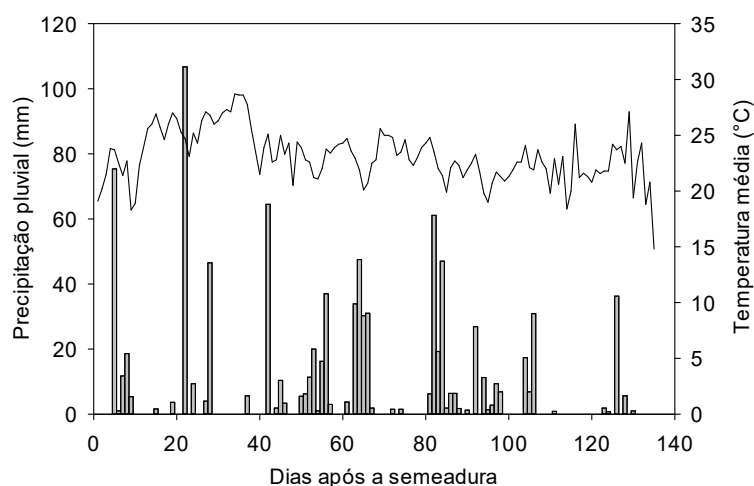
Diante de todas as facetas inerentes ao desempenho de sementes, uma abordagem ampla do vigor inicial, sem a manipulação dos lotes para obtenção de comportamentos contrastantes, é crucial para identificar os processos envolvidos no vigor *per se*. Assim, o objetivo foi avaliar o vigor de sementes de soja produzidas em condições de déficit hídrico por meio da caracterização de parâmetros fisiológicos, bioquímicos, de atividade *biospeckle* e de expressão de transcritos no eixo embrionário de sementes em diferentes períodos de embebição (0, 6 e 10 horas).

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Produção de sementes

O experimento foi conduzido durante a safra agrícola 2014/2015 na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, localizada no município de Botucatu, São Paulo, Brasil (22°50'32" S; 48°25'29" O; 750 m de altitude). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é caracterizado como temperado quente úmido (mesotérmico), do tipo Cfa, com precipitação pluviométrica média anual de 1.501,4 mm e a temperatura média anual de 20,3 °C (CUNHA; MARTINS, 2009). Os dados de precipitação e as temperaturas máxima e mínima durante este estudo foram coletados na Estação Meteorológica da Fazenda Experimental Lageado, pertencente ao Departamento de Recursos Naturais (Figura 1).

Figura 1 - Precipitação pluvial diária (mm) e temperatura média (°C) ao longo da realização do experimento no ano de 2014/2015, em Botucatu – SP.



O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho distroférrico (SANTOS, et al., 2018), de textura argilosa. Amostras de solo foram coletadas na camada de 0 a 20 cm e submetidas à análise química para correção do solo antes da instalação do experimento, em setembro de 2014 (Quadro 1).

Quadro 1 - Características químicas do solo antes da instalação do experimento no ano 2014.

Profundidade	pH (CaCl ₂)	M.O.	P (resina)	H+Al	K	Ca	Mg	CTC	V
(cm)		(g.dm ⁻³)	(mg.dm ⁻³)	-----		(mmolc.dm ⁻³)	-----		(%)
0 - 20	5,1	21	31	33	1,6	29	12	76	56

As cultivares de soja BRS 133 e MG/BR-46 Conquista, foram cedidas pela Embrapa Soja (Londrina-PR) e utilizadas para a produção das sementes utilizadas neste estudo. A cultivar BRS 133 pertence ao grupo de maturação semiprecoce, com duração de ciclo média de 132 dias, crescimento do tipo determinado, peso médio de 1000 sementes de 16 g, e teor de proteína 38,6% e 18% de óleo (EMBRAPA, 2010). Já a cultivar MG/BR-46 Conquista possui ciclo semitardio (140 dias), hábito de crescimento determinado, peso médio de 1000 sementes de 15,5 g, teor de proteína e óleo de 19,7% e 42,7%, respectivamente (ARANTES et al., 2010). As principais diferenças entre as cultivares estão na maior susceptibilidade ao déficit hídrico e estresse térmico por altas temperaturas, levando a maior produção de sementes esverdeadas (retenção de clorofila) da cultivar Conquista em relação a cultivar BRS 133 (PÁDUA, et al., 2009). Ambas as cultivares são recomendadas para as condições climáticas da região.

Para semeadura, as sementes foram tratadas com o fungicida Proteat® (Carbendazim + Thiran) na dose de 1,5 mL.kg⁻¹ de semente e inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, utilizando 1,6 mL.kg⁻¹ de Biomax® (Biosoja). O controle fitossanitário e tratos culturais foram realizados seguindo as recomendações técnicas para a cultura (EMBRAPA, 2013).

O plantio foi realizado em dezembro de 2014, no espaçamento 0,45 m entre linhas. Cada parcela experimental apresentou 4 linhas, com 7 m de comprimento. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições, no esquema fatorial 2 x 2. Os tratamentos foram constituídos por dois regimes hídricos: irrigação plena (mantendo a umidade do solo próxima à capacidade de campo) e déficit hídrico (mantendo a umidade do solo próximo ao ponto de murcha

permanente); e duas cultivares. Os tratamentos consistiram em: sementes produzidas em condições ideais (Controle - CT) e sob déficit hídrico (Estresse - EST), das cultivares BRS 133 (133) e MG/BR 46 Conquista (CONQ), totalizando 4 tratamentos: 133 CT, 133 EST, CONQ CT e CONQ EST.

As plantas de ambas as cultivares foram conduzidas sob condições ideais durante a fase vegetativa e parte da fase reprodutiva, mais especificamente até o estágio R5.5, mantendo a umidade do solo próxima a capacidade de campo, com suprimento de água por irrigação por gotejamento, quando necessário. Após o estágio R5.5, as plantas submetidas ao déficit hídrico foram mantidas em cobertura plástica, protegidas da chuva até o momento da colheita (Figura 2A), enquanto as plantas mantidas sob condições ideais permaneceram expostas a chuva, sendo irrigadas quando necessário (Figura 2B). O estágio R5.5 foi escolhido para implantação do déficit hídrico por corresponder a fase final do enchimento de sementes, a partir do qual tem início a aquisição da qualidade fisiológica (germinação, vigor e longevidade) (PANOFF, 2016; LIMA et al., 2017; BASSO et al., 2018), possibilitando a produção de sementes com diferentes níveis de vigor.

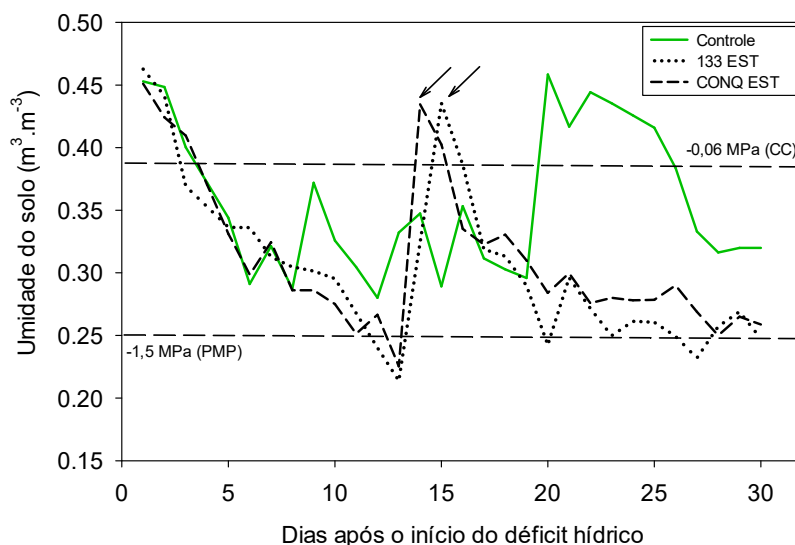
Figura 2 – Vista da área experimental. (A) Parcelas submetidas ao déficit hídrico a partir do estágio R5.5, mantidas sob cobertura plástica; (B) Parcelas mantidas em condições ideais, com irrigação suplementar.



Para o monitoramento da umidade do solo, as curvas de retenção de água no solo foram determinadas em câmara de pressão de placas porosas (Câmara de Richards) para os potenciais mátricos de -0,003, -0,006, -0,01, -0,03, -0,1, -0,5 e de -1,5 MPa. Os dados de umidade volumétrica e seus respectivos potenciais matriciais foram ajustados à equação de van Genuchten (1980) e calibrados para a utilização do sensor 5TM (Decagon Procheck), permitindo o monitoramento da umidade do

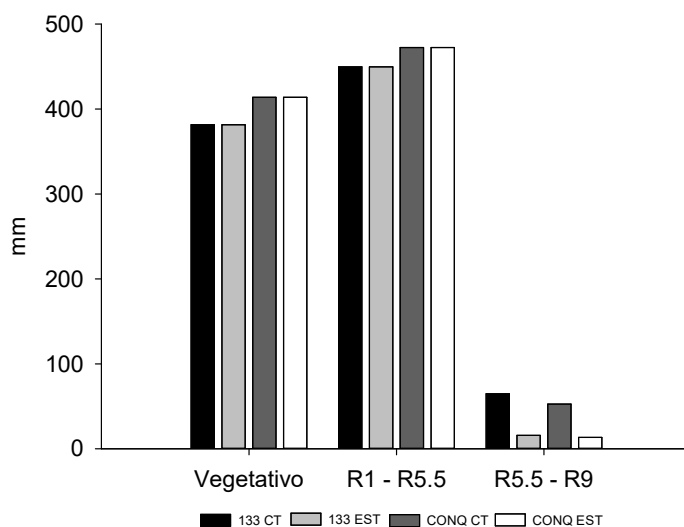
solo. Assim, entre os estádios R5.5 e R9, o monitoramento da umidade do solo foi realizado diariamente, em três pontos por parcela, sempre às 6 horas da manhã (Figura 3).

Figura 3 – Umidade do solo ($\text{m}^3.\text{m}^{-3}$) durante o período de déficit hídrico de plantas de soja. Setas indicam quando as parcelas mantidas sob cobertura plástica (déficit hídrico) foram irrigadas para retornar à capacidade de campo.



Antes da instalação do déficit hídrico, todas as parcelas foram mantidas nas mesmas condições, com valores de lâmina acumulada entre 400 e 470 mm para os períodos vegetativo e reprodutivo de R1 a R5.5, respectivamente (Figura 4). Nesses períodos, a lâmina acumulada foi corresponde a precipitação pluvial, sem necessidade de irrigação suplementar.

Figura 4 – Lâmina total acumulada (pluvial + irrigação), em mm, durante o ciclo da cultura de soja.



Entre os estádios R5.5 a R9, as plantas submetidas ao déficit hídrico, mantidas sob cobertura plástica e protegidas da chuva, foram irrigadas apenas uma vez, quando a umidade do solo chegou a níveis críticos (Figura 3). As parcelas 133 EST receberam apenas 15 mm de lâmina de irrigação, no 16º dia após o início do déficit hídrico; e as parcelas CONQ EST foram irrigadas com 13 mm, no 14º dia (Figura 4). As parcelas mantidas em condições ideais (controle - irrigação plena), na ausência de precipitação pluvial, foram irrigadas visando manter os níveis de umidade do solo próxima a capacidade de campo.

A colheita manual foi realizada em abril de 2015, no estádio R₉. Na sequência, as plantas foram expostas a secagem natural e trilhadas mecanicamente em trilhadeira de parcela. As sementes verdes, danificadas e quebradas foram descartadas. As demais sementes foram armazenadas em câmara fria com temperatura e umidade relativa (UR) de 12°C e 50%, respectivamente.

1.2.2 Caracterização das sementes

As sementes foram caracterizadas quanto ao seu teor de água, peso de mil sementes, porcentagem de germinação (plântulas), longevidade (P50) e vigor (porcentagem de protrusão radicular, velocidade de germinação (T50), comprimento e largura do hipocótilo, comprimento e massa seca de plântulas, raiz e parte aérea, emergência a campo, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica).

1.2.2.1 Teor de água

Foi determinado em 2 repetições de 20 sementes cada, pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

1.2.2.2 Peso de mil sementes

Foram utilizadas oito subamostras de 100 sementes e suas massas determinadas em balança de precisão 0,001 g. O peso de mil sementes (PMS) foi calculado utilizando a equação: $PMS = (\text{peso da amostra} \times 1.000) / \text{número total de sementes}$; conforme as instruções das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

1.2.2.3 Curva de embebição

Para a curva de embebição de sementes inteiras, quatro repetições de 100 sementes secas foram pesadas em balança de precisão de 0,0001 g e distribuídas em substrato de papel na forma de rolo, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco, mantidas em germinador regulado à 25 °C na ausência de luz (BRASIL, 2009). As sementes foram pesadas durante o processo de hidratação em intervalos de 6 h até 48 h de embebição. Com os dados de teor de água inicial (sementes secas) e o peso inicial correspondente, o teor de água ao longo da embebição foi calculado.

O padrão de embebição do eixo embrionário e dos cotilédones foi determinado com 4 repetições de 10 sementes. As sementes foram colocadas para embeber, como descrito anteriormente, e os eixos e cotilédones foram separados com o auxílio de lâmina e estilete após 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de embebição. As sementes secas foram previamente mantidas no substrato úmido por dez minutos, para facilitar a remoção do tegumento e a separação das partes correspondentes. Após cada tempo de embebição citado acima, os eixos e cotilédones foram isolados, pesados e os graus de umidade foram determinados em estufa a 105 ± 3 °C, por 24 h (BRASIL, 2009), sendo os resultados expressos em base úmida.

1.2.2.4 Protrusão radicular

O teste de protrusão radicular foi realizado com quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento, distribuídas em substrato de papel na forma de rolo, com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco, e mantidas em germinadores regulados a 10 °C, 15 °C e 25 °C. Também foi conduzido com solução salina de NaCl na concentração de 100 mmol.L⁻¹ em substituição à água no umedecimento do papel, à temperatura de 25 °C. A cada 6 horas foi computado o número de sementes que apresentaram protrusão radicular com 1 mm de comprimento como critério para germinação (expressa em porcentagem). O tempo requerido para germinação de 50% das sementes viáveis (T50) foi calculado por meio da análise de dados de germinação acumulada usando o módulo de ajuste de curva do software *Germinator* (JOOSSEN et al., 2010) e os resultados expressos em horas.

1.2.2.5 Germinação

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 25 sementes, semeadas em substrato de papel na forma de rolo, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco. Os rolos confeccionados permaneceram acondicionados dentro de sacos plásticos fechados mantidos em um germinador regulado à temperatura de 25 °C. As avaliações foram efetuadas aos cinco e oito dias após a semeadura, computando-se as porcentagens de plântulas normais, anormais e sementes mortas (BRASIL, 2009).

1.2.2.6 Comprimento e largura do hipocótilo

Para a medição do comprimento e largura do hipocótilo foram empregadas três repetições de dez sementes secas (0 h) e após 6 e 10 horas de embebição. Os hipocótilos foram isolados com auxílio de lâmina e pinça, posicionados em papel cartão azul, ao lado de régua graduada, onde foram fotografados. A partir das fotografias realizaram-se as medições de comprimento e largura do hipocótilo, em milímetros, utilizando o software *ImageJ* (RASBAND, 1997).

1.2.2.7 Comprimento e massa seca de plântulas, raiz e parte aérea

Foram utilizadas quatro repetições de dez sementes de soja, semeadas em linha traçada no terço superior do papel toalha de germinação no sentido longitudinal. Os papéis foram umedecidos com água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel e os rolos foram acondicionados em germinador por 8 dias a 25 °C (NAKAGAWA, 1999). Ao final deste período, foi efetuada a medida das partes das plântulas normais (raiz primária e parte aérea) utilizando régua graduada em centímetros. O comprimento de plântulas foi obtido por meio do somatório da parte aérea e raiz.

Após a obtenção das medidas de comprimento, as repetições de parte aérea e raiz foram acondicionadas separadamente, em sacos de papel, para secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de 60 °C durante 24 horas (NAKAGAWA, 1994). Após esse período, cada repetição foi pesada em balança de precisão de 0,001 g e os resultados de massa seca expressos em miligramas. A massa seca de plântulas foi obtida através do somatório entre raiz e parte aérea.

1.2.2.8 Emergência de plântulas a campo

O teste de emergência de plântulas foi realizado em canteiros de areia, umedecida inicialmente até atingir 60% da sua capacidade de retenção de água e reumedecida sempre que necessário. Foram utilizadas quatro sub-amostras de 50 sementes por parcela, distribuídas a 3 cm de profundidade. Realizaram-se contagens aos quinze dias após a semeadura, determinando-se as porcentagens médias de emergência de plântulas.

1.2.2.9 Envelhecimento acelerado (100% UR)

Conforme metodologia descrita por Marcos Filho (1999), as sementes foram dispostas em camada única sobre tela metálica suspensa dentro de caixas do tipo gerbox, contendo 40 mL de água destilada ao fundo (100% UR) e mantidas em câmara BOD, a 41 °C por 48 horas. Após este período, quatro repetições de 50 sementes foram submetidas a germinação, conforme descrito no item 1.2.2.5. Nas avaliações, foram computadas apenas as plântulas normais ao quinto dia após a

instalação e os resultados expressos em porcentagem. Antes e após os testes de envelhecimento acelerado, o teor de água foi determinado pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, utilizando 2 subamostras de 25 sementes (BRASIL, 2009).

1.2.2.10 Envelhecimento acelerado com solução salina saturada de NaCl

Foi realizado conforme descrição do item anterior, exceto pela substituição da água destilada por solução salina de NaCl, proporcionando umidade relativa do ar aproximada de 75%, com período de envelhecimento de 72 horas à 41°C (MARCOS FILHO et al., 2000).

1.2.2.11 Condutividade elétrica

Foi realizado com quatro sub-amostras de 50 sementes por tratamento, com massas conhecidas, em recipientes de plástico, adicionando-se 75 mL de água destilada. Os recipientes foram mantidos à 25°C por 24 horas, com posterior leitura da condutividade elétrica das soluções com condutivímetro (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999), modelo Digimed D31. O resultado foi expresso em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, dividindo-se a leitura pela massa das sementes.

1.2.2.12 Longevidade

As sementes foram distribuídas em camada única sobre tela metálica acoplada à caixa plástica (11 x 1,0 x 3,5 cm) sob uma atmosfera de 75% de umidade relativa à 35°C , obtidos por meio de solução saturada (40 mL de água destilada em 18 g de sal) de cloreto de sódio (NaCl). As sementes foram mantidas nessas condições por 14, 28, 42, 56, 77, e 98 dias e avaliadas quanto ao seu potencial germinativo (protrusão radicular). A longevidade das sementes de soja foi determinada pelo período em dias, em que a viabilidade das sementes se reduz pela metade (P50), calculados conforme Ellis e Roberts (1980), com base na equação matemática: $v = K_i - p/\sigma$.

1.2.3 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas corresponderam a avaliação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), da estimativa da extensão da peroxidação de lipídeos por meio dos níveis de malonaldeído (MDA) e da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX).

Para tanto, quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento (133 CT, 133 EST, CONQ CT e CONQ EST) foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

1.2.3.1 Quantificação de H_2O_2

O peróxido de hidrogênio foi quantificado utilizando-se amostras de 100 g de sementes maceradas e homogeneizadas em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos. O sobrenadante (75 μL) foi utilizado para reação com 75 μL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 150 μL de (KI) a 1 M em placas. A leitura da absorbância foi realizada em 390 nm e o conteúdo de H_2O_2 foi determinado pela curva padrão.

1.2.3.2 Estimativa da peroxidação de lipídeos

A estimativa da peroxidação de lipídeos (MDA) foi determinada a partir de amostras de 100 mg de sementes maceradas e homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) contendo 0,67% TCA, seguido de centrifugação a 15000 g durante 15 min. A 1,0 mL do sobrenadante foram adicionados 2,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% em 20% de TCA. A mistura foi aquecida à $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos no banho de água e depois arrefecida em gelo. Na sequência foi feita a centrifugação a 15000 g durante 20 min, seguida da absorbância do sobrenadante a 532 nm. O valor para a absorção inespecífica de cada amostra a 600 nm também foi gravado e subtraído da absorbância registrada a 532 nm.

1.2.3.3 Extração das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX)

A atividade enzimática foi determinada utilizando 100 mg de sementes maceradas e homogeneizadas com 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8) adicionado de 100 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1 mM de ácido ascórbico e 5% de (PVP) (GOMES et al., 2014). A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976).

A atividade da CAT foi determinada em meio contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.0), 10 mM de H_2O_2 e quantidade adequada de extrato enzimático, sendo o consumo de H_2O_2 monitorado na absorbância de 240 nm ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (AEBI, 1984).

A atividade de SOD foi avaliada em um meio de reação contendo fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 13 mM de L-metionina, 0,1 mM de EDTA, 0,002 mM de riboflavina, 0,075 mM de (NBT) e quantidade adequada de extrato enzimático (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O meio de reação foi mantido por 10 minutos em temperatura ambiente sob luz fluorescente direta de 15 W, enquanto o controle foi mantido no escuro. A formação do azul de formazan, derivado da redução do NBT, foi medido a 575 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT.

A atividade da APX foi determinada pela oxidação do ascorbato a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (NAKANO; ASADA, 1981). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de H_2O_2 e quantidade adequada de extrato enzimático.

1.2.4 Análises *Biospeckle*

O experimento foi realizado no Centro de Desenvolvimento e Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA), da Universidade Federal de Lavras (MG).

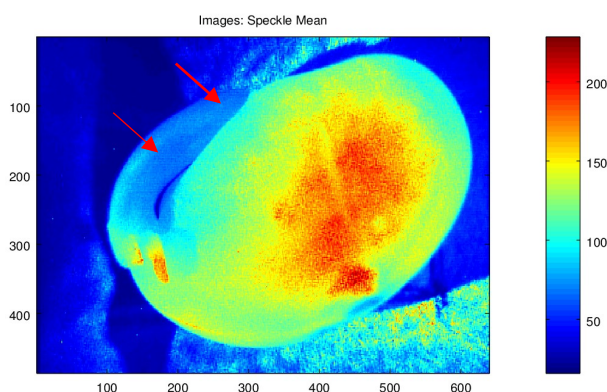
Para avaliar a relação entre o nível de atividade *biospeckle* e qualidade fisiológica das sementes, 24 sementes de soja, de cada tratamento, foram iluminadas após embebição, à 25 °C, nos tempos de 6, 10, 18, 24 e 30 horas. Para a obtenção das imagens, o tegumento foi retirado e os cotilédones separados longitudinalmente.

As sementes foram colocadas em mesa óptica com sistema anti-vibração e iluminadas com um laser HeNe vermelho (632 nm) de 10 mW de potência, utilizando um filtro neutro e um divisor de feixe para espalhar a luz laser através das sementes, evitando a superexposição e a saturação *biospeckle* nas imagens (MOREIRA; CARDOSO; BRAGA; 2014). As imagens foram capturadas com uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada) conectada a um computador para posterior processamento das imagens.

Os padrões *speckle* foram obtidos a uma taxa de amostragem de 0,08 s, totalizando 128 imagens por semente. Essas imagens foram processadas no software Octave versão 3.8.1 (EATON et al., 2014) e os padrões *speckle* foram obtidos pelos métodos numéricos de Momento de Inércia (MI) e Diferença dos Valores Absolutos (AVD). Esses parâmetros são proporcionais a atividade biológica, de modo que quanto maiores os índices de AVD e MI observados, maior a atividade biológica da amostra analisada (BRAGA et al., 2011).

A partir da seleção de duas regiões de interesse da amostra, os valores de MI e AVD foram calculados para a radícula e a região central do hipocótilo (Figura 5).

Figura 5 – Representação das regiões de interesse selecionadas para análise numérica da atividade *biospeckle* pelos métodos MI e AVD. Setas indicam as regiões de interesse selecionadas: radícula e região central do hipocótilo.



De acordo com as mudanças de frequência no padrão temporal *biospeckle* é importante utilizar diferentes abordagens de estudo. O cálculo do MI é indicado para estudo de mudanças bruscas de intensidade, enquanto o AVD possui maior sensibilidade a toda composição espectral, podendo fornecer informações complementares sobre o fenômeno analisado (BRAGA et al., 2011). Neste estudo, a análise dos dois índices permitiu o detalhamento da atividade *biospeckle*.

A escolha dessas regiões para análise da atividade *biospeckle* se justifica com base em estudos de citometria de fluxo em sementes de *Arabidopsis* (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009) e microscopia confocal em sementes de soja (SOUZA; TOPHAM; BASSEL, 2017) durante a germinação, indicando que a região responsável pelo alongamento celular e protrusão radicular é a região adjacente ao hipocótilo e não a radícula. Assim, além da análise da atividade *biospeckle* ao longo da embebição em sementes produzidas sob déficit hídrico e sob condições ótimas, também foi analisada a atividade na radícula e na região central do hipocótilo.

1.2.5 Estudo molecular do vigor

Para avaliar o efeito do déficit hídrico sobre a expressão de genes relacionados ao vigor foram selecionados os tempos de 0 h (sementes secas), 6 e 10 horas após a embebição, para as sementes de cada cultivar e condição de produção (133 CT, 133 EST, CONQ CT e CONQ EST). As sementes foram colocadas para embeber conforme descrito no item 1.2.2.5. Após cada período, os eixos embrionários foram isolados em três repetições biológicas de 50 eixos, totalizando 36 amostras, que foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL, congeladas sob nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a uma temperatura de -80 °C, até extração de RNA.

1.2.5.1 Extração de RNA total

Para a extração do RNA foi utilizado o kit – NucleoSpin RNA Plant® da Macherey-Nagel. Conforme protocolo descrito pelo fabricante, foram transferidos aproximadamente 100 mg do material macerado em nitrogênio líquido para um microtubo de 1,5 mL. Em capela, foram adicionados 350 µL de tampão de extração (RA1) e 3,5 µL de β-mercaptoethanol (β-ME), seguido de agitação em vórtex para homogeneizar as amostras. Para redução da viscosidade, as amostras foram filtradas no NucleoSpin Filter® e coletadas em tubos coletores de 2 mL em centrífuga por um minuto à 11.000 rpm. Os filtrados de cada amostra foram transferidos para eppendorfs de 1,5 mL e adicionados 350 µL de etanol 70%. Logo após as amostras

foram transferidas para colunas de NucleoSpin RNA Plant® e coletadas em tubos coletores de 2 mL em centrifuga por 30 segundos à 11.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna de filtração foi acondicionada a outros tubos coletores. Para cada amostra, foram adicionados 350 µL de *Membrane Desalting Buffer*® (MDB) na coluna de filtração e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm até secagem completa da membrana da coluna de filtração. A digestão do DNA foi realizada adicionando no centro da membrana de sílica da coluna de filtração 95 µL de *DNase reaction mix*® e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, as colunas de NucleoSpin RNA Plant® foram submetidas à primeira lavagem com adição de 200 µL de tampão (buffer RAW2) e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. As colunas de filtração foram acondicionadas em novos tubos coletores e submetidas a uma segunda lavagem adicionando 600 µL de tampão (RA3) e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Após o descarte da solução do tubo coletor, procedeu-se a terceira e última lavagem, adicionando-se 250 µL de tampão (RA3) as colunas de NucleoSpin RNA Plant®, seguido de centrifugação por dois minutos a 11.000 rpm até secagem completa da membrana. Por último, as colunas de NucleoSpin RNA Plant® foram transferidas para eppendorf de 1,5 mL e foi feita a eluição do RNA adicionando-se 35 µL de água RNase-free, seguido de centrifugação por um minuto a 11.000 rpm. Os RNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng.µL⁻¹. A integridade das amostras de RNA foi avaliada em gel de agarose 1,0% em cuba de eletroforese a 90 volts em 30 minutos.

1.2.5.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A síntese do cDNA foi elaborada para uma reação de 20 µL, utilizando para 2000 ng. Para o mix de cDNA foram adicionados 2 µL de 10X RT Random Primers, 2 µL de 10x RT Buffer, 0,8 µL 25X dNTP Mix (100mM), 1 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4,2 µL Nuclease-free H₂O. O mix do cDNA (10 µL) foi homogeneizado e adicionado ao RNA diluído. As reações foram incubadas em Termociclador 3Prime Thermal Cycler (Techne) e submetidos a 25 °C por 10 minutos (ativação inicial da enzima), 37 °C por 120 minutos (síntese de

cDNA), 85 °C por 5 minutos (inativação da enzima) e mantidos à 4°C ao final da ciclagem. As amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific), diluídas a uma concentração padrão de 60 ng.µL⁻¹ e armazenadas em freezer a -20 °C.

1.2.5.3 Desenho dos primers

Os genes candidatos foram identificados por buscas na literatura de genes associados ao vigor e germinação. A sequência dos genes estudados para o desenho dos primers foi retirada do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a confirmação da sequência CDS foi verificada pelo software online *Softberry* (<http://www.softberry.com/>), atestando a presença de apenas éxons na sequência.

Os primers foram desenhados utilizando o software *PerlPrimer* (<http://perlprimer.sourceforge.net>) e os parâmetros utilizados foram: tamanho da amplificação de 80 a 150, temperatura de anelamento de 58 – 61 °C e tamanho do primer de 18 a 24 pares de bases. A eficiência de amplificação para cada par de primers foi determinada por RT-qPCR e calculada a partir da curva de amplificação utilizando *LinReg PCR*.

Foram testados dois genes de referência (Importin beta-2 subunit family protein e 20S proteasome subunit beta 1) e utilizados 28 genes candidatos para o estudo molecular do vigor (Quadro 2 e 3), agrupados em quatro grupos: genes envolvidos no reparo de DNA e combate ao estresse oxidativo; no processo de respiração celular e mobilização de reservas; na regulação da transcrição gênica; e no remodelamento e síntese de parede celular.

Quadro 2 - Primers utilizados para as reações de PCR em tempo real.

Genes	Locus <i>Arabidopsis</i>	Locus <i>Glycine max</i>	Forward (5'–3')	Reverse (3'–5')
Importin beta-2 subunit family protein	AT2G16950	Glyma.20G106300	GATAATAAGCGGGTCCAAGAG	GTCATCAGGTGCTTCAGTATAA
20S proteasome subunit beta 1	AT4G31300	Glyma.06G078500	CACCAACACACGATACAACT	TCCCAACCACCAACAATTAACC
N-glycosylase/DNA lyase OGG1	AT1G21710	Glyma.06G115500	GTGCTCTTCTAATAACAACATCGG	AAAGCGTGGAAGTGAAGCTC
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	AT2G41460	Glyma.02G191100	CTACCACTTCTGTCAATCTCAC	CATTGCTTTCACAGTTGGAC
NAC domain-containing protein 8-like	AT1G25580	Glyma.01G088200	GCAATCAACGCTTACAACAC	TTTGAATCCCATTAAGACAAGCTG
Metallothionein-like protein 1	AT3G09390	Glyma.17G230500	GACTTGAGTTACGTTGAGAAGAC	CAGATGCAACACCCATTTCAG
Enolase	AT2G36530	Glyma.03G190500	GAGTTTATGGTTCTTCCCGTG	CCTTCGTCAACACATTTACTG
Thiol protease aleurain-like	AT3G45310	Glyma.17G049000	CGACACAGAAGAAGCATATCC	GTTTCAATTTCATCCTCAGCACC
Cysteine proteinase RD21a-like	AT1G47128	Glyma.14G085800	GTCCAAATCCACCTAATCCTG	CTCAAAGCAAGCATTTCGGA
CLASS I KNOX homeobox transcription factor	AT1G62360	Glyma.14G047000	CAACCTAGATTCTCAAGCTGAA	CTTCTTGAGGCTCCCTAGATA
WRKY transcription factor 27	AT4G04450	Glyma.03G224700	CATACATGGACAACCGACAC	GAGGCGATGAAGTTGAGAAG
ABI3L - B3 domain-containing protein	AT5G06250	Glyma.02G200500	ACGTTAGCAGCAGGAAGA	GATGATGCGCAGGATAGAAC
Heat stress transcription factor A3	AT5G03720	Glyma.10G066100	GGTTTGACCAAGGAGAAGAA	CACTAACATTGAGGCCAGAG
Auxin response factor 5-like	AT1G19850	Glyma.14G217700	CAGGTTCTGTAGGAAGATCAAT	GTGTCATTTCAGCAGACCAT
Homeobox-leucine zipper protein HAT1	AT4G16780	Glyma.17G144700	CCCAAATCCTCAACATCCGA	ATCCGAAGAAGTGAAAGCCTC
Expansin-A10-like	AT1G69530	Glyma.01G050100	TTGCGATTGCACAATACAGAG	TTATGAGGACCAAGTTAAAGTAGG
Expansin-A6	AT2G37640	Glyma.07G132600	GTGATGCTTCTGGAACAATGG	ATCCTGGTGCACCTTTATCTC
Expansin-like A1	AT3G45970	Glyma.11G096700	GAAGAATCAAGCAAGAAGCCT	TCCAGTTTGAAGACCCAACC
α -xylosidase 1-like	AT1G68560	Glyma.01G081300	GCTATTCAACCTATGTTGATCTCC	CTGCTCCACTTCTTCTAATCC
Tubulin α -4 chain-like	AT1G04820	Glyma.20G136000	CACCTACACCAACCTCAACC	ATTCAGTCACATCCACATTCAG
Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2	AT3G23730	Glyma.05G150400	CACCCTTTACAGCATACTACC	TATAAGAATCAAGCTCATTGCTCCT
Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 22	AT5G57560	Glyma.13G094900	GTTCCCTTCCCAAAGAATCAG	ATCTGTCTTCACAAGTCCACC
Endoglucanase 8-like	AT1G70710	Glyma.08G043600	CTACCCGCAGAGAATACACC	GGCTAAAGTAATACCGAGATCCAG
Endo-1,4- β -mannanase	AT5G66460	Glyma.01G171900	TTATTGGAAGCTGGACTAGAAGG	GTTATTTGCGATGAAGTCTGTC
Pectinesterase 3	AT1G53840	Glyma.16G014000	AAACAATCTCACAGCTCCCA	GCTTCAAGAATGACCCAATATCAG
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1	AT1G31420	Glyma.09G215700	TTTACTTGATGGAACTTGAGG	TCTGCCACTTTGCATATACTC
β -1,3-galactosyltransferase 20	AT4G21060	Glyma.15G091500	GAGTTCTTCTGCCTCAAATCAC	GCACCACATTTACTTCCTTCC
65-kDa microtubule-associated protein 1	AT5G55230	Glyma.14G018300	CTTGATGTGTACAAGAGAAAGG	CTCCAAGTGCTGATAGAAGAGTG
Cellulose synthase A catalytic subunit 2	AT5G64740	Glyma.08G145600	GTCCATCCAATGCCTTATACC	CACACTTCCATACCCATACAC
β -galactosidase 5-like	AT1G45130	Glyma.14G070600	CATTAGGAACGTATGAGCAGG	GGAGGATACTTATTGACCAAGGA

Quadro 3 - Genes (mRNAs) estudados no eixo embrionário de sementes de soja durante a embebição.

Genes	Locus	Sigla	Função
1 N-glycosylase/DNA lyase OGG1	Glyma.06G115500	OGG1	Reparo de DNA
2 DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	Glyma.02G191100	ARP	Reparo de DNA
3 NAC domain-containing protein 8-like	Glyma.01G088200	SOG1	Fator de transcrição - resposta à danos ao DNA
4 Metallothionein-like protein 1	Glyma.17G230500	MT1	Combate ao estresse oxidativo
5 Enolase	Glyma.03G190500	ENO	Mobilização de reservas/energia - Glicólise
6 Thiol protease aleurain-like	Glyma.17G049000	THIOL	Mobilização de proteínas - proteases
7 Cysteine proteinase RD21a-like	Glyma.14G085800	RD21a-like	Mobilização de proteínas - proteases
8 CLASS I KNOX homeobox transcription factor	Glyma.14G047000	KNOX1	TF - formação/regulação meristema apical
9 WRKY transcription factor 27	Glyma.03G224700	WRKY47	TF - respostas à estresse biótico e abiótico
10 ABI3L - B3 domain-containing protein At2g36080-like	Glyma.02G200500	ABI3L	TF - arquitetura foliar e sinalização hormonal (ABA, GA, AIA)
11 Heat stress transcription factor A3 (HSFA3)	Glyma.10G066100	HSFA3	TF - respostas à estresse
12 Auxin response factor 5-like (ARF)	Glyma.14G217700	ARF5	TF - respostas mediadas por AIA
13 Homeobox-leucine zipper protein HAT1	Glyma.17G144700	HAT1	TF - Regulação da germinação
14 Expansin-A10-like	Glyma.01G050100	EXPA10	Relaxamento e expansão de parede celular
15 Expansin-like A1	Glyma.11G096700	EXPA1	Relaxamento e expansão de parede celular
16 Expansin-A6	Glyma.07G132600	EXPA6	Relaxamento e expansão de parede celular
17 α -xylosidase 1-like	Glyma.01G081300	XYL1	Remodelamento de xiloglucanos
18 Tubulin α -4 chain-like	Glyma.20G136000	TUA	Manutenção da forma celular
19 Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2	Glyma.05G150400	XTH2	Modificação de parede celular
20 Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 22	Glyma.13G094900	XTH22	Modificação de parede celular
21 Endoglucanase 8-like	Glyma.08G043600	EGase	Alongamento celular
22 Endo-1,4- β -mannanase	Glyma.01G171900	MAN	Relaxamento de parede celular
23 Pectinesterase 3	Glyma.16G014000	PME	Modificação de parede celular
24 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1	Glyma.09G215700	FEI1	Proteína quinase envolvida no alongamento celular
25 β -1,3-galactosyltransferase 20	Glyma.15G091500	GALT20	Biossíntese de glucanos - arabinoglucanos
26 65-kDa microtubule-associated protein 1	Glyma.14G018300	MICROTUBULE	Regulação do crescimento celular
27 Cellulose synthase A catalytic subunit 2	Glyma.08G145600	CELLULOSE	Formação de parede celular
28 β -galactosidase 5-like	Glyma.14G070600	GALACTO	Modificação de parede celular

1.2.5.4 Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão gênica relativa dos genes candidatos e dos genes de referência foi utilizado o kit KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich), totalizando uma solução de 10,0 µL. Para controle negativo, o cDNA foi substituído por RNase free. A amplificação foi realizada em termociclador óptico Eco Real-Time (Illumina): etapa inicial de incubação a 50 °C durante 2 minutos, seguida de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 10 segundos e pareamento a 60 °C por 40 segundos. No final do processo foi realizada a curva de melting seguindo os passos: 15 segundos a 95 °C, 65 °C e 95 °C respectivamente. Os dados obtidos foram analisados no software *EcoStudy* versão 5.0 da Illumina. Foram utilizadas duas repetições biológicas e duas repetições técnicas para cada amostra.

Os valores de Ct obtidos no software *EcoStudy* foram exportados para planilha do Excel para cálculo do $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), que se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência; $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência.

1.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições para os testes fisiológicos realizados. Os dados médios de germinação, emergência de plântulas a campo, longevidade (P50), crescimento e largura do hipocótilo, crescimento e massa seca de plântulas, raiz e parte aérea, envelhecimento acelerado (100% UR) e com uso de solução salina saturada de NaCl (75% UR), condutividade elétrica e das análises bioquímicas foram comparados pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011). Os resultados de protrusão radicular (T50) foram calculados pelo software *Germinator* e as médias foram comparadas pelo teste t de Student

(JOOSEN et al., 2010). Os resultados de atividade *biospeckle*, MI e AVD, foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com o auxílio do software Minitab™ versão 17.

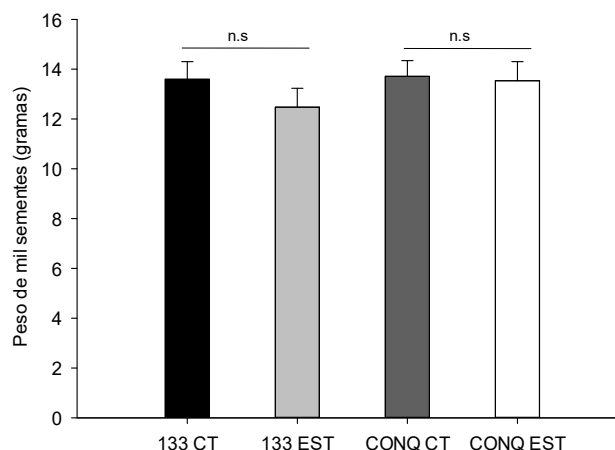
Os dados de expressão relativa de genes obtidos foram analisados utilizando o programa REST®, que realiza a quantificação comparativa pelo método de “*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*” (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Para o cálculo da quantificação relativa da expressão durante a embebição, o grupo controle foi representado pelas sementes secas (0 h). Para os cálculos da expressão relativa entre controle e estresse, os grupos controle adotados foram sementes controle (CT) em cada tempo de embebição.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Caracterização inicial das sementes

O déficit hídrico, imposto a partir de R5.5, não afetou significativamente o peso de mil sementes (PMS), apesar da tendência de redução observada para as sementes produzidas sob as condições de estresse (Figura 6). Houve redução de PMS de 8% para a 133 EST e de 2% para Conq EST em relação ao respectivo controle. No momento da colheita, o teor de água das sementes variou entre 10 e 11%.

Figura 6 - Peso de mil sementes, em gramas, de sementes de soja das cultivares BRS 133 (133) e MG/BR-46 Conquista (CONQ) produzidas sob condições ideais (controle) e sob déficit hídrico (estresse). CT – controle; EST – estresse. Colunas seguidas de n.s indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).



Reduções no peso de mil sementes de soja foram observados em condições de déficit hídrico induzidos no início do período reprodutivo (R1) (SALINET, 2009) e durante a fase final de maturação e pré-colheita das sementes (R6) (PÁDUA et al., 2009). Gava et al. (2015) avaliando o efeito do déficit hídrico em diferentes subperíodos da cultura da soja (BRS 316-RR), encontraram valores inferiores de peso de grãos quando o déficit foi instalado entre R4 e R6, não tendo efeito no período R7 a R8. Ou seja, há variações na resposta dependendo da fase da cultura, sendo o período R4 a R6 mais determinante para o peso de grãos, enquanto o potencial de redução desse componente em razão do estresse é reduzido a partir de R6.

Egli e Bruening (2004) avaliaram a intensidade do estresse hídrico desde o início do enchimento e observaram reduções de peso de 9 e 35%, para as condições de déficit moderada e severa, respectivamente. Estes autores destacam que o efeito do déficit hídrico nesse componente é indireto, estando mais relacionado com o encurtamento do período de enchimento do que com a taxa de acúmulo de matéria seca (g/planta/dia).

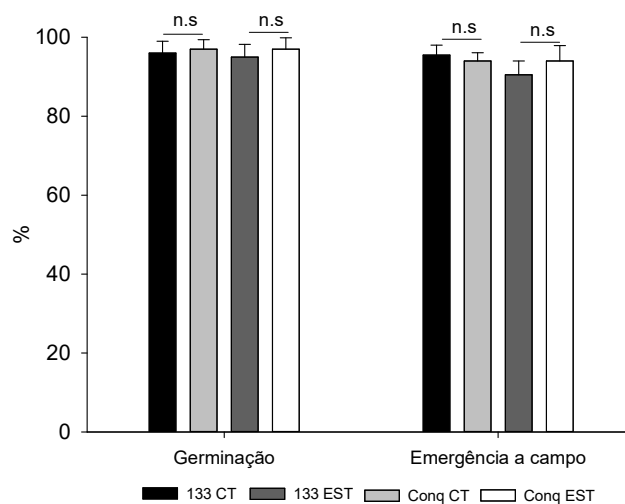
Períodos de déficit hídrico podem resultar em alterações fisiológicas, químicas e bioquímicas na planta e na semente, com efeito variável de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta e a intensidade e duração da escassez (DESCLAUX; HUYNH; ROUMET, 2000). Redução nas taxas assimilação de CO₂, condutância estomática, mudanças na propriedade das membranas, expansão celular e foliar, além de senescência acelerada podem ser observadas (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

O período reprodutivo é um dos mais críticos em relação à falta d'água, sendo a taxa de acúmulo de matéria seca (MS) e a duração do período enchimento os principais determinantes do rendimento da cultura, podendo levar a produção de sementes mais leves (BONATO, 2000).

Em plantas estressadas, a senescência de folhas é acelerada e há redução do período de enchimento e de maturação de sementes de soja, que podem não completar a sequência de desenvolvimento programada, podendo ter o acúmulo de proteínas, lipídios, aminoácidos e substâncias de reserva afetado (BREVEDAN; EGLI, 2003; DESCLAUX; ROUMET, 1996; EGLI; BRUENING, 2004). Condições adversas durante a maturação podem afetar não só a produtividade, mas também a qualidade fisiológica das sementes.

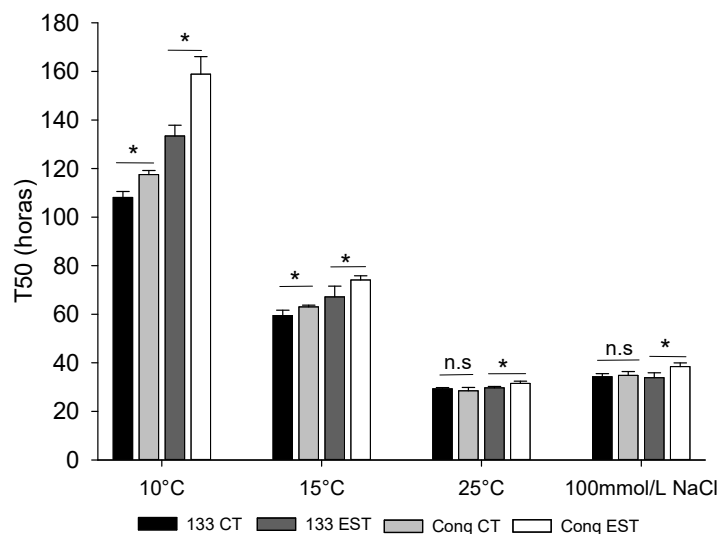
As condições de déficit hídrico impostas não afetaram a capacidade de germinação das sementes, avaliada como porcentagem de plântulas normais e de protrusão radicular (>1 mm) (Figura 7). Enquanto todas as sementes apresentaram protrusão radicular (100%), a porcentagem de sementes que originaram plântulas normais foi superior a 90%. A porcentagem de emergência de plântulas a campo também não foi afetada pelos tratamentos a campo, com valores entre 90,5 e 95,5% (Figura 7).

Figura 7 – Germinação (plântulas normais) e emergência de plântulas a campo de sementes das cultivares BRS 133 (133) e MG/BR-46 Conquista (Conq) produzidas sob condições de ideais (controle - CT) e déficit hídrico (estresse - EST). Colunas seguidas de n.s indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).



Os resultados de velocidade de germinação (T50) indicam que houve efeito negativo do déficit hídrico sobre o vigor das sementes (Figura 8). Com exceção da cultivar 133 em teste conduzido à 25 °C e com uso de solução salina saturada de NaCl, em todas as demais condições, as sementes produzidas sob déficit hídrico levaram maior tempo para protrusão radicular do que as sementes produzidas em condições ideais, sendo, portanto, menos vigorosas.

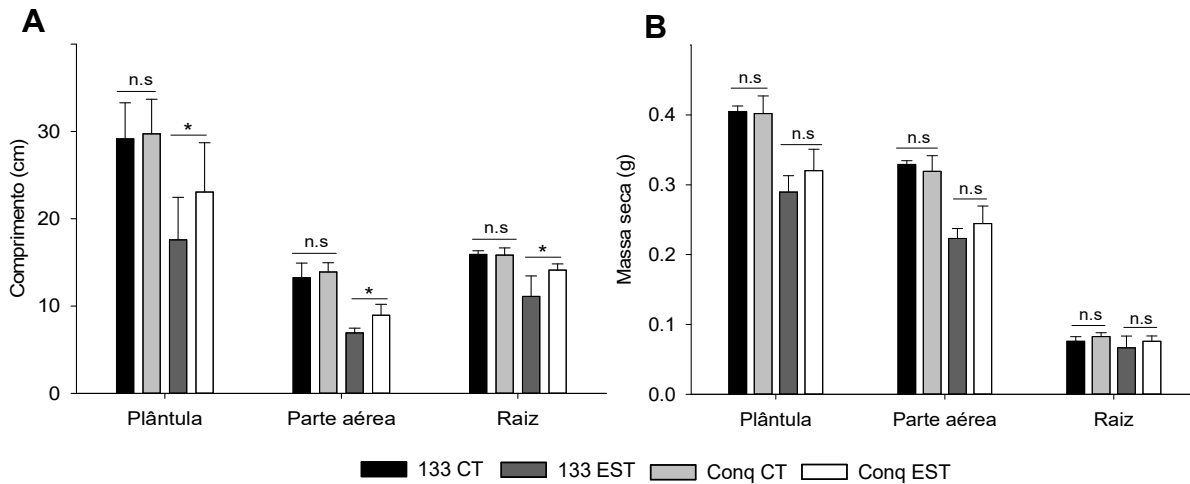
Figura 8 – Tempo, em horas, para protrusão de 50% das sementes das cultivares BRS 133 (133) e MG/BR-46 Conquista (Conq) produzidas sob condições de ideais (controle - CT) e déficit hídrico (estresse - EST). Asterisco (*) indica diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$).



A medida que as condições do teste foram se tornando mais adversas para a germinação, as diferenças de vigor entre os lotes tornaram-se mais evidentes. À 10 °C e 15 °C, os resultados de T50 apontaram diferenças significativas entre sementes de 133 CT e EST, e entre CONQ CT e EST.

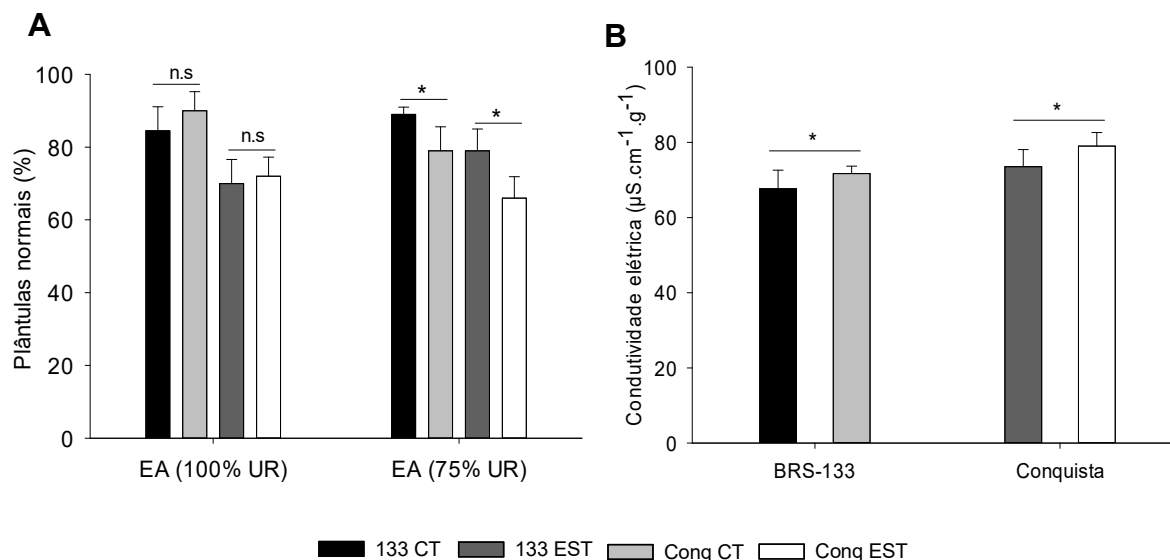
Na avaliação do vigor pela análise do crescimento de plântulas (Figura 9A), não houve diferença estatística entre os resultados de comprimento de plântulas e suas partes para cultivar BRS 133. Para cultivar Conquista, os resultados de comprimento indicam maior vigor das sementes EST em relação a CT, discordando dos demais resultados encontrados. Já os dados de massa seca não foram influenciados pelo déficit hídrico para nenhuma das cultivares (Figura 9B).

Figura 9 – Comprimento (A) e massa seca (B) de plântulas, parte aérea e raiz das sementes das cultivares BRS 133 (133) e MG/BR-46 Conquista (Conq) produzidas sob condições de ideais (controle - CT) e déficit hídrico (estresse - EST). Asterisco (*) indica diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$).



A porcentagem de plântulas normais, avaliadas após o teste de envelhecimento acelerado (100% UR), não variou entre as sementes produzidas sob condições ideais e sob déficit hídrico (Figura 10A). Quanto ao teste de envelhecimento conduzido com solução salina saturada de NaCl (75% UR), as sementes produzidas em condições ótimas apresentaram maior resistência às condições adversas impostas pelo teste e maior porcentagem de germinação, diferindo estatisticamente das sementes EST, para ambas as cultivares (Figura 10A). Após o envelhecimento, os teores de água observados variaram de 13,2 a 13,5%, indicando que o grau de umidade não influenciou nos resultados obtidos. O teor de água inicial das sementes submetidas ao teste variou de 10 a 11%, chegando a teores entre 27,9 e 28,9% ao final do teste, indicando uniformidade das condições do teste (MARCOS FILHO, 1999).

Figura 10 - Envelhecimento acelerado tradicional (EA 100% UR) e com solução salina de NaCl 75% UR (EA 75% UR), expresso em porcentagem de plântulas normais (A); Condutividade elétrica (CE) (B) das sementes das cultivares BRS 133 (133) e MG/BR-46 Conquista (Conq) produzidas sob condições de ideais (controle - CT) e déficit hídrico (estresse - EST). Asterisco (*) indica diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$).



Em relação aos valores de condutividade elétrica (Figura 10B), os maiores valores de liberação de exsudados foram observados para as sementes EST das cultivares 133 e Conquista, diferindo estatisticamente das sementes CT. Com o avanço do processo de maturação, as membranas atingem o máximo grau de estruturação e seletividade, controlando a lixiviação de solutos durante a embebição. Quando submetidas a estresse hídrico, o período de maturação é encurtado e os padrões de desenvolvimento da semente alterados (PEREIRA, 2017).

A germinação não foi afetada pelo déficit hídrico. Entretanto, os testes fisiológicos realizados possibilitaram identificar diferenças nos níveis de vigor entre as sementes produzidas sob déficit hídrico e controle. As sementes EST mostraram-se menos vigorosas quanto a velocidade de germinação (T50), principalmente sob condições subótimas, e nos testes de resistência a estresse. Esses resultados indicam que o déficit hídrico durante maturação pode afetar o potencial fisiológico das sementes em diferentes níveis, variando de acordo com a tolerância do genótipo às condições adversas de produção.

A capacidade de germinação, o vigor e a longevidade vão aumentando progressivamente durante o desenvolvimento até atingir a máxima qualidade fisiológica, que posteriormente vai sendo reduzida em função dos processos de deterioração (BEWLEY et al., 2013). Para soja, a capacidade de germinação tem

início a partir do estágio R5.5 e atinge seu máximo em R7.1; a maturidade fisiológica (maturidade de massa) é alcançada em R7.2, enquanto o máximo vigor em R8. O último parâmetro adquirido é a longevidade, com aumento gradual até máximo em R9 (PANOFF, 2016; LIMA et al., 2017; BASSO et al., 2018).

Além dos efeitos deletérios do processo de deterioração a que a semente está sujeita a partir do ponto de maturidade fisiológica (maturidade de massa), as condições ambientais desfavoráveis durante o desenvolvimento e maturação podem levar a formação de sementes de reduzido potencial fisiológico (LIGTERINK; JOOSEN; HILHORST, 2012).

O potencial fisiológico variável entre as cultivares e as diferentes respostas frente as condições de déficit hídrico impostas podem ser compreendidos devido aos diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico e duração de ciclo das cultivares. Enquanto a Conquista (MG/BR 46 Conquista) é suscetível, BRS 133 é menos suscetível ao estresse (PÁDUA et al., 2009). Além desse fator, também diferem quanto ao grupo de maturação, sendo a 133 de ciclo semiprecoce e a Conquista de ciclo semitardio (ARANTES et al., 2010; EMBRAPA, 2010). Como evidenciado por Carvalho et al. (2017), o grupo de maturação de soja pode influenciar nos parâmetros de qualidade fisiológica adquiridos e há uma tendência cultivares de ciclo mais curto produzirem sementes de maior longevidade, vigor e germinação.

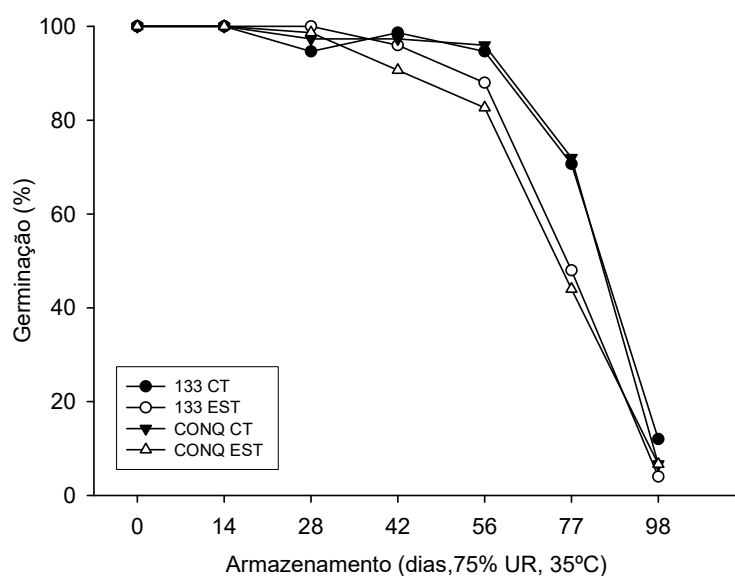
Em condições de déficit hídrico durante o enchimento de soja, Dornbos et al. (1989) observaram redução na germinação de apenas 5%, sendo o vigor mais afetado, com redução da massa seca de plântulas e aumento da condutividade elétrica, de 12 e 19%, respectivamente. Yaklich (1984) também relatam que a germinação não foi afetada sob déficit hídrico, havendo apenas redução no vigor (EA). Vieira et al. (1991) citam pequeno efeito do déficit hídrico no vigor avaliado por envelhecimento acelerado, teste de frio e condutividade elétrica, sem efeito na germinação de soja. Bem como em trabalho realizado por Teixeira (2014), no qual sementes de soja produzidas sob déficit hídrico a partir de R5.5 não apresentaram redução de germinação, mas houve redução de vigor avaliado por T50 e crescimento de plântulas. Esses resultados estão em consenso com os encontrados nesse estudo.

Por outro lado, ocorrência de déficit hídrico durante o desenvolvimento de sementes também pode afetar a viabilidade da semente, além do vigor (DORNBOS JR.; MULLEN, 1991; HEATHERLY, 1993). Como destacado por Samarah e Alqudah

(2011), a variação dos resultados encontrados na literatura revela a complexidade do efeito do déficit hídrico na qualidade de sementes, variando de acordo com o estágio de maturidade da cultura, severidade, duração e intensidade do estresse. Além disso, o efeito seca pode ser potencializado por outras condições ambientais adversas, como altas temperaturas (EGLI et al., 2005; EGLI; TEKRONY; SPEARS, 2005).

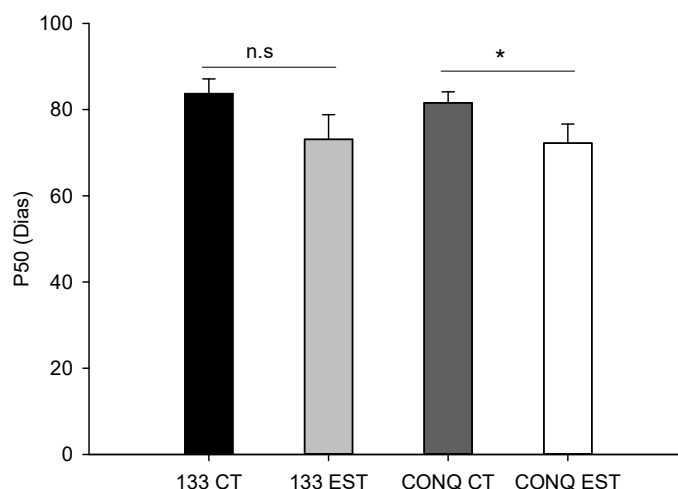
Como último componente da qualidade fisiológica adquirido ao longo da maturação, a longevidade das sementes também foi afetada pelas condições de estresse (Figura 11). Para ambas as cultivares, as sementes de soja produzidas sob déficit hídrico perderam mais rapidamente sua viabilidade. Aos 98 dias, nas condições do teste de longevidade realizado neste estudo, as sementes de soja chegaram a valores próximos a 5% de germinação.

Figura 11 - Germinação ao longo do teste de longevidade em sementes de soja produzidas sob condições ideais (controle) e sob déficit hídrico (estresse).



O efeito do estresse na longevidade das sementes de soja pode ser observado ao analisar os resultados de P50 (Figura 12). As sementes CT da cultivar 133 apresentaram P50 de 84 dias e 82 dias para a cultivar Conquista. Enquanto as sementes produzidas na condição de estresse apresentaram P50 de 72 dias para 133 e 73 dias para Conquista, o que representa uma redução de 13 e 11% em relação ao controle, respectivamente.

Figura 12 - Valores de P50 (dias) em sementes de soja produzidas sob condições ideais (controle) e sob déficit hídrico (estresse). Asterisco (*) indica diferença estatística entre os tratamentos; e n.s indica resultado não significativo entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$), dentro de cada grupo.



Estudos fisiológicos, associados com análise de transcriptoma e proteoma indicam que há uma série de eventos complexos ocorrendo durante a maturação tardia, não somente a dessecação das sementes (PANOFF, 2016; ROSSI, 2016; LIMA et al., 2017). Entre a maturidade fisiológica (R7.2) e a máxima longevidade (R9), análises de redes de co-expressão indicam complexas mudanças no perfil de expressão de transcritos e fatores de transcrição (FTs) envolvidos com a longevidade (LIMA et al., 2017). A transição entre essas fases caracteriza-se pela expressão de genes relacionados à degradação de clorofila, ao acúmulo de açúcares da série da rafinose (RFO), proteínas *late embryogenesis abundant* (LEA), proteínas de choque térmico (HSP) e FTs da família AP2/EREBP, WRKY, *auxin response factor* (ARF), *heat stress transcription factor* (HSF), dentre outros (NAKABAYASHI et al., 2005; PRIETO-DAPENA et al., 2006; CHATELAIN et al., 2012; VERDIER et al., 2013; LIMA et al., 2017).

A capacidade de tolerar dessecação e manter a viabilidade ao longo do estado seco depende do acúmulo de proteínas protetoras, como LEA (*late embryogenesis accumulating*) e HSP (*heat shock protein*), e açúcares solúveis como sacarose e oligossacarídeos (rafinose, estaquiase, verbascose). Em conjunto, contribuem para a formação do estado vítreo, que dificulta a ocorrência de reações químicas e favorece a manutenção da integridade das membranas (CHATELAIN et al., 2012; BEWLEY et al., 2013; SANO et al., 2016; LEPRINCE et al., 2017). Para

espécies ortodoxas, como *Glycine max* e *Medicago truncatula*, o acúmulo dessas proteínas e açúcares solúveis é intensificado no final da maturação e está relacionado com a longevidade das sementes (CHATELAIN et al., 2012; LIMA et al., 2017).

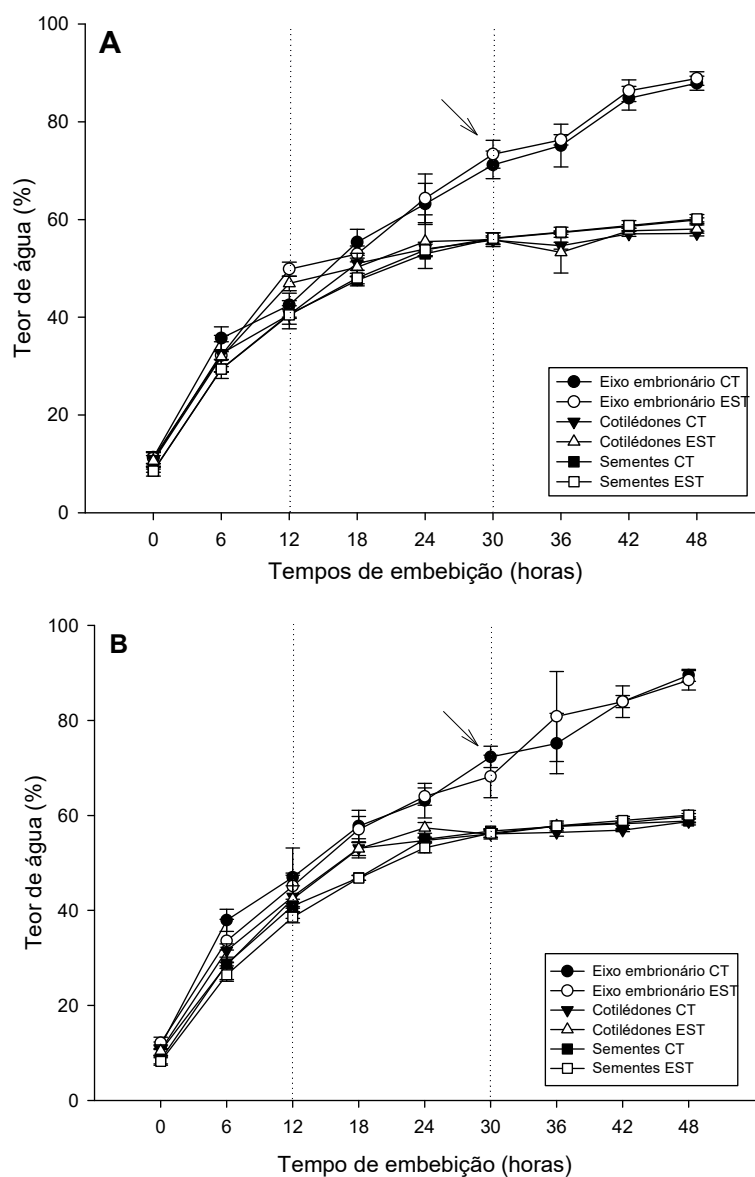
Durante o déficit hídrico, a redução no acúmulo de açúcares solúveis pode estar associada à diminuição na germinação de sementes e no vigor das sementes submetidas a condições estressantes (SAMARAH; MULLEN; ANDERSON, 2009). Com base nesses estudos, sugere-se que o déficit hídrico possa ter afetado o acúmulo de açúcares solúveis e proteínas protetoras, o que refletiu na menor longevidade e vigor avaliados pela velocidade de germinação, desorganização das membranas (maior lixiviação de solutos) e resistência a condições adversas no teste de envelhecimento acelerado.

1.3.2 Comportamento das sementes durante a embebição

O processo de germinação se inicia com a embebição da semente seca e tem sua taxa de progresso e conclusão estritamente dependente da disponibilidade de água no solo (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Outras variáveis podem influenciar o processo de embebição, tais como o teor de água inicial da semente e o potencial fisiológico (VILLELA; NOVEMBRE; MARCOS FILHO, 2007).

Conforme observa-se na Figura 13, a embebição das sementes de soja obedece ao padrão trifásico de embebição. A fase I é caracterizada pela rápida absorção de água e reativação do metabolismo, principalmente de atividades de reparo a DNA e membranas. Na fase II, o acréscimo no teor de água é praticamente constante e as atividades metabólicas se intensificam, permitindo a retomada do crescimento do eixo embrionário e protrusão da radícula (fase III) (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Figura 13 - Curva de embebição de sementes inteiras, eixos embrionários e cotilédones de soja da cultivar BRS 133 (A) MG/BR-46 Conquista (B) produzidas sob condições ideais (CT) e sob déficit hídrico (EST). Setas indicam início da protrusão radicular (1 mm).



Inicialmente, nas primeiras 12 horas, as sementes apresentaram uma rápida hidratação, atingindo teores de água próximos a 40%. A seguir, pode-se observar a fase intermediária, entre 12 e 30 h, no qual a absorção é mais lenta principalmente na curva de sementes inteiras e cotilédones. Após 30 h de embebição, as sementes atingiram cerca de 70% de teor de água no eixo e 55% nos cotilédones e sementes inteiras, o que foi suficiente para possibilitar a protrusão da raiz primária.

Observa-se comportamento semelhante entre a curva de sementes inteiras e de cotilédones, enquanto a velocidade de hidratação do eixo embrionário é superior e contínua. Mesmo em sementes secas (0 h), o teor de água no eixo embrionário foi,

em média, 35% superior ao teor de água de sementes inteiras. Enquanto nos cotilédones e sementes inteiras o teor de água permanece praticamente inalterado após 24 h, no eixo embrionário continua crescente, principalmente a partir da protrusão da raiz primária, em 30 h após a embebição (HAE). Esses resultados estão em conformidade com os obtidos por Villela, Novembre e Marcos Filho (2007), ao estudarem a marcha de absorção de sementes de soja, e com Silva et al. (2014), ao estudarem sementes de feijão.

A velocidade de embebição varia de acordo com as partes constituintes da semente, devido às diferenças na composição química, na morfologia e na função do tecido analisado. A hidratação mais rápida do embrião pode ser atribuída a sua localização periférica e superficial, além do tamanho relativamente pequeno em relação aos cotilédones (McDONALD et al., 1988). Somado a isso, o contínuo aumento no teor de água é resultado do processo de germinação, que envolve o alongamento e crescimento do eixo embrionário, processos dependentes da pressão de turgor celular, dentre outros fatores (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

De acordo com o comportamento observado, não houve diferença marcante no padrão de embebição entre as sementes e cotilédones oriundos de plantas submetidas a déficit hídrico e a condições normais de produção, para ambas as cultivares (Figura 13A e 13B). Porém, houve variação na velocidade de absorção de água entre os eixos embrionários, o que pode ter sido influenciado pela qualidade fisiológica dos lotes. Na fase inicial da hidratação, entre 6 e 12 horas, os eixos embrionários dos lotes 133 CT e CONQ CT, de maior potencial fisiológico, absorveram menores quantidades de água (68 g.kg^{-1} e 91 g.kg^{-1} , respectivamente), em relação as sementes de 133 EST e CONQ EST (177 g.kg^{-1} e 116 g.kg^{-1}). Durante a fase II, entre 12 e 30 horas, o incremento no teor de água foi superior nas sementes mais vigorosas (CT), refletindo a retomada do crescimento do embrião para protrusão da radícula.

A velocidade de hidratação pode ser afetada pela disponibilidade hídrica, composição química e potencial fisiológico das sementes (VILLELA; NOVEMBRE; MARCOS FILHO, 2007).

A rápida embebição em sementes menos vigorosas (EST) pode ser um indicativo da desorganização das membranas e menor eficiência dos mecanismos de reparo. Essa embebição rápida pode afetar entre a transição das membranas de um estado gel (seco) para líquido cristalino, resultando na maior lixiviação de solutos

(KRANNER et al., 2010). Com o avanço do processo de maturação, as membranas atingem o máximo grau de estruturação e seletividade, controlando a lixiviação de solutos durante a embebição. Quando submetidas a estresse hídrico, o período de maturação pode ser encurtado e os padrões de desenvolvimento da semente alterados (PEREIRA, 2017).

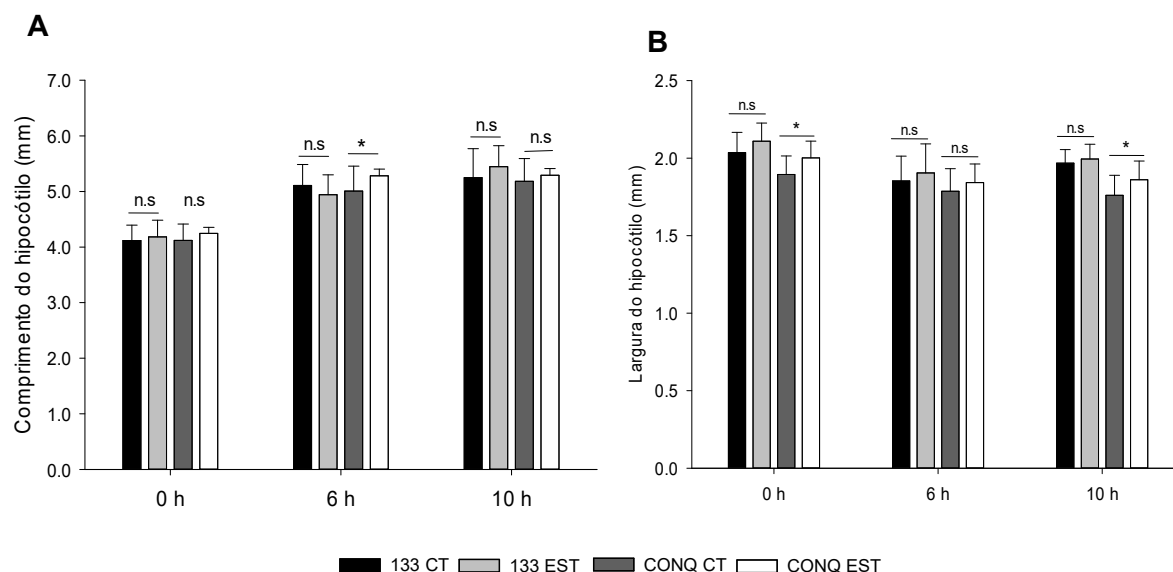
Por outro lado, o déficit hídrico pode levar a alteração da composição química de sementes de soja. Redução no teor de óleo e aumento no teor de proteína de sementes produzidas sob déficit hídrico durante o enchimento de grãos vêm sendo relatados (GHASSEMI-GOLEZANI; LOTFI, 2013; MERTZ-HENNING et al., 2017). Dessa forma, o potencial matricial das sementes pode ter sido alterado devido as diferenças entre lipídios e proteínas quanto a afinidade à água, levando a maior velocidade de absorção das sementes produzidas sob estresse.

Em concordância com os resultados encontrados nesse estudo, Rocha et al. (1984) e Villela et al. (2007) também observaram que sementes de menor potencial fisiológico absorvem maior quantidade de água na fase inicial de embebição. Em contrapartida, Rossetto et al. (1997) verificaram que a velocidade de embebição não foi influenciada pelas diferenças de vigor.

1.3.3 Crescimento do hipocótilo

Os resultados de comprimento do hipocótilo indicam aumento do crescimento no decorrer da embebição (0, 6 e 10 HAE), refletindo o início da expansão celular, responsável por impulsionar a protrusão radicular (Figura 14). Para as sementes da cultivar BRS 133, não houve diferença para comprimento do hipocótilo entre sementes EST e CT nos tempos avaliados, tendo o comprimento variado de 4,12 mm (0 h) à 5,45 mm (10 h), com o crescimento médio de 29% em 10 horas, atingindo teor de água próximo a 50%. Para a cultivar Conquista, houve diferença estatística para comprimento do hipocótilo apenas para o tempo de 6 horas após a embebição, no qual o hipocótilo das sementes EST mediu 5,28 mm em comparação a 5,01 mm do CT. O crescimento médio do hipocótilo, de modo geral, foi de 25% após 10 horas de embebição, atingindo 52% de teor de água nesse período. Já as medidas de largura do hipocótilo apresentaram pouca variação durante a embebição (Figura 14B).

Figura 14 - Medidas de comprimento (A) e largura do hipocótilo (B), em milímetros, nos tempos de embebição de 0, 6 e 10 h para sementes das cultivares BRS 133 MG/BR 46 Conquista, produzidas sob condições ideais (controle – CT) e sob déficit hídrico (estresse – EST); asterisco (*) indica diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$).



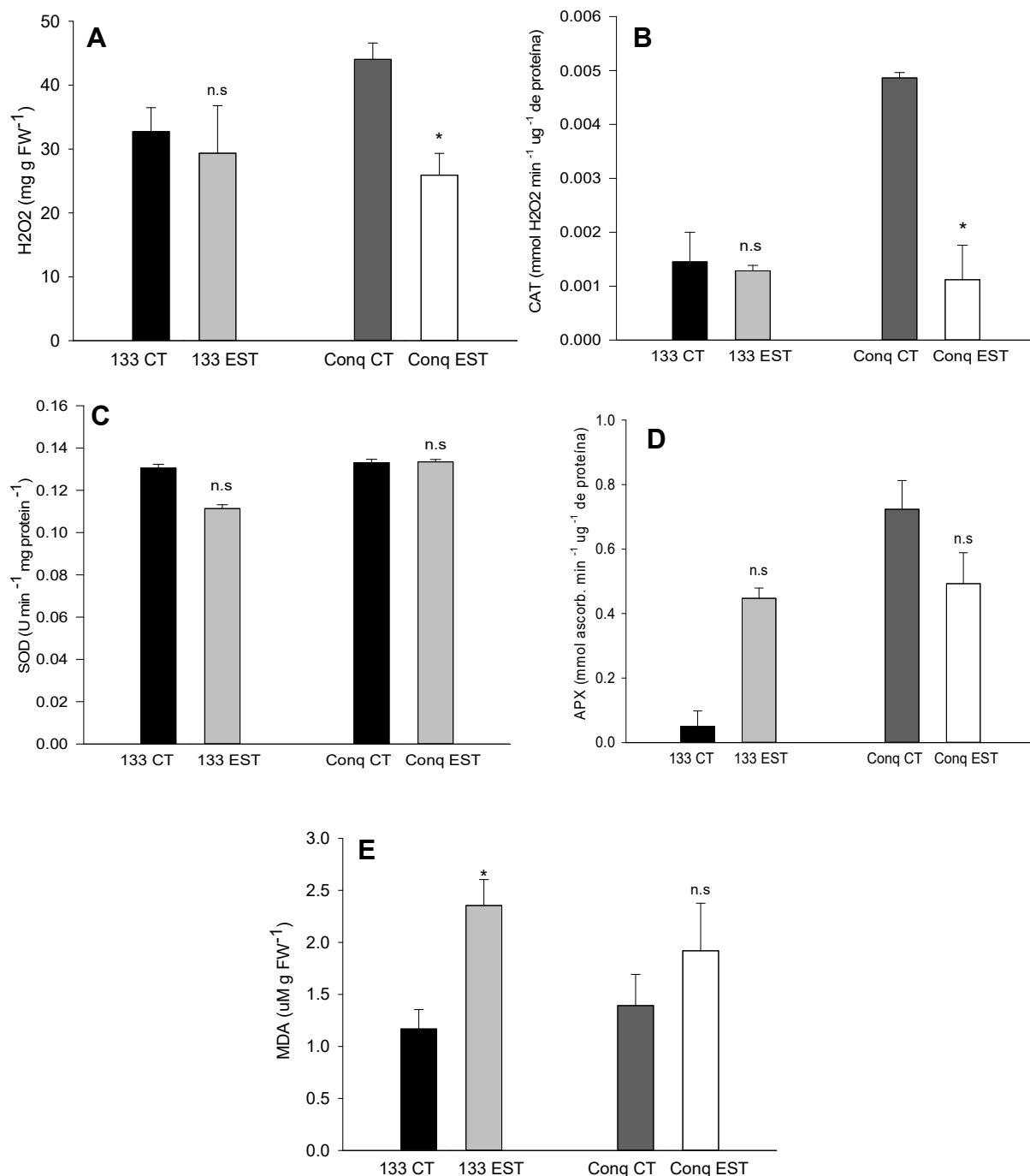
A expansão celular, que se manifesta fisicamente no crescimento, é resultado da atividade enzimática, geneticamente controlada, e de forças mecânicas exercidas pela pressão de turgor (COSGROVE, 2005). Enzimas hidrolíticas, como as expansinas (EXP), xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH) e β -1,4-glucanase atuam aumentando a extensibilidade da parede celular, permitindo o alongamento da célula e protrusão radicular.

Estudos recentes com sementes de *Arabidopsis* e soja indicam que o alongamento da radícula não é a principal região responsável pela protrusão, e sim uma região do hipocótilo adjacente a ela (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009; SOUZA; TOPHAM; BASSEL, 2017). Com base nesses resultados, informações sobre as taxas de crescimento do hipocótilo podem ajudar a elucidar diferenças de vigor entre lotes de sementes.

1.3.4 Atividade enzimática

Para avaliar a eficiência do sistema antioxidante, a atividade das enzimas CAT, SOD e APX, e os níveis de H_2O_2 e de MDA das sementes produzidas sob déficit hídrico e condições ótimas foram mensurados e comparados (Figura 15).

Figura 15 – Atividade bioquímica de sementes de soja das cultivares BRS 133 e Conquista produzidas sob déficit hídrico (EST) e condições ótimas (CT); Asterisco (*) indica diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$).



Os níveis de atividade de SOD e APX permaneceram inalterados entre as sementes CT e EST das duas cultivares (Figura 15C e 15D). Observa-se redução significativa na atividade da CAT e nos níveis de H₂O₂ para sementes EST da Conquista em comparação ao controle, sem variação significativa para 133, apesar de inferiores ao CT (Figura 15A e 15B). Já para os níveis de MDA, os resultados

revelam aumento significativo nas sementes de 133 EST em relação ao CT, com a mesma tendência nas sementes da Conquista EST (Figura 15E).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas constantemente durante toda a vida da planta e desenvolvimento da semente, mesmo sob condições favoráveis (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). A redução incompleta do oxigênio (O_2) leva a formação de oxigênio singleto (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) (APEL; HIRT, 2004). Esses compostos podem ter efeito deletério ao reagir com proteínas, lipídios, DNA e RNA, oxidando membranas celulares e organelas e afetando o funcionamento normal da célula, ou efeito benéfico, atuando em vias de sinalização na regulação do crescimento e desenvolvimento, além de respostas ao estresse (FAROOQ et al., 2009; KRANNER et al., 2010). O balanço entre os níveis de ROS gerados e inativados depende de um sistema complexo de moléculas antioxidantes, como a glutathiona, tocoferóis e ácido ascórbico, e enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR) e glutathiona oxidase (GPX), dentre outras (APEL; HIRT, 2004).

A SOD é responsável pela dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 , que pode ser tóxico a célula (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Ao mesmo tempo em que o controle dos níveis de H_2O_2 é realizado por duas enzimas principais, APX e CAT (APEL; HIRT, 2004). Devido a baixa afinidade de CAT ao H_2O_2 , essa enzima é apontada como responsável direta pela remoção do excesso de ROS, enquanto a APX é responsável pelo ajuste fino nos níveis de peróxido, em virtude de sua alta afinidade. O estresse oxidativo causado por altos níveis de ROS leva a peroxidação de lipídeos e a formação de MDA (CRUZ DE CARVALHO, 2008). Em sementes secas, os processos não-enzimáticos responsáveis pela produção de ROS são as reações de Amadori e Maillard e a peroxidação lipídica (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008).

A eficiência dos mecanismos de reparo ativados na embebição é determinante para a germinação das sementes e vigor (RAJJOU et al., 2008; SANO et al., 2016). A alta atividade de CAT em sementes mais vigorosas pode indicar melhor funcionamento do sistema antioxidante na prevenção de danos entre o armazenamento e a retomada do metabolismo da germinação. Diversos autores relatam que o decréscimo no nível de atividade da catalase durante o armazenamento torna as sementes mais sujeitas à perda de viabilidade, como em

sementes de milho (TIMÓTEO; MARCOS-FILHO, 2013), algodão (GOEL; SHEORAN, 2003) e girassol (LINS et al., 2014). Outro período crítico ao acúmulo de danos oxidativo é a dessecação de sementes, no qual sementes maduras e secas apresentam altos níveis de enzimas removedoras de ROS, como a CAT e glutathione redutase, e aumento na expressão de genes *CATA1* (BAILLY et al., 2004). Esses trabalhos sustentam a relação positiva entre os resultados fisiológicos de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e longevidade com os níveis de CAT mensurados nesse estudo.

Os danos oxidativo causados por acúmulo de ROS são largamente documentados na literatura (APEL; HIRT, 2004; CRUZ DE CARVALHO, 2008; KRANNER et al., 2010; SANO et al., 2016). Sementes submetidas a envelhecimento acelerado apresentam aumento nos níveis de H_2O_2 e MDA, que causam a deterioração das membranas e perda da capacidade de germinação e vigor ao longo do armazenamento (GOEL; SHEORAN, 2003; SONG et al., 2013). Em contrapartida, altos níveis de H_2O_2 também têm sido correlacionados à maior porcentagem de germinação e vigor de sementes, bem como envolvimento na aquisição da tolerância à dessecação (SAHU et al., 2017). Nesse estudo, o vigor e a longevidade de sementes tiveram relação positiva aos maiores níveis de H_2O_2 e CAT, e menores de MDA, o que pode indicar menor peroxidação lipídica e possível envolvimento de H_2O_2 em vias de sinalização.

Recentemente, o enfoque das pesquisas têm sido orientado quanto ao envolvimento de ROS, principalmente H_2O_2 , nas vias de sinalização da aquisição da tolerância a dessecação, enfraquecimento do endosperma, germinação e superação de dormência (LI-JUAN et al., 2008; WOJTYLA et al., 2016). Destaca-se que o acúmulo de H_2O_2 não ocorre apenas em situações de estresse, mas também durante o metabolismo normal das plantas (fotossíntese, respiração, crescimento, senescência). Quando mantido em níveis normais, pode atuar como mensageiro secundário na transdução de sinais e interagir com Ca^{2+} e hormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico, ABA, etileno, regulando a expressão gênica e o crescimento e desenvolvimento das plantas, inclusive na percepção do estresse (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; LI-JUAN et al., 2008; JEEVAN KUMAR et al., 2015).

Todas as fases do desenvolvimento de sementes, desde a embriogênese até a secagem e a permanência no estado seco (armazenamento), estão associadas

com flutuações nos níveis de ROS (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). O balanço entre as enzimas antioxidantes, as moléculas protetoras (como açúcares solúveis e tocoferóis) e os níveis de ROS determinam o limiar entre o efeito benéfico ou deletério desses compostos nas células.

1.3.5 Atividade *biospeckle* ao longo da embebição

As imagens *biospeckle* foram obtidas no decorrer da embebição, nos tempos de 6, 10, 18, 24 e 30 horas, e os índices numéricos Momento de Inércia (MI) e Diferença dos Valores Absolutos (AVD) foram calculados em duas regiões da semente, na radícula e na região central do hipocótilo de sementes de soja. De modo geral, independente do índice adotado, da região da semente analisada e da combinação cultivar e condição de produção, nota-se que os valores de atividade *biospeckle* aumentaram com o decorrer da embebição (Figura 16 e 17).

Figura 16 - Comportamento dos valores de AVD e MI de sementes da cultivar BRS 133 em função do período de embebição de 6, 10, 18, 24 e 30 horas. (A) AVD radícula; (B) AVD hipocótilo; (C) MI radícula; (D) MI hipocótilo; (E) Protrusão radicular ao longo da embebição. Asterisco (*) indica diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney dentro de cada tempo de embebição. CT – controle; EST – estresse.

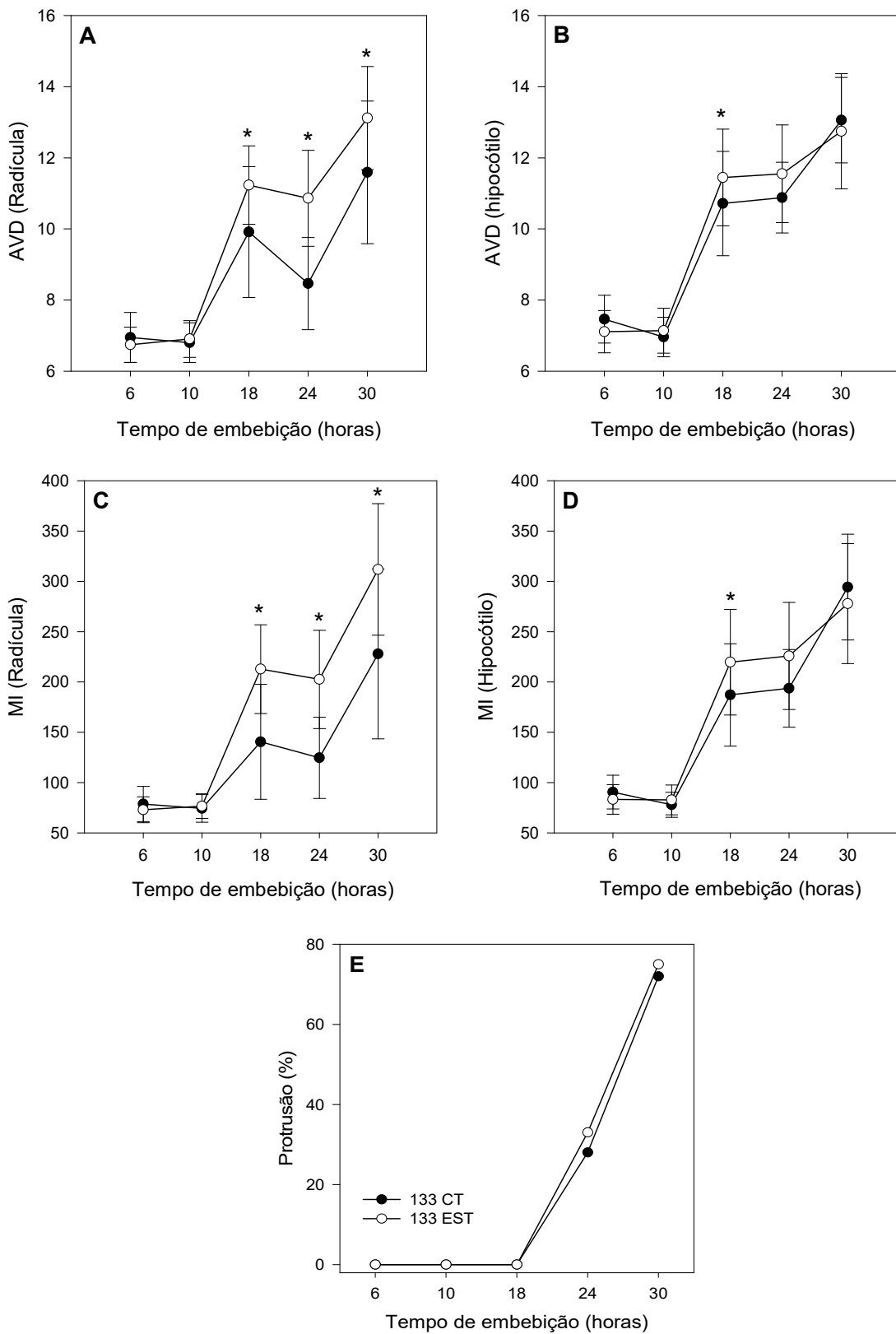
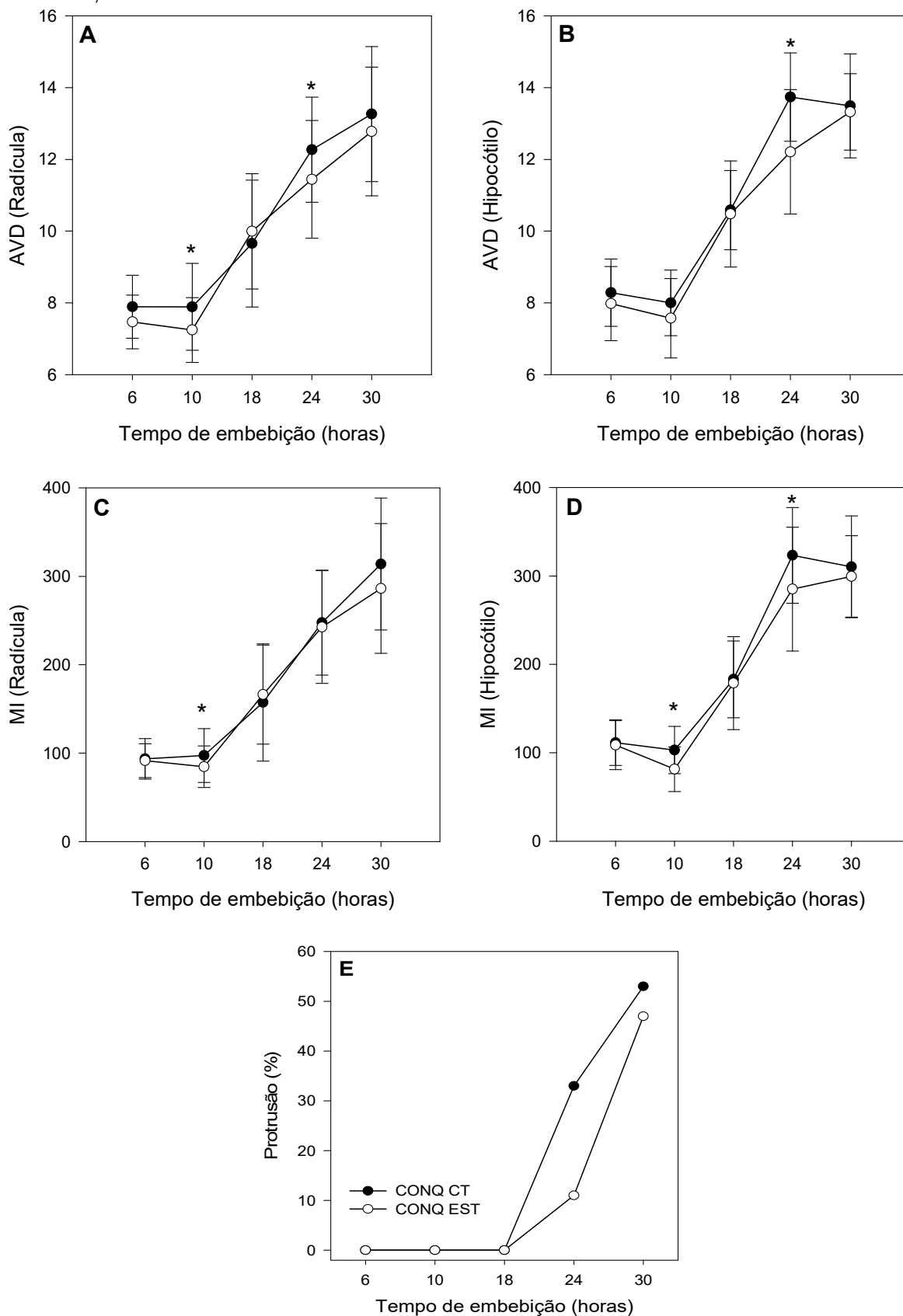


Figura 17 - Comportamento dos valores de AVD e MI de sementes da cultivar MG/BR 46 Conquista em função do período de embebição de 6, 10, 18, 24 e 30 horas. (A) AVD radícula; (B) AVD hipocótilo; (C) MI radícula; (D) MI hipocótilo; (E) Protrusão radicular ao longo da embebição. Asterisco (*) indica diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney dentro de cada tempo de embebição. CT – controle; EST – estresse.



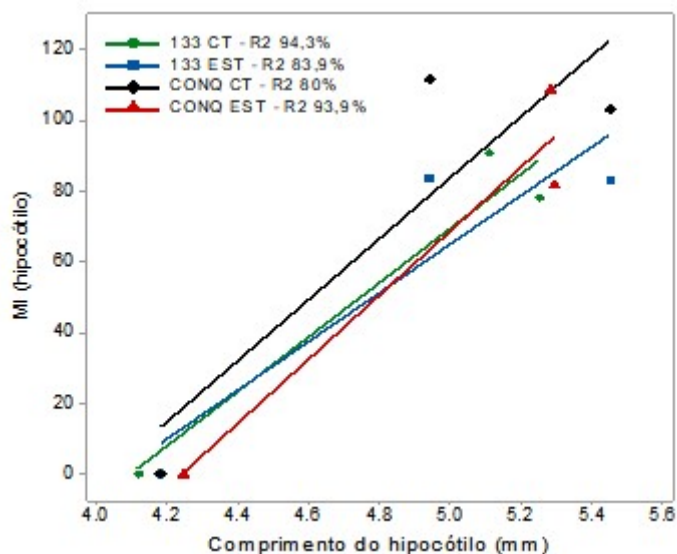
Para a cultivar BRS 133, os maiores valores de AVD e MI foram observados para sementes produzidas sob déficit hídrico nos tempos de 18, 24 e 30 horas na região da radícula, e no tempo de 18 h de embebição para a região central do hipocótilo, em comparação com sementes CT (Figura 16). Para a cultivar Conquista, os maiores valores de AVD foram observados para as sementes CT em 10 e 24 HAE na radícula e em 18HAE para a região central do hipocótilo, diferindo das sementes do EST (Figura 17). Os valores de MI também seguem a mesma tendência, com maior atividade *biospeckle* nos tempos de 10 h, tanto na região central do hipocótilo quanto na radícula, e 24 h após embebição no hipocótilo.

Durante a realização do teste de *biospeckle* foram contabilizadas as sementes que apresentaram protrusão radicular, o que ocorreu a partir de 24 horas após a embebição para 133 e Conquista (Figura 16E e 17E). As sementes com maior atividade *biospeckle* foram, de modo geral, 133 EST e CONQ CT, corroborando com os resultados de protrusão realizados durante a obtenção das imagens.

Também é interessante observar que há um nível de atividade diferente para cada cultivar avaliada, o que pode estar relacionado a características genéticas específicas, como coloração, composição química e teor de lignina das sementes. Na maioria dos tempos de embebição avaliados, os índices *biospeckle* da Conquista foram superiores aos da cultivar BRS 133. De acordo com as informações de cada cultivar, os teores de lipídios, proteínas e brilho da semente são diferentes entre as cultivares e podem ter influenciado nos resultados (ARANTES et al., 2010; EMBRAPA, 2010).

A análise de correlação entre comprimento (mm) e atividade *biospeckle* (MI) no hipocótilo de sementes de soja mostra uma correlação positiva e linear, indicando a tendência de aumento da atividade *biospeckle* à medida que o hipocótilo se alonga durante a embebição (Figura 18). A atividade *biospeckle* pode ser um fator norteador da taxa de crescimento do hipocótilo e uma ferramenta a ser explorada para o estudo do vigor.

Figura 18 - Diagrama de dispersão entre atividade *biospeckle* (MI) e comprimento do hipocótilo (mm) no decorrer da embebição de sementes de soja. Linhas correspondem a linhas de regressão linear.



No eixo embrionário, a atividade *biospeckle* observada pode ser reflexo da expansão celular que impulsiona a protrusão radicular (OGAWA; HANADA, 2003; SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009), da pressão de turgor e da atividade de enzimas envolvidas no enfraquecimento e síntese de parede celular (COSGROVE, 2005), no reparo de danos ao DNA e na respiração celular (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010), da reorganização do sistema de membranas, dentre outros.

De acordo com Arizaga, Trivi e Rabal (1999), a atividade *biospeckle*, tanto pelo cálculo do MI quanto AVD, é diretamente proporcional ao nível de atividade do tecido analisado, indicando que altos valores representam alta atividade e vice-versa. Assim, o aumento da atividade *biospeckle* observado durante a germinação pode ser derivado de movimentações moleculares e estruturais, como divisão celular, alongamento, movimentação de organelas e reações bioquímicas (BRAGA et al., 2009). Essa complexa movimentação interna, vinculada a atividade metabólica, varia de acordo com a fase de desenvolvimento, região analisada, teor de água, nível de deterioração, temperatura e também com a posição e intensidade da luz laser incidente (RABELO et al., 2005).

Resultados semelhantes foram encontrados por Fracarolli (2011) ao correlacionar o potencial germinativo de sementes de *Tabebuia heptaphylla* (ipê roxo) com valores de MI. De acordo com o estudo, sementes de maior potencial fisiológico apresentaram maiores valores médios de MI, devido a maior atividade metabólica em comparação com sementes de baixo potencial germinativo. Além

disso, há redução dos valores de atividade a medida que o vigor e viabilidade decrescem durante o envelhecimento acelerado.

A eficiência da técnica como um indicador da viabilidade também foi atestada por Rodrigues et al. (2007) ao utilizarem o método MI para diferenciar tecidos mortos e vivos em sementes de feijão. Também em sementes de feijão, Braga et al. (2003) observaram valores maiores de MI em sementes viáveis em comparação com sementes inviáveis.

Vivas et al. (2016) relataram correlação positiva entre atividade *biospeckle* e qualidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio, demonstrando também maiores índices para sementes que originaram plântulas normais durante a germinação. Ao longo da embebição, também observaram atividade superior na região do eixo embrionário em comparação com os cotilédones, apontando relação com o crescimento do embrião e atividade metabólica. Braga et al. (2001) também evidenciaram a sensibilidade da identificação de áreas com diferentes níveis de atividade em sementes de milho, sendo elas o endosperma e o eixo embrionário, o que corrobora com os resultados encontrados.

Em síntese, a consolidação da utilização da técnica para análise de sementes depende de estudos específicos de calibração e das diversas variáveis que podem afetar os resultados obtidos (ZDUNEK et al., 2013). Conforme evidenciado por Braga (2000), o método é eficiente para identificar diferenças contrastantes entre sementes de soja de alto vigor e sementes mortas e o grande desafio é o aperfeiçoamento técnico que permita identificar diferenças sutis relacionadas ao nível de atividade biológica. Desvendar a influência das características das sementes de diferentes cultivares e espécies sobre a atividade *biospeckle* é um desafio necessário para a futura utilização da técnica como ferramenta da análise de qualidade de sementes.

1.3.6 Expressão de genes relacionados ao vigor

Os resultados observados revelam mudanças no padrão de expressão relativa de genes em sementes secas e nos tempos de 6 e 10 HAE (fase II da germinação, de acordo com Figura 13A e 13B), para sementes de soja produzidas

sob déficit hídrico e com diferentes níveis de vigor (Figura 19 e 20). Os genes candidatos selecionados estão envolvidos no reparo de DNA e combate ao estresse oxidativo, no processo de respiração celular, na regulação da transcrição gênica e no remodelamento e síntese de parede celular.

Figura 19 - Expressão relativa de genes no eixo embrionário de sementes de soja - cultivar BRS 133 - produzidas sob déficit hídrico e condições ótimas durante os tempos de embebição de 0, 6 e 10 h. Controle - sementes produzidas sob condições ótimas; estresse – sementes produzidas sob déficit hídrico. Sementes secas do controle (tempo zero) foram usadas como controle para o cálculo de expressão relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

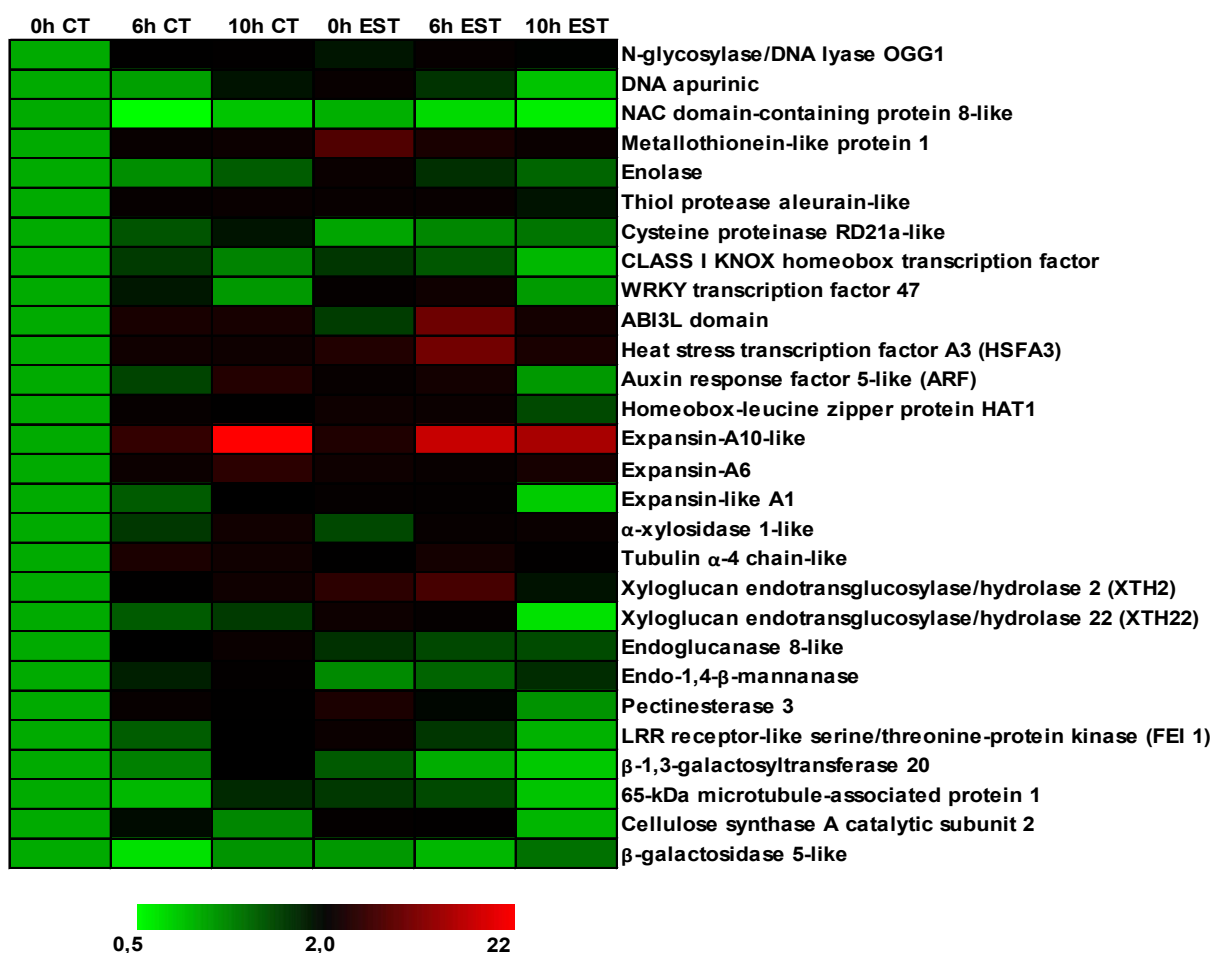
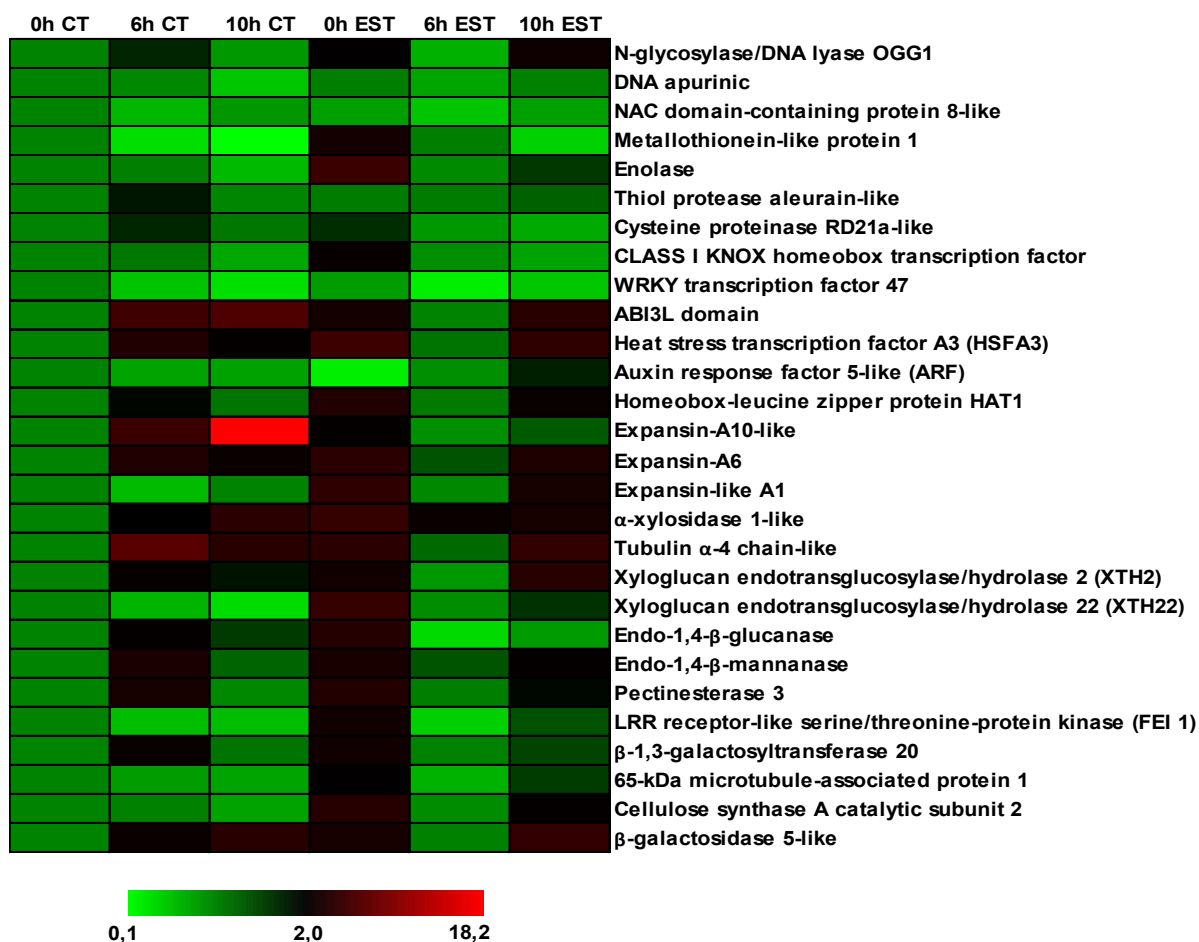


Figura 20 - Expressão relativa de genes no eixo embrionário de sementes de soja – cultivar MG/BR 46 Conquista - produzidas sob déficit hídrico e condições ótimas durante os tempos de embebição de 0, 6 e 10 h. Controle - sementes produzidas sob condições ótimas; estresse – sementes produzidas sob déficit hídrico. Sementes secas do controle (tempo zero) foram usadas como controle para o cálculo de expressão relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Pode-se observar que os resultados de expressão entre as cultivares e ao longo da embebição foram variáveis, assim como o potencial fisiológico das sementes. Essas diferenças na expressão relativa de genes envolvidos em diversas funções ao longo da germinação podem ser atribuídas aos diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico (PÁDUA et al., 2009) e ao grupo de maturação de cada cultivar (CARVALHO et al., 2017).

Para melhor compreensão dos resultados de expressão gênica, os genes avaliados foram agrupados e discutidos por similaridade de função. Dentre eles, merecem destaque no estudo do vigor de sementes os genes *N-glycosylase/DNA lyase*, *metalothionein-like protein 1*, *thiol protease aleurain-like* e aqueles envolvidos no relaxamento de parede celular e alongamento, como as expansinas, *α -xylosidase*

1-like, *tubulin α -4 chain-like*, *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2* (XTH2), *endo-1,4- β -mannanase* e *pectinesterase 3* (PME).

1.3.6.1 Reparo ao DNA

Para avaliar a influência dos mecanismos de reparo ao DNA no vigor das sementes de soja produzidas, foi estudada a expressão dos genes candidatos *N-glycosylase/DNA lyase OGG1* (OGG1) (Glyma.06G115500), *DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (ARP)* (Glyma.02G191100) e *NAC domain-containing protein 8-like* (SOG1) (Glyma.01G088200) em sementes secas (0 h) e 6 e 10 horas após a embebição (HAE).

No decorrer da embebição, a expressão relativa do gene que codifica *N-glycosylase/DNA lyase OGG1* foi crescente nas sementes 133 CT, sendo 2 vezes mais expresso em 6 e 10 HAE. Para as sementes da 133 EST e para Conquista CT os níveis permaneceram inalterados. Já as sementes da cultivar Conquista produzidas sob estresse apresentaram decréscimo na expressão em 6 HAE, com pico de expressão em 10 HAE. Observa-se que a expressão desse gene foi duas vezes superior nas sementes secas estressadas das duas cultivares em relação ao controle, sendo o mesmo observado para o gene *DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase* para 133, refletindo a expressão dos transcritos armazenados ao final da dessecação. A maior expressão de OGG1 em sementes produzidas sob déficit hídrico corrobora com os resultados de expressão do gene ortólogo *MtOGG1* observados em sementes de *Medicago truncatula* em resposta a condições de estresse osmótico (PEG) e por metais pesados (CuCl₂), em comparação ao controle (MACOVEI et al., 2011).

O aumento na expressão do gene *ARP* durante a embebição foi significativo apenas para 133 CT, enquanto para sementes EST a expressão foi diminuindo, mesmo sendo três vezes mais expresso nas sementes secas em relação ao tempo zero do controle. Para Conquista não houve variação na expressão. Esse comportamento evidencia que as cultivares respondem diferentemente ao estresse, com diferentes níveis de tolerância e regulação da expressão gênica, como já observado nos resultados fisiológicos. A influência do componente genético na tolerância ao déficit hídrico e expressão de genes em soja também foi observada por

Guimarães-Dias et al. (2012). Segundo esses autores, a expressão de genes varia drasticamente de acordo com a duração e intensidade do déficit, além de ativar distintas vias de respostas moleculares para cultivares tolerantes e sensíveis.

De acordo com Rajjou et al. (2012), os primeiros processos ativados durante a embebição correspondem ao reparo de danos ao DNA e organelas, que dependem da tradução de mRNAs armazenados. Além da fase de dessecação e armazenamento, a fase de embebição também é correlacionada a altos níveis de ROS, consequentemente, lesões ao DNA e membranas (WATERWORTH et al., 2011). Assim, a manutenção da integridade do DNA é essencial para que ocorram as fases subsequentes e é considerada um componente essencial do vigor (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são os principais agentes causadores de danos a macromoléculas, induzindo vários tipos de lesões ao DNA e mRNA, como oxidação de bases, geração de sítios apurínicos ou apirimídicos (AP) e clivagem de fitas duplas de DNA (CHEN et al., 2012). O DNA é naturalmente instável em solução aquosa, e mesmo o baixo teor de água das sementes (ortodoxas) durante o armazenamento não evita que os danos às moléculas de DNA ocorram, acumulando sítios AP durante esse período. Com o decorrer da embebição, há aumento ainda maior dos danos oxidativos, possivelmente causados por 7,8-*dihydro-8-oxoguanine* (8-oxoG), aumentando níveis de AP (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015). 8-oxoG são removidos pelas enzimas DNA glicosilases e os sítios AP são reparados por endonuclease ou liases (CÓRDOBA-CAÑERO; ROLDÁN-ARJONA; ARIZA, 2014). Além disso, o fator de transcrição SOG1 (família NAC) foi recentemente identificado como regulador mestre nas respostas a danos de fita dupla ao DNA em plantas, mediando a regulação transcricional de mais de 100 genes (YOSHIYAMA, 2011). Os fatores de transcrição da família NAC também são conhecidos por atuar na regulação de respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas (NURUZZAMAN; SHARONI; KIKUCHI, 2013).

ROS são os principais agentes causadores de danos ao DNA e mRNA, possuindo relação com a qualidade das sementes (VENTURA et al., 2012). Sementes produzidas sob condições de déficit hídrico das cultivares BRS 133 e Conquista, menos vigorosas e de germinação mais lenta, apresentaram maiores níveis de MDA, o que pode ser um indicativo da menor eficiência no combate a ROS. A partir desses resultados, faz-se um paralelo entre a ocorrência de danos e a

eficiência os mecanismos de reparo durante as primeiras horas de embebição (VENTURA et al., 2012). A tendência ao aumento de *OGG1* durante a embebição em sementes de soja pode indicar maior eficiência dos mecanismos de reparo e estar relacionada com a maior velocidade de germinação e vigor observadas para sementes de 133 CT em relação a EST e também em relação a Conquista.

O processo de germinação possui vários eventos iniciais e *checkpoints* que precisam ser completados para que a germinação ocorra normalmente (BASSEL et al., 2011). Nesse contexto, uma semente vigorosa passará por estes passos sequenciais mais rapidamente, completando o programa antes do que uma semente menos vigorosa (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Dentre essas etapas, o reparo de DNA representa uma importante limitação para o vigor de sementes (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015), de modo que o tempo gasto para os reparos metabólicos influencia diretamente na taxa de germinação das sementes (MATTHEWS; KHAJEH-HOSSEINI, 2007).

Relação positiva entre genes que codificam enzimas de reparo ao DNA e o vigor foram encontradas, como o gene *AtLIG1* que codifica *DNA ligase I*, em mutantes de *Arabidopsis* (WATERWORTH et al., 2009) e o gene *AtOGG1* que codifica a *DNA glicosilase*, também em *Arabidopsis* (CHEN et al., 2012). De acordo com pesquisa conduzida por Waterworth et al. (2010), com mutantes de *Arabidopsis AtLIG6* e *AtLIG4* (*DNA ligase*), esses genes não são apenas requeridos para rápida germinação sob condições de estresse, mas também importantes para desempenho das sementes (viabilidade, vigor e longevidade). Deficiência de *AtLIG4* e *AtLIG6* leva a um decréscimo da viabilidade e germinação/vigor de sementes, sendo determinantes para a qualidade de sementes de *Arabidopsis*.

O aumento gradual nos níveis de transcritos de *MtOGG1* também foi observado em sementes de *Medicago* durante a embebição, com pico em 8 horas e posterior decréscimo (MACOVEI et al., 2011). O mesmo comportamento foi observado para transcritos do homólogo *AtOGG1* (AT1G21710), sendo altamente expressos durante a embebição e a dessecação de sementes de *Arabidopsis*, sugerindo importante função desse gene no reparo de danos oxidativos ao DNA durante as primeiras horas de germinação (CHEN et al., 2012).

1.3.6.2 Combate ao estresse oxidativo

A expressão relativa de *Metallothionein-like protein 1*, homólogo de *AtMT2*, aumentou ao longo da embebição para sementes CT e EST da cultivar 133. Sementes de 133 produzidas sob condições de déficit hídrico apresentaram expressão 8x superior ao CT, o que pode ser associado a maior tolerância ao déficit hídrico em comparação com as sementes EST da Conquista, com expressão relativa apenas 3x superior. Aliado a isso, durante a embebição das sementes da Conquista, os valores foram reduzidos em cerca de 3x. Essas diferenças de comportamento sugerem uma possível relação entre a expressão de MTs em sementes de soja e o vigor de sementes produzidas sob estresse.

Dentre os numerosos mecanismos que atuam na proteção ao estresse oxidativo, as metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína e que apresentam alta afinidade de ligação a metais pesados. Suas funções nas plantas ainda não são bem definidas e variam de acordo com o tipo, mas tem sido reportadas funções quanto a regulação do crescimento celular, reparo ao DNA, homeostase de metais, desintoxicação e remoção de ROS e metais pesados (GRENNAN, 2011; RUTTKAY-NEDECKY et al., 2013).

Zhu et al. (2009) demonstraram que a expressão do gene *MT2a* foi up-regulada em sementes expostas a baixas temperaturas e à H_2O_2 , mediando o balanço de ROS nas células. Também foi observado aumento na atividade de CAT em mutantes *mt2a* e de *MT2a* em mutantes *cat2*, o que sugere uma compensação entre MTs e enzimas antioxidantes no combate ao estresse oxidativo. Plântulas de arroz superexpressando o gene *OsMT1a* também apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico e níveis mais elevados de enzimas antioxidantes como CAT, SOD e APX (YANG et al., 2009). Essa associação entre nível de expressão de MT e tolerância a estresses abióticos pode ter contribuído para o desempenho fisiológico superior das sementes da cultivar 133. Por outro lado, o aumento da expressão desses genes, não garante que as sementes apresentarão boa qualidade fisiológica.

O perfil de expressão dos transcritos *MT2a*, *MT2b* e *MT3* foi avaliado em sementes de *Nelumbo nucifera* e *Arabidopsis*, revelando alta expressão de MTs durante o desenvolvimento de sementes e germinação. Essa expressão também foi aumentada sob condições de estresse oxidativo, alta salinidade e presença de

metais pesados, além de alta atividade de SOD após o envelhecimento acelerado. Juntos, esses resultados indicam uma correlação entre a expressão de MTs e a manutenção do vigor e germinação das sementes, sob condições de estresse (ZHOU et al., 2012). Correlação positiva entre expressão de MTs e qualidade fisiológica também foi observada em sementes de café (VELOSO, 2017).

A contribuição efetiva de MTs na germinação e vigor de sementes e sua ação antioxidante precisa ser complementada por meio de estudos de caracterização funcional e transferida para espécies de importância agrícola, buscando a produção de sementes com maior tolerância a estresses e armazenamento.

1.3.6.3 Genes envolvidos na respiração celular e mobilização de reservas

A expressão de *enolase* (*ENO2*), enzima envolvida na via glicolítica, foi observada no eixo embrionário de sementes de soja secas e ao longo da embebição, porém não foi significativa para nenhuma das cultivares, tanto em sementes produzidas sob condições de estresse hídrico quanto aquelas produzidas em condições ideais (Figura 19 e 20). A tendência de aumento foi observada apenas para sementes 133 CT.

Homólogos de *ENO2* identificados no eixo embrionário de soja, apresentaram valores crescentes a partir de 3 HAE até 24 HAE, revelando o aumento da atividade glicolítica da sementes (BELLIENY-RABELO et al., 2016). Resultados similares foram observados em sementes de tomate, que apresentaram aumento na expressão relativa de enolases e álcool desidrogenases, indicando ativação da atividade respiratória (MACHADO, 2007). Esperava-se aumento na expressão desses genes ao longo da embebição, principalmente para as sementes mais vigorosas.

Os transcritos dos genes *Thiol protease aleurain-like* e *Cysteine proteinase RD21a-like* (*RD21a-like*) que codificam para cisteínoproteases também foram quantificados (Figura 19 e 20). No eixo embrionário de sementes 133 CT, a expressão relativa de *Thiol protease* aumentou em 3x e a de *Cysteine proteinase* 2x entre 0 e 10 HAE, sendo provável que desempenhem papel no início da mobilização de proteínas. Para 133 EST, os níveis de *Thiol protease* se mantiveram altos em

relação ao tempo 0 HAE, mas em 10 HAE começaram a decrescer. Observa-se também níveis de *Thiol protease* foram superiores em 3x em sementes secas EST em relação ao controle. Para Conquista, não houve variação na expressão relativa desses transcritos ao longo da embebição e entre sementes CT e EST.

A medida que as sementes secas absorvem água, ocorre a retomada gradual do metabolismo marcado pelo início da atividade respiratória e degradação das reservas armazenadas na forma de carboidratos, proteínas e lipídios (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). A respiração celular depende da ação de sistemas enzimáticos que hidrolisam os compostos de carbono armazenados, transformando-os em substâncias mais simples, solúveis e difusíveis, permitindo a translocação para os pontos de crescimento e biossíntese de novos tecidos, além de gerar energia na forma de ATP (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Inicialmente, a sacarose e os oligossacarídeos, como rafinose, estaquiose e verbascose, constituem a principal fonte de energia durante germinação, seguida da digestão das reservas armazenadas, que é essencial durante a embebição e determinante para o desenvolvimento da plântula (BEWLEY et al., 2013). Em sementes de soja, as principais reservas armazenadas correspondem a proteínas (40%), carboidratos (35%) e lipídios (20%), que são degradadas por proteases e peptidases, amilases e lipases, respectivamente (MARCOS FILHO, 2015a).

As proteínas são hidrolisadas por clivagem de suas ligações peptídicas a polipeptídeos menores e/ou aminoácidos, que são direcionados para a biossíntese de novas moléculas ou degradados gerando energia (TAN-WILSON; WILSON, 2012). De acordo com a maneira com que hidrolisam o substrato, elas podem ser agrupadas em endopeptidases, aminopeptidases e carboxipeptidases (proteínases). Inicialmente, as endopeptidases clivam as ligações peptídicas, gerando pequenos polipeptídeos e levando à mudanças na conformação da proteína, o que facilita a hidrólise por outros grupos enzimáticos (BEWLEY et al., 2013). De acordo com o aminoácido presente no sítio catalítico da enzima, as endopeptidases são classificadas em serino, cisteíno, aspártico e metaloproteinases. Até agora, as cisteínoproteases figuram como as principais enzimas envolvidas na mobilização de reservas em sementes (TAN-WILSON; WILSON, 2012).

Estudos moleculares ao longo da embebição de sementes de soja, arroz e tomate confirmam que a glicólise e vias respiratórias, bem como as vias catabólicas são ativadas logo no início da embebição, sustentando o crescimento do eixo

embrionário (HOWELL et al., 2008; BELLINENY-RABELO et al., 2016). Desse modo, enzimas envolvidas nas vias respiratórias, na hidrólise de reservas e na indução do ciclo celular são indicadores do processo de germinação e constituem uma potencial fonte de marcadores do vigor de sementes (CORBINEAU, 2012).

Em leguminosas, as proteínas de reserva são principalmente as globulinas, que podem ser classificadas em leguminas e vicilinas, sendo gradualmente degradadas durante a germinação e crescimento da plântula, de modo específico para cada espécie (FREITAS; TEIXEIRA; FERREIRA, 2007). A presença de cisteínoproteases já foi detectada em sementes secas de ervilhaca (*Vicia sativa* L.), trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), soja e abóbora, envolvidas na degradação de reservas durante a germinação (MÜNTZ et al., 2001). Durante o processo germinativo, nos cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata*, houve diminuição na principal proteína de reserva, a vicilina, após 72 HAE. Nesse mesmo trabalho, a atividade de proteinases cisteínicas foi detectada em sementes quiescentes (tempo 0), em 12 HAE e em 60 HAE nos cotilédones (OLIVEIRA, 2010).

A atividade de proteinases cisteínicas foi observada ao longo do desenvolvimento, decaindo até o estágio final de maturação de sementes de *Vigna unguiculata*. Durante a germinação, sua atividade só foi observada no eixo embrionário tardiamente, após 24 HAE (LIMA, 2010). Enquanto estudos do padrão de expressão de transcritos revelam altos níveis em sementes secas de *Solanum lycoperscium* e aumento significativo de cisteíno e serinoproteases ao longo da embebição de sementes maduras, menores níveis são observados em sementes imaturas, que apresentaram menor velocidade de germinação (MACHADO, 2007). Essas informações sugerem que variações na atividade de proteases podem ser um indicativo da eficiência do processo de germinação, porém, como destacado por Freitas et al. (2007), o padrão de degradação de proteínas e atividade de proteases é variável para cada espécie.

De acordo com Schlereth et al. (2000), as proteinases cisteínicas armazenadas em sementes secas são responsáveis pela mobilização de globulina no início da germinação de *Vicia sativa* L, que é completada pela síntese de proteínas *de novo*. Além dessa função, sua presença em cotilédones de soja em desenvolvimento sugere envolvimento no processo fisiológico de dessecação (NONG; BECKER; MÜNTZ, 1995). Assim, a presença dos transcritos de cisteínoproteases em sementes de soja secas pode ser um indício quanto a sua

importância no início da degradação de proteínas armazenadas e as variações do padrão de expressão observadas entre as cultivares revela a complexidade da atividade das proteases e suas formas de regulação (TAN-WILSON; WILSON, 2012).

Esses resultados apontam a necessidade de uma abordagem genética e proteômica mais profunda do padrão de expressão de proteínas envolvidas na mobilização de reservas durante a germinação e início do desenvolvimento de plântula em soja, buscando compreender a relação entre a mobilização de reservas, o processo respiratório e o vigor de sementes.

1.3.6.4 Expressão gênica de fatores de transcrição

A regulação da expressão gênica, à nível transcricional, é mediada por fatores de transcrição (FTs), que contém domínios de ligação ao DNA altamente conservados e capazes de interagir com elementos regulatórios de ação *cis* do DNA, ativando ou reprimindo a expressão em resposta a sinais endógenos ou exógenos (SCHWECHHEIMER; BEVAN, 1998). Os FTs podem ser agrupados em famílias conforme o domínio de ligação ao DNA. De acordo com o banco de dados PlantTFDB, em soja já foram identificados 3747 FTs, agrupados em 57 famílias. Desse total, cerca de 50% de FTs foram detectados ao longo da embebição de sementes de soja, enquanto 12% foram significativamente upregulados, o que reflete a complexidade e importância da regulação temporal e espacial dos fatores de transcrição no processo de germinação (BELLIENY-RABELO et al., 2016).

Com base em buscas na literatura, os fatores de transcrição selecionados para o estudo do vigor em sementes de soja foram *KNOX1*, *WRKY47*, *ABI3L*, *HSFA3*, *ARF5* e *HAT1* (STAMM et al., 2012; ROSSI, 2016).

O fatores de transcrição *KNOX*, pertencentes a superclasse TALE, controlam a formação e manutenção de meristemas apical, a morfogênese de órgãos e regulam múltiplas vias hormonais, incluindo auxina (AIA), brassinosteróides (BR), citocinina (CK) e giberelina (GA) e outros FTs, como *Homeobox*, *bHLH*, *YABBY*, *NAC*, *WRKY*, *ARF*, *AUX/IAA*, *AP2/EREBP* (TSUDA; HAKE, 2015). *KNOX1* são importantes reguladores na manutenção do meristema apical da parte aérea e na

iniciação dos órgãos, principalmente no crescimento e desenvolvimento de folhas, flores e vagens. Também garantem a manutenção de baixos níveis de GA no meristema apical, favorecendo a dominância e reprimindo a diferenciação celular (BOLDUC; HAKE, 2009; HAY; TSIANTIS, 2010; SAKAMOTO et al., 2001).

Em sementes de *Glycine max*, o primeiro homeobox isolado foi o *GmSBH1*, que codifica para um FT homeobox classe I, com possível envolvimento no crescimento e desenvolvimento de sementes e plântulas, além do aumento da tolerância a deterioração na pré-colheita, causada por alta temperatura e umidade (SHU et al., 2015). De acordo com os autores, a expressão de *GmSBH1* varia conforme o tecido (cotilédone, embrião, tegumento, raiz de plântula, flor e vagem) e a variedade de soja avaliada (sensível e resistente). Durante a embriogênese de sementes de soja e *Arabidopsis thaliana*, o aumento do nível de expressão de transcritos de *Sbh1* sugere que *SBH1* tenha uma importante função no desenvolvimento do embrião das sementes em desenvolvimento (HAY; TSIANTIS, 2010; MA; MCMULLEN; FINER, 1994). Também em soja, o aumento significativo na expressão de *Class I KNOX homeobox* foi observado em sementes maduras (R9), mas não em sementes imaturas durante a embebição (ROSSI, 2016).

Neste estudo, a expressão relativa de *Class I KNOX homeobox* foi constante para ambas as cultivares durante a embebição. Contrariando o esperado, a expressão *KNOX1* não aumentou ao longo das 10 horas de embebição, porém não se pode descartar a atuação desse FT na germinação e morfogênese, já que aumentos significativos foram observados mais tardiamente, após 18 HAE (ROSSI, 2016) e 48 HAE em sementes de soja (SHU et al., 2015).

As sementes da cultivar Conquista, sensível ao estresse, produzidas sob déficit hídrico apresentaram expressão 2,5x superior ao controle no tempo zero, enquanto não houve variação entre 133 CT e EST. Similar ao observado nesse trabalho, a expressão de proteínas *GmSBH1* foi aumentada em condições de alta temperatura e umidade na pré-colheita de soja (WANG et al., 2012). Na sequência, maiores níveis de expressão relativa do transcrito *GmSBH1* foram observados no embrião, cotilédones e tegumento da cultivar de soja sensível a deterioração por umidade e estresse térmico em relação a cultivar resistente (SHU et al., 2015). Em conjunto, esses resultados sugerem o envolvimento de *KNOX I* em respostas a estresses abióticos, como déficit hídrico e altas temperaturas.

A expressão relativa do fator de transcrição *WRKY* também foi analisada. Nas primeiras 6 horas de embebição, a expressão foi aumentada em 2,5 e 3x para 133 CT e EST, respectivamente, com posterior declínio na expressão. Sementes secas de 133 EST apresentaram 2,5x maior expressão que sementes secas do CT, o que não foi observado para Conquista. Durante a embebição da Conquista, houve redução na expressão ao longo da embebição para sementes controle e estressadas.

Membros da superfamília de fatores de transcrição *WRKY* estão envolvidos na regulação de vários processos fisiológicos e bioquímicos, como no desenvolvimento de sementes (LUO et al., 2005), na germinação e dormência, através da indução de ABA e repressão nas vias de sinalização de GA (ZHANG, 2004; XIE et al., 2006; ZOU; NEUMAN; SHEN, 2008) e especialmente envolvidos em respostas a estresse abiótico e biótico (EULGEM et al., 2000). Proteínas *WRKY* estão envolvidas em respostas a estresse salino, hídrico e frio (ZHOU et al., 2008; WANG et al., 2015;) e no aumento da resistência a patógenos (BHATTARAI et al., 2010; JIANG et al., 2015).

Durante a embebição, os altos níveis de expressão encontrados para a cultivar 133, mais tolerante ao estresse, podem indicar que esse gene atue na construção de um perfil mais tolerante ao déficit hídrico. A maior expressão de genes *WRKY* no genótipo tolerante de soja também foi observada em estudos conduzidos por Dias et al., (2016), indicando o envolvimento desses genes nas rotas de defesa contra estresse. Recentemente, também foi encontrada relação entre *WRKY* e longevidade de sementes de *Medicago truncatula* (RIGHETTI et al., 2015) e de soja (ROSSI, 2016).

Também há relatos de atuação de membros da família *WRKY* na regulação negativa da germinação, reprimindo a expressão mediada por ABA, impedindo a transcrição de α -amilases (ZHANG et al., 2009; ZOU; NEUMAN; SHEN, 2008). Por outro lado, a relação positiva também foi observada, com aumento da expressão de transcritos *WRKY* ao longo da embebição de sementes de soja (ROSSI, 2016), assim como observado para as sementes 133 CT e EST. Recentemente, análises moleculares apontaram que o fator de transcrição *HaWRKY10* atua como regulador positivo da mobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de sementes de girassol (RAINERI et al., 2016).

Resultados similares foram observados na expressão relativa de *Auxin response factor 5-like (ARF5)*. Enquanto sementes secas de 133 EST apresentaram expressão 2,6x maior expressão do que o CT, sementes secas da Conquista EST apresentaram resultados 5x menores que o seu CT. Assim como *WRKY*, *ARF* também parece estar envolvido na longevidade de sementes (RIGHETTI et al., 2015; ROSSI, 2016). Os membros da família ARF atuam nas vias de transdução de sinal de auxina, influenciando nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como nos processos de divisão e alongamento celular (KROGAN et al., 2014). Em conjunto e com base nos resultados fisiológicos, esses resultados podem indicar participação de *ARF* e *WRKY* na longevidade e vigor de sementes.

Outro fator de transcrição importante para longevidade de sementes e tolerância a condições de estresse estudado foi o *Heat stress transcription factor A3 (HSFA3)*. Essa família de FTs modula a expressão de *heat shock proteins (HSPs)* e *small shock proteins*, indispensáveis para as respostas a estresse (CHEN et al., 2010) e regulação da longevidade de sementes (PRIETO-DAPENA et al., 2006). Para ambas as cultivares, sementes secas do EST apresentaram 4,6x e 5,9x maior expressão relativa de *HSFA3*, para 133 e Conquista, respectivamente. O aumento significativo de expressão também foi observado ao longo da embebição para ambas cultivares.

Durante a maturação tardia, mais precisamente entre as fases R7.2 e R9, mudanças na expressão de transcritos HSF e acúmulo de HSP sugerem envolvimento na longevidade e tolerância a dessecação de sementes de soja, além do envolvimento de FTs das famílias *AP2/EREBP*, *ARF*, *WRKY*, regulados por ABA (LIMA et al., 2017; ROSSI, 2016). Proteínas HSP agem como chaperonas, responsáveis pela estabilização de proteínas e membranas sob condições de estresse. Além disso, as respostas à estresse abiótico indicam que *HSFA3* e *DREB2C* atuam em conjunto, regulando a expressão de HSP sob estresse térmico e da enzima APX sob estresse oxidativo, modulando a sinalização induzida por estresse em *Arabidopsis* (CHEN et al., 2010; SONG; CHUNG; LIM, 2016). Por outro lado, estudos de superexpressão de *SlHsfA3* em tomate sugerem envolvimento nas vias de sinalização de GA e na expressão de HSP sob condições de estresse durante a germinação (LI et al., 2013). Os resultados indicam aumento na expressão de transcritos *HSFA3* em sementes produzidas sob condições de estresse hídrico, o que pode estar relacionado às condições desfavoráveis durante a fase final da

maturação; enquanto durante a embebição, especula-se envolvimento nas vias de sinalização de GA durante a germinação.

Outro transcrito, o *ABI3L*, também teve sua expressão aumentada ao longo da embebição e maturação de sementes de soja (ROSSI, 2016). Visando relacionar a expressão desse transcrito ao vigor de sementes, a expressão relativa de *ABI3L* também foi analisada. Como observado por Rossi (2016), a expressão do transcrito aumentou ao longo da embebição, tanto para sementes da 133, quanto da Conquista, não havendo, portanto, relação direta com o vigor. Sementes secas da Conquista produzidas sob déficit hídrico apresentaram expressão 3,3x superior ao CT, o que não foi observado para 133.

A superfamília B3, da qual faz parte o *ABI3L*, possui diversas funções identificadas, como na sinalização hormonal (*ABI3*, *RAV1* e *ARF*), no controle do florescimento (*TEM1-2*, *OsLFL* e *VRN1*) e no crescimento de órgãos (*ARF3*, *ARF4* e *NGA1-4*), mas muito ainda precisa ser estudado para desvendar suas relações e funções (SWAMINATHAN; PETERSON; JACK, 2008). Em *Arabidopsis*, os homólogos desse transcrito possuem relação com a arquitetura foliar (*APEX4*), aspectos do florescimento (*AP2/B3-like*) (SHAO et al., 2012), regulação do tamanho de semente (ZHANG et al., 2015) mas aparentemente não há relação com as vias de sinalização de ABA e germinação.

A regulação da germinação e dormência de sementes sofre profunda influência de hormônios, com reconhecida função antagônica entre GA e ABA. Assim, genes que codificam proteínas que modulam o metabolismo dessas moléculas sinalizadoras, principalmente os envolvidos na biossíntese e desativação de GA e ABA são importantes reguladores desses eventos (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Em plantas, as rotas de transdução de sinal geralmente envolvem inativação de proteínas repressoras. Quando GA se liga ao seu receptor, *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1* (*G1D1*), há a formação do complexo *GA-G1D1*, que interage com as proteínas repressoras *DELLA* e desencadeia sua ubiquitinação e degradação via proteassomo (TAIZ et al., 2017). Após a degradação de *DELLA*, há ativação de fatores de transcrição e mudanças na expressão de genes responsivos a GA, como expansinas e α -amilases (GUPTA; CHAKRABARTY, 2014). Dentre os membros da família *DELLA*, o *REPRESSOR OF ga1-3* (*RGL2*) é um regulador negativo que atua especificamente no controle da germinação de sementes (LEE et

al., 2002), e regula diretamente a expressão de FT *Homeodomain-Leucinezipper* (HD-Zip) HAT4 e HB5 (STAMM et al., 2012).

A expressão relativa de *Homeobox-leucine zipper protein* (HAT1) foi superior em sementes secas estressadas de ambas as cultivares de soja em relação ao controle. Já as sementes embebidas de 133 apresentaram pico nas primeiras horas de embebição, com posterior declínio na expressão. Para Conquista, apesar de maior expressão em sementes secas EST, em 6 HAE a expressão retornou aos níveis iniciais do controle.

Stamm et al. (2012) sugere que *HAT4*, homólogo a *HAT1*, identificado como um gene marcador regulado diretamente por *RGL2*, tenha função no desenvolvimento, maturação e germinação de sementes, devido a seus níveis de expressão em sementes secas e embebidas de mutantes de *Arabidopsis*, o que sustenta os resultados encontrados neste trabalho.

Conforme estudos conduzidos por Lee et al. (2002), a expressão de *RGL2* é induzida pela embebição e aumenta rapidamente nas primeiras horas, declinando com o avanço da germinação, correspondente ao aumento nos níveis de GA. Já em estudos conduzidos por Bassel et al. (2004) com sementes de *Arabidopsis*, tomate e soja, a expressão de *RGL2* permaneceu alta durante a embebição e crescimento de plântula, de modo que a regulação negativa de *DELLA* por GA não é um pré-requisito para que a germinação se complete. Apesar da expressão relativa de *HAT4* estudada indicar alguma relação com a germinação e maturação de sementes de soja, os resultados não foram suficientes para diferenciar o comportamento de sementes com diferentes níveis de vigor.

1.3.6.5 Genes envolvidos no alongamento e expansão celular

A germinação *sensu stricto* se completa com a protrusão da radícula, como resultado do alongamento da região do hipocótilo (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009; SOUZA; TOPHAM; BASSEL, 2017). Essa expansão celular, coordenada principalmente pela ação de giberelina (GA) (OGAWA; HANADA, 2003; CAO et al., 2006; OH et al., 2014), depende da ação de enzimas hidrolíticas envolvidas na modificação e relaxamento de parede celular, como expansinas (EXP), xiloglucano

endotransglicosilase/hidrolases (XTH), pectina metil esterases (PME) e β -1,4-glucanases (COSGROVE, 2005).

Motivado pela regulação precoce de genes envolvidos na modificação de PC e pela importância do alongamento para a protrusão radicular, o comportamento de um grupo de genes envolvidos nesse mecanismo de expansão foi analisado durante a embebição de sementes de soja.

A expressão relativa das expansinas *expansin-A10-like* (*EXPA10*), *expansin-A6* (*EXPA6*) e *expansin-like A1* (*EXPA1*) foi analisada durante a embebição (Figura 19 e 20). Nas sementes 133 CT, observa-se aumento progressivo na expressão relativa das três expansinas durante a embebição, com destaque para *EXPA10*, sendo 22 vezes superior ao tempo zero em 10 h de embebição. Já as sementes EST apresentaram comportamento similar apenas para *EXPA10*, aumentando em 18 vezes em relação a 0 h. Reduções foram observadas ao longo da embebição para *EXPA6* e *EXPA1*. As sementes secas produzidas sob déficit hídrico tiveram a expressão de expansinas alteradas, apresentando expressão superiores ao CT (0 h) em 2 (*EXPA1*), 3 (*EXPA6*) e 4,5 vezes (*EXPA10*), o que sugere atuação das expansinas na tolerância ao déficit hídrico ou durante a maturação tardia. As sementes da cultivar Conquista, produzidas sob déficit hídrico, também apresentaram expressão superior em 5 (*EXPA1*), 4,7 (*EXPA6*) e 2 vezes (*EXPA10*) no tempo zero em relação ao CT. O aumento crescente durante a embebição foi observado para *EXPA10* e *EXPA6* nas sementes CT, enquanto no EST a tendência foi de redução na expressão.

Durante a germinação, a expressão de expansinas, induzidas por GA, facilita a extensão da parede celular e o enfraquecimento do endosperma em sementes, favorecendo a protrusão da radícula (CHEN; BRADFORD, 2000). Como a expressão de expansinas é mediada por GA, Stamm et al. (2012) demonstraram que *RGL2*, uma proteína repressora *DELLA*, regula negativamente dois genes codificadores de expansina, causando atrasos na germinação de sementes de *Arabidopsis*. Confirmando o envolvimento de expansinas no enfraquecimento de PC e na germinação mediada por GA, mutantes superexpressando o gene *AtEXP2* apresentaram maior velocidade de germinação em comparação com o genótipo selvagem, também sugerindo envolvimento na tolerância a estresses abióticos durante a germinação (YAN et al., 2014). Em soja, foi caracterizado o envolvimento do gene *GmEXP1* no desenvolvimento radicular, acelerando o crescimento e

alongamento de raízes primárias (LEE et al., 2003). Nesse contexto, os resultados encontrados nesse trabalho sugerem a relação positiva entre vigor de sementes e a expressão relativa de expansinas, principalmente *EXPA10* e *EXPA6*, durante a embebição. O envolvimento de expansinas pode ter influenciado positivamente na maior velocidade de germinação, inclusive em condições subótimas, como baixas temperaturas e sob solução salina de NaCl (Figura 8).

Análises filogenéticas identificaram um total de 75 genes da expansinas no genoma da soja, com variações no acúmulo de transcritos entre os diferentes tecidos e entre os membros de expansina avaliados, indicando o envolvimento em múltiplos processos durante o desenvolvimento de soja (ZHU et al., 2014). A maior expressão relativa de *EXPA10*, *EXPA6* e *EXPA1* observada em sementes secas estressadas indica algum envolvimento em resposta ao estresse abiótico imposto. Enquanto estresse salino e osmótico reduziram significativamente o nível de expressão de *AtEXP2*, implicando que a ocorrência de estresse pode inibir a germinação das sementes (YAN et al., 2014), também há relatos de regulação positiva pelo estresse térmico (XU et al., 2007). Este padrão variável de expressão gênica sob estresses abióticos evidencia a amplitude de funções dessa família gênica e enfatiza a importância de estudos de caracterização molecular de expansinas que possam ser direcionados para a melhoria das culturas.

Assim como observado para as expansinas em sementes 133 CT, a expressão relativa dos transcritos *XYL1*, *TUA*, *XTH2*, *EGase*, *MAN*, *PME* e *FEI1* aumentou ao longo da embebição. Em comparação com as sementes produzidas sob estresse hídrico, as maiores diferenças de expressão foram observadas entre os transcritos de *EGase*, *MAN*, *PME*, *FEI1* e *GALT20*.

Para as sementes da Conquista, as variações na expressão relativa dos transcritos foram mais acentuadas durante a embebição, corroborando com as diferenças de vigor mais contrastantes entre sementes produzidas sob condições de estresse e sob condições ideais. De modo geral, as sementes CT apresentaram maior pico de expressão em 6 HAE, enquanto as sementes EST em 10 HAE. As sementes secas estressadas apresentaram maior expressão relativa para todos os transcritos relacionados com modificação na PC avaliados, sendo no mínimo 2x mais expresso o transcrito que codifica a proteína *MICROTUBULE*, e no máximo 5,3 vezes para *XYL1* e *XTH2*.

As hemiceluloses mais comuns em plantas correspondem aos xiloglucanos, que são polissacarídeos compostos por uma cadeia principal de glicose (β -1,4) e ramificações laterais de xiloses (α -1,6), que também podem apresentar ramificações de galactoses e outros polissacarídeos (FRANKOVÁ; FRY, 2013). De modo geral, têm-se atribuído à expansinas e XTH o papel principal em atividades relacionadas ao relaxamento de PC durante a germinação (COSGROVE, 2005; 2015). As moléculas de XTH atacam os xiloglucanos, já destacados pelas expansinas por meio da quebra das pontes de hidrogênio entre eles e as microfibrilas de celulose, e refazem a ligação glicosídica com a extremidade livre de outra cadeia de xiloglucano, aumentando a extensibilidade da PC.

Em *Arabidopsis*, a expressão de *TCH4* (XTH) foi regulada por hormônios envolvidos no crescimento celular, como auxina, brassinosteróides e GA, com maior expressão em folhas jovens, tricomas, primórdios de raízes laterais, zonas de abscisão e hipocótilos em alongamento (XU et al., 1995). Em plântulas de soja, o alongamento do hipocótilo foi inibido pela baixa atividade de enzimas XTH, demonstrando o importante papel dessa proteína no remodelamento de parede celular no hipocótilo (WU et al., 2005).

Uma visão global do proteoma de hipocótilos de *Arabidopsis* também revelou a importante presença de proteínas XTHs, expansinas, poligalacturonases, pectina metilesterases, envolvidas na extensão da parede celular (IRSHAD et al., 2008). Também há evidências quanto à repressão por DELLA na expressão de vários genes relacionados a esse processo, o que sugere que a liberação da repressão de GA por DELLA é crucial para a expressão desses importantes modificadores da parede celular (CAO et al., 2006).

Dentro desse contexto, a enzima α -xilosidase também desempenha papel essencial no remodelamento de xiloglucanos, na manutenção da integridade da parede celular e na germinação de sementes. Glicosidases, como α -xilosidases, atuam catalisando a hidrólise de polissacarídeos, atacando os resíduos terminais da cadeia de açúcares (FRANKOVÁ; FRY, 2013). Segundo Shigeyama et al. (2016), os transcritos detectados no embrião possivelmente atuam controlando o potencial de crescimento e alongamento do hipocótilo durante a germinação, diretamente por meio de alterações físicas de PC e indiretamente por meio da regulação hormonal. Esses resultados corroboram com os encontrados nesse trabalho, no qual a relação

entre expressão relativa de *XYL1* foi positiva com os resultados fisiológicos, para ambas as cultivares.

Outro transcrito com expressão relativa superior em sementes controle em comparação com estressadas foi *TUA*. Subunidades de α - e β -tubulina fazem parte da composição dos microtúbulos, importantes para manutenção da forma celular e também envolvidos na germinação, com expressão aumentada durante a embebição (CAO et al., 2006). Sementes 133 CT apresentaram expressão relativa de *TUA* ligeiramente superior ao EST, enquanto para Conquista CT foi cerca de 8x superior em relação ao EST, o que também sugere relação com o vigor.

As tubulinas são essenciais para a separação das organelas durante a citocinese. No decorrer da embebição, as células iniciam a síntese de DNA (fase S) e duplicam seu conteúdo de DNA (fase G2), se preparando para a divisão celular (fase M), que ocorre após a protrusão radicular em sementes (VÁZQUEZ-RAMOS; SÁNCHEZ, 2003). Assim, a presença de tubulinas tem sido correlacionada à eficiência do processo de germinação, principalmente após *priming* (DE CASTRO et al., 2000; GALLARDO et al., 2002). Em sementes de café, o crescimento do eixo embrionário durante a germinação foi resultado da expansão e alongamento das células, tendo o preparo para a divisão celular marcado pela síntese de DNA, reorientação dos microtúbulos e acúmulo de β -tubulina (SILVA et al., 2008).

Nota-se também que a expressão de *endoglucanase 8-like* (EGase) foi superior em sementes CT em relação ao EST. Essas enzimas fazem parte da família das glicosil hidrolases, que tem como substratos a celulose e xiloglucanos de PC, atuando em conjunto com XTH (COSGROVE, 2005). Estudos de caracterização funcional de *CEL1* fundamentam a ligação entre expressão de *EGase* e alongamento celular (SHANI et al., 1997). Em plântulas jovens de *Arabidopsis*, o acúmulo diferencial de *CEL1* (EGase) foi observado na PC em diferentes órgãos da planta, reforçando a correlação entre a atividade dessa enzima na expansão celular e sugerindo papel na biossíntese de celulose (SHANI et al., 2006). Além disso, a expressão de endo-1,4- β -glucanases também foi observada durante a embebição, sofrendo repressão de proteínas DELLA (CAO et al., 2006).

De acordo com Iglesias-Fernández et al. (2011), a expressão de mananases (especialmente *AtMAN5*, *AtMAN7* e *AtMAN6*) durante a embebição em sementes de *Arabidopsis* é importante para a germinação, provavelmente reduzindo a resistência mecânica do endosperma micropilar e facilitando a protrusão, interferindo no tempo

de germinação (*T50*). Esse comportamento na expressão de endo- β -mananases também foi observado durante a embebição de sementes de café (DE FARIAS et al., 2015). As diferenças na expressão de *MAN* ficaram evidentes entre sementes de soja CT e EST e podem ser um indício da sua importância na germinação.

As pectinas, constituídas principalmente de ácido galacturônico, são polissacarídeos altamente hidratados e o principal componente da PC de plantas. As pectinas metilesterases (PME) catalisam a desesterificação de pectinas em pectato e metanol (EC 3.1.1.11), levando à modificações físicas e bioquímicas de PC (KOHLI; KALIA; GUPTA, 2015). A atividade de PME têm sido relacionada a vários processos, dentre eles a germinação e alongamento do hipocótilo (BORDENAVE; GOLDBERG, 1993). Durante a fase final de maturação de sementes de soja, a desesterificação aumenta e a PC fica mais flexível, o que aumenta a flexibilidade da parede celular, permitindo que o tecido do eixo mude rapidamente o seu volume sem danificar os tecidos durante a dessecação e posterior embebição (germinação) (KOCH et al., 1999).

Há evidências de que o grau de metil-esterificação de pectina (DE%) limita o crescimento celular, sendo necessário um nível mínimo para garantir o alongamento celular normal do hipocótilo, favorecido pela plasticidade da parede (DERBYSHIRE; MCCANN; ROBERTS, 2007). A expressão relativa de *PME* foi mais acentuada a partir de 6 HAE para 133 e Conquista CT em relação ao EST, o que pode ter favorecido o alongamento e consequentemente, a velocidade de germinação das sementes.

De modo geral, a atividade de proteínas envolvidas no afrouxamento de parede, como as expansinas, *XTHs*, *PMEs*, endo- β -mananases e outras hidrolases, resulta no deslizamento e afastamento das microfibrilas de celulose, permitindo a entrada de água e o alongamento celular. Como a protrusão radicular é resultado de alongamento e não divisão celular (SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009), os genes envolvidos nesse processo candidatos promissores para o estudo do vigor de sementes. Novas pesquisas e diferentes abordagens são necessárias para elucidar a real influência desse processo e desses genes no vigor de sementes.

1.4 CONCLUSÃO

O déficit hídrico imposto a partir do estágio R5.5 reduz a qualidade fisiológica das sementes de soja produzidas, que apresentam menor velocidade de germinação (T50), menor resistência a condições adversas impostas pelo teste de envelhecimento acelerado, menor longevidade e maior lixiviação de solutos.

Sementes de soja produzidas sob condições de déficit hídrico, menos vigorosas, apresentam redução na atividade de CAT e nos níveis de H₂O₂, e aumento nos níveis de MDA, indício da peroxidação de lipídios. Enquanto os níveis de atividade de SOD e APX permanecem inalterados entre as sementes CT e EST.

A atividade *biospeckle*, avaliada pelos índices AVD e MI, aumenta no decorrer da embebição de sementes de soja, em ambas as regiões de interesse avaliadas (região central do hipocótilo e radícula), independente da combinação cultivar e condição de produção. Há relação entre atividade *biospeckle* e os resultados de protrusão radicular realizados durante a obtenção das imagens.

A análise de correlação entre comprimento (mm) e atividade *biospeckle* (MI) no hipocótilo de sementes de soja mostra uma correlação positiva e linear, indicando a tendência de aumento da atividade *biospeckle* à medida que o hipocótilo se alonga durante a embebição.

Durante as primeiras horas de embebição, notam-se alterações significativas na expressão de genes relacionados a diversos processos ativados no início da germinação. A expressão dos genes *N-glycosylase/DNA lyase*, *metallothionein-like protein 1*, *thiol protease aleurain-like* e aqueles envolvidos no relaxamento de parede celular e alongamento, especialmente as expansinas, *α-xylosidase 1-like*, *tubulin α-4 chain-like*, *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2* (XTH2), *endo-1,4-β-mannanase* e *pectinesterase 3* (PME) apresentam relação com o vigor.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, New York, n. 105, p. 121-126, 1984.

AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. **Seed development: OMICS technologies toward improvement of seed quality and crop yield: OMICS in seed biology**. London: Springer, 2012. 566 p.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.

ARANTES, N. E.; et al. **Cultivares de soja: Minas Gerais e região Central do Brasil - Safra 2010/2011**. Londrina: Embrapa Soja; Uberaba: Fundação triângulo de Pesquisa e Desenvolvimento, 2010. 47 p.

ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. **Optics & Laser Technology**, v. 31, n. 2, p. 163–169, 1999.

BAILLY, C. et al. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 475–483, 2004.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 331, n. 10, p. 806–814, 2008.

BASSEL, G. W. Down-Regulation of DELLA Genes Is Not Essential for Germination of Tomato, Soybean, and Arabidopsis Seeds. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2782–2789, 2004.

BASSEL, G. W. et al. Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 23, p. 9709–9714, 2011.

BASSO, D. P. et al. Late seed maturation improves the preservation of seedling emergence during storage in soybean 1. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 2, p. 185–192, 2018.

BELLIENY-RABELO, D. et al. Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36009, 8 dez. 2016.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer International Publishing, 2013. 408 p.

BHATTARAI, K. K. et al. WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and Arabidopsis as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. **Plant Journal**, v. 63, n. 2, p. 229–240, 2010.

BOLDUC, N.; HAKE, S. The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 6, p. 1647–58, 2009.

BONATO, E. R. **Estresses em Soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 254 p.

BORDENAVE, M.; GOLDBERG, R. Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell walls. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 999–1003, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, R. A. "Bio-Speckle" : uma Contribuição para o Desenvolvimento de uma Tecnologia Aplicada à Análise de Sementes. 2000. 130 p. **Tese** (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRAGA, R. A. et al. Assessment of Seed Viability by Laser Speckle Techniques. **Biosystems Engineering**, v. 86, n. 3, p. 287–294, 2003.

BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser speckle using the absolute value of the differences. **Optics**, v. 284, n. 2, p. 646–650, 2011.

BRAGA, R. A. et al. Live biospeckle laser imaging of root tissues. **European Biophysics Journal**, v.38, p. 679–686, 2009.

BRAGA, R. A. et al. Potencial do bio-speckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciências Agrotecnologia UFLA**, v. 25, n. 3, p. 645–649, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 398 p.

BREVEDAN, R. E.; EGLI, D. B. Short periods of water wtress during weed filling, leaf senescence, and yield of soybean. **Crop Science**, v. 43, n. 6, p. 2083–2088, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2015. 1280 p.

CAO, D. et al. Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 509–525, 2006.

CARVALHO, C. F. et al. Physiological quality of soybean seed cultivars (*Glycine max* (L.) Merr) with different maturity groups. **Research Journal of Seed Science**, v. 10, n. 2, p. 59–72, 2017.

CHATELAIN, E. et al. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.

CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1265–1274, 2000.

CHEN, H. et al. Arabidopsis DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 401, n. 2, p. 238–244, 2010.

CHEN, H. et al. Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances

seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4107–4121, jan. 2012.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S61–S68, 2012.

CÓRDOBA-CAÑERO, D.; ROLDÁN-ARJONA, T.; ARIZA, R. R. Arabidopsis ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. **Plant Journal**, v. 79, n. 5, p. 824–834, 2014.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. November, p. 850–861, 2005.

COSGROVE, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 25, p. 162–172, 2015.

CRUZ DE CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 3, p. 156–165, 2008.

CUNHA, A. R. da; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. *Irriga, Botucatu*, v.14, n.1, p.1-11, 2009.

DE CASTRO, R. D. et al. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 327–335, 2000.

DE FARIAS, E. T. et al. Expression studies in the embryo and in the micropylar endosperm of germinating coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seeds. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 2, p. 575–581, 2015.

DELOUCHE, J. C. Seed deterioration. **Seed World**, v. 92, n. 4, p. 14–15, 1963.

DERBYSHIRE, P.; MCCANN, M. C.; ROBERTS, K. Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. **BMC plant biology**, v. 7, p. 31, 2007.

DESCLAUX, D.; HUYNH, T. T.; ROUMET, P. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. **Crop Science**, v. 40, n. 3, p. 716–722, 2000.

DESCLAUX, D.; ROUMET, P. Impact of drought stress on the phenology of two soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars. **Field Crops Research**, v. 46, n. 1, p. 61–70, 1996.

DIAS, L. P.; DE OLIVEIRA-BUSATTO, L. A.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. The differential expression of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] WRKY genes in response to water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 288–300, 2016.

DORNBOS JR., D. L.; MULLEN, R. E. Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination, and seedling growth rate. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 71, p. 373–383, 1991.

DORNBOS JR.; MULLEN, R. E.; SHIBLES, R. E. Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigor. **Crop Science**, v. 29, p. 476–480, 1989.

EATON, J. W.; BATEMAN, D.; HAUBERG, S.; WEHBRING, R. GNU Octave - version 3.8.1 manual: a high-level interactive language for numerical computations. Disponível em: <https://www.gnu.org/software/octave/download.html>. 2014.

EGLI, D. B. et al. Air temperature during seed filling and soybean seed germination and vigor. p. 1329–1335, 2005.

EGLI, D. B.; BRUENING, W. P. Water stress, photosynthesis, seed sucrose levels and seed growth in soybean. **Journal of Agricultural Science**, v. 142, n. 1, p. 1–8, 2004.

EGLI, D. B.; TEKRONY, D. M.; SPEARS, J. F. Effect of high temperature stress during different stages of seed development in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Seed Technology**, v. 27, n. 2, p. 177–189, 2005.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. **Oxford University Press**, v. 45, n. 1, p. 13–30, 1980.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, n. 3, p. 175–182, 2008.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Cultivares de soja: regiões Sul e Central do Brasil 2010/2011**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 60 p. (Folder. 12/2010).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Sistemas de Produção, n. 16).

EULGEM, T. et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 5, p. 199–206, 2000.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 9 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 48).

FAROOQ, M. et al. Review article Plant drought stress : effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, n. 1, p. 185–212, 2009.

FERGUSON, J. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Changes during early soybean seed and axes deterioration: II. Lipids. **Crop Science**, v. 30, n. 1, p. 179–182, 1990.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.

FRACAROLLI, J. A. Utilização do biospeckle laser na avaliação do potencial germinativo de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo). 2011. 86 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

FRANKOVÁ, L.; FRY, S. C. Biochemistry and physiological roles of enzymes that “cut and paste” plant cell-wall polysaccharides. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 12, p. 3519–3550, 2013.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Vicilin-type globulins follow distinct patterns of degradation in different species of germinating legume seeds. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 323–329, 2007.

GALLARDO, K. et al. Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. **Plant Physiology**, v. 129, p. 823–837, 2002.

GAVA, R. et al. Estresse hídrico em diferentes fases da cultura da soja. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 9, n. 6, p. 349–359, 2015.

GHASSEMI-GOLEZANI, K.; LOTFI, R. Influence of water stress and pod position on oil and protein accumulation in soybean grains. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, v. 4, n. 9, p. 2341–2345, 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.

GOEL, A.; SHEORAN, I. S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 3, p. 429-434, 2003.

GOMES, M. P.; SOARES, A. M.; GARCIA, Q. S. Phosphorous and sulfur nutrition modulate antioxidant defenses in Myracrodruon urundeuva plants exposed to arsenic. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 276, p. 97-104, 2014.

GRENNAN, A. K. Metallothioneins, a Diverse Protein Family. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1750–1751, 2011.

GUIMARÃES-DIAS, F. et al. Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. SUPPL.1, p. 222–232, 2012.

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S. K. Gibberellic acid in plant. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, p. e25504, 2014.

HAY, A.; TSIANTIS, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. **Development (Cambridge, England)**, v. 137, n. 19, p. 3153–3165, 2010.

HEATHERLY, L. G. Drought Stress and Irrigation Effects on Germination of Harvested Soybean Seed. **Crop Science**, v. 33, n. 4, p. 777, 1993.

HOWELL, K. A. et al. Mapping Metabolic and Transcript Temporal Switches during

Germination in Rice Highlights Specific Transcription Factors and the Role of RNA Instability in the Germination Process. **Plant Physiology**, v. 149, n. 2, p. 961–980, 2008.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R. et al. Molecular analysis of endo- β -mannanase genes upon seed imbibition suggest a cross-talk between radicle and micropylar endosperm during germination of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 1, p. 80–82, 2011.

INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2015. **International Rules for Seed Testing**. Zürich: ISTA, 2015.

IRSHAD, M. et al. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: Confirmed actors and newcomers. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 94, p. 1–16, 2008.

JEEVAN KUMAR, S. P. et al. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015.

JIANG, W. et al. Isolation of a WRKY30 gene from *Muscadinia rotundifolia* (Michx) and validation of its function under biotic and abiotic stresses. **Protoplasma**, v. 252, n. 5, p. 1361–1374, 2015.

JOOSEN, R. V. L. et al. Germinator: A software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148–159, 2010.

KOCH, J. L. et al. Methanol , pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation Methanol , pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation. **Seed Science Research**, v. 9, n. 04, p. 311–320, 1999.

KOHLI, P.; KALIA, M.; GUPTA, R. Pectin Methylesterases : A Review. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 5, p. 1–7, 2015.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.

KROGAN, N. T. et al. Distinct subclades of Aux/IAA genes are direct targets of ARF5/MP transcriptional regulation. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 474–483, 2014.

LEE, D.-K. et al. Expression of an Expansin Gene Is Correlated with Root Elongation in Soybean. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 985–997, 2003.

LEE, S. et al. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2,a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. **Genes & Development**, v. 16, p. 646–658, 2002.

LEPRINCE, O. et al. Late seed maturation: Drying without dying. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 4, p. 827–841, 2017.

LI, Z. et al. Ectopic Overexpression of SIHsfA3, a Heat Stress Transcription Factor

from Tomato, Confers Increased Thermotolerance and Salt Hypersensitivity in Germination in Transgenic Arabidopsis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

LIGTERINK, W.; JOOSEN, R. V. L.; HILHORST, H. W. M. Unravelling the complex trait of seed quality: Using natural variation through a combination of physiology, genetics and -omics technologies. **Seed Science Research**, v. 22, n. SUPPL. 1, 2012.

LI-JUAN, Q. et al. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 2–18, 2008.

LIMA, J. J. P. et al. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–25, 2017.

LIMA, N. B. Acompanhamento de proteinases serínicas em sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) em desenvolvimento, quiescência e germinação. 2010. 73 p. **Dissertação** (Mestrado em Biociências e Tecnologia) - Centro de Biociências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

LINS, S. R. DE O. et al. Physiological, enzymatic, and microstructural analyses of sunflower seeds during storage. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 7, p. 1038–1048, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUO, M. et al. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 48, p. 17531–17536, 2005.

MA, H.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 3, p. 465–473, 1994.

MACHADO, C. Gene expression during germination and post-germination of dried and non-dried developing seeds of tomato. 2007. 194 p. **Tese** (Doutorado em Botânica) - Universidade de Guelph, Canadá, 2007.

MACOVEI, A. et al. New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1040–1050, 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2.ed. Londrina: ABRATES, 2015b. 659 p.

MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015a.

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, 1999. cap.3, p.3.1-3.24.

MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Tamanho da semente e o teste de envelhecimento acelerado para soja. **Scientia Agricola**, v.57, p.473-482, 2000.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 5, p. 949–965, 2016.

MATTHEWS, S.; KHAJEH-HOSSEINI, M. Length of the lag period of germination and metabolic repair explain vigour differences in seed lots of maize (*Zea mays*). **Seed Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 200–212, 2007.

McDONALD, M.B.; VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Soybean seed imbibition: water absorption by seeds parts. **Crop Science**, Madison, v.28, n.6, p.993-997, 1988.

MERTZ-HENNING, L. et al. Effect of Water Deficit-Induced at Vegetative and Reproductive Stages on Protein and Oil Content in Soybean Grains. **Agronomy**, v. 8, n. 1, p. 3, 2017.

MOREIRA, J.; CARDOSO, R. R.; BRAGA, R.A. Quality test protocol to dynamic laser speckle analysis. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 61, p. 8–13, 2014.

MÜNTZ, K. et al. Stored proteases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 362, p. 1741–1752, 2001.

NAKABAYASHI, K. et al. Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: Epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **Plant Journal**, v. 41, n. 5, p. 697–709, 2005.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D., CARVALHO, N. M. (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.49-85.

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.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 5, p. 388–395, 2002.

NONG, V. H.; BECKER, C.; MÜNTZ, K. cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1261, p. 435–438, 1995.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010.

NURUZZAMAN, M.; SHARONI, A. M.; KIKUCHI, S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 248, 2013.

OGAWA, M.; HANADA, A. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. **The Plant Cell**, v. 15, n. July, p. 1591–1604, 2003.

OH, E. et al. Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–19, 2014.

OLIVEIRA, L. DE O. Uma visão integrada dos eventos proteolíticos de sementes de *Vigna unguiculata* ao longo dos processos germinativos e pós-germinativos com ênfase em proteinases cisteínicas. 2010. 62 p. **Dissertação** (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

PÁDUA, G. P. DE et al. Influência do tamanho da semente na qualidade fisiológica e na produtividade da cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 9–16, 2010.

PÁDUA, G. P. DE et al. Response of soybean genotypes to the expression of green seed under temperature and water stresses. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 140–149, 2009.

PANOFF, B. Estudo da tolerância à dessecação e longevidade em sementes de soja (*Glycine max* (L.) MERR.). 2016. 95 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

PEREIRA, S. G. D. F. Alterações em plantas de soja sob déficit hídrico no estágio reprodutivo. 2010. 58 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, 2017.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

PRIETO-DAPENA, P. et al. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1102–1112, 2006.

RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **Dynamic Laser Speckle and Applications**. New York: CRC Press, 2008, 290 p.

RABELO, G. F.; BRAGA, R. Laser speckle techniques in quality evaluation of orange fruits. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 4, p. 570-575, 2005.

RAINERI, J. et al. A sunflower WRKY transcription factor stimulates the mobilization of seed-stored reserves during germination and post-germination growth. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 9, p. 1875–1890, 2016.

RAJJOU, L. et al. Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis : A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. **Plant Physiology**, v. 148, p. 620–641, 2008.

RAJJOU, L. et al. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 507–533, 2012.

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

RASBAND, W. ImageJ. **U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA**, 1997.

RIBEIRO, K. M. et al. Continuous, high-resolution biospeckle imaging reveals a discrete zone of activity at the root apex that responds to contact with obstacles. **Annals of Botany**, v. 113, n. 3, p. 555–563, 2014.

RIGHETTI, K. et al. Inference of Longevity-Related Genes from a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. **The Plant Cell**, v. 27, n. October, p. tpc.15.00632, 2015.

ROCHA, V. S. et al. Embebição de água e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 6, n. 2, p. 51–66, 1984.

RODRIGUES, S. et al. Aplicação do speckle dinâmico na análise de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 9, n. 2, p. 119–124, 2007.

ROSSETTO, C.A.V.; NOVENBRE, A.D. DA L.C.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. DA.; NAKAGAWA, J. Comportamento das sementes de soja durante a fase inicial do processo de germinação. **Scientia Agricola**, v. 54, n.1-2, p. 106-115, 1997.

ROSSI, R. F. Towards understanding the influence of seed maturation on physiological seed quality in legumes. 2016. 165 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

RUTTKAY-NEDECKY, B. et al. The role of metallothionein in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6044–6066, 2013.

SAHU, B. et al. Insights on germinability and desiccation tolerance in developing neem seeds (*Azadirachta indica*): Role of AOS, antioxidative enzymes and dehydrin-like protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 64–73, 2017.

SAKAMOTO, T. et al. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem.

Genes and Development, v. 15, n. 5, p. 581–590, 2001.

SALINET, L. H. Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. 2009. 75 p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SAMARAH, N. H.; MULLEN, R. E.; ANDERSON, I. Soluble sugar contents, germination, and vigor of soybean seeds in response to drought stress. **Journal of New Seeds**, v. 10, n. 2, p. 63–73, 2009.

SAMARAH, N.; ALQUDAH, A. Effects of late-terminal drought stress on seed germination and vigor of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 57, n. 1, p. 27–32, 2011.

SANO, N. et al. Staying Alive : Molecular Aspects of Seed Longevity. **Plant Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, 2016.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa, 2018. 590 p.

SCHLERETH, A. et al. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1423–1433, 2000.

SCHWECHHEIMER, C.; BEVAN, M. The regulation of transcription factor activity in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 10, p. 378–383, 1998.

SHANI, Z. et al. Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4- β -glucanase (cel1) from *Arabidopsis thaliana*. **Plant molecular biology**, v. 34, p. 837–842, 1997.

SHANI, Z. et al. Expression of endo-1,4- β -glucanase (cel1) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 10, p. 1067–1074, 2006.

SHAO, J. et al. The Over-Expression of an Arabidopsis B3 Transcription Factor, ABS2/NGAL1, Leads to the Loss of Flower Petals. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

SHEFFIELD, J.; WOOD, E. F.; RODERICK, M. L. Little change in global drought over the past 60 years. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 435–438, 2012.

SHIGEYAMA, T. et al. α -Xylosidase plays essential roles in xyloglucan remodelling, maintenance of cell wall integrity, and seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 19, p. 5615–5629, 2016.

SHU, Y. et al. GmSBH1, a homeobox transcription factor gene, relates to growth and development and involves in response to high temperature and humidity stress in soybean. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 11, p. 1927–1937, 2015.

SILVA, E. A. A. et al. ABA Inhibits Embryo Cell Expansion and Early Cell Division

Events During Coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') Seed Germination. **Annals of Botany**, v. 102, p. 425–433, 2008.

SILVA, V. N. et al. Condução do teste de condutividade elétrica utilizando partes de sementes de feijão. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 206-213, 2014.

SLIWINSKA, E.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3587–3594, 2009.

SONG, C.; CHUNG, W. S.; LIM, C. O. Overexpression of Heat Shock Factor Gene HsfA3 Increases Galactinol Levels and Oxidative Stress Tolerance in *Arabidopsis*. **Molecules and cells**, v. 39, n. 6, p. 477–483, 2016.

SONG, X.-M. et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 573, 2013.

SOUZA, N. M.; TOPHAM, A. T.; BASSEL, G. W. Quantitative analysis of the 3D cell shape changes driving soybean germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 7, p. 1531–1537, 2017.

STAMM, P. et al. Insights into the molecular mechanism of RGL2-mediated inhibition of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 1–16, 2012.

STERNBERG, T. Regional drought has a global impact. **Nature**, v. 472, p. 169, 13 abr. 2011.

SWAMINATHAN, K.; PETERSON, K.; JACK, T. The plant B3 superfamily. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 647–655, 2008.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017. 888 p.

TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 140–153, 2012.

TEIXEIRA, R. N. et al. Gene expression profiling of the green seed problem in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2016.

TEIXEIRA, R. Retenção de clorofila em sementes de soja (*Glycine max* (L.) MERR): Estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. 2014. 86 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

TIMÓTEO, T. S.; MARCOS-FILHO, J. Seed performance of different corn genotypes during storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 207–215, 2013.

TSUDA, K.; HAKE, S. Diverse functions of KNOX transcription factors in the diploid body plan of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 27, p. 91–96, 2015.

- VAN GENUCHTEN, M. T. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 44, n. 1, p. 892-898, 1980.
- VÁZQUEZ-RAMOS, J. M.; SÁNCHEZ, M. D. L. P. The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research**, v. 13, n. 2, p. 113–130, 2003.
- VELOSO, J. S. Avaliação molecular de sementes de café submetidas à criopreservação. 2017. 55 p. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 196–206, 2012.
- VERDIER, J. et al. A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 757–774, 2013.
- VIEIRA, A. R. D.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Effect of Drought Stress on Soybean Seed Germination and Vigor. **Journal of Seed Technology**, v. 15, n. 1, p. 12–21, 1991.
- VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI FC; VIEIRA RD; FRANÇA NETO JB (eds). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.4. p.1-26.
- VILLELA, F. A.; NOVENBRE, A. D. DA L. C.; MARCOS FILHO, J. Estado energético da água na germinação de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 27–34, 2007.
- VIVAS, P. G. et al. Biospeckle activity in coffee seeds is associated non-destructively with seedling quality. **Annals of Applied Biology**, p. 1–9, 2016.
- WANG, F. et al. GmWRKY27 interacts with GmMYB174 to reduce expression of GmNAC29 for stress tolerance in soybean plants. **Plant Journal**, v. 83, n. 2, p. 224–236, 2015.
- WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2109–2127, 2012.
- WATERWORTH, W. M. et al. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. **Plant Journal**, v. 63, n. 5, p. 848–860, 2010.
- WATERWORTH, W. M. et al. DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. **BMC plant biology**, v. 9, n. 1, p. 79, 2009.
- WATERWORTH, W. M. et al. Repairing breaks in the plant genome: The importance of keeping it together. **New Phytologist**, v. 192, n. 4, p. 805–822, 2011.
- WATERWORTH, W. M.; BRAY, C. M.; WEST, C. E. The importance of safeguarding

genome integrity in germination and seed longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 12, p. 3549–3558, 2015.

WEITBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: Early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289–3309, 2011.

WOJTYLA, Ł. et al. Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. February, p. 1–16, 2016.

WU, Y. et al. Change in XET activities, cell wall extensibility and hypocotyl elongation of soybean seedlings at low water potential. **Planta**, v. 220, n. 4, p. 593–601, 2005.

XIE, Z. et al. Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant Journal**, v. 46, n. 2, p. 231–242, 2006.

XU, J. et al. Identification and characterization of an expansin gene AsEXP1 associated with heat tolerance in C3 Agrostis grass species. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 13, p. 3789–3796, 2007.

XU, W. et al. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. **The Plant Cell**, v. 7, n. 10, p. 1555–1567, 1995.

YAKLICH, R. W. Moisture stress and soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, v. 9, n. 1, p. 60–67, 1984.

YAN, A. et al. AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in Arabidopsis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2014.

YANG, Z. et al. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 1–2, p. 219–229, 2009.

YOSHIYAMA, K. O. SOG1: a master regulator of the DNA damage response in plants. **Genes & Genetic Systems**, v. 90, p. 209–216, 2011.

ZDUNEK, A. et al. The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: A review. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 52, n. 1, p. 276–285, 2013.

ZHANG, Y. et al. Transcription Factors SOD7/NGAL2 and DPA4/NGAL3 Act Redundantly to Regulate Seed Size by Directly Repressing *KLU* Expression in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 27, n. 3, p. 620–632, 2015.

ZHANG, Z. L. et al. A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 1–2, p. 139–151, 2009.

ZHANG, Z.-L. A Rice WRKY Gene Encodes a Transcriptional Repressor of the Gibberellin Signaling Pathway in Aleurone Cells. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1500–1513, 2004.

ZHOU, Q. Y. et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 5, p. 486–503, 2008.

ZHOU, Y. et al. Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in Arabidopsis. **Planta**, v. 235, n. 3, p. 523–537, 2012.

ZHU, W. et al. Arabidopsis thaliana metallothionein, AtMT2a, Mediates ROS balance during oxidative stress. **Journal of Plant Biology**, v. 52, n. 6, p. 585–592, 2009.

ZHU, Y. et al. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: Segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–19, 2014.

ZOU, X.; NEUMAN, D.; SHEN, Q. J. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 176–186, 2008.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO HIDROCONDICIONAMENTO NO DESEMPENHO FISIOLÓGICO E NA EXPRESSÃO GÊNICA EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO

O condicionamento fisiológico é uma técnica que permite aprimorar a qualidade fisiológica das sementes, por meio da ativação do metabolismo pré-germinativo (fases I e II), sem que ocorra a protrusão radicular, promovendo melhorias na uniformidade, velocidade de germinação e tolerância a condições adversas. Diante disso, o objetivo foi definir o melhor método de hidrocondicionamento e avaliar os efeitos no desempenho fisiológico e na expressão gênica de sementes de soja. Para definição do melhor método, sementes da cultivar BMX Potência foram submetidas ao hidrocondicionamento por imersão direta em solução ao hidrocondicionamento entre papel, sendo avaliadas quanto a porcentagem (GMAX) e velocidade de germinação (T50). A partir da definição do hidrocondicionamento entre papel como a melhor metodologia avaliada, sementes da cultivar BRS 133 e MG/BR 46 Conquista produzidas sob condições ideais (CT) foram utilizadas para determinar a melhor combinação temperatura e período de condicionamento. Com base nos resultados fisiológicos, o método 15 horas à 22 °C foi definido para análise da expressão gênica e estudo do vigor nas sementes produzidas sob déficit hídrico e sob condições ideais. Sementes condicionadas apresentaram maior porcentagem e velocidade de germinação, e início mais rápido da protrusão, especialmente em temperaturas subótimas. A análise de expressão de genes demonstrou que as sementes condicionadas, de ambas as cultivares e condições de produção, apresentaram maior expressão de transcritos envolvidos na respiração celular e mobilização de reservas, no alongamento e no remodelamento, modificação e síntese de parede celular, refletindo o efeito benéfico do hidrocondicionamento sobre o desempenho fisiológico das sementes.

Palavras-chave: *Priming*. Imersão direta. Condicionamento fisiológico. Velocidade de germinação. Vigor.

ABSTRACT

Seed priming is a technique used to improve seed quality through the activation of the pre-germinative metabolic events (phases I and II) while preventing radicle protrusion, improving uniformity, speed of germination and tolerance to adverse conditions. Therefore, the objective was to define the best hydropriming method and evaluate the effects on the physiological performance and gene expression of soybean seeds of different levels of vigor. To define the best protocol, seeds from the cultivar BMX Potencia were subjected to hydropriming by direct imbibition in water and hydropriming between papers. The effects of seed priming were evaluated by maximum percentage of germination (GMAX) and the germination rate (T50). Based on these results, the hydropriming between papers was defined as the best protocol and, seeds of cultivar BRS 133 and MG/BR 46 Conquista produced under ideal conditions (CT) were used to determine the best combination of temperature and period of priming. The primed seeds during 15 hours at 22 °C showed the best results and were used to study vigor and gene expression in seeds produced under drought stress (EST). The hydropriming provided higher percentage of germination, rate of germination (T50) and faster radicle protrusion, especially at suboptimal temperatures. The priming for both cultivars and production conditions showed higher gene expression of transcripts involved in various germination-related process as respiration, reserve mobilization, cell elongation, cell wall loosening and biosynthesis of cell wall, which may indicate the beneficial effects of priming on physiological performance in primed seeds during germination.

Keywords: Priming. Soaking on water. Physiological conditioning. Germination rate. Vigor.

2.1 INTRODUÇÃO

O vigor de sementes é uma característica fisiológica complexa, necessária para emergência rápida e uniforme à campo (VENTURA et al., 2012) e está associado à vários aspectos do desempenho de sementes, como na velocidade e

uniformidade de germinação, crescimento de plântulas e resistência a estresse durante a emergência e armazenamento (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). O uso de sementes de alto vigor é essencial para o estabelecimento do estande, aumento do rendimento das culturas e redução de custos de produção, especialmente sob condições edafoclimáticas desfavoráveis (WU et al., 2017), cada vez mais impactantes para a agricultura (HIRURAKI; LAZZAROTTO, 2011). Apesar de sua importância, o vigor ainda não é priorizado em programas de melhoramento genético, que visam tratos relacionados à produtividade e resistência a doenças, principalmente.

Diferenças de vigor entre as sementes podem ser explicadas como uma consequência do envelhecimento, motivo pelo qual testes como o envelhecimento acelerado e deterioração controlada são úteis para discriminar a resposta das sementes (PRIETO-DAPENA et al., 2006; WANG et al., 2012). Por outro lado, lotes de sementes de baixo vigor podem ser aprimoradas por meio da técnica de condicionamento fisiológico (*priming*), restabelecendo a germinação e a emergência a campo sob condições ambientais adversas (BRADFORD, 1986; HEYDECKER; GIBBINS, 1978).

O condicionamento fisiológico consiste em submeter as sementes a hidratação controlada, o que permite ativação do metabolismo pré-germinativo (fases I e II), sem que ocorra o alongamento celular e protrusão radicular (fase III) (HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975). A hidratação controlada, seguida ou não de secagem das sementes, é interrompida antes que ocorra a protrusão radicular, a partir da qual a semente não tolera mais a dessecação (BRADFORD, 1986). Durante as fases iniciais da germinação, a absorção de água e hidratação dos tecidos reativam o metabolismo, predominando as atividades de reparo a DNA e membranas, reduzindo a liberação de exsudados. Também favorece a atividade do sistema antioxidante, a síntese de enzimas hidrolíticas e mobilização de substâncias de reserva, além de processos envolvidos no ciclo celular (CORBINEAU; CÔME, 2006).

Há diversos métodos de hidratação que podem ser empregados para elevar o teor de água das sementes até níveis compatíveis com a fase II da embebição. Dentre as técnicas destacam-se o hidrocondicionamento, com utilização exclusiva de água para hidratação; o osmocondicionamento, que utiliza soluções de polietileno glicol, sais ou manitol; e o matricondicionamento, com emprego de matriz úmida,

como argilas, areia e vermiculita (PAPARELLA et al., 2015). Dentre estes, o hidrocondicionamento destaca-se por utilizar apenas água, evitando possíveis interferências de produtos químicos ou do substrato no desempenho das sementes, podendo ser realizado pela imersão direta em água ou embebição entre papel (TILDEN; WEST, 1985).

Em sementes de soja, o hidrocondicionamento, seguido ou não de secagem das sementes, tem sido destacado como benéfico, com melhorias na germinação e principalmente no vigor, como no aumento da velocidade de germinação, comprimento de plântulas e resistência a deterioração durante o armazenamento (COSTA et al., 2017; COSTA; BONASSA; NOVEMBRE, 2013; GIURIZATTO et al., 2008; SADEGHI et al., 2011).

Após o condicionamento fisiológico, as sementes estão em um estado metabólico mais avançado, o que leva a uma redução da fase *lag* (fase II), de modo que ao serem reidratadas, completam mais rapidamente o programa de germinação, que ocorre de forma mais rápida e uniforme (PAPARELLA et al., 2015). Além dos mecanismos de reparo ativados durante o condicionamento (HUANG et al., 2008), permitindo a reorganização de membranas e redução da liberação de exsudados (GIURIZATTO et al., 2008), vários outros processos têm sido relacionados ao efeito benéfico do *priming*. Destacam-se eventos relacionados ao ciclo celular (DE CASTRO et al., 2000), a atuação do sistema de proteção antioxidante, representado pelas enzimas catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase (BAILLY et al., 2000; SUN et al., 2011) e enzimas envolvidas na mobilização de reservas (JOB et al., 1997).

Também tem sido relatadas mudanças na biossíntese e sinalização de hormônios, principalmente ácido abscísico, giberelina e etileno (EL-ARABY et al., 2006; LUTTS et al., 2016). Nakaune et al. (2012) demonstraram que o *priming* aumentou a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de giberelina, juntamente com genes codificadores de enzimas envolvidas na modificação de parede celular, incluindo expansina, β -1,3-glucanase, endo- β -mananase e xiloglucano endotransglicosilase/hidrolases. Em sementes de soja, especialmente, ainda há uma lacuna quanto a técnica ideal para condicionamento, bem como seus efeitos na expressão de genes.

Como destacado, o condicionamento de sementes provoca respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares complexas, estando intimamente ligado ao

vigor, um dos componentes da qualidade fisiológica mais beneficiado pelo condicionamento. Desse modo, o entendimento dos mecanismos pré-germinativos e seus eventos moleculares, ativados durante o condicionamento, constituem um objetivo relevante para a pesquisa aplicada à biologia de sementes, com futuras aplicações para agricultura (VENTURA et al., 2012). Assim, relacionar as respostas fisiológicas de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico e as alterações na expressão de genes, que supostamente regulam a resposta ao *priming*, pode contribuir para a compreensão do vigor de sementes.

Desse modo, objetivou-se avaliar métodos de condicionamento fisiológico de sementes de soja de diferentes cultivares e níveis de vigor, analisando seus efeitos sobre a germinação e velocidade de germinação sob condições adversas e sobre a expressão de genes relacionados ao vigor.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na *School of Biosciences* da Universidade de Birmingham, Inglaterra, durante o período de setembro a dezembro de 2017. Para isso, foram utilizadas as sementes de soja das cultivares BRS 133 e MG/BR 46 Conquista, produzidas em condições ideais e sob déficit hídrico após estádio R5.5, conforme descrição do Capítulo 1 (133 CT, 133 EST, Conq CT e Conq EST). Para os testes preliminares foram utilizadas sementes da cultivar BMX Potência RR, cedidas pela Universidade de Birmingham.

Os protocolos de condicionamento fisiológico corresponderam ao hidrocondicionamento por imersão direta em água e hidrocondicionamento entre papel.

2.2.1 Hidrocondicionamento por imersão direta

O primeiro protocolo testado foi o de imersão em solução aerada, realizado somente com as sementes da cultivar BMX Potência. Para isso, 3 repetições de 30 sementes foram dispostas em sacos de nylon e colocadas em frascos de vidro contendo 900 mL de água destilada. Os frascos de vidro foram vedados com rolha de borracha, supridos com aeração constante por meio de uma bomba de ar (bomba

de aquário) e mantidos em câmaras de crescimento à 10, 16 e 22 °C, nos períodos de 6, 18, 30 e 42 horas. Após cada período de condicionamento fisiológico, as sementes foram colocadas em placas de Petri sobre três folhas de papel filtro e submetidas a secagem em câmara de fluxo laminar durante 18 horas, à temperatura ambiente (20 a 25 °C). Em seguida, as sementes foram cobertas com três folhas de papel filtro, umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e colocadas para germinar em câmara de crescimento a 22 °C. A cada 8 e 16 horas, durante 7 dias, foi computado o número de sementes que apresentaram protrusão radicular ≥ 1 mm de comprimento. Nesse trabalho, a germinação foi considerada como a protrusão da raiz primária. Os efeitos do condicionamento fisiológico foram avaliados pela porcentagem de germinação máxima (GMAX) e velocidade de germinação, avaliado como o tempo requerido para germinação de 50% das sementes viáveis (T50). Esses resultados foram obtidos usando o módulo de ajuste de curva do software *Germinator* (JOOSSEN et al., 2010). Sementes não submetidas a imersão direta em água constituíram o tratamento controle.

2.2.2 Hidrocondicionamento entre papel

Inicialmente, as sementes da cultivar BMX Potência foram submetidas a um pré-teste de hidrocondicionamento entre papel umedecido, por 6, 18 e 24 horas à 22 °C. As sementes foram colocadas para embeber entre duas camadas de filtro de papel, em placa de Petri, com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em câmara de crescimento à 22 °C. A contagem de protrusão radicular e os dados foram calculados conforme descrição do item anterior. A partir da comparação dos resultados do condicionamento por imersão direta em água e entre papel de sementes da cultivar BMX Potência, o hidrocondicionamento entre papel foi definido como mais adequado, por meio da análise dos efeitos fisiológicos, e utilizado na etapa subsequente.

Para determinar a melhor combinação temperatura e período de hidrocondicionamento entre papel foram utilizadas apenas as sementes 133 CT e Conq CT.

Assim, para o hidrocondicionamento, 3 repetições de 30 sementes dos lotes 133 CT e Conq CT foram colocadas para embeber entre duas camadas de filtro de

papel, em placa de Petri, com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, e submetidas às temperaturas de 10, 16 e 22 °C. Para o condicionamento realizado à 22 °C foi testado o tempo de 15 horas, para 16 °C o período de 18 horas e para 10 °C, os períodos de 24, 30 e 48 horas.

Após cada período, as sementes foram submetidas à secagem em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente (20 a 25 °C) por aproximadamente 18 horas. Imediatamente após a secagem, as sementes foram submetidas à germinação, como descrito anteriormente, em câmara de crescimento à 10, 16 e 22 °C. A cada 8 e 16 horas, contabilizou-se o número de sementes que apresentaram protrusão radicular (>1mm de comprimento), adotado como germinação. Os efeitos do condicionamento fisiológico foram avaliados pela porcentagem de germinação máxima (GMAX) e velocidade de germinação, avaliado como o tempo requerido para germinação de 50% das sementes viáveis (T50), calculados utilizando o módulo de ajuste de curva do software *Germinator* (JOONSEN et al., 2010). Sementes não submetidas ao hidrocondicionamento constituíram o tratamento controle.

A partir da avaliação do efeito do condicionamento fisiológico sobre o desempenho das sementes sob diferentes temperaturas, foi definido o melhor método para análise da expressão gênica e estudo do vigor.

2.2.3 Isolamento dos eixos embrionários de soja

As sementes de soja dos lotes 133 CT, 133 EST, Conquista CT e Conquista EST foram submetidas ao hidrocondicionamento por 15 horas à 22 °C, seguido de secagem por período de 18 horas (como descrito no item 2.2.2) e novamente embebidas por 2 horas para o isolamento dos eixos embrionários e extração de RNA. O controle consistiu de sementes embebidas por 2 horas, seguido do isolamento dos eixos embrionários. Os eixos embrionários foram isolados em 3 repetições biológicas de 50 eixos e acondicionados em tubos plásticos de 1,5 mL, congelados sob nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à -80 °C, até a extração de RNA.

2.2.4 Extração de RNA total

Para a extração do RNA foi utilizado o kit – RNeasy® Plant Mini da QIAGEN. Seguindo as instruções do fabricante, foram transferidos aproximadamente 100 mg do material macerado em nitrogênio líquido para um microtubo de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 450 µL de Buffer RLT, seguido de agitação em vórtex para homogeneizar as amostras. Logo após o lisado foi transferido para as colunas de QIAshredder e coletadas em tubos coletores de 2 mL, centrifugadas por 2 minutos à rotação máxima. O supernadante foi transferido para novo tubo coletor, sem os peletes. Em seguida, adicionou-se 0,5 volume de etanol (96-100%) e as amostras (sem precipitados) foram transferidas para colunas RNeasy Mini em tubos coletores de 2 mL e centrifugadas por 15 segundos a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna de filtragem foi acondicionada a outros tubos coletores. Para cada amostra, adicionou-se 700 µL de Buffer RW1, seguido de centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm e descarte do filtrado. Adicionou-se 500 µL de Buffer RPE a coluna, seguido de centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm e descarte do filtrado. Novamente, adicionou-se 500 µL de Buffer RPE a coluna, seguido de centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm. As colunas foram acondicionadas em novos tubos coletores de 1,5 mL e foi feita a eluição do RNA adicionando-se 35 µL de água RNase-free H₂O, seguido de centrifugação por um minuto a 10.000 rpm. Para maiores concentrações de RNA, o RNA eluído foi utilizado, repetindo o último passo. Os RNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng.µL⁻¹. A integridade das amostras de RNA foi avaliada em gel de agarose 1,0% em cuba de eletroforese a 90 volts em 30 minutos.

2.2.5 Tratamento com DNase

Para garantir a pureza do RNA, as amostras foram submetidas a tratamento com o kit DNase I da Invitrogen®. Para isso foram colocados em tubos eppendorf de 0,5 mL: 1 µg da amostra de RNA, 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 1 µL DNase I, Amp Grade e Nuclease-free H₂O até completar o volume de 10 µL. Os tubos foram

incubados em temperatura ambiente por 15 minutos, seguindo-se da adição de 1 μL de 25 mM EDTA. Os tubos foram colocados em termociclador por 10 minutos à 65 °C. Após decorrido esse período, foram armazenados em gelo até a síntese de cDNA.

2.2.6 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). A síntese do cDNA foi elaborada para uma reação de 10 μL , utilizando para 1000 ng, conforme descrito no protocolo, onde o volume exato de RNA foi dependente da quantificação fornecida no espectrofotômetro. Para cada tubo eppendorf de 0,5 mL foram transferidos 1 μL de Oligo (dT)15 Primer e 4 μL da amostra de RNA (tratada com DNase). Em seguida, os tubos foram aquecidos a 70 °C por 5 minutos e colocados imediatamente no gelo por pelo menos 5 minutos. Após esse período, foram centrifugados e mantidos no gelo. O mix de cDNA (15 μL) consistiu de 4 μL de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 1,5 μL de MgCl_2 (25mM), 1 μL de PCR Nucleotide Mix, 0,5 μL Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 1 μL GoScript™ Reverse Transcriptase e 7 μL Nuclease-free H₂O. Por fim, o mix do cDNA (15 μL) foi homogeneizado com a solução de RNA tratada (5 μL) e levado para o termociclador. As reações foram incubadas em Termociclador “3Prime Thermal Cycler” (Techne) sendo submetidas a temperaturas e tempos específicos necessários para a ativação inicial da enzima (25 °C por 5 minutos), síntese de cDNA (42 °C por 1 hora), inativação da enzima (70 °C por 15 minutos) e finalizando a ciclagem sob 4°C constante. A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

2.2.7 Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Os genes candidatos e os respectivos primers utilizados nesta etapa foram selecionados e desenhados conforme consta no Capítulo 1. Foram testados 2 (dois) genes de referência (Importin beta-2 subunit family protein e 20S proteasome subunit beta 1) e utilizados 26 genes candidatos para o estudo de expressão gênica.

Para a quantificação da expressão gênica relativa dos genes candidatos e dos genes de referência, foi utilizado o kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® QPCR Master Mix (Agilent), totalizando uma solução de 10,0 µL. Para controle negativo, o cDNA foi substituído por RNase *free water*. Com a utilização do termociclador AriaMAX Real-Time PCR System (Agilent), foi realizada a amplificação dos fragmentos alvos: etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 5 segundos e pareamento a 60 °C por 10 segundos. No final do processo foi realizada a curva de melting seguindo os passos: 30 segundos a 95°C, 65°C e 95°C respectivamente. Os dados obtidos foram analisados no software AriaMix versão 1.3 da Agilent. Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas para cada amostra.

Os valores de Ct obtidos no software AriaMix foram exportados para planilha do Excel para cálculo do $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2008), que se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência; $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência.

Os dados de expressão relativa de genes obtidos foram analisados utilizando o programa REST®, que realiza a quantificação comparativa pelo método de “*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*” (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Para o cálculo da quantificação relativa da expressão das sementes hidrocondicionadas, o grupo controle foi representado pelas sementes não condicionadas, para cada cultivar.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

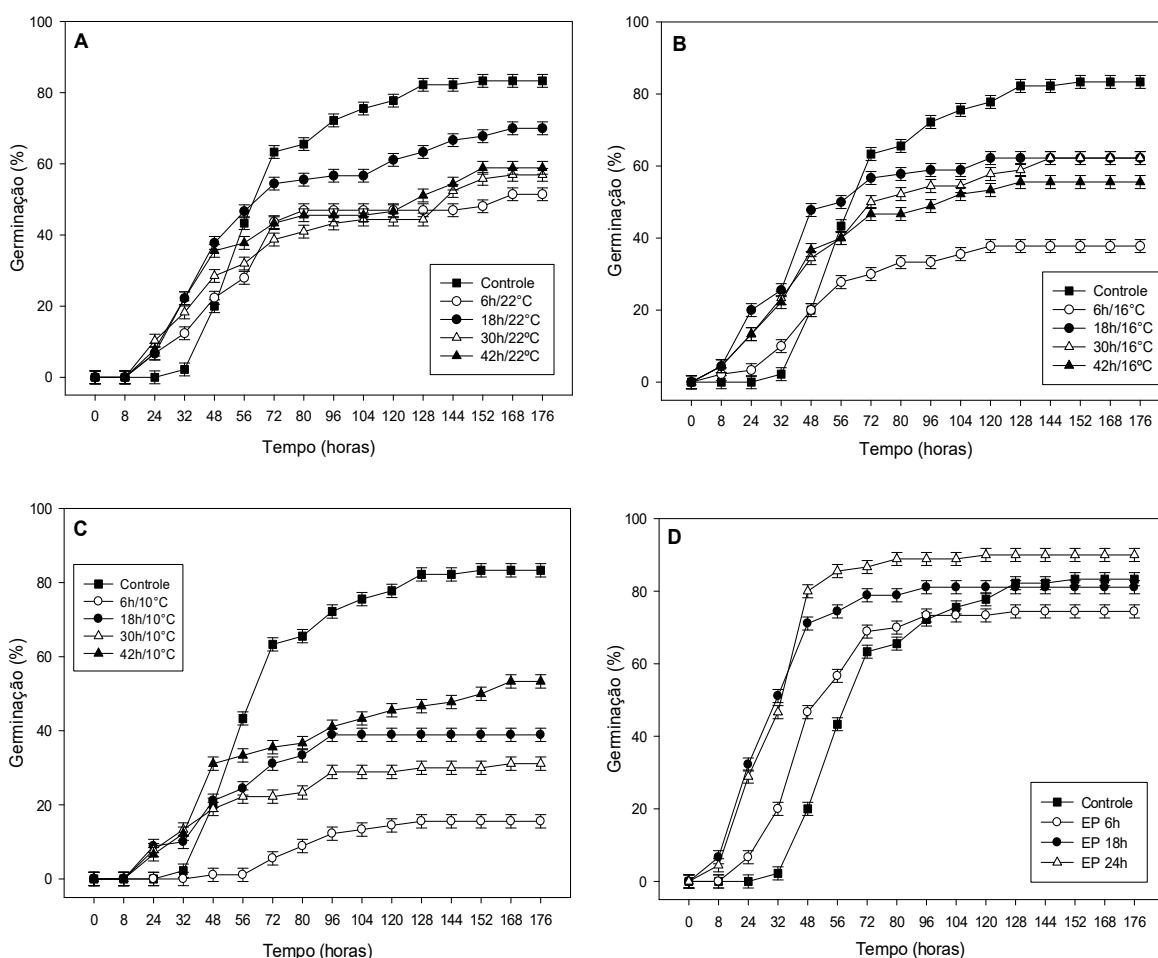
2.3.1 Comparação de métodos para o condicionamento fisiológico

O condicionamento fisiológico favoreceu o início da protrusão radicular das sementes de soja da cultivar BMX Potência, independente da temperatura de condicionamento e do método de condicionamento (Figura 1). Pode-se observar que

as sementes condicionadas por imersão direta, à 22 °C, começaram a germinar após 24 horas, enquanto as não condicionadas somente após 32 horas (Figura 1A). Quando condicionadas à 16 °C, o início da protrusão deu-se a partir de 8 horas, antecipando em 24 horas o início da germinação em relação ao controle (Figura 1B). E quando realizado à 10 °C, o condicionamento reduziu o início da protrusão em 16 horas para o tratamento 6h/10°C, e em 18 horas para as demais combinações (Figura 1C).

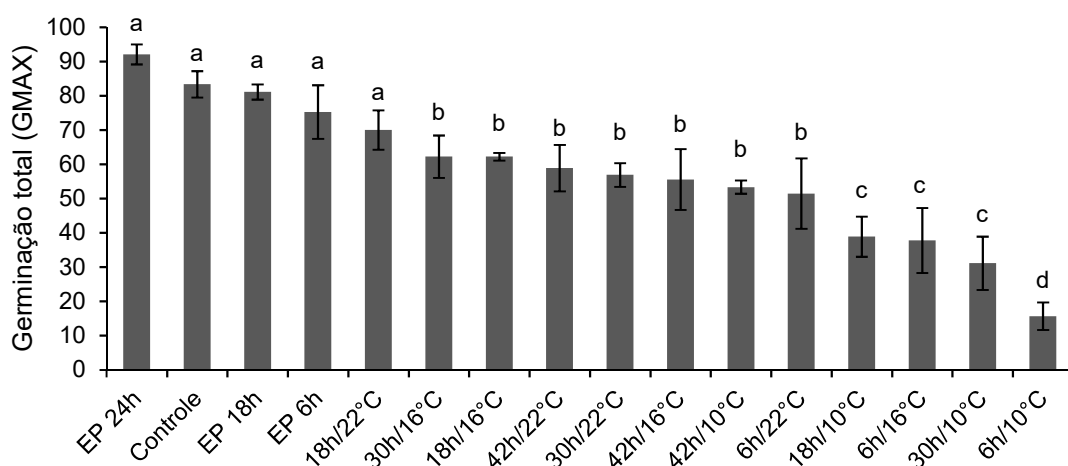
A mesma tendência de redução do tempo necessário para o início da protrusão também foi observada para as sementes hidrocondicionadas entre papel (EP). No condicionamento por 18 e 24 horas, as sementes condicionadas iniciaram a germinação entre 0 e 8 horas, enquanto as não condicionadas após 32 horas (Figura 1D).

Figura 1 – Curva de germinação, realizada à 22 °C, de sementes de soja da cultivar BMX Potência não condicionadas (controle) e após condicionamento fisiológico por imersão direta em água por 6, 18, 30 e 48 horas, à temperatura de 22, 16 e 10 °C (A, B e C, respectivamente) e hidrocondicionamento entre papel (EP) à 22 °C (D).



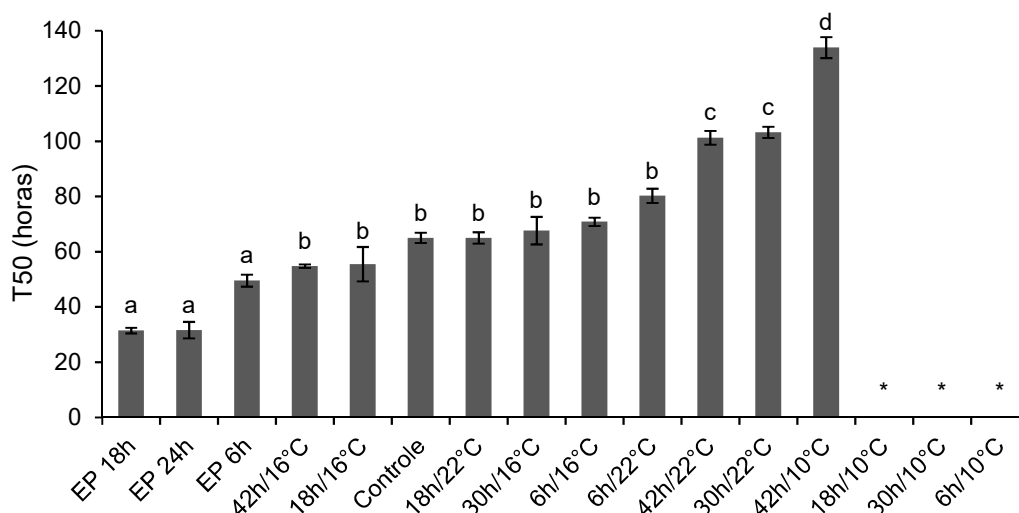
Apesar de favorecer o início da protrusão radicular, o hidrocondicionamento por imersão direta reduziu a germinação total das sementes (GMAX) a valores entre 15 e 70%, em comparação aos 83,3 % do controle (Figura 2). Em contrapartida, o hidrocondicionamento entre papel favoreceu a germinação final em todos os tempos avaliados, com destaque para o condicionamento EP 24 h, proporcionando incremento de cerca de 10% na porcentagem final de germinação (Figura 2).

Figura 2 – Germinação total (GMAX) realizada à 22°C, de sementes de soja da cultivar BMX Potência após hidrocondicionamento entre papel (EP; à 22°C) e por imersão direta em água (por 6, 18, 30 e 42 horas, à 22, 16 ou 10°C). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).



Além da redução da porcentagem final de germinação, o método por imersão direta não aumentou a velocidade de germinação (T50) (Figura 3). Já o hidrocondicionamento entre papel proporcionou aumento de até 50% na velocidade de germinação em relação ao controle, além de alta porcentagem de GMAX. Somado a isso, a redução observada na germinação total para valores inferiores a 70%, faz com que o método por imersão direta não seja adequado para os estudos posteriores.

Figura 3 - Velocidade de germinação (T50), à 22 °C, de sementes de soja da cultivar BMX Potência após hidrocondicionamento entre papel (EP; à 22 °C) e por imersão direta em água (por 6, 18, 30 e 42 horas, à 22, 16 ou 10 °C). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Asterisco (*) indica germinação inferior à 50%.



De modo geral, podem-se observar os benefícios do hidrocondicionamento entre papel em comparação com o hidrocondicionamento por imersão direta, no aumento ou manutenção dos valores de GMAX, e na maior velocidade de germinação (T50), o que justifica a escolha do método EP para os estudos seguintes.

A técnica de hidrocondicionamento (entre papel) tem sido destacada como benéfica para a soja, com melhorias na germinação e vigor, como no aumento da velocidade de germinação, comprimento de plântulas e resistência a deterioração durante o armazenamento (SADEGHI et al., 2011; COSTA; BONASSA; NOVOBRE, 2013; COSTA et al., 2017).

A embebição de sementes constitui a fase I da germinação, na qual a semente passa de um estado quiescente para um estado metabolicamente ativo, caracterizado principalmente pela reorganização do sistema de membranas, mecanismos de reparo e início da respiração (BEWLEY et al., 2013). A absorção de água se dá por diferença de potencial hídrico entre os tecidos da semente e do substrato que contém água, com velocidade de hidratação variável de acordo com a disponibilidade hídrica, temperatura, composição química e potencial fisiológico das sementes (VILLELA; NOVOBRE; MARCOS FILHO, 2007).

A medida que a água penetra na semente, a membrana passa de um estado seco (estado gel) para um estado cristalino líquido, com a reorganização das proteínas e fosfolípidios de membrana, recuperando a permeabilidade seletiva e

permitindo a retenção de solutos no interior da célula (MARCOS FILHO, 2015). A rápida embebição pode afetar a transição das membranas, aumentando a lixiviação de solutos e macromoléculas (KRANNER et al., 2010), podendo prejudicar o processo de germinação, levando a reduções na porcentagem final de germinação e no vigor das sementes (MARCOS FILHO, 2015).

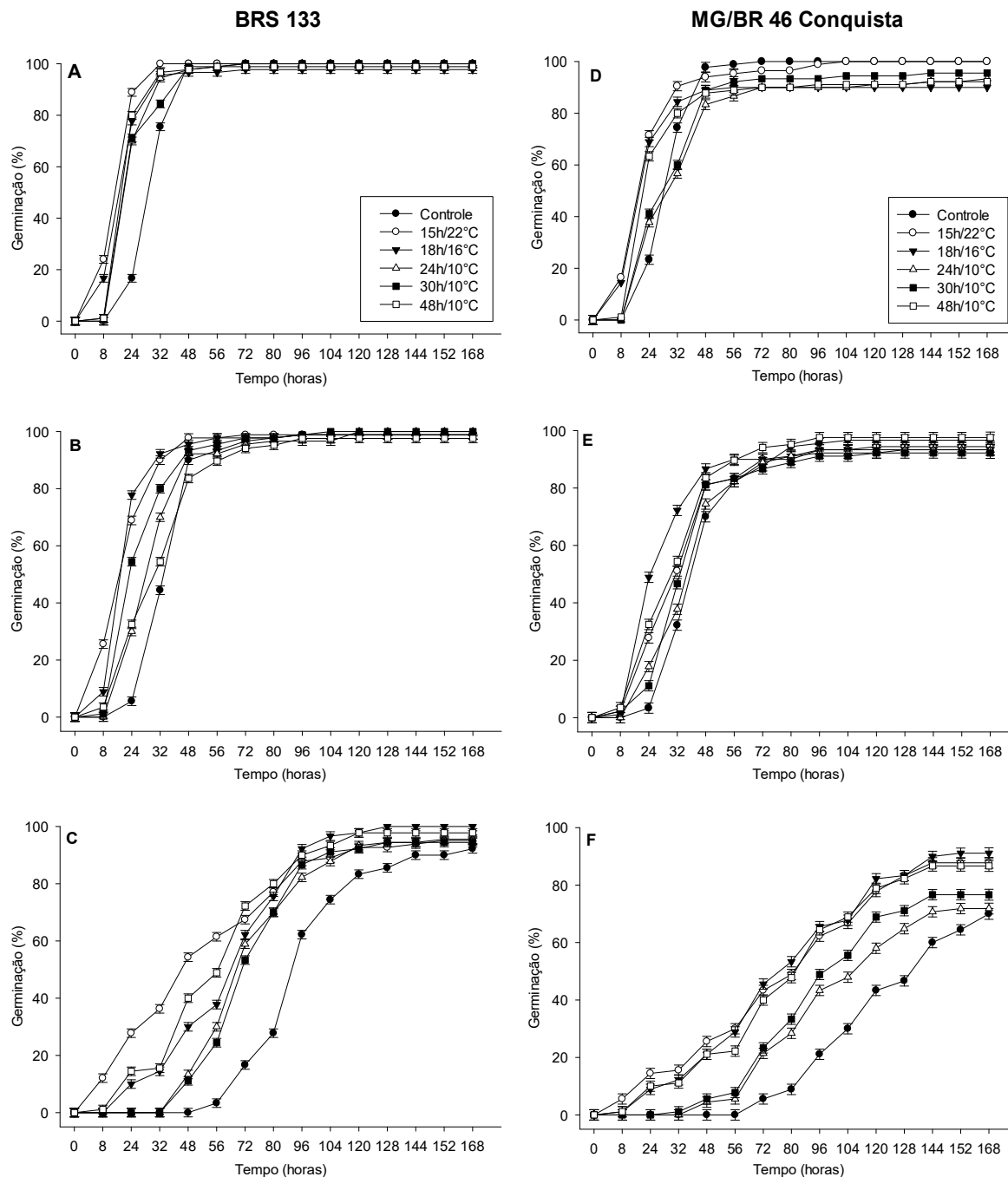
Em condições de ampla disponibilidade hídrica, como na imersão direta das sementes em água (potencial hídrico próximo ou igual a zero), as sementes podem absorver água muito rapidamente, reduzindo o tempo para atuação dos mecanismos de reparo e restabelecimento da integridade de membrana, levando a danos por embebição, o que pode explicar as reduções nos resultados de GMAX e menor velocidade (T50) observados para as sementes condicionadas por imersão direta em água em relação ao hidrocondicionamento entre papel (Figura 2 e 3). Resultados semelhantes foram observados por Braccini et al. (1999), com reduções drásticas na germinação e no vigor em sementes de soja submetidas à embebição direta em água em relação à solução com polietilenoglicol (PEG), que controla a velocidade de hidratação e favorece a germinação.

As injúrias causadas por hidratação rápida podem ser agravadas à baixas temperaturas, podendo resultar em aumento na exsudação e, possivelmente, ruptura da estrutura das membranas (MARCOS FILHO, 2015). Os danos por embebição rápida sob temperaturas subótimas podem ser observados nos resultados de GMAX e T50 de sementes submetidas à imersão direta em água à temperatura 10 °C.

2.3.2 Efeito do hidrocondicionamento entre papel sobre a qualidade fisiológica das sementes

Dentre os protocolos avaliados, o hidrocondicionamento entre papel proporcionou melhoria do vigor (T50) e da porcentagem de germinação total. Assim, para definir a melhor combinação, as sementes da 133 CT e Conquista CT foram submetidas à diferentes tempos de embebição e temperaturas de condicionamento, com germinação conduzida em condições ótimas (22 °C) e subótimas (16 e 10 °C) (Figura 4).

Figura 4 – Curva de germinação de sementes de soja das cultivares BRS 133 e Conquista não condicionadas (controle) e após condicionamento fisiológico entre papel por 15 horas à 22 °C (15h/22°C), 18 horas à 16 °C (18h/16°C) e 24, 30 e 48 horas à 10°C (24h/10°C; 30h/10°C; 48h/10°C). Germinação da cultivar BRS 133 realizada à 22 °C (A), à 16 °C (B) e à 10 °C (C); Germinação da cultivar MG/BR 46 Conquista realizada à 22 °C (D), à 16 °C (E) e à 10 °C (F).



As curvas de germinação permitem visualizar os benefícios do *priming*, sobretudo sob temperaturas subótimas de germinação. A temperatura, junto com a água e disponibilidade de oxigênio, constitui os parâmetros determinantes para a germinação de sementes. A amplitude ideal para a germinação de sementes de soja

se situa entre 20 e 30 °C (BRASIL, 2009). Devido à temperatura de 10 °C ser bastante drástica para sementes de soja, as sementes não condicionadas levaram entre 56 e 72 horas para o início da protrusão radicular, com redução da velocidade de germinação, evidenciando o efeito positivo do condicionamento fisiológico (Figura 4).

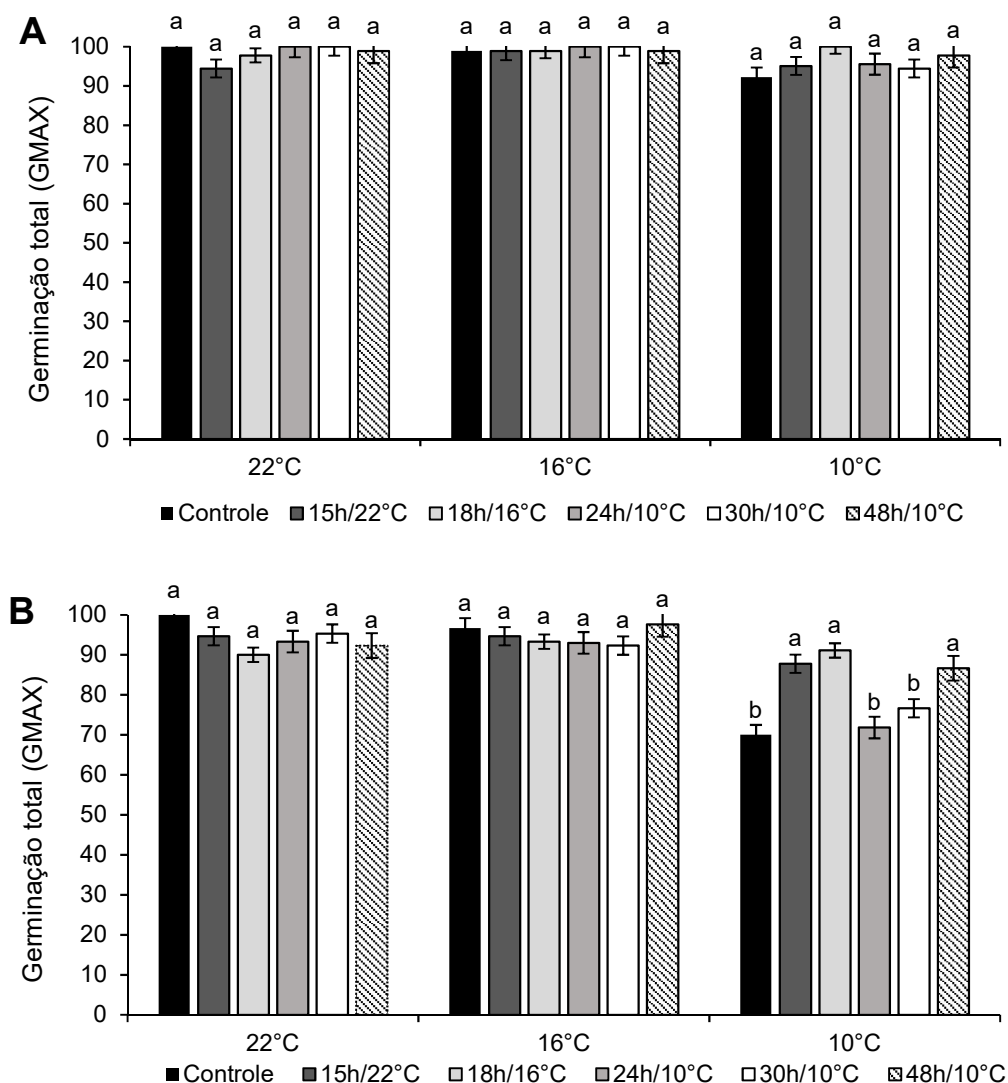
Dentre os efeitos do condicionamento, um dos pontos mais vantajosos é seu efeito benéfico em condições de estresse. Resultados superiores àqueles obtidos com sementes não condicionadas de várias espécies têm sido relatados na literatura, especialmente sob condições adversas como baixas e altas temperaturas, déficit hídrico ou salinidade (PILL; FRETT; MORNEAU, 1991). Pereira et al. (2009) e Gouveia et al. (2017) observaram efeito positivo na germinação de sementes de cenoura e milho submetidas à baixas temperaturas de germinação. Nascimento (2005) também observou melhoria na germinação de cucurbitáceas (melão e melancia) e solanáceas (berinjela e tomate) sob temperaturas subótimas. Em sementes de soja, Tilden e West (1985) observaram aumento da resistência à condições de envelhecimento acelerado e menores valores de condutividade elétrica, sugerindo a ocorrência de reparo metabólico durante o condicionamento, principalmente da membrana plasmática.

Os dados de GMAX indicam que o condicionamento não influenciou a germinação final das sementes da cultivar BRS 133, não diferindo estatisticamente do controle, para as três temperaturas avaliadas (Figura 5A). Para a cultivar Conquista também não houve diferença de desempenho entre os tratamentos na germinação conduzida à 22 e a 16 °C (Figura 5B). Já na germinação à temperatura subótima de 10 °C, as sementes submetidas ao hidrocondicionamento por 15h/22°C, 18h/16°C e 48h/10°C apresentaram porcentagem final de GMAX superior as sementes não condicionadas e aos tratamentos 24h/10°C e 30h/30°C.

Além da germinação final, uniformidade e velocidade de germinação, a resposta de sementes condicionadas a adversidades é um importante parâmetro para avaliar o efeito do condicionamento. Quando expostas a 10 °C, as sementes da Conquista dos tratamentos 24h/10°C e 30h/10°C foram os que apresentaram menores porcentagem de germinação, o que indica menor eficiência desses tratamentos na melhoria do desempenho das sementes. Esses resultados demonstram que o condicionamento à baixas temperaturas pode ser prejudicial a germinação, principalmente sob temperaturas subótimas. A utilização de

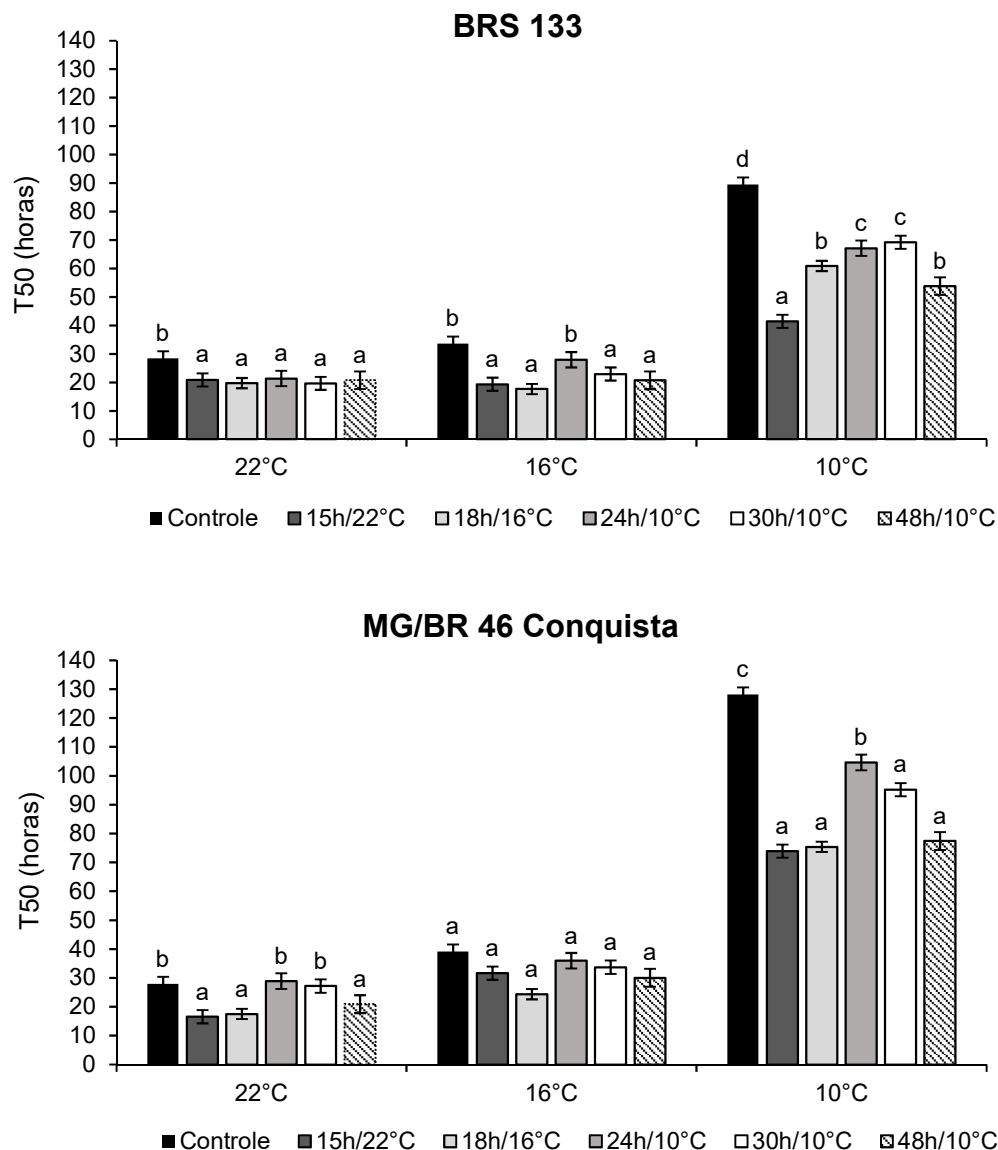
temperaturas baixas no condicionamento determina aumento do período em que as sementes liberam exsudados durante a hidratação, já que os mecanismos de reparo são retardados pela temperatura (HEYDECKER; HIGGINS; GULLIVER, 1973).

Figura 5 - Efeitos do hidrocondicionamento entre papel na germinação total (GMAX) de sementes de soja da cultivar BRS 133 (A) e da cultivar MG/BR 46 Conquista (B) realizadas à temperatura de 22, 16 e 10 °C. *Médias seguidas de mesma letra, para cada temperatura, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).



Alterações na porcentagem de germinação final são menos drásticas e evidentes que reduções no vigor, avaliada como velocidade de germinação (Figura 6). De modo geral, o efeito do hidrocondicionamento foi benéfico para as sementes de soja, que apresentaram maior velocidade de germinação e início mais rápido da protrusão.

Figura 6 - Efeitos do condicionamento fisiológico por hidrocondicionamento (entre papel) na velocidade de germinação (T50) de sementes de soja da cultivar BRS 133 (A) e da cultivar MG/BR 46 Conquista (B) realizadas à temperatura de 22, 16 e 10 °C. *Médias seguidas de mesma letra, para cada temperatura, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).



Pode-se observar que a germinação realizada à 22 °C, as sementes condicionadas da cultivar BRS 133, em qualquer combinação período e temperatura, apresentaram maior velocidade de germinação quando comparadas ao controle. À 16 °C, observa-se a mesma tendência, com exceção do tratamento 24h/10°C, que se equiparou ao controle. Para germinação à 10 °C, destaca-se o condicionamento à 15h/22°C, que reduziu em mais da metade o tempo necessário para atingir 50% da germinação (T50) em relação ao controle, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 6A).

Para as sementes condicionadas da cultivar Conquista, as combinações 15h/22°C, 18h/16°C e 48h/10°C apresentaram as maiores velocidades de germinação à 22 °C. À 16 °C, não houve diferença entre os tratamentos. Já à 10 °C, com exceção do condicionamento à 24h/10°C, as demais combinações de condicionamento proporcionaram aumento da velocidade de germinação (Figura 6B); destaque para o condicionamento 15h/22°C, em que o aumento da velocidade de germinação foi de 54% em relação ao controle.

Vale destacar que para a temperatura de germinação à 10 °C, em ambas as cultivares, o hidrocondicionamento 15h/22°C foi o único em que as sementes começaram a germinar entre 0 e 8 horas após a embebição, evidenciando seu efeito positivo na qualidade fisiológica dos lotes (Figura 4C e 4F).

Diversos pesquisadores têm relatado os efeitos benéficos do condicionamento fisiológico de sementes. Em sementes de soja, os resultados benéficos têm sido observados quanto a maior velocidade de emissão da raiz primária e comprimento de plântulas (COSTA et al., 2017), menor taxa de lixiviação de solutos ao longo do armazenamento, atribuído ao efeito do condicionamento sobre a reorganização das membranas (GIURIZATTO et al., 2008), melhor desempenho na germinação e na emergência de plântulas à campo (SILVA; VILLELA, 2011). Relatos em outras espécies também confirmam a melhoria na qualidade fisiológica no aumento da velocidade e da porcentagem final de germinação de sementes de arroz (FAROOQ et al., 2006), cenoura (PEREIRA et al., 2009), maxixe (ARAÚJO et al., 2011), couve-flor (KIKUTI; MARCOS FILHO, 2009), dentre outras.

Os efeitos benéficos do condicionamento ficam mais evidentes em condições de estresse por altas ou baixas temperaturas, déficit hídrico e salinidade (MARCOS FILHO, 2015). Sementes de soja condicionadas apresentaram melhor desempenho sob temperaturas subótimas e supra ótimas, à 20 e 35 °C, respectivamente (GIÚDICE et al., 1999) e resultados similares também foram relatados para sementes de cenoura, com melhoria na emergência a campo e desempenho de sementes sob estresse térmico (PEREIRA et al., 2009). Supõe-se que o condicionamento proteja as membranas das injúrias causadas pelo estresse térmico, garantindo melhor desempenho das sementes pela manutenção da permeabilidade seletiva, prevenindo a liberação excessiva de exsudados (LIMA; MARCOS FILHO, 2010).

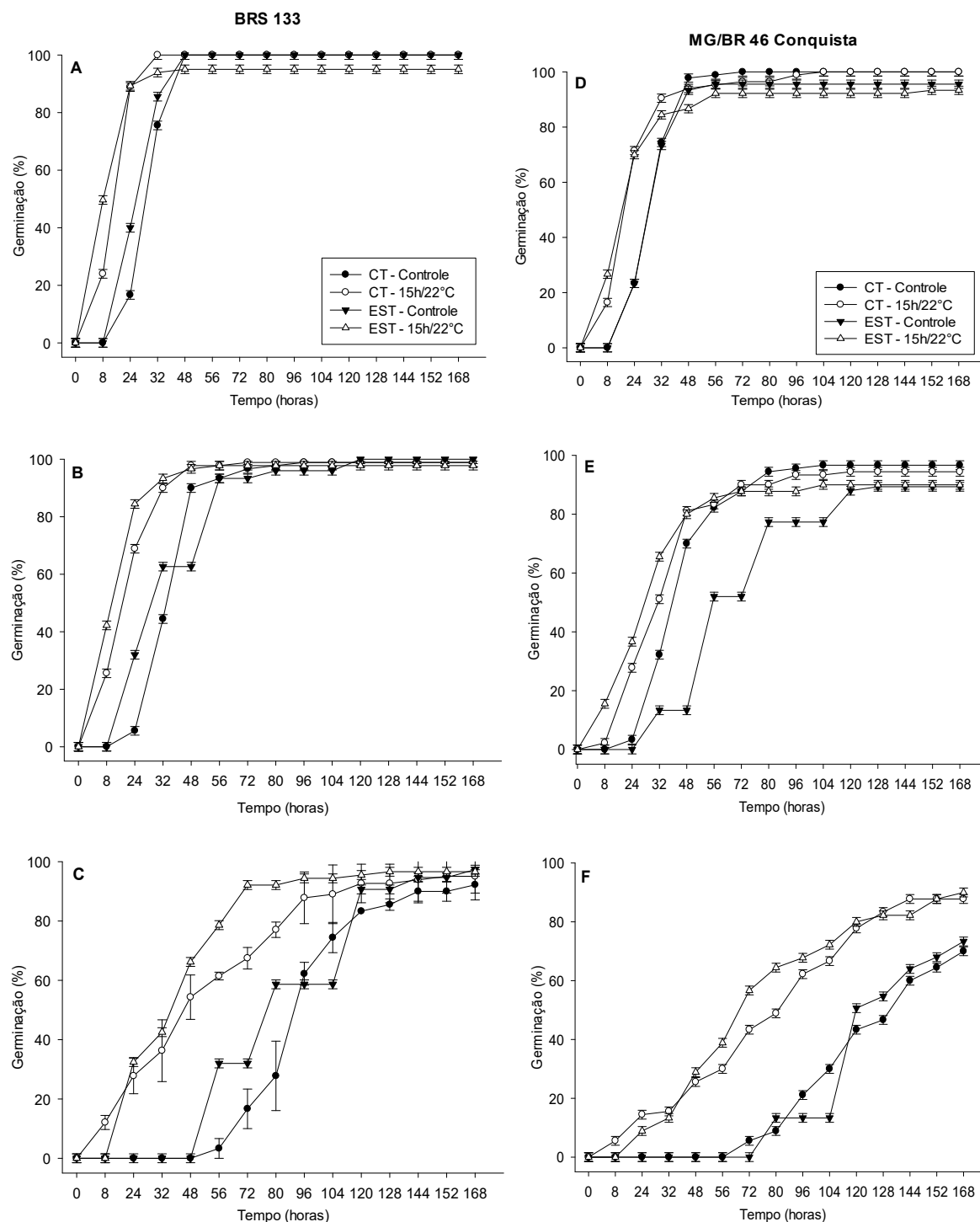
Nesse contexto, pode-se observar o melhor desempenho das sementes hidrocondicionadas quando expostas a temperaturas subótimas de germinação, principalmente à 10 °C, com destaque para a combinação 15 horas à 22 °C, para ambas as cultivares (Figura 6). Assim, o método definido para avaliação do efeito do hidrocondicionamento sobre a qualidade fisiológica e a expressão gênica foi a combinação 15h/22°C.

2.3.3 Efeito do hidrocondicionamento entre papel sobre a qualidade fisiológica e expressão gênica de sementes

O hidrocondicionamento por 15 horas à 22 °C também foi avaliado sobre a qualidade fisiológica das sementes produzidas sob condições de déficit hídrico (EST) das cultivares BRS 133 e MG/BR 46 Conquista.

O condicionamento fisiológico reduziu o tempo necessário para o início da protrusão, para ambas as cultivares e temperaturas de germinação avaliadas (Figura 7). Para as sementes hidrocondicionadas da cultivar BRS 133, submetidas à germinação à 22 e 16 °C, observa-se que as sementes EST alcançaram 50% de germinação entre 0 e 8 h, enquanto CT apresentou apenas metade desse valor. À 10 °C, as sementes CT iniciam a germinação entre 0 e 8 h, antes das sementes EST, que começam a germinar entre 8 e 24 horas. Essa mesma tendência pode ser observada para as sementes da Conquista.

Figura 7 - Curva de germinação de sementes de soja das cultivares BRS 133 e Conquista, produzidas sob condições ideais (controle – CT) e déficit hídrico (estressadas – EST), não condicionadas (controle) e após condicionamento fisiológico entre papel por 15 horas à 22°C (15h/22°C). Germinação da cultivar BRS 133 realizada à 22°C (A), à 16°C (B) e à 10°C (C); Germinação da cultivar MG/BR 46 Conquista realizada à 22°C (D), à 16°C (E) e à 10°C (F).



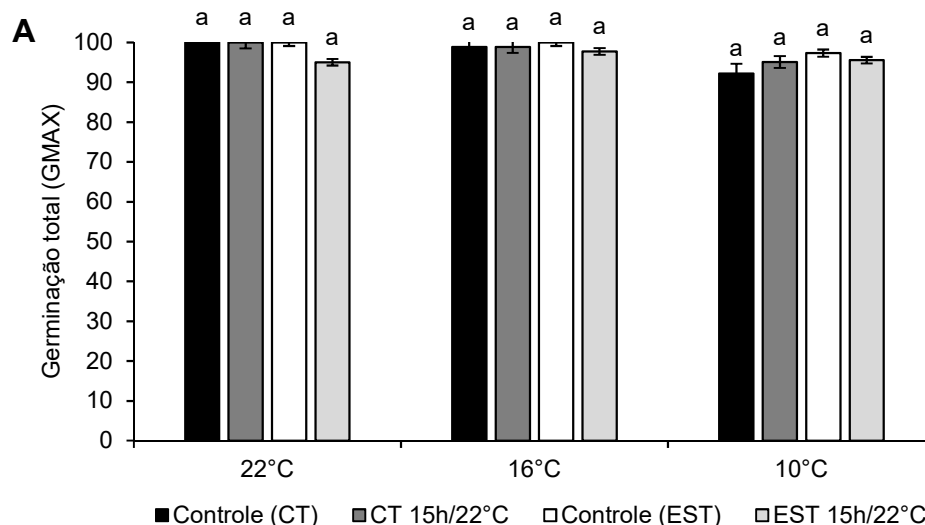
As cultivares apresentaram resposta variável ao hidrocondicionamento, tanto em vigor (T50), quanto em germinação total. Resultados diferenciados no comportamento de cultivares de soja submetidas a condicionamento também foram

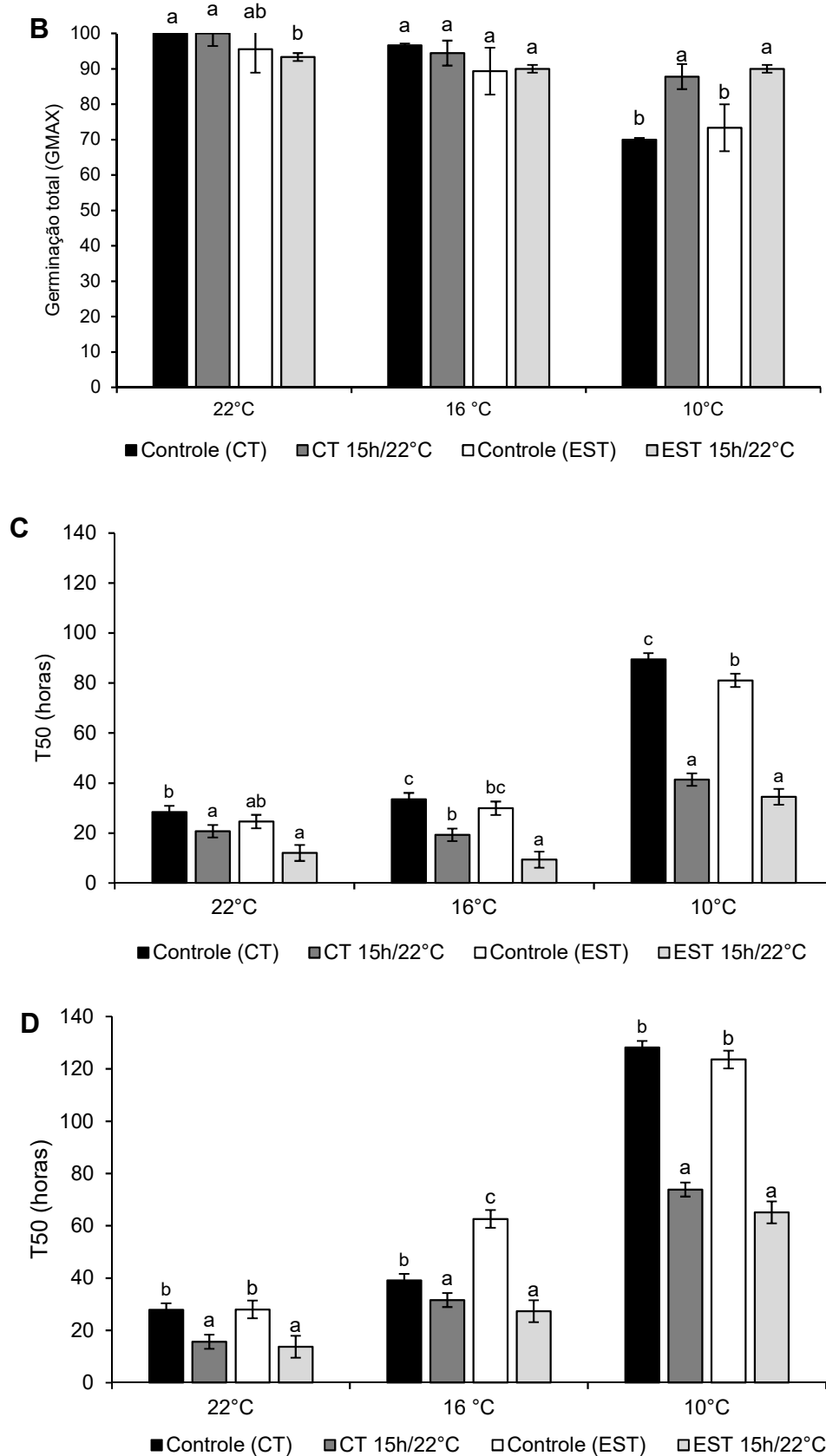
observadas por (BRACCINI et al., 1999). Além disso, diferenças no potencial fisiológico também influenciam a taxa de hidratação das sementes e suas partes (VILLELA; NOVENBRE; MARCOS FILHO, 2007).

Para as sementes da cultivar BRS 133, CT e EST, não houve alterações na porcentagem final de germinação (GMAX), para temperaturas ótimas e subótimas de germinação (Figura 8A). Já para as sementes da Conquista, de potencial fisiológico inferior ao da cultivar BRS 133, conforme avaliado no Capítulo I, os efeitos positivos do hidrocondicionamento ficaram evidentes. Sementes condicionadas dessa cultivar apresentaram melhor desempenho na germinação total à 10 °C do que as sementes não condicionadas (Figura 8B), evidenciando o incremento na tolerância a estresse térmico durante a germinação (GIÚDICE et al., 1999; PEREIRA et al., 2009).

Em relação à velocidade de germinação, o hidrocondicionamento também promoveu efeitos positivos, proporcionando redução dos valores de T50 para as sementes condicionadas produzidas sob condições ideais e sob condições de déficit hídrico (Figura 8C e 8D). Em todas as temperaturas testadas para germinação e em ambas as cultivares, as sementes condicionadas apresentaram, em média, redução de metade do tempo necessário para atingir 50% de germinação (Figura 8C e 8D).

Figura 8 - Efeitos do hidrocondicionamento entre papel sobre os resultados de germinação total (GMAX) e velocidade de germinação (T50) de sementes de soja da cultivar BRS 133 e da cultivar MG/BR 46 Conquista produzidas sob condições ideais (CT) e sob déficit hídrico (EST). Germinação realizada à temperatura de 22, 16 e 10 °C. (A e C) GMAX e T50 da cultivar BRS 133; (B e D) GMAX e T50 da cultivar MG/BR 46 Conquista. Médias seguidas de mesma letra, para cada temperatura, não diferem entre si pelo teste t Student ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).





Melhorias na germinação e vigor, sobretudo no desempenho fisiológico de sementes em condições adversas, já vêm sendo relatadas após condicionamento

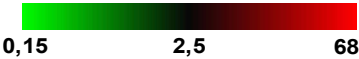
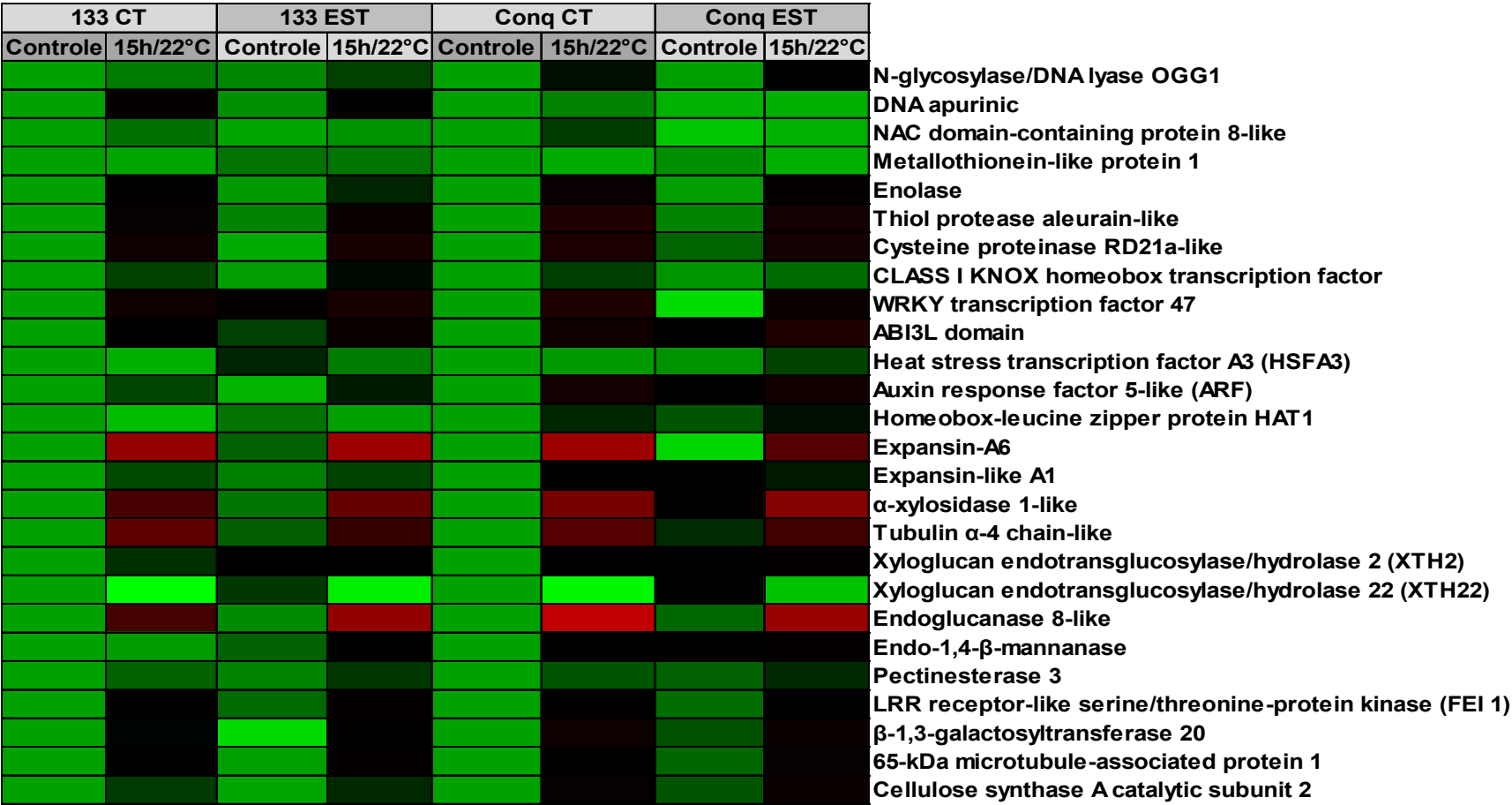
fisiológico de sementes de diversas espécies (FAROOQ et al., 2006; GIURIZATTO et al., 2008; KIKUTI; MARCOS FILHO, 2009; PEREIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; SILVA; VILLELA, 2011; COSTA et al., 2017). Em linhas gerais, a melhoria do condicionamento tem sido relacionada com o mecanismo de reparo das membranas celulares, melhorando o progresso dos eventos subsequentes do processo de germinação (BURGASS; POWELL, 1984). Vários trabalhos também relatam acréscimos na síntese e atividade de enzimas, intensidade de síntese de RNA e atividade respiratória (CORBINEAU; CÔME, 2006).

Os processos associados aos efeitos benéficos do condicionamento fisiológico também incluem eventos relacionados ao ciclo celular (DE CASTRO et al., 2000), atuação do sistema de proteção antioxidante (SUN et al., 2011), atividade de enzimas hidrolíticas (CHEN; ARORA, 2013) e na mobilização de reservas (JOB et al., 1997). As melhorias ocasionadas pelo condicionamento também estão associadas à mudanças na biossíntese e sinalização de hormônios vegetais (LUTTS et al., 2016). Alterações na relação ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA) foram detectadas em sementes (EL-ARABY et al., 2006), o que afeta diretamente o padrão de expressão gênica durante a germinação (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Buscando avaliar o efeito do hidrocondicionamento na expressão gênica de sementes de soja e sua relação com o vigor inicial, os genes candidatos selecionados estão envolvidos em diversas funções durante a embebição, como no reparo ao DNA e combate ao estresse oxidativo, no processo de respiração, na regulação da transcrição gênica e no remodelamento e síntese de parede celular.

A análise de expressão de genes demonstrou que as sementes condicionadas, de ambas as cultivares e condições de produção, apresentaram maior expressão de transcritos envolvidos na respiração celular e mobilização de reservas, no alongamento e no remodelamento, modificação e síntese de parede celular, e para a maioria dos fatores de transcrição, em comparação com as sementes não condicionadas (Figura 9).

Figura 9 - Expressão relativa de genes no eixo embrionário de sementes de soja da cultivar BRS 133 e Conquista submetidas a hidrocondicionamento entre papel por 15 horas à 22°C e não condicionadas (controle). Controle (CT) - sementes produzidas sob condições ótimas; estresse (EST) - sementes produzidas sob déficit hídrico. Sementes não condicionadas, de cada cultivar, foram usadas como controle para o cálculo de expressão relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Os mecanismos de reparo têm sido citados como a mais provável explicação para os efeitos benéficos dos tratamentos de *priming* (VENTURA et al., 2012; WU et al., 2017). Entretanto, não houve uniformidade de resposta, nem aumento significativo de expressão dos genes *N-glycosylase/DNA lyase OGG1*, *DNA apurinic*, *NAC domain-containing protein 8-like* e *Metallothionein-like protein 1*, envolvidos no reparo ao DNA e combate ao estresse oxidativo (MANOVA; GRUSZKA, 2015; ZHOU et al., 2012).

A expressão relativa de enolase (*ENO2*) foi estatisticamente superior em sementes condicionadas da cultivar 133 e Conquista, produzidas sob condições ideais (CT) e sob déficit hídrico (EST), em comparação com as sementes não condicionadas.

A enolase é uma enzima envolvida na via glicolítica, ativada logo nas primeiras horas de embebição (BELLIENY-RABELO et al., 2016). Durante o condicionamento, a ativação da respiração e a rápida produção de ATP são eventos metabólicos primários (McDONALD, 2000), e uma maior atividade respiratória é necessária para cobrir o estoque de energia para acelerar a germinação (LUTTS et al., 2016).

Conforme demonstrado por Corbineau et al. (2000), o aumento do metabolismo respiratório e do nível de ATP foram muito mais intensos nas primeiras horas de embebição de sementes condicionadas de tomate do que em sementes não condicionadas. Supõe-se que mecanismos de reparo atuem na reestruturação do sistema de membranas (TILDEN; WEST, 1985), garantindo maior taxa respiratória e fornecimento de energia para o progresso da germinação. Assim, o maior nível de expressão de *ENO2* em sementes condicionadas, de desempenho fisiológico superior quanto à GMAX e T50 (Figura 8), pode ser um indício do maior grau de organização de membranas e eficiência respiratória, impulsionando a germinação.

A mobilização de proteínas também desempenha um papel importante durante o condicionamento fisiológico de sementes (JOB et al., 1997). As proteases avaliadas, *thiol protease aleurain-like*, *cysteine proteinase RD21a-like (RD21a-like)*, apresentaram expressão superior nas sementes condicionadas de soja tanto de CT e EST, para as duas cultivares. As proteases, pertencentes a classe das cisteínoproteases, são descritas como as principais enzimas envolvidas na

mobilização de proteínas em sementes, importante para geração de energia da célula e biossíntese de novas moléculas (TAN-WILSON; WILSON, 2012).

Análises de proteoma revelaram redução de proteínas de reserva e acréscimo no conteúdo de polipeptídios em sementes de *Arabidopsis* e beterraba, submetidas a osmo e hidrocondicionamento (GALLARDO et al., 2001; JOB et al., 1997). O que sugere que a degradação de proteínas, consequentemente a atividade de proteases, possa ser um indicativo da eficiência do processo de germinação, guardadas as devidas particularidades de cada espécie (FREITAS; TEIXEIRA; FERREIRA, 2007). Esses resultados, associados com o de *ENO2*, fortalecem a ideia de que a maior eficiência energética e maior taxa de mobilização contribuem para a germinação em sementes condicionadas. Entretanto, conforme destacado por Chen e Arora (2013), as informações sobre as vias metabólicas primárias ativadas pelo *priming* são escassas, o que torna necessário novos estudos de proteoma e transcriptoma em sementes condicionadas.

Dentre os fatores de transcrição avaliados, houve aumento significativo na expressão de *WRKY transcription factor 47 (WRKY47)*, *ABI3L domain* e *Auxin response factor 5-like (ARF5)* nas sementes hidrocondicionadas de soja.

Fatores de transcrição (FTs) da família WRKY são reguladores chave de muitos processos nas plantas, incluindo respostas a estresses bióticos e abióticos, senescência, dormência de sementes e germinação de sementes, especialmente na regulação de respostas à ABA (RUSHTON et al., 2012). Membros dessa família têm sido apontados como reguladores negativos da germinação de sementes, atuando na repressão da transcrição mediada por GA (ZOU; NEUMAN; SHEN, 2008; ZHANG et al., 2009). Porém, também há relação positiva com a germinação, relatado no aumento significativo da expressão de transcritos WRKY observado ao longo da embebição de sementes de soja (ROSSI, 2016).

Em sementes de girassol, análises moleculares e fenotípicas apontaram *HaWRKY10* como regulador positivo da mobilização de reservas armazenadas na semente durante a germinação e no crescimento pós-germinativo, provavelmente através da repressão do ABI4 (RAINERI et al., 2016). A partir dessas informações, pode-se sugerir que *WRKY47* esteja envolvido na mobilização de reservas em sementes de soja hidrocondicionadas, o que também sustenta o aumento de *ENO2* e proteases observadas nessas condições.

A exemplo de WRKY, os fatores de transcrição ABI3L e *Auxin response factor 5-like* (ARF5) também apresentaram expressão superior nas sementes condicionadas. Ambos pertencem a superfamília de fatores de transcrição B3, atuando em diversas funções nas plantas. Embora as pesquisas demonstrem atividade de ABI3L e ARF5 nas vias de sinalização de ABA e auxina, respectivamente, ainda não há relatos dessa atividade durante a germinação de sementes.

O homólogo de ABI3L em Arabidopsis, o FT *AP2/B3-like*, tem sido relacionado a aspectos de arquitetura foliar, florescimento e regulação do tamanho da semente (SHAO et al., 2012; ZHANG et al., 2015), enquanto membros da família ARF atuam em vias de transdução de sinal de auxina, influenciando nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como na divisão e alongamento celular (KROGAN et al., 2014). Durante a embebição de sementes de soja, Rossi (2016) observou níveis significativos de ABI3L e ARF5, o que sugere alguma função de regulação da transcrição durante a germinação.

Dentre os genes relacionados a modificação e remodelamento de parede celular, os transcritos *expansin-A6* (EXPA6), *expansin-like A10* (EXPA10), *α -xylosidase 1-like* (XYL1), *Tubulin α -4 chain-like* (TUA) e *endoglucanase 8-like* (EGase) foram os que apresentaram expressão mais elevada em sementes hidrocondicionadas em relação as sementes não condicionadas.

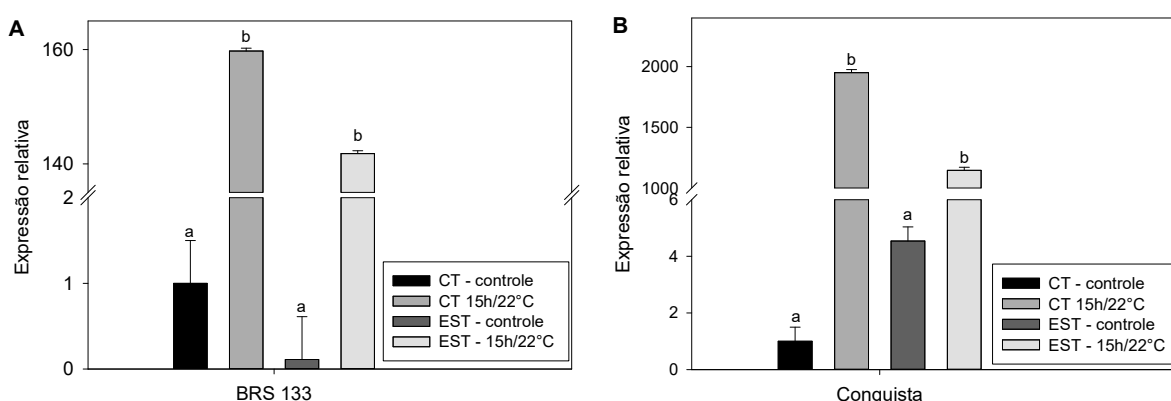
A protrusão radicular depende de ações conjuntas da pressão de turgor positiva e da atuação de enzimas hidrolíticas, que permitem a expansão da parede celular e o alongamento das células do hipocótilo (COSGROVE, 2005; SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009). O afrouxamento de parede celular é mediado por expansinas e enzimas hidrolíticas que atuam sobre a celulose e os polissacarídeos de matriz, capacitando a absorção de água e o crescimento celular (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

As expansinas atuam afrouxando as junções não-covalentes entre polissacarídeos da parede celular e catalisam a extensão dependente de pH (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Durante a germinação, induzida por GA, facilitam a extensão da parede celular das células do embrião, o enfraquecimento do endosperma de sementes e, conseqüentemente, a protrusão radicular (CHEN; BRADFORD, 2000). Mutantes superexpressando o gene *AtEXP2* em Arabidopsis apresentaram maior velocidade de germinação (YAN et al., 2014), enquanto em soja

o gene *GmEXP1* foi caracterizado por acelerar o crescimento e alongamento de raízes primárias (CHEN et al., 2013).

As sementes hidrocondicionadas de soja apresentaram aumento de expressão de *EXPA6* de aproximadamente 50 vezes em sementes condicionadas da cultivar BRS 133, e de 30 e 55 vezes para CONQ EST e CT, respectivamente (Figura 9). Para o transcrito *EXPA10* a diferença foi ainda maior; nas sementes 133 CT e EST foi 159 e 142 vezes superior nas condicionadas, enquanto para CONQ CT e EST foi 1950 e 1146 vezes mais elevada (Figura 10).

Figura 10 - Expressão relativa de *EXPA10* no eixo embrionário de sementes de soja produzidas sob condições ideais (CT) e sob déficit hídrico (EST) e submetidas a hidrocondicionamento por 15h à 22°C. (A) Cultivar BRS 133; (B) Cultivar Conquista. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste t Student ($p < 0,05$).



Em sementes de tomate, após condicionamento em água e em solução de NaCl, também foi observada expressão aumentada de expansina (*SIEXP4*), β -1,3-glucanase (*SIGuIB*), endo- β -mannanase (*SIMAN2*) e xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (*SIXTH4*), sugerindo que o enfraquecimento do endosperma acelera a germinação e a uniformidade das sementes condicionadas (NAKAUNE et al., 2012).

A expressão relativa de endoglucanase 8-like (*EGase*) foi 39 e 60 vezes superior nas sementes condicionadas de soja da cultivar 133 e Conquista, respectivamente. Para o transcrito de α -xylosidase (*XYL1*) o aumento na expressão foi de 30x para 133 e 45x para Conquista; números significativos também foram observados para *tubulin α -4 chain-like* (*TUA*), sendo 30x mais expresso nas condicionadas, de ambas as cultivares.

As hidrolases, xilosidase e endoglucanases, atuam catalisando reações de hidrólise de polissacarídeos de parede, promovendo o relaxamento de PC. Transcritos de α -xilosidases, detectados no embrião de *Arabidopsis*, possivelmente atuam no controle do potencial de crescimento e alongamento do hipocótilo durante a germinação (SHIGEYAMA et al., 2016). Já a endoglucanase, além de atividade relacionada a expansão celular pela ação sobre celulose e xiloglucanos de PC, também tem papel sugerido na biossíntese de celulose (SHANI et al., 1997; 2006). Em sementes condicionadas, foi observada relação positiva entre presença de glucanases e velocidade e uniformidade de germinação (NAKAUNE et al., 2012). Em conformidade com os trabalhos citados, pode-se sugerir que há relação positiva entre atividade de *XYL1* e *EGase* e o incremento da velocidade de germinação das sementes condicionadas.

Já as tubulinas fazem parte da composição dos microtúbulos, importantes para manutenção da forma celular e essenciais para a separação das organelas durante a citocinese. Conforme observado por Cao et al. (2006), há aumento da expressão de α e β -tubulinas ao longo da embebição, estando envolvidas na germinação. De acordo com Silva et al. (2008), o preparo para a divisão celular é marcado pela síntese de DNA, reorientação dos microtúbulos e acúmulo de β -tubulina. O acúmulo de β -tubulinas precede a expansão e divisão celular e o subsequente crescimento da radícula, tendo sido correlacionada à eficiência do processo de germinação em sementes de tomate após *priming* (DE CASTRO et al., 2000).

Assim como a expressão de tubulina, a síntese de celulose e hemicelulose ocorre a medida que a célula se expande, especialmente durante a citocinese e crescimento celular, mediada por complexos *cellulose synthase* (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Esses complexos são necessários durante a expansão celular e no direcionamento da deposição de microfibrilas de PC, que é regulada e orientada pelos microtúbulos (PANTERIS et al., 2015). Em *Arabidopsis*, os complexos *cellulose synthase* são essenciais para síntese de PC e modulam o desenvolvimento do hipocótilo de plântulas (CHEN et al., 2013).

Os demais transcritos relacionados a parede celular que apresentaram aumento significativo de expressão foram *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2 (XTH2)*, *LRR receptor-like serine/threonine-*

protein kinase (FEI1), β -1,3-galactosyltransferase 20 (GALT20), 65-kDa microtubule-associated protein 1 (MICROTUBULE) e cellulose synthase (CELLULOSE).

Proteínas quinases, como *FEI1* e *FEI2*, atuam em vias de sinalização que regulam a biossíntese de PC, sendo expressas em hipocótilos e raízes de plântulas, ou seja, órgãos compostos por células que sofrem expansão longitudinal. Mutações nesses genes *FEI1* e *FEI2* interrompem a expansão anisotrópica e a síntese de polímeros da parede celular em *Arabidopsis*, prejudicando o desenvolvimento das plântulas (XU et al., 2008). Assim como houve aumento na expressão relativa de *FEI1* em sementes condicionadas, o mesmo foi observado para genes relacionados à biossíntese de PC, como *CELLULOSE*. Entretanto, as informações acerca da atuação e relação entre esses genes é escassa na literatura.

Os microtúbulos fazem parte da formação do citoesqueleto, movimentação de organelas e formação de parede celular, também atuando na formação do fuso mitótico durante a citocinese (LUTTS et al., 2016). Em concordância com os resultados encontrados, sementes osmocondicionadas de *Brassica napus* também apresentaram maior expressão de genes que codificam proteínas associadas aos microtúbulos e tubulinas, refletindo a benefícios do *priming* na germinação (KUBALA et al., 2015)

O relaxamento de PC também é facilitado por enzimas, principalmente por xiloglucano endotransglicosilases (XTH), que atuam clivando a cadeia principal do xiloglucano e integrando novos xiloglucanos à PC, aumentando sua extensibilidade (COSGROVE, 2005). Genes que codificam XTH foram regulados positivamente em sementes condicionadas de várias espécies como *Arabidopsis*, *Brassica napus* e *Solanum lycopersicum*, demonstrando relação positiva com a germinação (GALLARDO et al., 2001; NAKAUNE et al., 2012; KUBALA et al., 2015). Além delas, também auxiliam outras hidrolases, como as transglicosilases, glicosidases e pectina metil esterases (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

O aumento na expressão de transcritos que codificam expansinas, enzimas envolvidas no alongamento e crescimento, tem sido reportada para diversas espécies durante a germinação (MAROWA; DING; KONG, 2016). Nas sementes condicionadas de soja, o incremento no vigor e germinação das sementes foram acompanhados de aumento significativo da expressão relativa de genes envolvidos em diferentes funções. Percebe-se uma harmonia entre os resultados que envolvem genes atuando no alongamento celular, desde o relaxamento de PC, a síntese de

polissacarídeos para compor novas paredes celulares, a manutenção da forma celular até o preparo para divisão celular. Também merecem destaque os genes envolvidos na respiração celular e mobilização de reservas, eventos metabólicos primários necessários para suprir o processo de germinação.

2.4 CONCLUSÃO

O hidrocondicionamento por imersão direta em água prejudica a velocidade e a porcentagem final de germinação de sementes de soja.

O hidrocondicionamento entre papel por 15 horas à 22 °C proporciona melhor desempenho fisiológico de sementes de soja, com efeitos benéficos sobre a germinação e velocidade de germinação sob temperaturas ótimas e subótimas.

Melhorias na germinação e velocidade de germinação de sementes de soja hidrocondicionadas por 15 horas à 22 °C coincidem com o aumento na expressão relativa dos genes envolvidos na respiração e mobilização de reservas (*ENO2*, *THIOL* e *RD21a-like*); fatores de transcrição (*WRKY47*, *ABI3L* e *ARF5*); e no relaxamento, síntese de parede celular e alongamento celular (*EXPA6*, *EXPA10*, *XYL1*, *TUA*, *XTH2*, *EGase*, *FEI1*, *GALT20*, *MICROTUBULE* e *CELLULOSE*) em sementes hidrocondicionadas de soja.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P. C. et al. Condicionamento fisiológico e vigor de sementes de maxixe. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 3, p. 482–489, 2011.

BAILLY, C. et al. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, v. 10, n. 1, p. 35–42, 2000.

BELLIENY-RABELO, D. et al. Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36009, 8 dez. 2016.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer International Publishing, 2013.

BRACCINI, A. DE L. E et al. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, após o processo de hidratação-desidratação e envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 1052–1066, 1999.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, v. 21, n. 5, p. 1105–1112, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 398 p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2015. 1280 p.

BURGASS, R. W.; POWELL, A. A. Evidence for Repair Processes in the Invigoration of Seeds by Hydration. **Annals of Botany**, v. 53, p. 753–757, 1984.

CAO, D. et al. Gibberellin Mobilizes Distinct DELLA-Dependent Transcriptomes to Regulate Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 509–525, 2006.

CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Expression of an Expansin Is Associated with Endosperm Weakening during Tomato Seed Germination. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1265–1274, 2000.

CHEN, I. J. et al. A chemical genetics approach reveals a role of brassinolide and cellulose synthase in hypocotyl elongation of etiolated Arabidopsis seedlings. **Plant Science**, v. 209, p. 46–57, 2013.

CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 33–45, 2013.

CORBINEAU, F. et al. Improvement of tomato seed germination by osmopriming as related to energy metabolism. In: BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; VASQUEZ-RAMOS, J. (Eds.). **Seed biology: advances and applications**. Wallingford: CABI, p. 467–476, 2000.

CORBINEAU, F.; CÔME, D. Priming: A Technique for Improving Seed Quality. **Seed Testing International**, n. 132, p. 38–40, 2006.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850–861, 2005.

COSTA, D. S. DA et al. Hidratação controlada de sementes de soja: potencial fisiológico e emergência em solo com *Rhizoctonia solani*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 27–34, 2017.

COSTA, D. S. DA; BONASSA, N.; NOVENBRE, A. D. DA L. C. Incidence of storage fungi and hydropriming on soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 1, p. 35–41, 2013.

DE CASTRO, R. D. et al. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 327–335, 2000.

EL-ARABY, M. M. et al. Hormone and phenol levels during germination and osmopriming of tomato seeds, and associated variations in protein patterns and anatomical seed features. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 54, n. 4, p. 441–457, 2006.

FAROOQ, M. et al. Optimization of seed hardening techniques for rice seed invigoration. **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 507–512, 2006.
FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Vicilin-type globulins follow distinct patterns of degradation in different species of germinating legume seeds. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 323–329, 2007.

GALLARDO, K. et al. Proteomic Analysis of Arabidopsis Seed Germination and Priming. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 835–848, 2001.

GIÚDICE, M. P. DEL et al. Efeito Do Condicionamento Osmótico Na Germinação De Sementes De Dois Cultivares De Soja. **Revista Ceres**, v. 46, n. 266, p. 435–444, 1999.

GIURIZATTO, M. I. K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas ao hidrocondicionamento. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, p. 711–717, 2008.

GOUVEIA, G. C. C.; BINOTTI, F. F. DA S.; COSTA, E. Priming effect on the physiological potential of maize seeds under abiotic stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 3, p. 328–335, 2017.

HEYDECKER, W.; GIBBINS, B. M. The “Priming” of Seeds. **Acta Horticulturae**, v. 83, p. 213–223, 1978.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated Germination by Osmotic Seed Treatment. **Nature**, v. 246, p. 42, 2 nov. 1973.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, I. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 881–888, 1975.

HIRURAKI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **Evolução e Perspectivas de Desempenho Econômico Associadas com a Produção de Soja nos Contextos Mundial e Brasileiro**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2011. (Embrapa Soja. Documentos, 319).

HUANG, Z. et al. Possible role of pectin-containing mucilage and dew in repairing embryo DNA of seeds adapted to desert conditions. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 277–283, 2008.

JOB, C. et al. The solubilization of the basic subunit of sugar beet seed 11-S globulin during priming and early germination. **Seed Science Research**, v. 7, n. 1997, p. 225–243, 1997.

JOOSEN, R. V. L. et al. Germinator: A software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148–159, 2010.

KIKUTI, A. L. P.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 240–245, 2009.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.

KROGAN, N. T. et al. Distinct subclades of Aux/IAA genes are direct targets of ARF5/MP transcriptional regulation. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 474–483, 2014.

KUBALA, S. et al. Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. **Plant Science**, v. 231, p. 94–113, 2015.

LIMA, L. B. DE; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino e germinação sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 138–147, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUTTS, S. et al. Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. In: ARAUJO, S.; BALESTRAZZI, A. (Ed.). **New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology**. InTech, 2016. p. 1-49.

MANOVA, V.; GRUSZKA, D. DNA damage and repair in plants – from models to crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. October, p. 885, 2015.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2.ed. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 5, p. 949–965, 2016.

McDonald, MB. Seed priming. In: Black M, Bewley JD, editors. **Seed Technology and its Biological Basis**. Sheffield, Sheffield Academic Press; p 287-325, 2000.

NAKAUNE, M. et al. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 28–37, 2012.

- NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando a germinação em condições de temperaturas baixas. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 211–214, 2005.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010.
- PANTERIS, E. et al. Cortical microtubule patterning in roots of *Arabidopsis thaliana* primary cell wall mutants reveals the bidirectional interplay with cell expansion. **Plant Signaling and Behavior**, v. 10, n. 6, p. e28737, 2015.
- PAPARELLA, S. et al. Seed priming: state of the art and new perspectives. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 8, p. 1281–1293, 2015.
- PEREIRA, M. D. et al. Primed carrot seeds performance under water and temperature stress. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 2, p. 174–179, 2009.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 1–10, 2002.
- PILL, W. G.; FRETT, J. J.; MORNEAU, D. C. Germination and Seedling Emergence of Primed Tomato and Asparagus Seeds under Adverse Conditions. **HortScience**, v. 26, n. 9, p. 1160–1162, 1991.
- PRIETO-DAPENA, P. et al. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1102–1112, 2006.
- RAINERI, J. et al. A sunflower WRKY transcription factor stimulates the mobilization of seed-stored reserves during germination and post-germination growth. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 9, p. 1875–1890, 2016.
- ROSSI, R. F. Towards understanding the influence of seed maturation on physiological seed quality in legumes. 2016. 165 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.
- RUSHTON, D. L. et al. WRKY transcription factors: Key components in abscisic acid signalling. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 2–11, 2012.
- SADEGHI, H. et al. Effect of seed osmopriming on seed germination behavior and vigor of soybean (*Glycine max* L.). **Network**, v. 6, n. 1, p. 39–43, 2011.
- SHANI, Z. et al. Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4- β -glucanase (cel1) from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 837–842, 1997.
- SHANI, Z. et al. Expression of endo-1,4- β -glucanase (cel1) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 10, p. 1067–1074, 2006.

SHAO, J. et al. The Over-Expression of an Arabidopsis B3 Transcription Factor, ABS2/NGAL1, Leads to the Loss of Flower Petals. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

SHIGEYAMA, T. et al. α -Xylosidase plays essential roles in xyloglucan remodelling, maintenance of cell wall integrity, and seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 19, p. 5615–5629, 2016.

SILVA, E. A. A. et al. ABA Inhibits Embryo Cell Expansion and Early Cell Division Events During Coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') Seed Germination. **Annals of Botany**, v. 102, p. 425–433, 2008.

SILVA, K. DA R. G.; VILLELA, F. A. Pré-hidratação e avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2, p. 331–345, 2011.

SLIWINSKA, E.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3587–3594, 2009.

SUN, H. et al. Ascorbate-glutathione cycle of mitochondria in osmoprimed soybean cotyledons in response to imbibitional chilling injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 3, p. 226–232, 2011.

TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 140–153, 2012.

TILDEN, R. L.; WEST, S. H. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 77, n. 3, p. 584–586, 1985.

VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 196–206, 2012.

VILLELA, F. A.; NOVENBRE, A. D. DA L. C.; MARCOS FILHO, J. Estado energético da água na germinação de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 27–34, 2007.

WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2109–2127, 2012.

WU, X. et al. Genetic Modification for Improving Seed Vigor Is Transitioning from Model Plants to Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 1–7, 2017.

XU, S.-L. et al. Two Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases Mediate Signaling, Linking Cell Wall Biosynthesis and ACC Synthase in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, v. 20, n. 11, p. 3065–3079, 2008.

YAN, A. et al. AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2014.

ZHANG, Y. et al. Transcription Factors SOD7/NGAL2 and DPA4/NGAL3 Act Redundantly to Regulate Seed Size by Directly Repressing KLU Expression in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 27, n. 3, p. 620–632, 2015.

ZHANG, Z. L. et al. A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 1–2, p. 139–151, 2009.

ZHOU, Y. et al. Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 235, n. 3, p. 523–537, 2012.

ZOU, X.; NEUMAN, D.; SHEN, Q. J. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 176–186, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vigor de sementes engloba uma complexidade de relações. No contexto agrícola, representa o desempenho das sementes e estabelecimento da cultura, sob ampla variação de condições do ambiente. Também pode ser visto como uma consequência das condições de produção das sementes, fortemente influenciada pelo ambiente e variável em função do genótipo. Sobretudo, é resultado da interação da atuação de genes, proteínas, enzimas e fitormônios que atuam regulando os processos responsáveis pela germinação, determinantes para a eficiência ou não do processo germinativo e estabelecimento de plântulas.

A ocorrência de estresses durante a fase final desenvolvimento das sementes pode prejudicar o vigor inicial das sementes em diferentes níveis, como confirmado pelos resultados da caracterização fisiológica realizados com sementes de soja produzidas sob déficit hídrico, oscilando de acordo com a cultivar. Sementes produzidas sob essas condições estressantes apresentaram menor velocidade de germinação (T50), especialmente à baixas temperaturas, menor resistência a condições adversas avaliado pelo teste de envelhecimento acelerado (75% UR), menor longevidade e maior lixiviação de solutos.

Além dos efeitos negativos sobre o vigor das sementes, houve alteração dos níveis de atividade enzimática, sendo observados maiores níveis de CAT, H₂O₂ e menores MDA nas sementes produzidas sob condições de estresse por seca. Os níveis de APX e SOD não foram alterados.

A atividade *biospeckle*, avaliada pelos índices AVD e MI, apresenta-se como uma ferramenta com grande potencial de aplicação na área de análise de sementes e estudo do vigor. Além do aumento da atividade *biospeckle* ao longo da embebição, acompanhando os resultados de protrusão radicular, a correlação positiva e linear observada entre comprimento do hipocótilo e atividade *biospeckle* nessa mesma região sugerem relação com a expansão celular. Entretanto, o aperfeiçoamento da técnica e avaliação de sementes de soja de diferentes cultivares são necessários para compreender as fontes de variação dos índices AVD e MI.

Na fase inicial de embebição e reativação do metabolismo germinativo, avaliou-se a atuação de transcritos envolvidos no reparo ao DNA, combate ao estresse oxidativo, atividades respiratórias e alongamento celular (modificação na parede celular). Para estudos futuros sobre vigor, destaca-se a análise dos

transcritos *N-glycosylase/DNA lyase* (reparo de DNA), *metallothionein-like protein 1* (combate ao estresse oxidativo), *thiol protease aleurain-like* (mobilização de reservas) e aqueles envolvidos no relaxamento de parede celular e alongamento, como as expansinas, *α -xylosidase 1-like*, *tubulin α -4 chain-like*, *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2 (XTH2)*, *endo-1,4- β -mannanase* e *pectinesterase 3 (PME1)*. Além disso, a grande variação observada na expressão gênica entre as cultivares e as condições de produção reflete os vários níveis de regulação envolvidos na manifestação do vigor de sementes.

Como vem sendo destacado por diversas pesquisas utilizando diferentes espécies, o condicionamento fisiológico de sementes provoca respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares complexas, estando intimamente ligado ao vigor, um dos componentes da qualidade fisiológica mais beneficiado pelo condicionamento.

Neste trabalho, a técnica de hidrocondicionamento entre papel proporcionou maior porcentagem e velocidade de germinação, e início mais rápido da protrusão, especialmente em temperaturas subótimas. Esta técnica uniformizou as respostas fisiológicas entre as cultivares e condições de produção de sementes, o que também refletiu nos resultados de expressão observados. Sementes condicionadas de soja apresentaram aumento na expressão de transcritos envolvidos na respiração e mobilização de reservas (*ENO2*, *THIOL* e *RD21a-like*); no relaxamento, síntese de parede celular e alongamento celular (*EXPA6*, *EXPA10*, *XYL1*, *TUA*, *XTH2*, *EGase*, *FEI1*, *GALT20*, *MICROTUBULE* e *CELLULOSE*); coincidindo com o melhor vigor, germinação e tolerância ao estresse térmico durante a germinação de sementes de soja.

Como proposto, este trabalho apresentou uma visão integrada sobre a fase inicial da germinação abordando diversos aspectos do vigor de sementes. Assim como o uso do condicionamento fisiológico possibilitou a análise do vigor sob outra perspectiva, a técnica de *biospeckle* apresentou-se como uma ferramenta com potencial para a análise do vigor de sementes. Ao longo da embebição, observou-se aumento da atividade *biospeckle*, com índices variando entre as regiões (hipocótilo e radícula) e entre as cultivares de soja avaliadas. Esses índices de atividade *biospeckle* podem estar relacionados com a taxa de alongamento e expansão dessa região, principal responsável pela protrusão radicular. Essas observações inéditas na literatura, encorajam novos estudos visando a utilização da técnica para compreender os processos fisiológicos que ocorrem durante a germinação.

Neste cenário, combinar diferentes abordagens para o estudo do vigor pode ajudar a compreender mais profundamente essa característica. Novas pesquisas integrando a atividade *biospeckle*, o condicionamento fisiológico e o desempenho em condições desfavoráveis podem revelar traços desconhecidos sobre o vigor. Como o efeito do vigor manifesta-se especialmente sob condições desfavoráveis, sugere-se também a análise de expressão desses genes sob condições desfavoráveis de embebição.

Definir até que ponto a atuação dos transcritos analisados pode explicar as variações entre os níveis de vigor é o próximo desafio da pesquisa. Apesar do volume de pesquisas e avanços da ciência, o nível de conhecimento sobre vigor de sementes permanece insuficiente para esclarecer as razões e efeitos dessa característica sobre o desempenho das sementes. Com os avanços da biotecnologia, a edição gênica precisa e específica por meio da tecnologia CRISPR-Cas9 (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) é uma alternativa que permite estudos funcionais e manipulação de genes, ampliando as possibilidades de alteração de características de interesse, como o vigor de sementes, e acelerando a obtenção de novas cultivares.

Por fim, é inegável a importância do vigor para a agricultura e indústria de sementes. O grande desafio da pesquisa em sementes envolve a compreensão e, sobretudo, a transformação do conhecimento adquirido em melhorias efetivas para o desenvolvimento e identificação de sementes mais vigorosas.

REFERÊNCIAS

- BASSO, D. P. et al. Late seed maturation improves the preservation of seedling emergence during storage in soybean 1. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 2, p. 185–192, 2018.
- BELLIENY-RABELO, D. et al. Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36009, 8 dez. 2016.
- BETTEY, M. et al. Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in Brassica oleracea. **New Phytologist**, v. 148, n. 2, p. 277–286, 2000.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer International Publishing, 2013. 408 p.
- BRAGA, R. A. et al. Potencial do bio-speckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciências Agrotecnologia UFLA**, v. 25, n. 3, p. 645–649, 2001.
- BRAGA, R. A. et al. Potencial do bio-speckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciências Agrotecnologia UFLA**, v. 25, n. 3, p. 645–649, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 398 p.
- CHEN, H. et al. Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4107–4121, jan. 2012.
- CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S61–S68, 2012.
- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. November, p. 850–861, 2005.
- COSTA, D. S. DA et al. Hidratação controlada de sementes de soja : potencial fisiológico e emergência em solo com Rhizoctonia solani. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 27–34, 2017.
- COSTA, D. S. DA; BONASSA, N.; NOVENBRE, A. D. DA L. C. Incidence of storage fungi and hydropriming on soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 1, p. 35–41, 2013.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 567–591, 2016.
- FRACAROLLI, J. A. Utilização do biospeckle laser na avaliação do potencial germinativo de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo). 2011.

86 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GIURIZATTO, M. I. K. et al. Qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas ao hidrocondicionamento. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, p. 711–717, 2008.

GRENNAN, A. K. Metallothioneins, a Diverse Protein Family. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1750–1751, 2011.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, I. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 881–888, 1975.

HOWELL, K. A. et al. Mapping Metabolic and Transcript Temporal Switches during Germination in Rice Highlights Specific Transcription Factors and the Role of RNA Instability in the Germination Process. **Plant Physiology**, v. 149, n. 2, p. 961–980, 2008.

INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2015. **International Rules for Seed Testing**. Zürich: ISTA, 2015.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.

LIGTERINK, W.; JOOSEN, R. V. L.; HILHORST, H. W. M. Unravelling the complex trait of seed quality: Using natural variation through a combination of physiology, genetics and -omics technologies. **Seed Science Research**, v. 22, n. SUPPL. 1, 2012.

LIMA, J. J. P. et al. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–25, 2017.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 5, p. 949–965, 2016.

MORANDO, R. et al. Déficit hídrico: efeito sobre a cultura da soja. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, n. especial, p. 114–129, 2014.

PÁDUA, G. P. DE et al. Response of soybean genotypes to the expression of green seed under temperature and water stresses. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 140–149, 2009.

PANOFF, B. Estudo da tolerância à dessecação e longevidade em sementes de soja (*Glycine max* (L.) MERR.). 2016. 95 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **Dynamic Laser Speckle and Applications**. New York:

CRC Press, 2008, 290 p.

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

SADEGHI, H. et al. EFFECT OF SEED OSMOPRIMING ON SEED GERMINATION BEHAVIOR AND VIGOR OF SOYBEAN (*Glycine max* L.). **Network**, v. 6, n. 1, p. 39–43, 2011.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017. 888 p.

VIVAS, P. G. et al. Biospeckle activity in coffee seeds is associated non-destructively with seedling quality. **Annals of Applied Biology**, p. 1–9, 2016.

VIVAS, P. G. et al. Biospeckle activity in coffee seeds is associated non-destructively with seedling quality. **Annals of Applied Biology**, p. 1–9, 2016.

WATERWORTH, W. M. et al. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. **Plant Journal**, v. 63, n. 5, p. 848–860, 2010.

WEITBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: Early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289–3309, 2011.

WU, Y. et al. Change in XET activities, cell wall extensibility and hypocotyl elongation of soybean seedlings at low water potential. **Planta**, v. 220, n. 4, p. 593–601, 2005.

YANG, Z. et al. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 1–2, p. 219–229, 2009.

ZDUNEK, A. et al. The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: A review. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 52, n. 1, p. 276–285, 2013.

ZHU, W. et al. Arabidopsis thaliana metallothionein, AtMT2a, Mediates ROS balance during oxidative stress. **Journal of Plant Biology**, v. 52, n. 6, p. 585–592, 2009.