UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

DAIANI AJALA LUCCAS

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR EM SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) COM RETENÇÃO DE CLOROFILA

Botucatu

2018

DAIANI AJALA LUCCAS

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR EM SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) COM RETENÇÃO DE CLOROFILA

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 A. Amaral da Silva

Coorientadora: Dr.ª Renake Nogueira Teixeira

Botucatu

2018

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

Luccas, Daiani Ajala, 1986-
L934c Caracterização fisiológica, bioquímica e molecular em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) com retenção de clorofila / Daiani Ajala Luccas. – Botucatu: [s.n.], 2018
181 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Coorientador: Renake Nogueira Teixeira
Inclui bibliografia

1. Soja – Sementes - Fisiologia. 2. Expressão gênica. 3. Óleo de Soja – Qualidade. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Teixeira, Renake Nogueira Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

Ficha elaborada por : Maria Lúcia Martins Frederico – CRB-8:5255

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

FCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR EM SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L)) Merr.) COM RETENÇÃO DE CLOROFILA"

AUTORA: DAIANI AJALA LUCCAS
ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA
COORIENTADORA: RENAKE NOGUEIRA TEIXEIRA

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 Agronômicas de Botucatu - UNESP

Veterinário Livre-Docente JOÃO NAKAGAWA
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu

Dr.ª MARIA MARCIA PEREIRA SARTORI
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP

Prof. Dr. WANDERLEY GODOY MAIA
Genética / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Dr.ª HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS
Agricultura / Universidade Federal de Lavras

Botucatu, 17 de agosto de 2018.

Faculdade de Ciências Agronômicas - Câmpus de Botucatu
Avenida Universitária, 3780 - 18610-034 - Botucatu - São Paulo
Tel.: (14) 3880-7000 - Fax: (14) 3880-7011

Aos meus amados pais de coração,

Helena e João,

dedico

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP) e ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Agricultura, pela oportunidade de realização do curso e qualificação profissional.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por financiar essa pesquisa (Processo CNPq 456415/2013).

À minha mãe, Marilsa, e aos meus pais de coração, Helena e João, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida e por me acolherem quando eu preciso.

Aos meus irmãos, Gustavo, Marilsa, Maria Helena, Cida, Odair, Valdir e Ademir, pela amizade, carinho e cuidado.

Ao meu marido Thiago, por todo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos e, principalmente, pela paciência durante as fases mais difíceis dessa longa caminhada. Thi, obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Edvaldo A. Amaral da Silva, pela orientação e pelos momentos de apoio, ensinamentos, atenção e dedicação. Além disso, agradeço por todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal oferecidas ao longo desses anos de trabalho juntos.

Ao Prof. Dr. Henk W. M. Hilhorst da Universidade de Wageningen – Holanda, pela orientação e apoio a essa pesquisa.

À Dr.ª Renake Nogueira Teixeira, pela coorientação, confiança, oportunidade, ensinamentos e atenção em momentos em que foram solicitados esclarecimentos ou sugestões.

À Embrapa Soja e ao Dr. José de Barros França Neto pela parceria e colaboração no envio do material para pesquisa.

À Prof.ª Dr.ª Queila de Souza Garcia e a Dr.ª Elisa Monteze Bicalho da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio a essa pesquisa e disponibilização dos seus laboratórios para realização das análises bioquímicas.

Ao Dr. Júlio Maia de Oliveira, pelo apoio a essa pesquisa e colaboração nas análises de expressão gênica.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e por contribuírem com este importante passo em minha vida.

A todos os professores do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Agricultura, pela atenção e ensinamentos. Em especial, à Prof.ª Dr.ª Maria Márcia Pereira Sartori pelo apoio a essa pesquisa colaboração nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, pela atenção, sugestões e valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Agricultura. Em especial, a minha grande amiga Valéria Giandoni, pela amizade, carinho, cuidado, atenção, ajuda e prestatividade. Agradeço muito o apoio que você tem me oferecido ao longo de todos esses anos. A sua presença em minha vida é um grande presente.

Aos amigos do Laboratório de Sementes, pelos conhecimentos divididos e momentos de descontração.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento, não só profissional, mas também e de não menor importância, pessoal.

Muito obrigada!

RESUMO

As principais condições ambientais, que afetam a degradação de clorofila em sementes de soja, são a seca e temperaturas extremamente altas, que acompanham as mudanças climáticas verificadas nas últimas décadas em algumas regiões do Brasil. O objetivo desse estudo foi realizar uma caracterização fisiológica em lotes de sementes de soja com diferentes porcentagens de sementes verdes, avaliar os efeitos da retenção de clorofila na qualidade fisiológica (germinação, vigor e longevidade) e na qualidade do óleo de sementes de soja além de avaliar a expressão de genes relacionados com esse fenômeno, considerando influências genéticas e ambientais. Foram avaliados 37 lotes de sementes de soja que apresentaram sementes verdes, de cultivares produzidas por produtores rurais (condições não controladas) em diferentes municípios do Brasil na safra 2014/2015. Os lotes com as maiores e as menores porcentagens de sementes verdes de cada cultivar foram selecionados com a finalidade de realizar uma caracterização fisiológica nas sementes dos lotes. Posteriormente, cinco lotes foram selecionados e organizados em duas combinações (Influência Ambiental e Influência Genotípica) e, após a classificação e divisão em amostras de sementes verdes e amarelas, foram avaliados quanto a qualidade fisiológica das sementes (viabilidade inicial, germinação, vigor e longevidade), parâmetros bioquímicos durante o armazenamento, qualidade do óleo (teor de óleo, teor de tocoferóis e tocotrienóis, teor de clorofila total e estabilidade oxidativa) e expressão de genes associados a retenção de clorofila (*D1*, *D2*, *PPH2* e *NYC1_1*). Os resultados obtidos demonstraram que, independente da cultivar ou da região de produção, lotes com maior porcentagem de sementes verdes possuem qualidade fisiológica inferior. Além disso, verificou-se que sementes com retenção de clorofila apresentaram menor qualidade fisiológica (viabilidade inicial, germinação, vigor e longevidade), menor expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2* e menor qualidade do óleo, com presença de clorofilas residuais, menor estabilidade oxidativa e menores índices de tocoferóis.

Palavras-chave: Sementes verdes. Qualidade fisiológica. Armazenamento. Qualidade de óleo. Expressão gênica.

ABSTRACT

The main environmental conditions affecting the degradation of chlorophyll in soybean seeds are drought and extremely high temperatures that accompany the dramatic climatic changes observed in the last decades in some regions of Brazil. The aim of this study was to perform a physiological characterization in soybean seed lots with different percentages of green seeds, to evaluate the effects of chlorophyll retention on physiological quality (germination, vigor and longevity) and soybean oil quality and to evaluate the expression of genes related to this phenomenon, considering genetic and environmental influences. Overall, 37 soybean seed lots that presented green seeds of cultivars produced under real growing conditions (uncontrolled conditions) in different cities of Brazil in the 2014/2015 harvest season were evaluated. Lots with the largest and smallest percentages of green seeds of each cultivar were selected with the purpose of performing a physiological characterization in seed lots. Subsequently, five lots were selected and organized into two combinations (Environmental Influence and Genotypic Influence) and, after classification and division into green and yellow seed samples, the physiological quality of seeds (initial viability, germination, vigor and longevity) (tocopherol and tocotrienol, oil and total chlorophyll contents and oxidative stability), and expression of genes associated with chlorophyll retention (*D1, D2, PPH2* and *NYC1_1*). The results showed that, regardless of cultivar or production region, lots with higher percentage of green seeds have lower physiological quality. In addition, it was verified that seeds with chlorophyll retention showed lower physiological quality (initial viability, germination, vigor and longevity), lower oil quality, with presence of residual chlorophylls, lower oxidative stability and lower tocopherol index and expression of *D1, D2* and *PPH2* genes.

Keywords: Green seeds. Physiological quality. Storage. Oil quality. Gene expression.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
	CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA EM LOTES DE SEMENTES DE SOJA COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE SEMENTES VERDES.....	31
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT.....	32
1.1	INTRODUÇÃO.....	32
1.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1.2.1	Material Vegetal.....	34
1.2.2	Porcentagem de sementes verdes.....	37
1.2.3	Procedimento de seleção dos lotes.....	37
1.2.4	Qualidade inicial das sementes.....	37
1.2.5	Análises estatísticas.....	38
1.3	RESULTADOS.....	39
1.3.1	Seleção dos lotes de acordo com a porcentagem de sementes verdes.....	39
1.3.2	Qualidade inicial das sementes.....	42
1.4	DISCUSSÃO.....	49
1.5	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	53
	CAPÍTULO 2 - ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES EM SEMENTES DE SOJA COM RETENÇÃO DE CLOROFILA.....	57
	RESUMO.....	57
	ABSTRACT.....	58
2.1	INTRODUÇÃO.....	58
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.2.1	Material Vegetal.....	59
2.2.2	Teor de água.....	60
2.2.3	Porcentagem de sementes verdes.....	60
2.2.4	Critério de seleção dos lotes e obtenção de sementes verdes e amarelas.....	60

2.2.5 Quantificação de clorofila..... 61
2.2.6 Qualidade inicial das sementes..... 62
2.2.7 Extração de RNA..... 62
2.2.8 Validação de genes associados a retenção de clorofila..... 63
2.2.9 Quantificação da expressão relativa por PCR (RT-qPCR)..... 63
2.2.10 Identificação de genes de referência..... 64
2.2.11 Análises estatísticas..... 65
2.3 RESULTADOS..... 65
2.3.1 Seleção dos lotes para avaliação da qualidade inicial das sementes e validação de genes associados a retenção de clorofila..... 65
2.3.2 Condições climáticas de cultivo..... 70
2.3.3 Influência ambiental e genotípica na porcentagem de sementes verdes..... 71
2.3.4 Influência ambiental e genotípica no conteúdo de clorofila..... 73
2.3.5 Qualidade inicial das sementes..... 76
2.3.6 Validação de genes associados a retenção de clorofila..... 84
2.4 DISCUSSÃO..... 89
2.5 CONCLUSÃO..... 95
REFERÊNCIAS..... 95
CAPÍTULO 3 - LONGEVIDADE E QUALIDADE DO ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA COM RETENÇÃO DE CLOROFILA..... 99
RESUMO..... 99
ABSTRACT..... 100
3.1 INTRODUÇÃO..... 100
3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 102
3.2.1 Material Vegetal..... 102
3.2.2 Teor de água..... 102
3.2.3 Porcentagem de sementes verdes..... 103
3.2.4 Critério de seleção dos lotes e obtenção de sementes verdes e amarelas..... 103
3.2.5 Quantificação de clorofila..... 103
3.2.6 Viabilidade inicial..... 104
3.2.7 Longevidade..... 105

3.2.8 Análises bioquímicas..... 106
3.2.9 Análises de qualidade do óleo..... 107
3.2.10 Análises estatísticas..... 108
3.3 RESULTADOS..... 109
3.3.1 Seleção dos lotes e obtenção das amostras para avaliação da longevidade e qualidade do óleo das sementes..... 109
3.3.2 Condições climáticas de cultivo..... 113
3.3.3 Avaliação da longevidade das sementes..... 114
3.3.4 Influência ambiental e genotípica no conteúdo de clorofila..... 119
3.3.5 Influência ambiental e genotípica na viabilidade inicial..... 122
3.3.6 Influência ambiental e genotípica na longevidade..... 124
3.3.7 Influência ambiental e genotípica em alterações bioquímicas na longevidade das sementes..... 130
3.3.8 Qualidade do óleo das sementes..... 143
3.3.9 Influência ambiental e genotípica na qualidade do óleo das sementes..... 144
3.4 DISCUSSÃO..... 152
3.5 CONCLUSÃO..... 164
REFERÊNCIAS..... 165
CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 173
REFERÊNCIAS..... 175

INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade das sementes é um traço essencial para a produção agrícola e segurança alimentar, particularmente com a crescente incerteza devido às mudanças climáticas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). De forma geral, a qualidade das sementes consiste em pureza genética, qualidade física, qualidade fisiológica e sanidade (POPINIGS, 1985). Todos esses atributos são importantes nessa determinação, no entanto a qualidade fisiológica, que é considerada uma característica complexa (HILHORST; TOOROP, 1997), tem recebido atenção especial e refere-se a germinação, vigor e longevidade, que regem a capacidade teórica das sementes em expressar suas funções vitais sob condições favoráveis e desfavoráveis no meio ambiente (BEWLEY et al., 2013).

A qualidade das sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é parcialmente afetada pela genética da planta. A tendência nos programas de melhoramento genético foi inicialmente desenvolver genótipos capazes de serem cultivados em regiões tropicais, em diferentes latitudes. No entanto, as influências ambientais têm se tornado cada vez mais determinantes no sistema de produção agrícola de países tropicais. O aquecimento global está associado ao aumento da ocorrência de seca e altas temperaturas em várias partes do mundo e inclusive no Brasil, o que pode comprometer consideravelmente o sistema agrícola brasileiro (NOAA, 2016).

Na cultura da soja, diversos estudos demonstraram a associação entre estresses ambientais durante o desenvolvimento das sementes e a redução da qualidade das mesmas (DORNBOS; MULLEN, 1990; GIBSON; MULLEN, 1996; EGLI et al., 2005). O desenvolvimento de sementes é um processo complexo que pode ser dividido em três fases parcialmente sobrepostas: embriogênese, enchimento de sementes e maturação tardia (BEWLEY; BLACK, 1994). Esse processo complexo envolve a interação de uma rede de muitos processos de desenvolvimento e vias metabólicas, juntamente com suas interações com o ambiente (BEWLEY et al., 2013).

No desenvolvimento de sementes de soja, a maturidade fisiológica corresponde a fase em que a massa final, germinação, tolerância a dessecação, longevidade e vigor das sementes são adquiridos (RIGHETTI et al., 2015). No entanto, os traços de qualidade fisiológica não são adquiridos ao mesmo tempo (BEWLEY et al., 2013). Durante a maturação das sementes um conjunto de eventos intrincados e sobrepostos

ocorrem desde o final da embriogênese até que as sementes se tornem fisiologicamente independentes da planta-mãe (RIGHETTI et al., 2015). Durante essa fase, a perda progressiva de água pelas sementes induz a formação do chamado estado vítreo citoplasmático, uma matriz amorfa semelhante a um estado sólido, onde a mobilidade e o nível de fluidez das moléculas são severamente desaceleradas, impondo um estado de quiescência e conferindo longevidade (BUITINK; LEPRINCE, 2008). Além disso, também se verifica o acúmulo de moléculas protetoras (proteínas abundantes de embriogênese tardia – LEAs, proteínas de choque térmico – HSPs e oligossacarídeos da família da rafinose – RFOs) (PRIETO-DAPENA et al., 2006; ROSNOBLET et al., 2007; HUNDERTMARK et al., 2011), diversos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SATTLER et al., 2004; KRANNER et al., 2006) e a ocorrência de degradação de clorofila (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; ZINSMEISTER et al., 2016).

O sucesso da germinação de sementes e o estabelecimento de plântulas são características determinantes para a propagação de espécies vegetais de importância econômica e ecológica (RAJJOU et al., 2012). Devido à sua alta vulnerabilidade a lesões, doenças e estresses ambientais, a germinação é considerada a fase mais crítica no ciclo de vida da planta (RAJJOU et al., 2012). A germinação é um processo complexo durante o qual a semente seca madura ao iniciar o processo de embebição deve mudar rapidamente de um programa de maturação para um programa de desenvolvimento baseado na germinação e se preparar para o crescimento da plântula (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Por definição, o processo de germinação incorpora eventos começando com a absorção de água pela semente e terminando com a protrusão da radícula (ou parte do embrião) através dos tecidos de cobertura das sementes (RAJJOU et al., 2012; BEWLEY et al., 2013). Bewley et al. (2013) ressaltam que germinação *sensu stricto* não inclui crescimento de plântulas já que esse processo começa depois que a germinação é completada. No entanto, pelo ponto de vista tecnológico, a germinação de sementes em testes laboratoriais é definida como a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009).

As alterações celulares que ocorrem durante a germinação são complexas, pois o metabolismo da embebição deve ser iniciado para permitir a recuperação dos

danos estruturais causados pela secagem e oxidação ocorrida durante a maturação enquanto atividades celulares basais secas devem ser restabelecidas (BEWLEY et al., 2013). A captação de água pelas sementes obedece um padrão trifásico e reflete diferentes processos físicos e metabólicos que impulsionam o movimento da água em cada fase (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). A Fase I é definida pela absorção de água pelas sementes por um processo físico, na Fase II o conteúdo de água é razoavelmente constante e a atividade metabólica aumenta com a transcrição de novos genes e, por fim, na Fase III a quantidade de água aumenta à medida que a plântula se estabelece utilizando as principais reservas armazenadas (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

Diversos trabalhos abordam os variados aspectos da fisiologia das sementes em relação à germinação, incluindo dormência, relações hídricas, fatores ambientais e controle hormonal (DONOHUE et al., 2010; HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008; IGLESIAS-FERNANDEZ; RODRIGUEZ-GACIO; MATILLA, 2011; KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005). Além disso, a baixa taxa de germinação tem sido associada a sinais precoces de desorganização das membranas, enquanto a ocorrência de anormalidades de plântulas é atribuída à morte significativa de tecidos em diferentes partes de sementes, particularmente em tecidos meristemáticos (MARCOS-FILHO, 2015).

Em condições ideais, as sementes podem apresentar porcentagens de germinação semelhantes. No entanto, essas mesmas sementes sob as condições ambientais mais estressantes como as verificadas em campo podem ter habilidades muito contrastantes para estabelecer plântulas devido as diferenças em seu vigor (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). O vigor da semente é a soma das propriedades que determinam a atividade e o desempenho de germinação aceitável em uma ampla gama de ambientes (ISTA, 2015).

A vida útil das sementes é um componente importante do vigor das sementes, que depende do potencial de conservação fisiológica e genética das sementes e das condições encontradas durante o armazenamento (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010). Segundo ISTA (2015), o vigor não é uma única propriedade mensurável, mas um conceito associado a aspectos de desempenho de sementes que incluem: taxa e uniformidade de germinação de sementes e crescimento de plântulas; capacidade de emergência de plântulas em

condições ambientais desfavoráveis; e desempenho após armazenamento, particularmente a manutenção da capacidade de germinar.

O impacto do vigor das sementes é observado durante o estabelecimento de plântulas no campo diante de efeitos das variáveis temperatura, disponibilidade de água e resistência do solo no desempenho de sementes e plântulas (POMMEL et al., 2002). Mesmo se as condições no dia da semeadura forem ótimas, as condições subsequentes que influem no estabelecimento das plântulas podem não ser. Neste sentido, sementes mais vigorosas mitigam esses efeitos limitadores de rendimento, estabelecendo plântulas de maneira mais uniforme em uma ampla gama de condições ambientais (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

Ainda não existe um único teste universalmente aceito para avaliar o potencial fisiológico de sementes de uma determinada espécie ou grupo de espécies. No entanto, vários pesquisadores tentaram elucidar os mecanismos envolvidos na deterioração de sementes e também as possíveis transformações que podem provocar diferenças quanto ao vigor de sementes. Estes incluem mudanças na síntese e atividade das mitocôndrias, desnaturação de proteínas, diminuição das reservas de armazenamento, aumento de ácidos graxos livres e níveis de açúcares, atividade enzimática diminuída e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (KRANNER et al., 2010; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Em lavouras de soja, o uso de sementes de alto vigor também apresenta um potencial maior de produção, chegando a índices de até 10% de aumento de produtividade (FRANÇA-NETO et al., 2012). Kolchinski et al. (2005), ao avaliar os efeitos dos níveis de vigor da semente de soja sobre diversas características agronômicas, observaram aumentos na produtividade de grãos, com o uso de sementes de elevado vigor, variando de 24,3% a 35%.

Para uma produção agrícola bem-sucedida, o estágio de maturidade é o principal fator que influencia o vigor na cadeia de produção de sementes (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Colher cedo demais pode resultar em baixa longevidade e vigor, pois nem todas as características de vigor de sementes foram adquiridas. Por outro lado, adiar a colheita, aumentam os riscos de quebra ou deterioração de sementes no campo devido a condições climáticas desfavoráveis (LEPRINCE et al., 2017). Apesar da importância central da longevidade e do vigor das sementes na

agricultura, a maneira como eles são adquiridos durante o desenvolvimento das sementes ainda é pouco compreendida (LEPRINCE et al., 2017).

A longevidade das sementes, isto é, a manutenção da viabilidade durante o armazenamento (BEWLEY et al., 2013; LEPRINCE et al., 2017), é um fator crucial para a conservação dos recursos genéticos e para garantir o estabelecimento adequado de plântulas e o rendimento das culturas (ZINSMEISTER et al., 2016). A longevidade é progressivamente adquirida durante a maturação, após o enchimento das sementes, até que a semente atinja um estado seco e quiescente, dependendo da espécie, genótipo e ambiente. (PROBERT et al., 2007; VERDIER et al., 2013; RIGHETTI et al., 2015).

A sobrevivência no estado seco é o resultado de uma série de processos moleculares e celulares durante o desenvolvimento das sementes que começam com a aquisição da tolerância à dessecação, definida como a capacidade de sobreviver a uma perda de água que rapidamente oferece equilíbrio entre a umidade da semente e a umidade relativa do ar (LEPRINCE et al., 2017). Segundo Sano et al. (2016) durante a dessecação das sementes, o citoplasma das células transforma-se de fluido para vítreo pelo acúmulo de açúcares não redutores solúveis, o que limita a mobilidade da maioria das moléculas nas células. A viscosidade celular e a mobilidade molecular no citoplasma têm sido altamente correlacionadas com a longevidade das sementes em uma ampla faixa de temperaturas e teores de água (BUITINK et al., 2000). Segundo Rajjou e Debeaujon (2008) a formação do estado vítreo está associada com a redução do metabolismo, a fim de reduzir a produção de compostos tóxicos como espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos em membranas, proteínas e ácidos nucleicos.

Além disso, também se verifica a associação da formação do estado vítreo com RFOs (ROSNOBLET et al., 2007), proteínas LEAs (HUNDERTMARK et al., 2011; CHATELAIN et al., 2012), proteínas de choque térmico HSPs (PRIETO-DAPENA et al., 2006; ROSNOBLET et al., 2007) e um conjunto de defesas antioxidantes contra o estresse oxidativo como glutationa (KRANNER et al., 2006), tocoferóis (SATTLER et al., 2004) e flavonóides (DEBEAUJON et al., 2000).

A degradação da clorofila também tem sido relacionada com a manutenção da viabilidade durante o armazenamento. Mutantes com degradação de clorofilas afetada apresentaram redução da longevidade em sementes de *Arabidopsis thaliana*

(CLERKX et al., 2003; DEKKERS et al., 2016) e *Medicago truncatula* (ZINSMEISTER et al., 2016). Uma possível explicação para a relação entre a degradação de clorofila e a longevidade das sementes pode estar na liberação de substratos necessários para a síntese de tocoferóis, um conhecido antioxidante envolvido na longevidade das sementes (SANO et al., 2016; VOM DORP et al., 2015).

A longevidade é cada vez mais reconhecida como estando sob a forte influência do ambiente (LEPRINCE et al., 2017). No entanto, a deterioração no armazenamento é um estresse em particular, já que as sementes são submetidas a muitos estresses, uma vez semeadas em campo (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Fatores de estresse abiótico como seca, calor, salinidade do solo e excesso de radiação ultravioleta já estão causando perdas significativas na produção agrícola e se tornarão ainda mais prevalecentes nas próximas décadas devido aos efeitos das mudanças climáticas globais (WASSMANN et al., 2009; LOBELL et al., 2008; NOAA, 2016).

O estresse desencadeia uma ampla gama de respostas de plantas, de alterações na expressão gênica e metabolismo celular a mudanças na taxa de crescimento e no rendimento da cultura (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). A duração, a severidade e a taxa na qual um estresse é imposto influenciam na forma como a planta responde, sendo que a resistência e a sensibilidade ao estresse variam de acordo com a espécie, genótipo, estádio de desenvolvimento e tipo de órgão ou tecido afetados (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

O solo é um ambiente complexo no qual as sementes e as plântulas são expostas a múltiplos estresses, a temperatura influencia no tempo necessário para a ocorrência da germinação e emergência, mas o estresse hídrico e os impedimentos mecânicos são citados como os maiores impedimentos para a realização desses processos (WHALLEY; FINCH-SAVAGE, 2010). Para alcançar grandes produtividades, a soja necessita de uma disponibilidade hídrica em torno de 450 a 800 milímetros durante seu ciclo, com temperaturas variando entre 20 e 30° C, além de boa radiação solar para o crescimento e produção (EMBRAPA SOJA, 2011).

A qualidade de sementes de soja é afetada negativamente por diversos fatores. No campo, estresses climáticos e nutricionais, frequentemente associados com danos causados por insetos e por microrganismos, são considerados como as principais causas da deterioração da semente (FRANÇA-NETO et al., 2016). A qualidade da semente de soja também pode ser reduzida nas operações de colheita, secagem,

beneficiamento, armazenamento, transporte e semeadura (FRANÇA-NETO et al., 2016). Além disso, a retenção de clorofila vem sendo considerada um grave problema para o sistema de produção de sementes de soja, já que sua ocorrência é uma característica indesejável que leva à redução da qualidade fisiológica das sementes e dos seus produtos relacionados (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; TEIXEIRA et al., 2016).

Durante o desenvolvimento da semente, a síntese de clorofila começa no estádio globular, aumenta durante o desenvolvimento do embrião e é inibida nas etapas finais da maturação (PUTHUR; SARADHI, 2004; NAKAJIMA et al., 2012; RIGHETTI et al., 2015). Nas etapas finais da maturação, as sementes entram no período de dormência, que é acompanhado de desidratação, desintegração do aparato fotossintético e degradação da clorofila (DELMAS et al., 2013; RIGHETTI et al., 2015). A degradação da clorofila é um passo importante durante o desenvolvimento das sementes, pois sua retenção em sementes maduras tem causado impactos negativos na qualidade inicial e capacidade de armazenamento em sementes de muitas espécies de plantas comerciais, como canola, repolho, cenoura e soja (JOHNSON-FLANAGAN; MARET; POMEROY, 1994; JALINK et al., 1998; CLERKX et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2016).

O processo de degradação da clorofila em sementes muitas vezes permanece incompleto nas etapas finais da maturação devido a alterações nas vias constitutivas de degradação da clorofila (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). Na maioria das vezes, esse fenômeno está associado a fatores ambientais desfavoráveis como secas e temperaturas extremamente altas ou baixas (PÁDUA et al., 2009b; SINNECKER, 2002; SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016; TEIXEIRA et al., 2016). A presença de clorofilas residuais em sementes tem se tornado um problema especialmente importante para sementes oleaginosas como canola e soja, pois além de comprometer o uso das sementes para propagação de plantas por redução de sua qualidade fisiológica também reduz a qualidade do óleo extraído das mesmas (MAILER et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2016).

Na cultura da soja, a produção de sementes com alta qualidade fisiológica (germinação, vigor e longevidade) é primordial para a expansão da lavoura. A alta qualidade das sementes de soja é um pré-requisito para um bom estabelecimento e rendimento das culturas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). As empresas produtoras

de sementes necessitam produzir sementes de alto vigor pois isso resulta em melhor estabelecimento de plantas, aumento da relação custo-benefício e eficácia das aplicações de herbicidas e estratégias de remoção de plantas daninhas (MARCOS FILHO, 2015; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Perdas inesperadas na viabilidade das sementes devido a reduções no vigor afetam negativamente as vendas dos lotes, o escalonamento da produção e as rotações das culturas. Tais perdas na viabilidade das sementes são frequentemente observadas em colheitas com sementes verdes (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; TEIXEIRA et al., 2016).

Um segundo impacto igualmente negativo da semente verde de soja (e outras culturas oleaginosas) é a qualidade do óleo (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; FRANÇA-NETO et al., 2012). A retenção de clorofila em sementes de soja maduras é um grande problema para os produtores brasileiros de soja (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; TEIXEIRA et al., 2016). Se mais de 9% da safra de grãos apresentar esse fenótipo, a comercialização será comprometida, resultando em sérias perdas financeiras (PÁDUA et al., 2007). Até à data, foram publicados relatórios de colheitas contendo até 90% de sementes verdes (PÁDUA et al., 2009a; FRANÇA-NETO et al., 2012). Considerando que 85% do biodiesel vendido no Brasil é derivado do óleo de soja, esse problema se torna muito influente para o comércio brasileiro.

Há um aumento alarmante nos relatórios sobre o problema das sementes verdes de soja na agricultura brasileira e esse problema também pode surgir em outras áreas produtoras de soja do mundo (FRANÇA-NETO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2016). Evidentemente, isso se deve às mudanças climáticas em curso, mas também à expansão da produção de soja em direção à linha do Equador (PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; FRANÇA-NETO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2016). Em casos extremos, os rendimentos das colheitas foram relatados como sendo reduzidos por porcentagens de sementes verdes tão altas como 90% (PÁDUA et al., 2009a; FRANÇA-NETO et al., 2012). Uma vez que a soja é uma importante cultura no Brasil com utilização na alimentação humana e animal, tanto para os mercados nacional e internacional, há uma grande necessidade de conhecer e eliminar esse problema cada vez mais grave.

A degradação de clorofila verificada durante a senescência foliar está relacionada a um processo de "desintoxicação", pois a clorofila é um potencial fotossensibilizador quando não está integrada nos sistemas fotossintéticos (HORTENSTEINER, 2006). Além disso, a degradação da clorofila também é importante para a alocação de recursos de carbono e nitrogênio de folhas senescentes para órgãos em desenvolvimento. Makino e Osmond (1991) afirmam que a coordenada degradação de clorofila mantém a viabilidade celular durante a senescência e permite uma remobilização eficiente de nutrientes para o crescimento de órgãos, já que os cloroplastos contêm até 75% de teor de nitrogênio nos tecidos fotossintéticos. Em contraste com os papéis fisiológicos bem estudados do metabolismo da clorofila nas folhas, as funções fisiológicas do metabolismo da clorofila são pouco compreendidas em sementes em maturação (NAKAJIMA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2016). A síntese e a degradação da clorofila também ocorrem em sementes em maturação de maneira similar àquela observada nas folhas fotossintéticas (NAKAJIMA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2016). A presença de clorofilas residuais em sementes pode estar relacionada alterações em seu catabolismo.

Nos últimos anos, as vias constitutivas de degradação da clorofila tem sido intensamente estudas (TANAKA; TANAKA, 2011; NAKAJIMA et al., 2012; SHIMODA; ITO; TANAKA, 2016). No cloroplasto, no último passo da síntese de clorofila, uma porção de clorofila a é convertida em clorofila b por clorofilideo a oxigenase (chlorophyllide a oxygenase-CAO) via 7-hidroximetil clorofila a. A clorofila b é então reconvertida em clorofila a através da clorofila b redutase (chlorophyll b reductase-CBR) (KUSABA et al., 2013) e 7-hidroximetil clorofila a redutase (7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase-HCAR) (KUSABA et al., 2007; HORIE et al., 2009; SATO et al., 2009; MEGURO et al., 2011). São conhecidos dois tipos de CBR, a NYC1 e NOL (HORIE et al., 2009; SATO et al., 2009). Na etapa seguinte, a Mg^{2+}-dequelatase (Mg^{2+}-dechelatase) remove o íon de magnésio da clorofila resultando na formação de feofitina a (SHIMODA; ITO; TANAKA, 2016). Em passo adicional, a feofitina a é metabolizada em feoforbideo a e fitol por feofitinases (pheophytin pheophorbide hydrolase pheophytinase-PPH2) (MORITA et al., 2009; SCHELBERT et., 2009). O feoforbideo a é convertido em catabólitos vermelhos de clorofila (red chlorophyll catabolite-RCC) por feoforbideo a oxigenase (pheophorbide a oxygenase-PaO) e

eventualmente convertido em catabólitos incolores primários de clorofila (uncolored primary fluorescent chlorophyll catabolite-pFCC) (PRUŽINSKÁ et al., 2007; HORTENSTEINER, 2013). Por fim, o pFCC é transferido para o citosol e armazenado em vacúolos como catabólitos não fluorescentes de clorofila (non-fluorescing chlorophyll catabolites-NCC) (HORTENSTEINER, 2013).

Além das enzimas citadas, sabe-se que os produtos dos genes STAY-GREEN (SGR) atuam como reguladores chaves da degradação de clorofila, desestabilizando complexas proteínas do pigmento e aumentando a disponibilidade de clorofilas para clivagem por enzimas catabólicas (SATO et al., 2009; CHRIST; HÖRTENSTEINER, 2013; SAKURABA et al., 2015). Por esta razão, os mutantes verdes permanentes, chamados mutantes stay-green (sgr), identificados a partir de várias espécies de plantas têm sido investigados há muito tempo para elucidar os mecanismos genéticos e bioquímicos da degradação de clorofila (PARK et al., 2007). Atualmente, com base na presença ou ausência da atividade fotossintética e cinética da senescência foliar, distinguem-se cinco tipos de mutantes sgr (THOMAS; HOWARTH, 2000). O tipo A e B retardam o início da senescência foliar e a fase fotossinteticamente ativa é prolongada, com a senescência fortemente retardada para o tipo A; o tipo C tem atividade fotossintética e senescência normais, mas as clorofilas não são degradas; o tipo D passa por morte celular programada antes ou durante a senescência e degradação de clorofila; enquanto o tipo E não possuem atividade fotossintética e senescência afetadas, mas acumulam níveis altos de clorofilas e demandam de mais tempo para a degradação (THOMAS; HOWARTH, 2000). Esses cinco tipos podem ser divididos em duas categorias principais, geralmente denominados mutantes funcionais e não-funcionais, nos quais o início da senescência ocorre sem e com perda de atividade fotossintética, respectivamente (THOMAS; HOWARTH, 2000). Assim, os tipos funcionais (A e B) permanecem verdes e com atividade fotossintética por muito mais tempo, enquanto os tipos não-funcionais (C, D e E) permanecem verdes, sem manter a capacidade fotossintética durante a senescência.

O *SGR* é um gene nuclear que codifica proteínas específicas de cloroplasto, e seus homólogos existem como genes únicos ou duplicados em plantas superiores (PARK et al., 2007). A maior parte das espécies de plantas possui dois ou mais homólogos de *SGR* (*STAY-GREEN - SGR* e *STAY-GREEN LIKE - SGRL*), todos os quais prevê que se localizem no cloroplasto (PARK et al., 2007). Estudos relatam que

homólogos dos genes *SGR* foram clonados em arroz (*Oryza sativa*) (*OsSGR*) (PARK et al., 2007), Arabidopsis (*AtSGR1 e AtSGR2*) (REN et al., 2007) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (*SlSGR*) (BARRY et al., 2008).

A retenção de clorofila pode ser causada devido à ausência das proteínas SGR ou por um defeito em qualquer uma das enzimas catabólicas de clorofila. Alterações na via de degradação de clorofila frequentemente resultam em mutantes sgr tipo C ou tipo D. Fenótipos sgr foram descritos em mutação para o gene *SGR* em soja (GUIAMÉT et al., 1991), Arabidopsis (REN et al., 2007) e arroz (JIANG et al., 2007), assim como para as enzimas PaO (THOMAS et al., 1999) e NYC1 ou NOL (KUSABA, 2007; HORIE et al., 2009; SATO et al., 2009). No arroz, a ausência de NYC1 ou NOL leva ao fenótipo sgr tipo C durante a senescência natural e sob senescência induzida pelo escuro (KUSABA et al., 2007; SATO et al., 2009). Em contraste, em Arabidopsis, apenas a ausência de NYC1 resulta no fenótipo sgr tipo C, enquanto a ausência de NOL não afeta a degradação de clorofila (HORIE et al., 2009).

Em soja, Guiamét et al. (1991) sugerem que a transcrição de alguns genes de degradação de clorofila, especialmente *NYC1* e *PPH*, mostrou-se afetada pela mutação nos genes *Glyma11g02980* (*D1*) e *Glyma01g42390* (*D2*), que são ortólogos funcionais de *SGR*. O mutante duplo-recessivo *d1d1d2d2* demonstrou retenção de clorofila em folhas, durante a senescência, e em vagens e sementes, durante a maturidade. Recentemente, Teixeira et al. (2016) observaram que a expressão de *NYC1_1* e *PPH2*, espelhou a expressão de *D1* e *D2* com correlação negativa significativa ao conteúdo de clorofila em sementes de soja. Além disso, os autores também sugerem que a maior expressão constitutiva desses quatro genes oferece maior tolerância ao estresse por calor e seca em relação à degradação de clorofila nas sementes durante a maturação (TEIXEIRA et al., 2016). De fato, os níveis de expressão do gene *SGR* aumentam no decorrer da maturação das sementes (PARK et al., 2007).

Em contribuição a isso, estudos recentes demonstraram que a Mg2+-dequelatase é codificada pelo gene *STAY GREEN/NON-YELLOWING* (*SGR/NYE*) (SHIMODA; ITO; TANAKA, 2016). Também foi verificado que mutantes de Mg^{2+}-dequelatase teriam um fenótipo sgr já que as proteínas recombinantes de *SGR* (SGR1 e SGR2) são capazes de retirar o Mg^{2+} não apenas das moléculas livres de clorofila, mas também das clorofilas localizadas nos complexos pigmento-proteína (SHIMODA;

ITO; TANAKA, 2016). As proteínas SGR1 e SGR2 mostraram uma afinidade relativamente alta pelo íon magnésio da molécula de clorofila a, enquanto seu potencial de dequelatização em relação à clorofila b foi bastante baixo (SHIMODA; ITO; TANAKA, 2016).

Normalmente, a degradação de clorofilas é uma parte do processo de maturação de sementes e o papel do ácido abscísico (ABA) nesse processo foi abordado de forma abrangente em vários estudos (NAMBARA et al., 2010). Durante o desenvolvimento de sementes, sabe-se que o ABA controla os estádios médio e tardio da maturação e a tolerância à dessecação através do fator de transcrição de domínio ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) (FINKELSTEIN et al., 2008). Delmas et al. (2013) ao realizar estudos transcricionais em sementes de Arabidopses abi3-6, mutantes de ABI3, observaram que a família de genes *SGR* está sob controle transcricional direto de ABI3, com regulação da degradação de clorofila em sementes durante a maturação. Além disso, demonstraram que a má expressão dos genes *SGR* resulta em intenso fenótipo sgr e resgata parcialmente a insensibilidade a ABA de abi3-6, mas não se relaciona a outros defeitos tardios da embriogênese, como intolerância à dessecação e acúmulo de proteínas no armazenamento de sementes neste alelo (DELMAS et al., 2013). Neste contexto, o fator de transcrição ABI3 parece ser um candidato promissor para o papel de regulador de atividade do *SGR*.

Em análise de locos de características quantitativas (quantitative trait locus-QTL) sobre longevidade de sementes em Medicago, Zinsmeister et al. (2016) identificaram o fator de transcrição bZIP INSENSITIVE5 ABSCISIC ACID (ABI5). A caracterização de mutantes abi5 em sementes de Medicago e *Pisum sativum*, confirmaram o papel do ABI5 regulador de módulos gênicos com funções relacionadas ao metabolismo de RFOs, proteínas LEA e genes nucleares associados à fotossíntese e degradação de clorofila (PhANGs), identificando o ABI5 como um regulador proeminente da maturação tardia de sementes em leguminosas (ZINSMEISTER et al., 2016).

Outro importante regulador da maturação de sementes é o DELAY OF GERMINATION1 (DOG1), originalmente identificado por seu papel na dormência, mas que também desempenhou papel na estabilidade do armazenamento de sementes e na regulação de muitos genes de maturação de sementes em interação com o ABI3 e ABI5 (BENTSINK et al. 2006; DEKKERS et al., 2016). Dekkers et al. (2016) em

análises transcriptômicas e metabolômicas investigaram as consequências moleculares de um gene DOG1 disfuncional e concluíram que DOG1 afeta a expressão de centenas de genes que, parcialmente, também estão sobre o controle de ABI3 e ABI5, incluindo os genes relacionados a proteínas LEA, HSPs e degradação de clorofila. O que sinaliza que DOG1 não se limita à dormência, mas que é necessário para múltiplos aspectos da maturação da semente, em parte por interferir nos componentes de sinalização do ABA.

A soja é uma das mais importantes oleaginosas, contribuindo para 53% de toda a produção mundial de sementes oleaginosas em 2017 (SOYSTATS, 2017) e é um dos óleos comestíveis mais utilizados e saudáveis do mundo (NGUYEN et al., 2016). Além disso, a soja é uma importante fonte de proteína. As porcentagens de proteína e óleo na soja, embora influenciadas tanto pelo genótipo quanto pelo ambiente, têm uma média aproximada de 40% e 20%, respectivamente (CLEMENTE; CAHOON, 2009). As concentrações de óleo e proteína das culturas são sensíveis a fatores genéticos e ambientais. Os principais fatores de estresse que foram investigados são seca, salinidade, ozônio e calor. Uma diminuição na concentração lipídica foi relatada em quase todos os estudos envolvendo culturas cultivadas em condições desfavoráveis. Por outro lado, essas tensões normalmente estimulam uma maior concentração de proteína na fração colhida das colheitas, com apenas alguns estudos mostrando nenhum efeito ou menor concentração de proteína (WANG; FREI, 2011).

Além de ser um composto crítico no desenvolvimento e metabolismo das plantas, a presença de clorofilas em sementes oleaginosas também pode comprometer a qualidade de óleo extraído das mesmas (DIOSADY, 2005; KULKARNI; DALAI; BAKHSHI, 2006). Esse fato deve ser considerado ao citar que os óleos vegetais se tornaram uma parte importante e integrante da nossa economia. Eles são importantes como matéria-prima, para usos alimentícios e para uma abundância de aplicações industriais, como biodiesel, lubrificantes, óleos para motores, poliésteres, pesticidas e tintas (NGUYEN et al., 2016). O esgotamento das fontes de combustíveis fósseis e o aumento da poluição atmosférica criada pelo uso desses combustíveis exigiram alternativas aos combustíveis derivados do petróleo. O biodiesel (ésteres metílicos de ácidos graxos) obtido a partir de óleos vegetais é uma boa opção para esse fim (KULKARNI; DALAI; BAKHSHI, 2006).

A cor verde das sementes é resultado da presença de uma alta quantidade de clorofilas e seus derivados. A maioria deles são compostos solúveis em gordura e, portanto, são extraídos com o óleo, resultando em uma coloração mais escura (TAUTORUS; LOW, 1993). A clorofila é termicamente decomposta no pigmento feofitina, o que resulta em um óleo fosco de cor escura. Este pigmento contribui para um sabor anormal e pode também promover a oxidação do óleo, reduzindo assim a sua estabilidade no armazenamento (DIOSADY, 2005). Como a vida útil do óleo e a eficiência do catalisador durante os processos de hidrogenação são reduzidos na presença de clorofilas, etapas adicionais de clareamento são necessárias para remover esses pigmentos aumentando significativamente os custos de produção (TAUTORUS; LOW, 1993).

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA EM LOTES DE SEMENTES DE SOJA COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE SEMENTES VERDES

RESUMO

As principais condições ambientais, que afetam a degradação de clorofila em sementes de soja, são a seca e temperaturas extremamente altas, que acompanham as mudanças climáticas verificadas nas últimas décadas em algumas regiões do Brasil. Pesquisas anteriores demostraram comprometimento da qualidade fisiológica do lote de sementes soja em presença de níveis superiores a 9% de sementes verdes. Novas investigações considerando condições reais de cultivo, maior variabilidade de genótipos e ambientes de produção podem fornecer um diagnóstico importante sobre a atual exposição dos produtores da área a este problema. O objetivo desse estudo foi realizar uma caracterização fisiológica em lotes de sementes de soja com diferentes porcentagens de sementes verdes utilizando cultivares produzidas em regiões e condições ambientais variadas. Os tratamentos constaram de 37 lotes de sementes de soja, de nove cultivares, produzidos em diferentes estados brasileiros. Para cada lote foi determinada a porcentagem de sementes verdes e aqueles que apresentaram a maior e a menor porcentagem de sementes verdes de cada cultivar foram selecionados com a finalidade de avaliar o contraste em sua qualidade fisiológica. A qualidade fisiológica inicial dos lotes selecionados foi analisada através de parâmetros de germinação e vigor de sementes. Os resultados encontrados demonstraram que, independente da cultivar ou da região de produção, lotes com maior porcentagem de sementes verdes possuem sua qualidade fisiológica reduzida. Além disso, observou-se que, embora existam indicações de regiões mais adequadas para a produção de sementes de soja devido a menor exposição aos riscos climáticos, a retenção de clorofila também pode ser associada a questões pontuais como condições locais específicas que influenciam na maturação das sementes.

Palavras-chave: Qualidade de sementes. Retenção de clorofila. Germinação. Vigor.

ABSTRACT

The main environmental conditions affecting chlorophyll degradation in soybean seeds are drought and extremely high temperatures observed in the dramatic climatic changes verified in the last decades in some regions of Brazil. Previous studies have demonstrated that the physiological quality of soybean seed lots is compromised in the presence of levels above 9% of green seeds. New investigations considering real growing conditions, greater variability of genotypes and production environments can provide important diagnosis about the current exposure of producers to this problem. The aim of this study was to perform a physiological characterization of soybean seed lots with different percentages of green seeds using cultivars produced in different regions and environmental conditions. Treatments consisted of 37 soybean seed lots of nine cultivars produced in different Brazilian states. The percentage of green seeds was determined for each lot and those with the highest and lowest percentage of green seeds were selected with the purpose of evaluating variations in their physiological quality. The initial physiological quality of selected lots was analyzed through seed germination and vigor parameters. The results showed that, regardless of cultivar or production region, lots with higher percentage of green seeds have reduced physiological quality. In addition, it was observed that, although there are indications of more suitable regions for the production of soybean seeds due to less exposure to climatic changes, chlorophyll retention can also be associated with specific issues such as specific local conditions that influence seed maturation.

Keywords: Seed quality. Chlorophyll retention. Germination. Vigor.

1.1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das culturas produzidas na agricultura mundial começa com a semeadura de uma semente para estabelecer uma nova planta no campo. A qualidade das sementes é um traço essencial para a produção agrícola e segurança alimentar, particularmente durante a crescente incerteza devido às mudanças climáticas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Na safra 2016/2017 a soja brasileira ocupou uma área de 33,89 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de

111,56 milhões de toneladas e classificou o Brasil como o segundo maior produtor mundial de soja (CONAB, 2018). Nesse contexto, a utilização de sementes de alta qualidade associada a boas práticas de semeadura asseguram o estabelecimento de uma população de plantas vigorosas e em número adequado, contribuindo para que máximas produtividades sejam alcançadas (KRZYZANOWSKI et al., 2008; FRANÇA-NETO et al., 2016). A avaliação da qualidade fisiológica em lotes de sementes de soja torna-se uma iniciativa importante para a seleção de lotes com alto desempenho e para o sucesso da produção agrícola.

A retenção de clorofila em sementes de soja é uma característica indesejável que leva à redução da qualidade fisiológica das sementes e dos seus produtos relacionados, sendo considerada um grave problema para o sistema de produção já que sua ocorrência tem se tornado frequente no final da maturação das sementes (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; TEIXEIRA et al., 2016). O teor de clorofila em sementes de soja é determinado pelo genótipo e pode ser afetado pelas condições ambientais que interferem durante o processo de maturação das sementes (PÁDUA et al., 2009b; SINNECKER, 2002; TEIXEIRA et al., 2016). As principais condições ambientais, que afetam a degradação de clorofila em sementes de soja, são a seca e temperaturas extremamente altas, que acompanham as mudanças climáticas verificadas nas últimas décadas (TEIXEIRA et al., 2016; FRANÇA-NETO et al., 2016).

A ocorrência de condições climáticas ótimas durante a produção das sementes não é facilmente verificada em regiões tropicais e sua ausência vem restringindo a produção de sementes de soja como tem sido observado no cerrado brasileiro, local onde o fenômeno da retenção de clorofila nas sementes tem se tornado constante (ZORATO et al., 2007; FRANÇA-NETO et al., 2016). Portanto, com a finalidade de delimitar as regiões de maior e menor risco climático, a indicação de regiões mais propícias a produção de sementes tem sido realizada considerando fatores como altitude, temperatura e precipitação pluvial (FRANÇA-NETO et al., 2016).

Pesquisas anteriores demostraram que o comprometimento da qualidade do lote de sementes soja para fins comerciais ocorre em presença de níveis superiores a 9% de sementes verdes no lote devido ao efeito negativo da retenção de clorofila na qualidade fisiológica das sementes (PÁDUA et al., 2007). No entanto, novas investigações considerando condições reais de cultivo e maior variabilidade de

genótipos, ambientes de produção e tipos de manejo durante a produção podem fornecer um diagnóstico importante sobre a influência da porcentagem de sementes verdes do lote na redução da qualidade fisiológica das sementes e sobre a atual exposição dos produtores da área a este problema. Soma-se a isso a importância de relacionar a porcentagem de sementes verdes do lote com sua exposição aos diferentes fatores climáticos ocorridos nos locais de produção.

De acordo com um recente levantamento da Embrapa (HENNING et al., 2017) sobre qualidade de sementes de soja, o percentual médio nacional de sementes verdes presentes no lote de soja foi considerado baixo na safra 2015/2016 (0,6%). No entanto, a mesma publicação indica percentuais máximos de sementes verdes de até 31,5% em lotes produzidos no estado de Tocantins, região Norte do Brasil. Considerando o padrão comercial elevado da cultura da soja e os possíveis prejuízos causados pela retenção de clorofila a qualidade das sementes, esses valores devem ser ponderados.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi realizar uma caracterização fisiológica em lotes de sementes de soja com diferentes porcentagens de sementes verdes utilizando cultivares produzidas em regiões e condições ambientais variadas.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

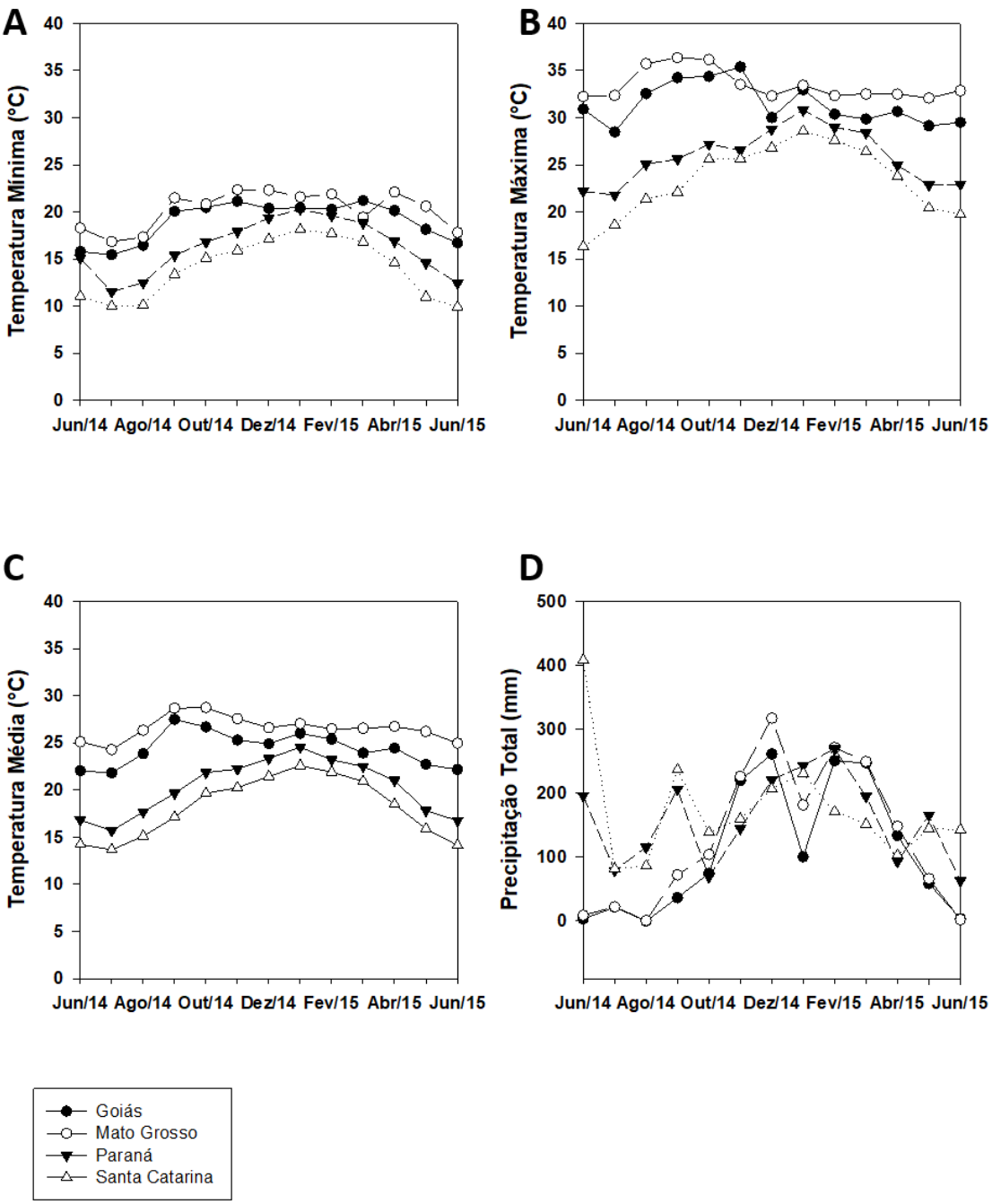
1.2.1 Material vegetal

Os lotes de sementes de soja foram produzidos em condições reais de cultivo por produtores da área (condições não controladas) em diferentes regiões e condições ambientais do Brasil na safra de 2014/2015 e cedidos pela Embrapa Soja/Londrina-PR. No total, foram cedidas nove cultivares (Quadro 1) distribuídas em 37 lotes produzidos em municípios dos estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina. A Figura 1 mostra as médias de temperaturas mínima, máxima e média e a precipitação pluvial total mensais nos estados de produção dos lotes de sementes de soja avaliados, durante os meses de junho de 2014 a junho de 2015 para referência das condições climáticas durante o ciclo das plantas de soja.

Quadro 1 - Descrição das cultivares avaliadas e seus respectivos grupos de maturação e hábitos de crescimento

Cultivar	Grupo de maturação	Hábito de crescimento
NS 5959 IPRO	5.9	Indeterminado
97Y07	7.0	Indeterminado
8473 RSF	7.4	Indeterminado
71MF00 RR	7.1	Indeterminado
SYN1059 RR	5.9	Indeterminado
NA 5909 RG	6.9	Indeterminado
W 799 RR	7.7	Indeterminado
6266 RSF IPRO	6.6	Indeterminado
M6972 IPRO	6.9	Indeterminado

Figura 1 - Médias de temperatura mínima (A), temperatura máxima (B), temperatura média (C) e precipitação pluvial total (D) mensais nos estados de produção dos lotes de sementes de soja avaliados (Goiás, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina), no período de junho de 2014 a junho de 2015



Fonte: Agritempo - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (2018).

1.2.2 Porcentagem de sementes verdes

A percentagem de sementes verdes presente nos diferentes lotes foi determinada visualmente utilizando quatro repetições com 100 sementes de cada lote, sendo que, ao observar qualquer sinal de pigmentação verde na semente, a mesma foi classificada como “ semente verde”.

1.2.3 Procedimento de seleção dos lotes

Com a finalidade de avaliar o contraste na qualidade inicial das sementes dos lotes com diferentes porcentagens de sementes verdes, foram selecionados os dois lotes de cada cultivar com as maiores variações em sua porcentagem de sementes verdes. Dessa forma, do total de 37 lotes, divididos em nove cultivares, foram selecionados os lotes com a maior e a menor porcentagem de sementes verdes de cada cultivar, resultando na seleção de 18 lotes. Em todas as avaliações realizadas foram mantidas as porcentagens de sementes verdes originais de cada lote.

1.2.4 Qualidade inicial das sementes

Após a devida seleção, a avaliação da qualidade inicial das sementes dos lotes de soja com diferentes porcentagens de sementes verdes foi realizada utilizando os seguintes parâmetros:

Teor de água: as sementes de cada lote foram avaliadas quanto ao teor de água por meio de duas amostras, de acordo com o método da estufa a 105 °C ± 3 °C (BRASIL, 2009). Portanto, o tempo de secagem foi de 24 horas, com duas repetições de 25 sementes e os resultados expressos em porcentagem de água.

Germinação: a avaliação da germinação foi realizada com quatro repetições de 25 sementes, usando rolos de papel toalha do tipo germitest, umedecidos com água destilada e mantidos em câmara de germinação a 25 °C no escuro por oito dias (BRASIL, 2009). A porcentagem de germinação foi contabilizada a cada 24 horas (diariamente) contando a protrusão da radícula, quando a radícula possuía mais de 2 milímetros de comprimento.

Plântulas normais e anormais: a formação de plântulas normais e anormais foi avaliada após oito dias de embebição, utilizando parâmetros de características de plântulas como descrito em Brasil (2009).

Sementes mortas: as sementes foram consideradas mortas quando, ao final do teste de germinação, não germinaram e apresentaram tecidos coalescentes (BRASIL, 2009).

T50: o tempo necessário para 50% das sementes viáveis germinarem foi analisado por contagens de protrusão de radícula contabilizadas de 12 em 12 horas. O cálculo foi realizado através da análise de dados de germinação cumulativa usando o módulo de ajuste de curva do pacote de software "Germinator" (JOOSEN et al., 2010).

Primeira leitura da germinação: realizada conjuntamente com o teste de avaliação de plântulas normais e anormais, correspondeu à formação de plântulas normais ao quinto dia após instalação deste (BRASIL, 2009).

Comprimento de plântulas, raiz e parte aérea: o comprimento de plântulas normais e suas partes foram medidos após oito da intalação do teste. Quatro repetições de dez sementes foram utilizadas neste teste. O comprimento médio da plântula, raiz e parte aérea foi calculado em centímetros para cada repetição.

Massa seca de plântulas, raiz e parte aérea: após a determinação do comprimento, as partes das plântulas foram colocadas para secar em estufa com circulação de ar a 80 °C durante 24 horas e calculou-se o peso médio em miligramas (ml) da plântula, raiz e parte aérea de cada repetição.

1.2.5 Análises estatísticas

As análises de correlação de Pearson e a análise de componentes principais foram realizadas usando software Minitab 16. Além disso, foi realizada análise de variância e, quando efeitos significativos foram detectados ($P<0,05$), a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional SISVAR.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Seleção dos lotes de acordo com a porcentagem de sementes verdes

No Quadro 2 encontra-se o local de produção (município e estado), o teor de água e a porcentagem de sementes verdes dos lotes das cultivares DM2367 (dois lotes), 97Y07 (três lotes), 8473 RSF (três lotes), 71MF00 RR (três lotes), W 799 RR (três lotes), SYN1059 RR (quatro lotes), NS 5959 IPRO (seis lotes), NA 5909 RG (cinco lotes) e M6972IPRO (oito lotes), resultando no total de 37 lotes. Os valores de porcentagem de sementes verdes oscilaram de zero a 74,5% entre os lotes das cultivares avaliadas, enquanto que os valores referentes ao teor de água apresentaram variação de 7,9 a 15,5% (Quadro 2).

Quadro 2 - Local de produção, teor de água (%) e sementes verdes (%) dos lotes das cultivares avaliadas

Lote	Cultivar	Local de produção	Teor de água (%)	Sementes verdes (%)
1	DM2367	Planaltina-GO	9,4	20,2
2	DM2367	Cristalina-GO	8,1	74,5
3	97Y07	Sítio D'Abadia-GO	8,9	0,7
4	97Y07	Niquelândia-GO	9,2	0,7
5	97Y07	Cristalina-GO	8,7	12,2
6	8473 RSF	Rio Verde-GO	10,1	2,7
7	8473 RSF	Paraúna-GO	8,9	22,0
8	8473 RSF	Rio Verde-GO	8,7	22,0
9	71MF00 RR	Ipameri-GO	9,8	4,2
10	71MF00 RR	Cristalina-GO	8,6	6,5
11	71MF00 RR	Cristalina-GO	8,4	15,2
12	W 799 RR	Rio Verde-GO	10,0	11,0
13	W 799 RR	Paraúna-GO	8,7	23,7
14	W 799 RR	Rio Verde-GO	10,1	34,2
15	SYN1059 RR	Cristalina-GO	7,9	2,7
16	SYN1059 RR	Ipameri-GO	9,4	3,5

17	SYN1059 RR	Cristalina-GO	9,0	12,0
18	SYN1059 RR	Cristalina-GO	8,3	20,7
19	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	9,8	3,0
20	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	9,3	4,7
21	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	15,5	5,7
22	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	11,1	17,5
23	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	12,0	33,5
24	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	12,0	66,5
25	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	10,5	7,5
26	NA 5909 RG	Rio Verde-GO	9,7	7,7
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	10,6	22,5
28	NA 5909 RG	Paraúna-GO	8,6	38,0
29	NA 5909 RG	Paraúna-GO	8,4	55,0
30	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	9,0	0,0
31	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	9,3	0,2
32	M6972IPRO	Juscimeira-MT	8,6	12,0
33	M6972IPRO	Juscimeira-MT	8,5	13,7
34	M6972IPRO	Juscimeira-MT	9,3	14,2
35	M6972IPRO	Juscimeira-MT	9,03	16,5
36	M6972IPRO	Juscimeira-MT	8,9	17,5
37	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	8,7	17,7

Para avaliar o contraste na qualidade inicial das sementes dos lotes com diferentes porcentagens de sementes verdes foram selecionados os lotes com a maior e a menor porcentagem de sementes de cada cultivar (Quadro 3). Como exemplo, pode-se citar a cultivar NA 5909 RG, onde foram selecionados os lotes com porcentagens de sementes verdes de 7,5 e 55,0%, identificados como Lote 25 e 29, respectivamente (Quadro 2). O mesmo procedimento de seleção foi realizado para as demais cultivares, resultando nos 18 lotes descritos e classificados (Maior % verdes e Menor % verdes) no Quadro 3, sendo que para aqueles lotes que apresentaram a mesma porcentagem de sementes verdes a seleção foi aleatória.

Ao considerar os lotes selecionados, observa-se que os valores de porcentagem de sementes verdes variaram de zero a 74,5%, com média de 20,6% entre todos os lotes. A análise da variável mostrou valores de desvio padrão de ±22,7, indicando que os dados apresentam grande dispersão em comparação com sua média (Quadro 3).

Quadro 3 - Local de produção, classificação e sementes verdes (%) dos lotes selecionados das diferentes cultivares. Desvio padrão e média da porcentagem de sementes verdes entre os lotes

Cultivar	Lote	Local de produção	Classificação	Sementes verdes (%)
DM2367	1	Planaltina-GO	Menor % verdes	20,2
	2	Cristalina-GO	Maior % verdes	74,5
97Y07	3	Sítio D'Abadia-GO	Menor % verdes	0,7
	5	Cristalina-GO	Maior % verdes	12,2
8473 RSF	6	Rio Verde-GO	Menor % verdes	2,7
	8	Rio Verde-GO	Maior % verdes	22,0
71MF00 RR	9	Ipameri-GO	Menor % verdes	4,2
	11	Cristalina-GO	Maior % verdes	15,2
W 799 RR	12	Rio Verde-GO	Menor % verdes	11,0
	14	Rio Verde-GO	Maior % verdes	34,2
SYN1059 RR	15	Cristalina-GO	Menor % verdes	2,7
	18	Cristalina-GO	Maior % verdes	20,7
NS 5959 IPRO	19	Campo Novos-SC	Menor % verdes	3,0
	24	Ubiratã-PR	Maior % verdes	66,5
NA 5909 RG	25	Ubiratã-PR	Menor % verdes	7,5
	29	Paraúna-GO	Maior % verdes	55,0
M6972IPRO	30	Pedra Preta-MT	Menor % verdes	0,0
	37	Pedra Preta-MT	Maior % verdes	17,7
			Média	20,6
			Desvio Padrão	22,7

1.3.2 Qualidade inicial das sementes

As sementes dos lotes selecionados das diferentes cultivares, produzidas em vários municípios de estados do Brasil, foram avaliadas quanto a sua qualidade inicial para entender o efeito da porcentagem de sementes verdes sobre a qualidade do lote sementes de soja. Para isso, análises de correlações foram realizadas com o objetivo de identificar as relações próximas entre a porcentagem de sementes verdes do lote e os parâmetros de qualidade física (teor de água) e fisiológica (germinação e vigor) avaliados (Tabela 1).

Na Tabela 1 são apresentadas as análises de correlações simples entre os parâmetros avaliados e a porcentagem de sementes verdes dos lotes selecionados e classificados como Maior % verdes e Menor % verdes. De acordo com Ferreira (2000), o coeficiente de correlação de Pearson (r) indica a força da relação entre duas variáveis e pode variar de -1 a +1. O sinal negativo ou positivo determina a direção da correlação e o valor sugere o grau de relação entre as variáveis. Os valores -1 e +1 indicam a correlação máxima, e 0 significa que não há correlação entre as variáveis.

Os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a porcentagem de sementes verdes e as variáveis germinação, plântulas normais, primeira leitura da germinação, comprimento de plântulas, comprimento de raiz, massa seca de plântulas, massa seca de raiz e massa seca de parte aérea apresentaram valores negativos de r variando de -0.833 a -0.659; portanto, correlações negativas significativas foram identificadas (Tabela 1). Por outro lado, correlações positivas significativas ocorreram entre a porcentagem de sementes verdes e as variáveis sementes mortas (r = 0.82), T50 (r = 0.77) e plântulas anormais (r = 0.48) (Tabela 1). Os dados indicam que a porcentagem de sementes verdes influenciou de forma negativa a viabilidade inicial, germinação e o vigor das sementes dos lotes das cultivares, aumentando o tempo necessário para a ocorrência de germinação, comprometendo o desenvolvimento das plântulas e contribuindo para a mortalidade das sementes (Tabela 1). Além disso, às variáveis comprimento de parte aérea e teor de água não apresentaram correlação significativa, com valores de r = -0.385 e r = 0.123, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Correlação simples entre a porcentagem de sementes verdes (% Sem verdes) e a germinação (Germ), T50 (T50), plântulas normais (Pl n), primeira leitura da germinação (1ª leitura), plântulas anormais (Pl an), sementes mortas (Sem mortas), comprimento de plântulas (C pl), comprimento de raiz (C raiz), comprimento de parte aérea (C PA), massa seca de plântulas (Ms pl), massa seca de raiz (Ms raiz), massa seca de parte aérea (Ms PA) e teor de água (Teor de água) dos lotes classificados como Maior % verdes e Menor % verdes das diferentes cultivares

Variável dependente	Variáveis independentes	r	*p*	Significância
% Sem verdes	Germ	-0.833	0.001	**
% Sem verdes	T50	0.776	0.001	**
% Sem verdes	Pl n	-0.763	0.001	**
% Sem verdes	1ª leitura	-0.767	0.001	**
% Sem verdes	Pl an	0.486	0.041	*
% Sem verdes	Sem mortas	0.823	0.001	**
% Sem verdes	C pl	-0.659	0.003	*
% Sem verdes	C raiz	-0.677	0.002	*
% Sem verdes	C PA	-0.385	0.114	ns
% Sem verdes	Ms pl	-0.824	0.001	**
% Sem verdes	Ms raiz	-0.703	0.001	**
% Sem verdes	Ms PA	-0.777	0.001	**
% Sem verdes	Teor de água	0.123	0.626	ns

r: coeficientes de correlação de Pearson;

p: nível de significância;

ns: não significativo;

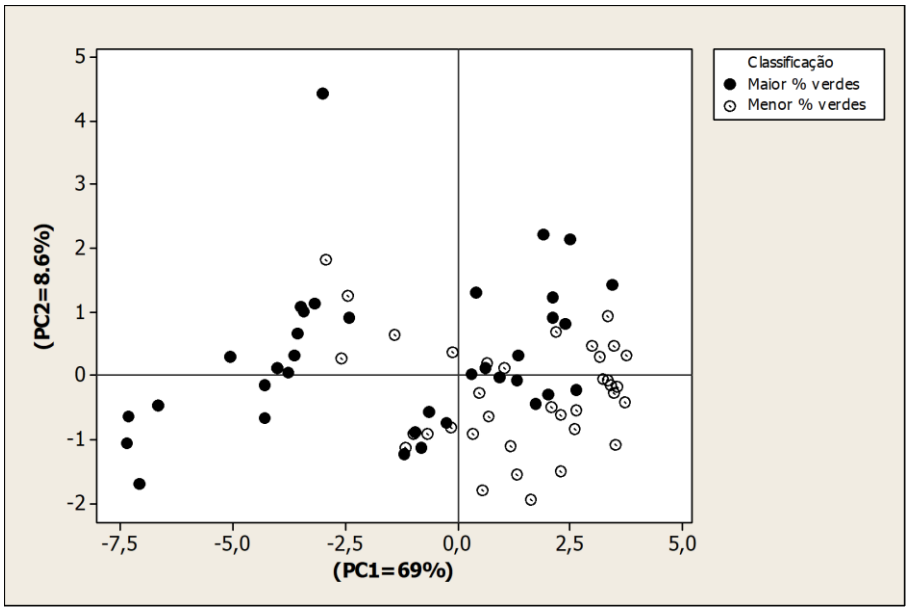
* significativo a 5% de probabilidade;

** significativo a 1% de probabilidade.

Uma visão geral do potencial fisiológico dos lotes classificados como Maior % verdes e Menor % verdes de cada cultivar é apresentada usando uma análise de componentes principais com os parâmetros de qualidade inicial avaliados (germinação e vigor) (Figura 2). É interessante notar a disposição dos lotes ao longo das duas primeiras componentes, que foram escolhidas para análise porque

ofereceram maior influência em suas distinções, modelando respectivamente 69,0 e 8,6% da variância da matriz dos dados (Figura 2). De forma geral, lotes com maior incidência de sementes verdes (Maior % verdes) se apresentam relacionados e agrupados e com posicionamento contrário ao grupo de lotes com menor incidência de sementes verdes (Menor % verdes) (Figura 2). Isto indica variação na qualidade fisiológica entre os lotes, já que a porcentagem de sementes verdes varia no sentido inverso aos parâmetros de germinação e vigor de sementes (Tabela 1). Em alguns momentos verificou-se proximidade entre lotes com classificações distintas, no entanto, deve-se considerar a grande dispersão na variável porcentagem de sementes verdes encontrada entre os lotes avaliados (Quadro 3), o que pode ter resultado nos diferentes efeitos fisiológicos observados.

Figura 2 - Análise de componentes principais da porcentagem de sementes verdes, germinação, T50, plântulas normais, primeira leitura da germinação, plântulas anormais, sementes mortas, comprimento de plântulas, comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, massa seca de plântulas, massa seca de raiz e massa seca de parte aérea dos lotes classificados como Maior % verdes (9 lotes x 4 repetições) e Menor % verdes (9 lotes x 4 repetições) das diferentes cultivares



Com base nos resultados obtidos pela análise de componentes principais, os respectivos autovalores e porcentagens de variância explicada e acumulada por cada

um estão apresentados na Tabela 2. Algumas variáveis foram selecionadas para uma avaliação mais apurada dos dados e maior entendimento das informações relevantes ao problema estudado (Figura 3). Diante de sua contribuição na primeira componente foram selecionadas as variáveis: plântulas normais (PC1 0.310), sementes mortas (PC1 -0.310) e massa seca de plântulas (PC1 0.308) (Tabela 2). E, considerando a influência na caracterização fisiológica das sementes, foram selecionadas as variáveis: porcentagem de sementes verdes, germinação e comprimento de plântulas.

Tabela 2 - Variáveis porcentagem de sementes verdes (% Sem verdes), germinação (Germ), T50 (T50), plântulas normais (Pl n), primeira leitura da germinação (1ª leitura), plântulas anormais (Pl an), sementes mortas (Sem mortas), comprimento de plântulas (C pl), comprimento de raiz (C raiz), comprimento de parte aérea (C PA), massa seca de plântulas (Ms pl), massa seca de raiz (Ms raiz) e massa seca de parte aérea (Ms PA), autovalores, variação explicada e acumulada ao longo das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2)

Variável	Componentes	
	PC1	PC2
% Sem verdes	-0.271	0.244
Germ	0.269	-0.168
T50	-0.258	0.022
Pl n	0.310	-0.258
1ª leitura	0.306	-0.214
Pl an	-0.218	0.438
Sem mortas	-0.310	0.052
C pl	0.288	0.438
C raiz	0.286	0.234
C PA	0.213	0.565
Ms pl	0.308	0.100
Ms raiz	0.254	-0.062
Ms PA	0.289	0.159
Autovalores	8.9695	1.1150
Variação explicada	0.690	0.086
Variação acumulada	0.690	0.776

As variáveis mais influentes na distinção entre os lotes de Maior % verdes e Menor % verdes de cada cultivar são apresentadas de forma individual na Figura 3. Como esperado, todas as cultivares apresentaram diferença estatística significativa quanto a porcentagem de sementes verdes dos lotes avaliados (Figura 3A). Nesse

sentido, os efeitos da maior porcentagem de sementes verdes são muito claros nos lotes das cultivares 71MF00 RR, NS 5959 IPRO e NA 5909 RG, onde todos os parâmetros de qualidade inicial avaliados foram comprometidos influenciando de forma negativa a germinação e o vigor das sementes (Figura 3A-F). O mesmo ocorreu para a cultivar DM2367, com exceção do comprimento de plântulas (Figura 3E).

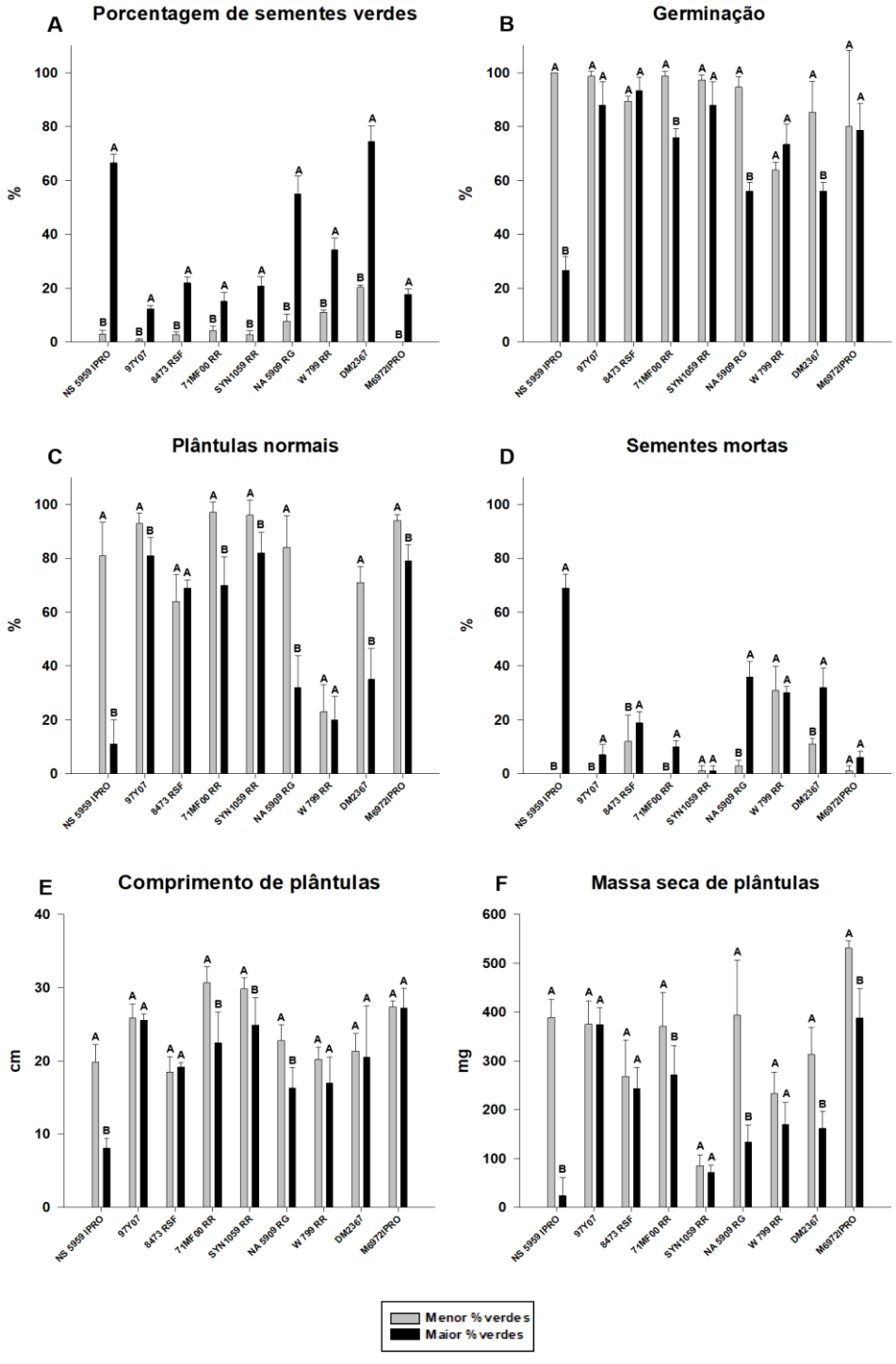
Observa-se que as cultivares 97Y07, SYN1059 RR e M6972IPRO, apesar de não serem afetadas em sua germinação nos lotes classificados como Maior % verdes (Figura 3B), não apresentaram capacidade de desenvolver plântulas normais (Figura 3C). Consequentemente, o comprimento de plântulas (Cultivar SYN1059 RR, Figura 3E), a massa seca de plântulas (Cultivar M6972IPRO, Figura 3F) e a porcentagem de sementes mortas (Cultivar 97Y07, Figura 3D) também foram afetados nos lotes com a maior incidência de sementes verdes.

Apesar do impacto da porcentagem de sementes verdes sobre a mortalidade das sementes (Figura 3A e F), os lotes da cultivar 8473 RSF não apresentaram diferenças quanto ao seu potencial fisiológico considerando o restante das sementes viáveis, já que as características de germinação e vigor (plântulas normais, comprimento de plântulas e massa seca de plântulas) não foram influenciadas pela maior incidência de sementes verdes no lote (Figura 3C, E e F). Nesse aspecto, é relevante considerar que o teor de clorofila presente nas sementes consideradas verdes pode ser diferente entre elas e entre os lotes, o que pode ter resultado na morte das sementes que, possivelmente, apresentaram maiores teores de clorofila.

Quando se analisa a cultivar W 799 RR observa-se que, independente da porcentagem de sementes verdes dos lotes (Figura 3A), não foi possível constatar diferenças significativas quanto a germinação e vigor das sementes. Provavelmente, isso se deve ao fato de que ambos os lotes (Maior % verdes e Menor % verdes) apresentaram elevados níveis de deterioração (Figura 3B-F) que podem ter sido promovidos por outros fatores durante a fase de produção no campo, colheita ou pós-colheita, não sendo possível constatar a influência causada pela maior porcentagem de sementes verdes nos lotes em questão.

Figura 3 - Valores médios de porcentagem de sementes verdes (A), germinação (B), plântulas normais (C), sementes mortas (D), comprimento de plântulas (E) e massa seca de plântulas (F) dos lotes classificados

como Maior % verdes (preto) e Menor % verdes (cinza) das cultivares NS 5959 IPRO, 97Y07, 8473 RSF, 71MF00 RR, SYN1059 RR, NA 5909 RG, W 799 RR, DM2367 e M6972IPRO. Cada tratamento consistiu de quatro repetições de 25 sementes (n=100). Barras de erros representam os desvios padrão e médias seguidas por letras diferentes diferem entre si dentro da cultivar pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade



1.4 DISCUSSÃO

A qualidade fisiológica das sementes refere-se a germinação, vigor e longevidade, que regem a capacidade teórica das sementes em expressar suas funções vitais sob condições favoráveis e desfavoráveis no meio ambiente (BEWLEY et al., 2013), sendo considerada uma característica complexa (HILHORST; TOOROP, 1997). Em nosso estudo, a utilização de diversos parâmetros relacionados a qualidade fisiológica inicial (germinação e vigor) possibilitou avaliar correlações próximas entre a porcentagem de sementes verdes e outras variáveis, observar uma visão global do potencial fisiológico dos lotes classificados como Maior % verdes e Menor % verdes e, após a seleção de variáveis mais influentes, comparar de forma individual os lotes selecionados de cada cultivar.

O teor de clorofila em sementes de soja é determinado pelo genótipo e sofre uma variação significativa entre as cultivares (PÁDUA et al., 2009b). Esse nível pode ser afetado pelo estádio de maturação, condições de secagem ou condições ambientais que podem interferir durante o processo de maturação das sementes, como seca e temperaturas extremamente altas (SINNECKER, 2002; HÖRTENSTEINER; KRÄUTLER, 2000; TEIXEIRA et al., 2016). Pádua et al. (2009a) relataram a produção de sementes de soja verde variando de 9% a 86%, dependendo da gravidade do estresse imposto. Estes fatos confirmam a influência das diferentes condições ambientais nos locais de produção diretamente relacionada com condições de estresses em que se encontravam as cultivares na ocasião de sua produção (Figura 1). Além disso, podem explicar a grande variação na porcentagem de sementes verdes e, consequentemente, na qualidade fisiológica encontrada entre os lotes das cultivares avaliadas (Quadro 3, Figura 2, Figura 3 e Tabela 2).

A alta qualidade das sementes de soja tem sido atribuída à ocorrência de condições climáticas ótimas durante a maturação das sementes, como temperaturas amenas e alta disponibilidade hídrica durante a fase de deposição de reservas (GIBSON; MULLEN, 1996; EGLI et al., 2005). Para alcançar grandes produtividades, a soja necessita de uma disponibilidade hídrica em torno de 450 a 800 mm durante seu ciclo, com temperaturas variando entre 20 a 30 °C, além de boa radiação solar para o crescimento e produção (EMBRAPA SOJA, 2011). No Brasil, as grandes variações edafoclimáticas nas regiões produtoras de soja resultadam em estresses

abióticos que afetam drasticamente a produção (HIRAKURI, 2016). Neste sentido, é interessante observar na Figura 1 as influências das diferentes condições ambientais durante a safra 2014/2015 nos estados de produção dos lotes de sementes de soja avaliados. De forma geral, os estados da região Sul (Paraná e Santa Catarina) apresentaram temperaturas máximas entre 25 e 30 °C entre os meses de cultivo da soja (outubro a maio), enquanto que, os estados da região Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso) apresentaram temperaturas máximas entre 30 e 35 °C, além de maiores temperaturas mínimas, máximas e médias quando comparados com os estados da região Sul (Figura 1). Além disso, é possível observar grandes oscilações quanto a precipitação pluvial em todos os estados avaliados na época em questão (Figura 1).

De fato, diferente da região Sul, a região Centro-Oeste tem sido mencionada por alta incidência de estresse por calor (altas temperaturas) e seca (precipitação irregular) (HIRAKURI, 2016) e por grande ocorrência de sementes verdes presentes no lote de sementes de soja (FRANÇA-NETO et al., 2005; ZORATO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2016). No entanto, pode-se verificar que o problema está expandindo para novas regiões, já que é possível observar ocorrência de retenção de clorofila em sementes de soja produzidas na região Sul (Paraná e Santa Catarina), mesmo que com intensidades diferentes e independente do histórico de risco climático do estado (Quadro 2 e 3).

O efeito esperado na redução da qualidade fisiológica em sementes de soja como resultado da maior presença de sementes verdes no lote (PÁDUA et al., 2007; ZORATO et al., 2007; CICERO et al., 2009; FRANÇA-NETO et al., 2012) também foi observado nos dados aqui analisados. Mesmo considerando a grande variabilidade de genótipos, ambientes de produção e porcentagens de sementes verdes avaliadas, o efeito negativo da maior incidência de sementes verdes na qualidade fisiológica inicial é muito claro nos lotes avaliados (Tabela 1, Figura 2 e Figura 3).

Um dos padrões exigidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na produção de sementes para uso em propagação de plantas diz respeito a porcentagem mínima de germinação (formação de plântulas normais) que um lote de sementes deve possuir para que esteja adequado à comercialização, sendo essa porcentagem de 80% para soja (BRASIL, 2004). A maioria dos lotes classificados como Maior % verdes apresentaram capacidade de germinação comprometida e não atingiram a porcentagem mínima de germinação estabelecida

pela legislação (Ver plântulas normais em Figura 2C). A influência negativa da porcentagem de sementes verdes do lote na germinação das sementes de soja também foi observada por outros autores (PÁDUA et al., 2007; ZORATO et al., 2007; PÁDUA et al., 2009a; RANGEL et al., 2011; FRANÇA-NETO et al., 2012). E, ressaltando que os lotes aqui avaliados apresentaram mais de 9% de sementes verdes, nossos dados confirmam os achados de Pádua et al. (2007), que afirmam que níveis superiores a 9% de sementes de verdes comprometem o potencial fisiológico de lotes de sementes de soja.

O vigor das sementes é a soma das propriedades que determinam a atividade e o desempenho de lotes de sementes com germinações aceitáveis em uma ampla gama de condições ambientais (ISTA, 2015). A utilização de sementes com essas propriedades é essencial em regiões tropicais como a maioria das regiões produtoras de soja no Brasil, onde alguns fatores como altas temperaturas e precipitação irregular são considerados preponderantes para a produção. O vigor em sementes de soja se relaciona com o seu desempenho no campo (VIEIRA et al., 1999; HYATT et al., 2007) e, com a evidência de nossos dados, fica comprovado que lotes de sementes com maior porcentagem de sementes verdes apresentam vigor severamente reduzido (Tabela 1, Figura 1 e Figura 2).

Independente da cultivar ou da região de produção, as sementes oriundas de lotes classificados como Maior % verdes necessitaram de maior tempo para completar a germinação e há falta de uniformidade nesse processo (Ver T50 e primeira leitura da germinação em Tabela 1). A uniformidade no processo de germinação e emergência de plântulas determina uma vantagem obtida pelas primeiras plântulas emergentes em relação a absorção da radiação solar que interceptam (EGLI, 1993; POMMEL et al., 2002). Esta vantagem resulta em maiores taxas de crescimento das plantas em comparação com aquelas que emergiram tardiamente e, posteriormente, podem se traduzir em maior número de sementes e maior rendimento por planta (EGLI, 1993; VEGA et al., 2001).

O estabelecimento bem-sucedido de plântulas é o primeiro passo crítico para a produção agrícola e determina o sucesso ou o fracasso da futura colheita (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). A utilização de sementes de alta qualidade garante o surgimento rápido e uniforme de plântulas vigorosas da cultivar desejada assegurando um alto desempenho da planta e qualidade do produto colhido (MARCOS FILHO,

2015). Em certo, a presença de sementes verdes no lote compromete o desenvolvimento de plântulas (Figura 2C, E e F) e este fato indica que a utilização de lotes com maior incidência de sementes verdes oferece riscos quanto a qualidade e produtividade esperadas pelos produtores.

A produção de sementes de soja de qualidade elevada demanda altos investimos já que depende da adoção de técnicas especiais (FRANÇA NETO et al., 2007; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). Algumas dessas técnicas seguem os mesmos princípios e procedimentos adotados na produção agrícola comercial para grãos, mas os cuidados e o nível tecnológico dirigidos à produção de sementes são mais apurados, já que o material produzido se destina a produção de novas plantas e não apenas para o consumo direto ou indireto. Diante disso, é fácil entender que a baixa viabilidade inicial verificada em lotes com maior incidência de sementes verdes (Ver sementes mortas em Figura 2D) pode causar prejuízos consideráveis aos produtores de sementes. Algo similar foi verificado por Pádua et al. (2007) e Zorato et al. (2007) que observaram que lotes com altas porcentagens de sementes verdes apresentam acentuada deterioração e redução da viabilidade.

Uma visão geral do potencial fisiológico dos lotes com diferentes porcentagens de sementes verdes foi apresentada por uma análise de componentes principais (Figura 2). Pode-se verificar grande variação na qualidade fisiológica entre lotes que se diferenciaram quanto a porcentagem de sementes verdes, independente da cultivar ou da região de produção, lotes com maior porcentagem de sementes verdes possuem sua qualidade fisiológica reduzida e diferem substancialmente daqueles com menor porcentagem (Tabela 1, Figura 2 e Figura 3), mostrando-se inadequados ao uso pelos agricultores como também foi observado por Pádua et al. (2007) e Zorato et al. (2007).

A redução da qualidade fisiológica das sementes em função da ocorrência de sementes verdes no lote foi observada em lotes em exposição a temperaturas máximas superiores as indicadas para a cultura (acima de 30° C) na região Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso), e em exposição a temperaturas máximas consideradas dentro do limite indicado para a cultura (entre 20 e 30º C) na região Sul (Paraná) (Figura 1, Quadro 3 e Figura 3). Nesse contexto, além da influência genotípica, é possível afirmar que, embora existam indicações de regiões mais adequadas a produção de sementes de soja devido a menor exposição aos riscos climáticos, a

retenção de clorofila também pode ser associada a questões pontuais como condições locais específicas que influenciam na maturação das sementes.

Em posse de uma grande variabilidade de genótipos, ambientes de produção e tipos de manejo, uma caracterização da qualidade fisiológica das sementes de soja foi realizada diante da variação na porcentagem de sementes verdes do lote, oferecendo uma análise geral do problema em questão. Embora a influência negativa da porcentagem de sementes verdes do lote sobre a qualidade fisiológica das sementes de soja já tenha sido avaliada anteriormente (PÁDUA et al., 2007; ZORATO et al., 2007; PÁDUA et al., 2009a; RANGEL et al., 2011; FRANÇA-NETO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2016), os dados aqui apresentados confirmam que os produtores rurais continuam expostos a este problema já que os lotes de sementes aqui avaliados foram produzidos em condições reais de cultivo por produtores rurais (condições não controladas) e podem ser de grande importância para a comunidade técnica e científica. Além disso, observou-se que, embora existam indicações de regiões mais adequadas a produção de sementes de soja devido a menor exposição aos riscos climáticos, a retenção de clorofila também pode ser associada a questões pontuais como condições locais específicas que influenciam na maturação das sementes.

1.5 CONCLUSÃO

Independente da cultivar ou da região de produção, lotes com maior porcentagem de sementes verdes possuem menor qualidade fisiológica.

REFERÊNCIAS

AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Embrapa Informática Agropecuária, 2018. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>. Acesso em: 05 abri. 2018.

BEWLEY J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy.** 3. ed. New York: Springer, 2013. 408 p.

BORRMANN, D. et al. Chemical and biochemical characterization of soybean produced under drought stress. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 676-681, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação brasileira sobre sementes e mudas.** Lei nº 10.711 de 05 de agosto de 2003; Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004/MAPA, SNPC. Brasília: MAPA/SNPC, 2004. 122 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras Para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009.

CICERO, S. M.; SCHOOR, R. V. D.; JALINK, H. Use of chlrophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 145-151, 2009.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, v. 5, n. 5, 2018. Disponível em: file:///C:/Users/Daiani/Downloads/Boletim_Graos_fevereiro_2018.pdf. Acesso em: 05 maio 2018.

EGLI, D. B. Relationship of uniformity of soybean seedling emergence to yield. **Journal of Seed Technology***,* v. 17, n. 1, p. 22–28, 1993.

EGLI, D. B. et al. Air Temperature During Seed Filling and Soybean Seed Germination and Vigor. **Crop Science**, Lexington, v. 45, n. 4, p.1329-1335, 2005.
EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2011.** Londrina: Embrapa Soja, 255p. (Sistemas de Produção n.14), 2011.

FERREIRA P. V. **Estatística experimental aplicada à Agronomia.** Maceió: EDUFAL, 2000, 422 p.

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

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico - Série Sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2012. 15 p. (Circular Técnica, 40).

FRANÇA-NETO, J. B.; et al. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 38).

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Tecnologia de produção de sementes de soja de alta qualidade - Série Sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Circular Técnica, 40).

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade.** Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p. (Documentos, 380).

GIBSON, L. R.; MULLER, R. E. Soybean seed quality reductions by high day and night temperature. **Crop Science**, Lexington, v. 36, p.1615-1691, 1996.

HENNING, A. A. et al. **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2015/16.** Londrina: Embrapa Soja, 2017. 227 p. (Documentos, 393).

HILHORST, H. W. M.; TOOROP, P. E. Review on dormancy, germinability, and germination in crop and weed seeds. **Advances in Agronomy**, Maryland Heights, v. 61, p. 111-165, 1997.

HIRAKURI, M. H. **Impactos econômicos de estresses na produção de soja da safra 2015/16.** Londrina: Embrapa Soja, 2016. 8 p. (Circular Técnica, 125).

HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown in oilseed rape. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Hague, v. 64, p. 137–146, 2000.

HYATT, J. et al. Soil compaction and soybean seedling emergence. **Crop Science**, Lexington, v. 47, n. 6, p. 2495–2503, 2007.

ISTA. **International rules for seed testing.** Basserdorf, Switzerland: International Seed Testing Association, 2015.

JOOSEN, R. V. L. et al. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 148-159, 2010.

KRZYZANOWSKI, F. C. et al. **A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades - Série sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2008. 8 p. (Circular Técnica, 55).

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

PÁDUA, G. P. et al. Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 150–159, 2009a.

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

PÁDUA, G. et al. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 112–120, 2007.

POMMEL, B. D. et al. Influence of delayed emergence and canopy skips on the growth and development of maize plants: a plant scale approach with CERES-Maize. **European Journal of Agronomy**, v. 16, p. 263–277, 2002.

RANGEL et al. Presença e qualidade de sementes esverdeadas de soja na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientiarum**. **Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 127-132, 2011.

SINNECKER, P. et al. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3961–3966, 2002.

TEIXEIRA, R. N. et al. Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. **BMC Plant Biology**, London, v. 1, p. 16–37, 2016.

VEGA, C. R. C. et al. Determination of seed number in soybean, sunfl ower and maize. **Crop Science**, Lexington, v. 41, p. 748–754, 2001.

VIEIRA, R. D.; PAIVA, J. A.; PERECIN, D. Electrical conductivity and field performance of soybean seeds. **Seed Technology**, v. 21, p. 15–24, 1999.

ZORATO, M. F. et al. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 11–19, 2007.

CAPÍTULO 2

ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES EM SEMENTES DE SOJA COM RETENÇÃO DE CLOROFILA

RESUMO

A degradação de clorofila é um passo importante durante a maturação de sementes de soja, pois sua retenção afeta a germinação e o vigor das sementes. A maior parte da produção de soja no Brasil se encontra em áreas tropicais do país, mais propensas à ocorrência de estresse por calor e seca e, portanto, de retenção de clorofila nas sementes. Estudos recentes identificaram distúrbios na expressão de genes de enzimas do catabolismo de clorofila e de genes *STAY-GREEN* na retenção de clorofila em sementes estressadas de soja. Novas investigações considerando condições reais de cultivo, maior variabilidade de genótipos e ambientes de produção podem fornecer um diagnóstico importante sobre a atual exposição dos produtores da área a este problema. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da retenção de clorofila sobre a qualidade inicial (germinação e vigor) e expressão de genes relacionados com esse fenômeno em sementes de soja, considerando influências ambientais e genéticas. Lotes de sementes de soja que apresentaram sementes verdes, de cultivares produzidas em condições reais de cultivo por produtores da área (condições não controladas) em diferentes cidades do Brasil na safra 2014/2015, foram organizados em duas combinações (Influência Ambiental e Influência Genotípica) e, após a classificação e divisão em amostras de sementes verdes e amarelas, foram avaliados quanto a porcentagem de sementes verdes, conteúdo de clorofila, germinação, vigor e expressão de genes associados a retenção de clorofila (*D1*, *D2*, *PPH2* e *NYC1_1*). Foi possível observar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes com retenção de clorofila apresentaram menor germinação, vigor e expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2.*

Palavras-chave: Sementes verdes. Germinação. Vigor. Expressão gênica.

ABSTRACT

Chlorophyll degradation is an important step during the maturation of soybean seeds, since its retention affects seed germination and vigor. Most of the soybean production in Brazil is found in tropical areas of the country, which are more prone to the occurrence of heat and dry stress and, therefore, to chlorophyll retention in seeds. Recent studies have identified disturbances in the expression of genes of enzymes from chlorophyll catabolism and *STAY-GREEN* genes in the chlorophyll retention in stressed soybean seeds. New investigations considering real growing conditions, greater variability of genotypes and production environments can provide important diagnosis about the current exposure of producers to this problem. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of chlorophyll retention on the initial quality (germination and vigor) and expression of genes related to this phenomenon in soybean seeds, considering environmental and genetic influences. Soybean seed lots that presented green seeds of cultivars produced under real cultivation conditions by producers (uncontrolled conditions) in different municipalities of Brazil in the 2014/2015 harvest season were organized in two combinations (Environmental Influence and Genotypic Influence) and after classification and division into green and yellow seed samples, lots were evaluated regarding the percentage of green seeds, chlorophyll content, germination, vigor and expression of genes associated with chlorophyll retention (*D1, D2, PPH2* and *NYC1_1*). Regardless of cultivar or production environment, seeds with chlorophyll retention showed lower germination, vigor and expression of *D1, D2* and *PPH2* genes.

Keywords: Green seeds. Germination. Vigor. Gene expression.

2.1 INTRODUÇÃO

Embora a degradação de clorofila seja um passo importante e esperado durante a maturação de sementes, sob condições de estresse por calor e seca, na prática, os produtores frequentemente relatam a presença de altas quantidades de clorofilas residuais não degradadas em sementes (MAILER et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2016). Este fenômeno chamado de “problema semente verde” é indesejado pois a retenção

de clorofila leva à redução da qualidade fisiológica das sementes e dos seus produtos relacionados (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com uma produção de 111,56 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (CONAB, 2018) e grande parte dessa produção está diante de condições ambientais estressantes (HIRAKURI, 2016). O processo de degradação da clorofila em sementes muitas vezes permanece incompleto nas etapas finais da maturação devido a alterações nas vias constitutivas de degradação da clorofila causadas por condições ambientais estressantes (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). Teixeira et al. (2016) mostraram que o estresse por calor e seca durante a maturação de sementes de soja resultou em retenção de clorofila e alteração da expressão dos genes *STAY-GREEN 1* e *STAY-GREEN 2 (D1, D2)*, *PHEOPHORBIDASE 2 (PPH2)* e *NON-YELLOW COLORING 1 (NYC1_1)* em sementes de soja de uma cultivar de soja suscetível ao estresse.

O impacto do ambiente na produção das sementes é bem conhecido e, como resultado, localizações geográficas específicas com climas favoráveis são frequentemente selecionadas por empresas comerciais de sementes para ajudar a garantir a produção de sementes de alta qualidade (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). No entanto, considerando as mudanças climáticas globais que estão ameaçando habitats naturais e tornando áreas agrícolas do mundo cada vez mais propensas a extremos climáticos (IPCC, 2014; NOAA, 2016), novas investigações considerando condições reais de cultivo, maior variabilidade de genótipos e ambientes de produção podem fornecer um diagnóstico importante sobre a atual exposição dos produtores rurais ao “problema semente verde”.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da retenção de clorofila na qualidade inicial (germinação e vigor) e na expressão de genes relacionados com esse fenômeno em sementes de soja, considerando influências genéticas e ambientais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal

Os lotes de sementes de soja foram produzidos em condições reais de cultivo por produtores da área (condições não controladas) em diferentes regiões e condições ambientais do Brasil na safra de 2014/2015 e cedidos pela Embrapa Soja/Londrina-PR. No total, foram cedidas nove cultivares (Quadro 1) distribuídas em 37 lotes produzidos em cidades dos estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina.

Quadro 1 - Descrição das cultivares avaliadas e seus respectivos grupos de maturação e hábitos de crescimento

Cultivar	Grupo de maturação	Hábito de crescimento
NS 5959 IPRO	5.9	Indeterminado
97Y07	7.0	Indeterminado
8473 RSF	7.4	Indeterminado
71MF00 RR	7.1	Indeterminado
SYN1059 RR	5.9	Indeterminado
NA 5909 RG	6.9	Indeterminado
W 799 RR	7.7	Indeterminado
6266 RSF IPRO	6.6	Indeterminado
M6972IPRO	6.9	Indeterminado

2.2.2 Teor de água

As sementes de cada lote foram avaliadas quanto ao teor de água por meio de duas amostras, de acordo com o método da estufa a 105 °C ± 3 °C (BRASIL, 2009). Portanto, o tempo de secagem foi de 24 horas, com duas repetições de 25 sementes e os resultados expressos em porcentagem de água.

2.2.3 Porcentagem de sementes verdes

A percentagem de sementes verdes presente nos diferentes lotes foi determinada visualmente utilizando quatro repetições com 100 sementes de cada lote, sendo que com qualquer sinal de pigmentação verde na semente a mesma foi classificada semente “verde”.

2.2.4 Critério de seleção dos lotes e obtenção de sementes verdes e amarelas

Após a determinação da porcentagem de sementes verdes, lotes que apresentaram sementes verdes foram selecionados com a finalidade de avaliar o contraste na qualidade inicial entre sementes verdes e amarelas e realizar a validação

de genes associados a retenção de clorofila, além de avaliar a influência ambiental e genotípica nestes fatores. Para análise da interferência do ambiente, foram selecionados lotes da mesma cultivar produzidos em diferentes municípios e, portanto, em diferentes condições ambientais. Por outro lado, para análise da interferência do genótipo, foram selecionados lotes de diferentes cultivares produzidos na mesma cidade e em condições ambientais similares.

Posteriormente, através de análise visual, as sementes dos lotes selecionados foram classificadas e divididas em amostras de sementes verdes, quando apresentaram qualquer sinal de pigmentação verde na semente, e amostras de sementes amarelas, quando não apresentaram sinal de pigmentação verde na semente.

2.2.5 Quantificação de clorofila

As amostras com quatro repetições de 25 sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados foram liofilizadas e moídas até obtenção de um pó fino para a quantificação de clorofila a e b por cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography-HPLC). Ambos os padrões de clorofila a e b foram adquiridos pela Sigma (USA). Todos os solventes utilizados foram de nível HPLC.

As extrações de clorofilas foram realizadas sob luz verde de acordo com Teng e Chen (1999), com adaptações. As amostras de sementes secas de 0,5 g foram colocadas em tubo Falcon de 15 ml, ao qual foram adicionados 3 ml de metanol. A mistura foi homogeneizada em vortex durante 1 minuto e mantida por 1 hora a 10°C no escuro. Em seguida, a mistura foi novamente homogeneizada em vortex durante 1 minuto e centrifugada a 3000 g (4° C) durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo Falcon, a solução foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 µm para HPLC e colocada num frasco âmbar para injeção imediata subsequente.

Para as análises de clorofila por HPLC foram realizadas separações analíticas em uma coluna Shimadzu Shim-Pack GIST (150x2,1 mm - número de série 17C00967). Os pigmentos foram eluídos usando um gradiente linear em 15 minutos, com um sistema de dois solventes: metanol: acetato de amônio (80:20 v/v) e metanol: acetona (80:20 v/v). O volume de injeção foi de 25 µl. O detector de fluorescência (Shimadzu RF-10XL) foi operado a uma excitação de 440 nm, uma emissão de 660

nm e uma taxa de fluxo de 0,8 ml/min (ALMELA et al., 2000). As curvas de calibração foram feitas de 0,01 a 5,0 mg/l para ambas as clorofilas. Alta linearidade foi obtida com coeficientes de correlação de 0,99. As clorofilas a e b foram então quantificadas usando as respectivas curvas de calibração.

2.2.6 Qualidade inicial das sementes

Após a devida seleção, a qualidade inicial de sementes foi avaliada através de parâmetros de germinação e vigor conforme a descrição abaixo.

Germinação: a avaliação da germinação foi realizada com três repetições de 25 sementes, usando rolos de papel toalha do tipo germitest, umedecidos com água destilada e mantidos em câmara de germinação a 25°C no escuro por oito dias (BRASIL, 2009). A porcentagem de germinação foi contabilizada diariamente contando a protrusão da radícula, quando a radícula possuía mais de 2 milímetros de comprimento.

Plântulas normais e anormais: a formação de plântulas normais e anormais foi avaliada após oito dias de embebição, utilizando parâmetros de características de plântulas como descrito em Brasil (2009).

Sementes mortas: as sementes foram consideradas mortas quando, ao final do teste de germinação, não germinaram e apresentaram tecidos coalescentes.

Comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas: o comprimento de plântulas normais foi medido após oito dias de embebição. Três repetições de dez plântulas foram utilizadas neste teste. O comprimento médio da raiz, parte aérea e da plântula foi calculado em centímetros para cada repetição.

Massa seca de plântulas: após a determinação do comprimento, as plântulas foram colocadas para secar em estufa com circulação de ar a 80 °C durante 24 horas e calculou-se o peso médio em miligramas das plântulas de cada repetição.

2.2.7 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel) em três repetições, utilizando sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados com 25 sementes inteiras de cada

amostra biológica (repetição). A integridade do RNA foi avaliada por análise em um gel de agarose a 1%, e a qualidade e a concentração da amostra de RNA foram adicionalmente avaliadas usando um Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

2.2.8 Validação de genes associados a retenção de clorofila

Os genes associados a retenção de clorofila foram validados por meio de quantificação da expressão gênica relativa nas sementes classificadas como verdes e amarelas de lotes de sementes de soja produzidos em diferentes regiões e condições ambientais do Brasil. Concentramo-nos em genes relacionados à fotossíntese e aos genes que codificam enzimas envolvidas na via de degradação de clorofila, portanto, intimamente relacionados aos fenômenos da retenção de clorofila que foram indicados por Fang et al. (2014) e validados no estudo de Teixeira et al. (2016). A lista de genes validados neste estudo, usando análise de RT-qPCR, pode ser encontrada no Quadro 1.

2.2.9 Quantificação da expressão relativa por PCR (RT-qPCR)

O RNA utilizado para análise da expressão gênica por RT-qPCR foi extraído de amostras de sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados. O cDNA foi então sintetizado usando o “kit” High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystens) de acordo com o protocolo do fabricante. O iQ-SYBRGreen-Supermix (Bio-Rad) foi utilizado para a análise da expressão de genes em uma máquina MyIQ RT-qPCR (Bio-Rad) ou LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma) para a análise em um sistema Eco Real-Time PCR (Illumina).

O programa RT-qPCR para ambas as máquinas consistiu em um primeiro passo a 95°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os *primers* utilizados (Quadro 1) foram de preferência desenhados na extremidade 3' do fim da transcrição e, se possível, abrangendo uma borda de intrão-exão. O Tm dos primers estava entre 58 e 62ºC exceto alguns primers com Tm ligeiramente inferior. De forma rotineira, uma análise da curva de *melting* foi realizada após a execução do qPCR (entre 55 e 95ºC com incrementos de 0,5ºC cada 10

segundos). Para todos os *primers*, observou-se um único pico, confirmando a síntese de um único produto.

A eficiência dos *primers* foi calculada realizando uma série de diluição de 10X e a inclinação da curva padrão foi traduzida em um valor de eficiência. Todos os *primers* mostraram eficiências entre 90 e 110%. Os valores de Ct obtidos no software iQ5 (Bio-Rad) foram analisados com qBase+ (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica). Os valores Ct obtidos a partir do software Eco Real-Time (Illumina) foram analisados pelo software excel pelo método ΔΔCt. Os dados de RT-qPCR de cada gene de interesse foram normalizados contra os dois genes de referência mais estáveis, escolhidos como descrito abaixo.

2.2.10 Identificação de genes de referência

A identificação de genes de referência, adequados para normalização de dados de RT-qPCR, foi feita com base nos conjuntos de dados de três estudos com microarranjos: Teixeira et al., (2016), Hudson (2010) e Asakura et al., (2012) (GEO Series ID GSE70999, GSE18827 e GSE26443, respectivamente). Os genes *Prot* e *60S* foram usados para a normalização dos dados de expressão RT-qPCR neste estudo (Quadro 2).

Quadro 1 - Sequências de *primers* usados para o estudo dos genes alvos

Gene		Forward	Reverse	Referência
D1	Glyma01g42390	CAAGGAAGAGAGTGAGCAAGA	CACTGAATTGGGCTTAACGTC	Fang et al. (2014)
D2	Glyma11g02980	CACTCCTAAGAACAAAACCTTCAGT	TTTTCCCTACTGTGGAAGACGG	Fang et al. (2014)
PPH_2	Glyma11g16070	GCTGCCAAGTTGTGAACTCA	AATCTCACAGGCGCACATGC	Fang et al. (2014)
NYC1_1	Glyma07g09430	TCGGGAGTTTCTTCTTTCTGGA	ACAAACATCACAAGCAATGCCTACA	Fang et al. (2014)

Quadro 2 - Sequências de *primers* usados para o estudo dos genes de referência

Primer	Anotação	Gene	Forward	Reverse	Comprimento do fragmento
Prot	Proteasoma	Glyma06g08260	CACCAACACACGATACAACT	TCCCAACCACCAACAATTAACC	122
60S	60S	Glyma15g42620	AGGCAGAGAAGGAGGAGAA	AAAGAAAACCTAGCACCCAAG	133

2.2.11 Análises estatísticas

As análises de componentes principais foram realizadas usando software Minitab 16. Além disso, foi realizada análise de variância e, quando efeitos significativos foram detectados (P<0,05), a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional SISVAR. Para os dados de expressão gênica, as médias foram comparadas pelo teste t-Student a 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Seleção dos lotes para avaliação da qualidade inicial das sementes e validação de genes associados a retenção de clorofila

No Quadro 3 é possível encontrar os lotes das cultivares 6266 RSF IPRO (dois lotes), 97Y07 (três lotes), 8473 RSF (três lotes), 71MF00 RR (três lotes), W 799 RR (três lotes), SYN1059 RR (quatro lotes), NS 5959 IPRO (seis lotes), NA 5909 RG (cinco lotes) e M6972 IPRO (oito lotes), resultando no total de 37 lotes avaliados. Além disso, observa-se o local de produção (cidade e estado), teor de água e a porcentagem de sementes verdes dos lotes. Os valores de teor de água oscilaram entre 7,9 e 15,5%, enquanto que os valores referentes a porcentagem de sementes verdes apresentaram variação de zero a 74,5% entre os lotes das cultivares avaliadas (Quadro 3).

Quadro 3 - Cultivar, local de produção, teor de água (%) e sementes verdes (%) dos lotes avaliados

Lote	Cultivar	Local de produção	Teor de água (%)	Sementes verdes (%)
1	6266 RSF IPRO	Planaltina-GO	9,4	20,2
2	6266 RSF IPRO	Cristalina-GO	8,1	74,5
3	97Y07	Sítio D'Abadia-GO	8,9	0,7
4	97Y07	Niquelândia-GO	9,2	0,7
5	97Y07	Cristalina-GO	8,7	12,2
6	8473 RSF	Rio Verde-GO	10,1	2,7
7	8473 RSF	Paraúna-GO	8,9	22,0
8	8473 RSF	Rio Verde-GO	8,7	22,0

9	71MF00 RR	Ipameri-GO	9,8	4,2
10	71MF00 RR	Cristalina-GO	8,6	6,5
11	71MF00 RR	Cristalina-GO	8,4	15,2
12	W 799 RR	Rio Verde-GO	10,0	11,0
13	W 799 RR	Paraúna-GO	8,7	23,7
14	W 799 RR	Rio Verde-GO	10,1	34,2
15	SYN1059 RR	Cristalina-GO	7,9	2,7
16	SYN1059 RR	Ipameri-GO	9,4	3,5
17	SYN1059 RR	Cristalina-GO	9,0	12,0
18	SYN1059 RR	Cristalina-GO	8,3	20,7
19	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	9,8	3,0
20	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	9,3	4,7
21	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	15,5	5,7
22	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	11,1	17,5
23	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	12,0	33,5
24	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	12,0	66,5
25	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	10,5	7,5
26	NA 5909 RG	Rio Verde-GO	9,7	7,7
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	10,6	22,5
28	NA 5909 RG	Paraúna-GO	8,6	38,0
29	NA 5909 RG	Paraúna-GO	8,4	55,0
30	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	9,0	0,0
31	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	9,3	0,2
32	M6972IPRO	Juscimeira-MT	8,6	12,0
33	M6972IPRO	Juscimeira-MT	8,5	13,7
34	M6972IPRO	Juscimeira-MT	9,3	14,2
35	M6972IPRO	Juscimeira-MT	9,03	16,5
36	M6972IPRO	Juscimeira-MT	8,9	17,5
37	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	8,7	17,7

Seguindo o critério de seleção (Ver item 2.2.4), para avaliar o contraste na qualidade inicial entre sementes verdes e amarelas e realizar a validação de genes associados a retenção de clorofila, do total de 37 lotes, divididos em 9 cultivares (Quadro 3), foram selecionados 5 lotes, divididos em 3 cultivares, com presença de sementes verdes produzidos em diferentes cidades e condições ambientais (Quadro 4). Os teores de água das sementes dos lotes selecionados variaram de 9,0 a 9,7%, enquanto que, as porcentagens de sementes verdes variaram de 22,0 a 55,0% (Quadro 4).

Quadro 4 - Cultivar, local de produção, teor de água (%) e sementes verdes (%) dos lotes selecionados para avaliação da qualidade inicial e validação de genes associados a retenção de clorofila em sementes verdes e amarelas

Lote	Cultivar	Local de produção	Teor de água (%)	Sementes Verdes (%)
7	8473 RSF	Paraúna-GO	9,0	22,0
8	8473 RSF	Rio Verde-GO	9,3	22,0
23	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	9,7	33,5
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	9,5	22,5
29	NA 5909 RG	Paraúna-GO	9,1	55,0

Através de análise visual, as sementes dos lotes selecionados foram classificadas e divididas em amostras de sementes verdes e amarelas (Figura 1-5).

Figura 1 - Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar 8473 RSF produzidas em Paraúna-GO (Lote 7)

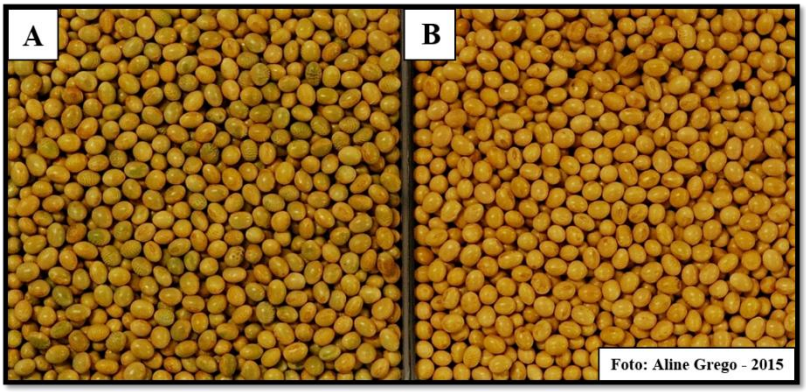


Figura 2 – Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar 8473 RSF produzidas em Rio Verde-GO (Lote 8)

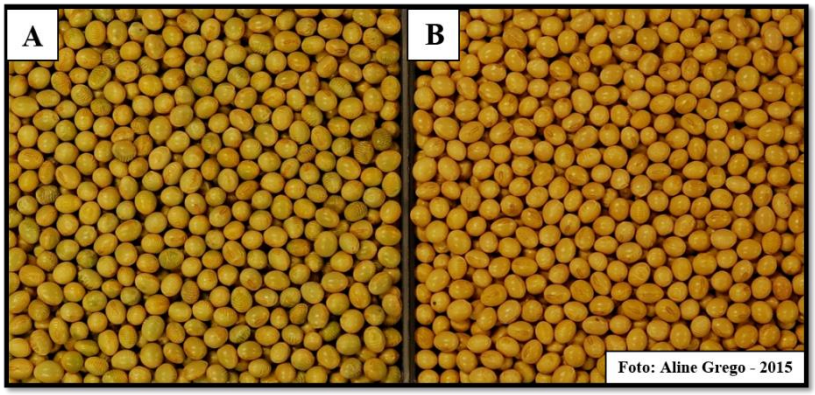


Figura 3 - Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar NS 5959 IPRO produzidas em Ubiratã-PR (Lote 23)

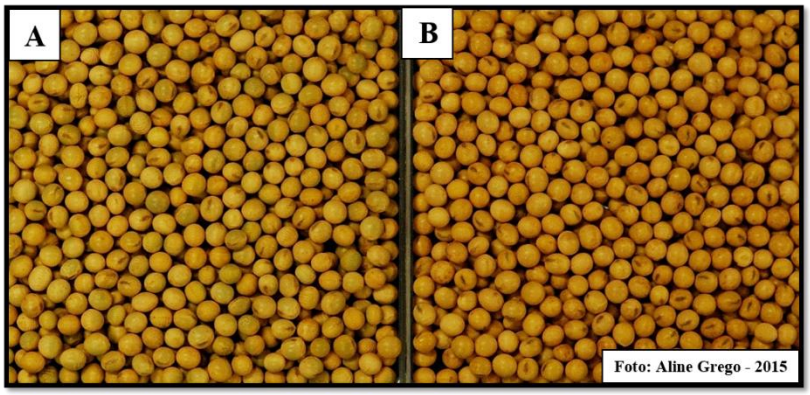


Figura 4 - Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar NA 5909 RG produzidas em Ubiratã-PR (Lote 27)

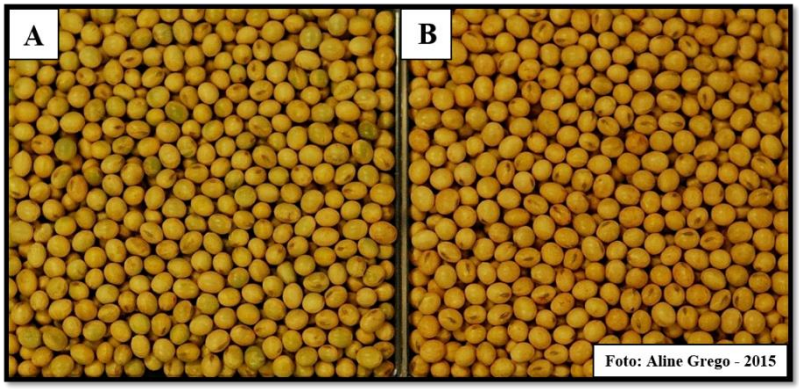
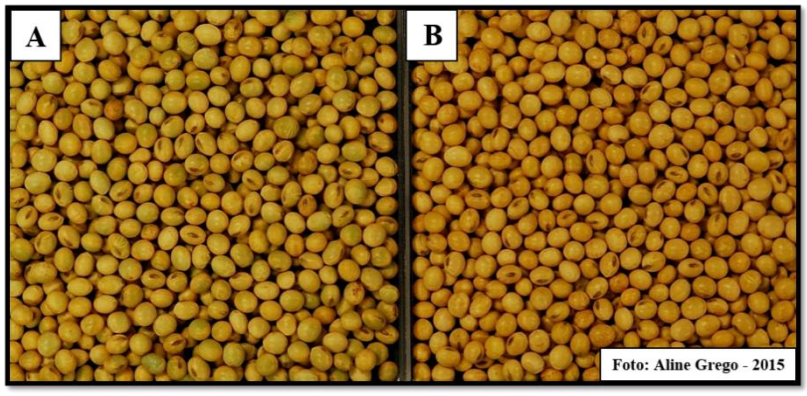


Figura 5 - Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar NA 5909 RG produzidas em Paraúna-GO (Lote 29)



Para avaliar a influência ambiental e genotípica na qualidade inicial de sementes verdes e amarelas e realizar a validação de genes associados a retenção

de clorofila nos lotes selecionados, duas combinações entre os lotes foram realizadas (Quadro 5 e 6).

Para análise da influência do ambiente de produção (Combinação 1) foram selecionadas a cultivar 8473 RSF, com lotes produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8), e a cultivar NA 5909 RG, com lotes produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29) (Quadro 5). Nessa combinação, avaliando-se o mesmo genótipo, pode-se verificar a interferência das condições ambientais das diferentes cidades de produção nas características avaliadas.

Quadro 5 - Cultivar, local de produção e classificação de cor da semente dos lotes selecionados para avaliação da Influência Ambiental (Combinação 1) na germinação e vigor de sementes verdes e amarelas e na validação de genes associados a retenção de clorofila

Influência Ambiental (Combinação 1)				
Lote	**Cultivar**	**Local de produção**	**Classificação**	
7	8473 RSF	Paraúna-GO	Verdes	Amarelas
8		Rio Verde-GO	Verdes	Amarelas
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	Verdes	Amarelas
29		Paraúna-GO	Verdes	Amarelas

Por outro lado, para avaliar a influência do genótipo (Combinação 2), uma nova combinação foi realizada utilizando lotes produzidos na cidade de Paraúna-GO, das cultivares NA 5909 RG (Lote 29) e 8473 RSF (Lote 7) e na cidade de Ubiratã-PR, das cultivares NA 5909 RG (Lote 27) e NS 5959 IPRO (Lote 23) (Quadro 6). Na combinação em questão, avaliando-se a mesma cidade de produção e condições ambientais similares, pode-se verificar a interferência dos diferentes genótipos nas características avaliadas.

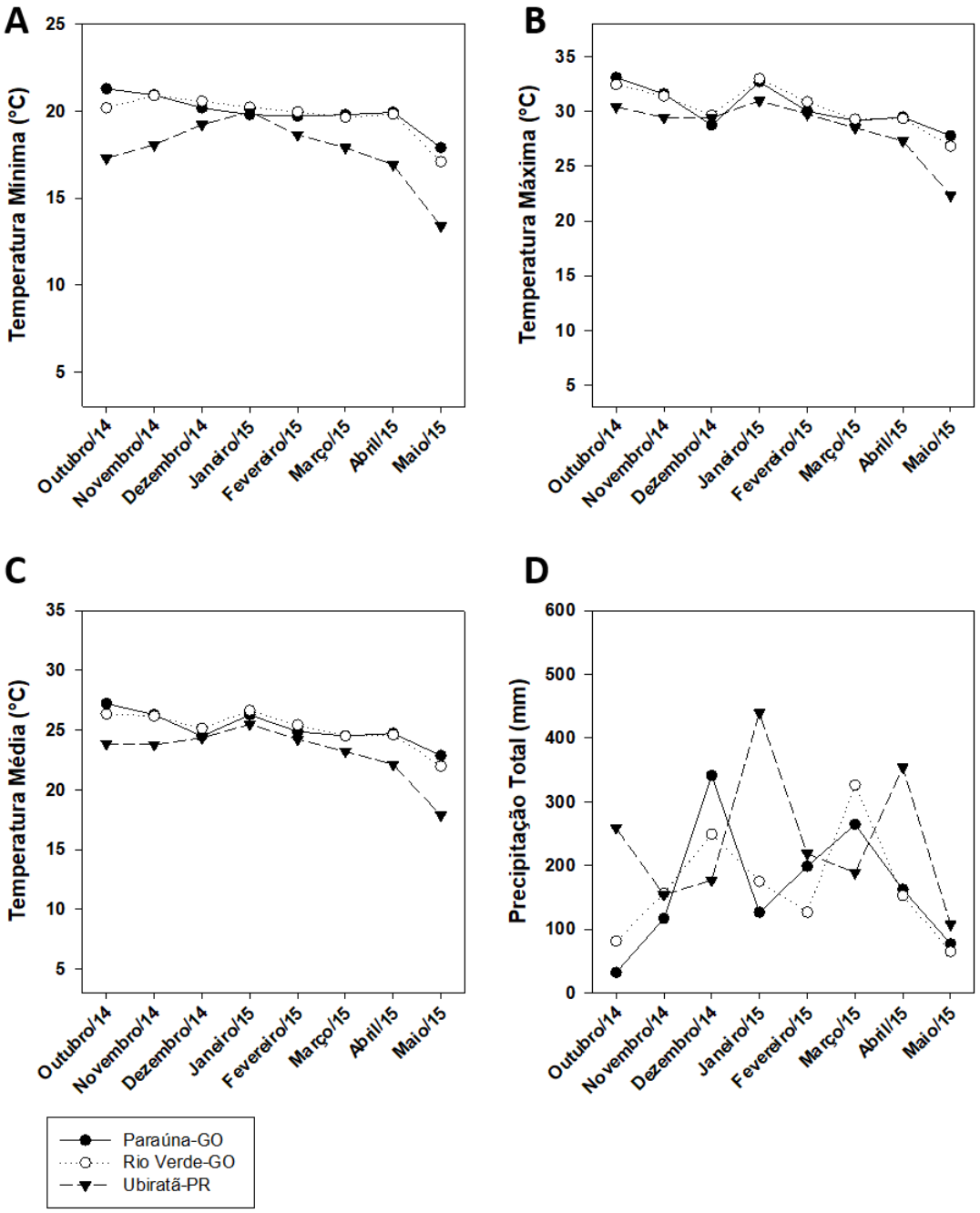
Quadro 6 - Local de produção, cultivar e classificação de cor da semente dos lotes selecionados para avaliação da Influência Genotípica (Combinação 2) na germinação e vigor de sementes verdes e amarelas e na validação de genes associados a retenção de clorofila

Influência Genotípica (Combinação 2)				
Lote	**Local de produção**	**Cultivar**	**Classificação**	
7	Paraúna-GO	8473 RSF	Verdes	Amarelas
29		NA 5909 RG	Verdes	Amarelas
23	Ubiratã-PR	NS 5959 IPRO	Verdes	Amarelas
27		NA 5909 RG	Verdes	Amarelas

2.3.2 Condições climáticas de cultivo

A Figura 6 mostra a temperatura mínima, máxima e média e a precipitação pluvial total nos municípios de produção dos lotes de sementes de soja avaliados, durante os meses de outubro de 2014 a maio de 2015 para referência das condições climáticas durante o ciclo das plantas de soja.

Figura 6 – Médias de temperaturas mínima, máxima e média e precipitação pluvial total mensal durante os meses de outubro de 2014 a maio de 2015 nos municípios de Paraúna-GO, Rio Verde-GO e Ubiratã-PR



Fonte: Agritempo - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (2018).

2.3.3 Influência ambiental e genotípica na porcentagem de sementes verdes

Influências ambientais na porcentagem de sementes verdes dos lotes selecionados foram avaliadas (Combinação 1, Figura 7). Não foram observadas

diferenças significativas na porcentagem de sementes verdes dos lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8) (Figura 7A). No entanto, para cultivar NA 5909 RG, maior porcentagem de sementes verdes foi verificada em lotes produzidos em Paraúna-GO (Lote 29) (Figura 7B). Influências do material genético na porcentagem de sementes verdes foram avaliadas (Combinação 2, Figura 8). Em Paraúna-GO, maior porcentagem de sementes verdes foi verificada em lotes da cultivar NA 5909 RG (Figura 8A) e em Ubiratã-PR, maior porcentagem foi verificada em lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) (Figura 8B).

Figura 7 - Influência ambiental (Combinação 1) na porcentagem de sementes verdes de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8) (A) e da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29) (B). Cada tratamento consistiu de quatro repetições de 25 sementes (n=100). Barras de erros representam os desvios padrão e médias seguidas por letras diferentes diferem entre si dentro da cultivar pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

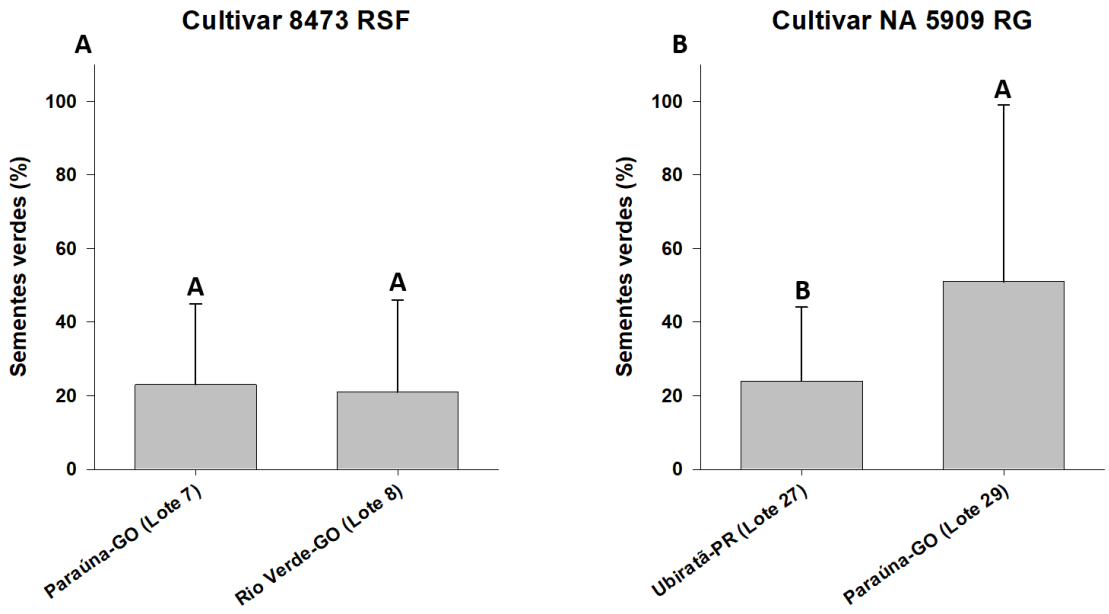
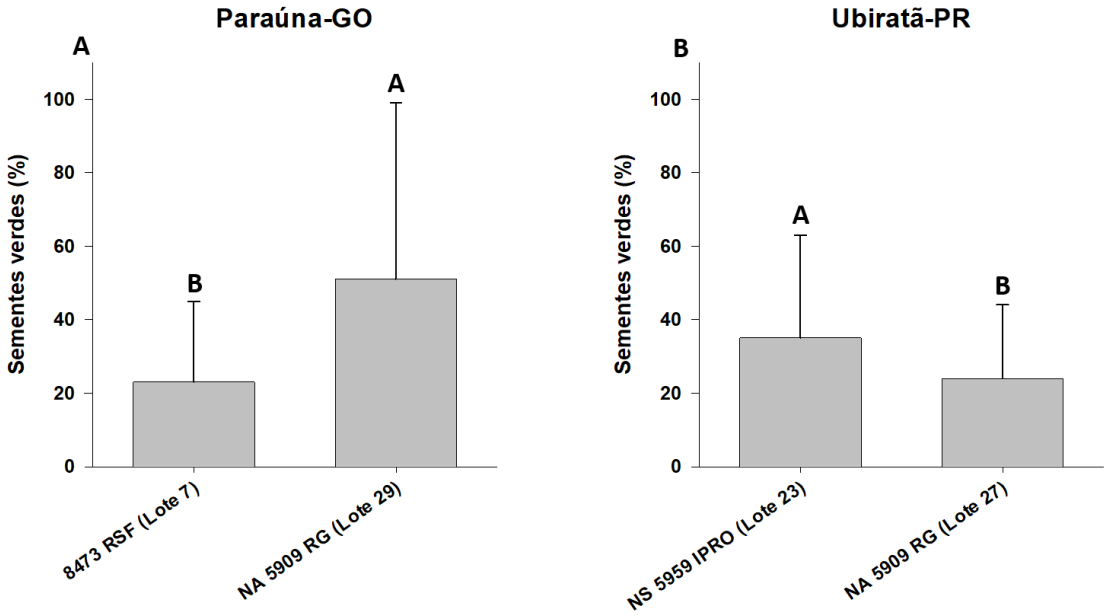


Figura 8 - Influência genotípica (Combinação 2) na porcentagem de sementes verdes de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidos em Paraúna-GO (A) e de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) e produzidos em Ubiratã-PR (B). Cada tratamento consistiu de quatro repetições de 25 sementes (n=100). Barras de erros representam os desvios padrão e médias seguidas por letras diferentes diferem entre si dentro da cultivar pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade



2.3.4 Influência ambiental e genotípica no conteúdo de clorofila

O conteúdo de clorofila a (Cl a) e clorofila b (Cl b) em sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados para avaliação da qualidade inicial e expressão de genes associados a retenção de clorofila foram determinados por HPLC (Tabela 1-4).

Nas Tabelas 1 e 2 são dispostos os resultados relativos a influência do ambiente (Combinação 1) de diferentes locais de produção no conteúdo de clorofila (Cl a e b) de sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Tabela 1) e NA 5909 RG (Tabela 2).

Na Tabela 1 foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para a cultivar 8473 RSF nos conteúdos

de Cl a e b. Os resultados de Cl a e b dentro de ambos os locais de produção diferiram significativamente entre sementes verdes e amarelas, sendo que as sementes verdes apresentaram os maiores resultados. Considerando a interação local de produção dentro de cada classificação de cor, foi constatado maior retenção de Cl a e b em sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 7).

Tabela 1 - Influência ambiental (Combinação 1) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Paraúna-GO (Lote 7)	10,27 Aa	0,08 Ab	5,17	6,01 Aa	0,14 Ab	3,07
Rio Verde-GO (Lote 8)	3,67 Ba	0,10 Ab	1,88	1,67 Ba	0,15 Ab	0,91
Médias	6,97	0,09	3,52	3,84	0,15	1,99
CV (%)	7,92			10,94		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Para a cultivar NA 5909 RG (Tabela 2), foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para a variável Cl a, onde foi verificado maior conteúdo do pigmento em sementes verdes dentro de ambos os locais de produção. Tendo em vista o desdobramento da interação local de produção dentro das classificações de cor, foi encontrado maior conteúdo de Cl a em sementes verdes de lotes produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27). Não foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação da semente para a variável Cl b, mas efeitos isolados das classificações de cor foram observados, em média, sementes verdes apresentaram maior retenção de Cl b quando comparadas com as amarelas.

Tabela 2 - Influência ambiental (Combinação 1) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	3,99 Aa	0,10 Ab	2,04	1,43	0,16	0,79 A
Paraúna-GO (Lote 29)	3,71 Ba	0,21 Ab	1,96	1,96	0,18	1,07 A
Médias	3,85	0,15	2,00	1,70 a	0,17 b	0,93
CV (%)	5,42			45,91		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Nas Tabelas 3 e 4 são dispostos os resultados relativos a influência do genótipo (Combinação 2) de diferentes cultivares no conteúdo de clorofila (Cl a e b) de sementes verdes e amarelas de lotes produzidos em Paraúna-GO (Tabela 3) e Ubiratã-PR (Tabela 4).

Conforme os resultados no conteúdo de Cl a e b da Tabela 3, foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente em lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidas em Paraúna-GO. Os resultados de Cl a e b de ambas as cultivares diferiram significativamente entre sementes verdes e amarelas, sendo que as sementes verdes apresentaram os maiores resultados. Referente ao desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor, maior retenção de Cl a e b foi verificada em sementes verdes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) na cidade em questão.

Tabela 3 - Influência genotípica (Combinação 2) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) e produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	10,2 Aa	0,08 Ab	5,17	6,01 Aa	0,14 Ab	3,07
NA 5909 RG (Lote 29)	3,71 Ba	0,21 Ab	1,96	1,96 Ba	0,18 Ab	1,07
Médias	6,99	0,14	3,56	3,98	0,16	2,07
CV (%)	8,14			10,87		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente para as variáveis Cl a e b foram constatados em lotes de cultivares produzidas em Ubiratã-PR (Tabela 4). Ambas as cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NS 5959 IPRO (Lote 23) apresentaram maior retenção de Cl a e b em sementes classificadas como verdes. Além disso, em sementes verdes da cultivar NA 5909 RG (Lote 27) observou-se maior conteúdo de Cl a e menor de Cl b, analisando o desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor da semente.

Tabela 4 - Influência genotípica (Combinação 2) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) e produzidos em Ubiratã-PR

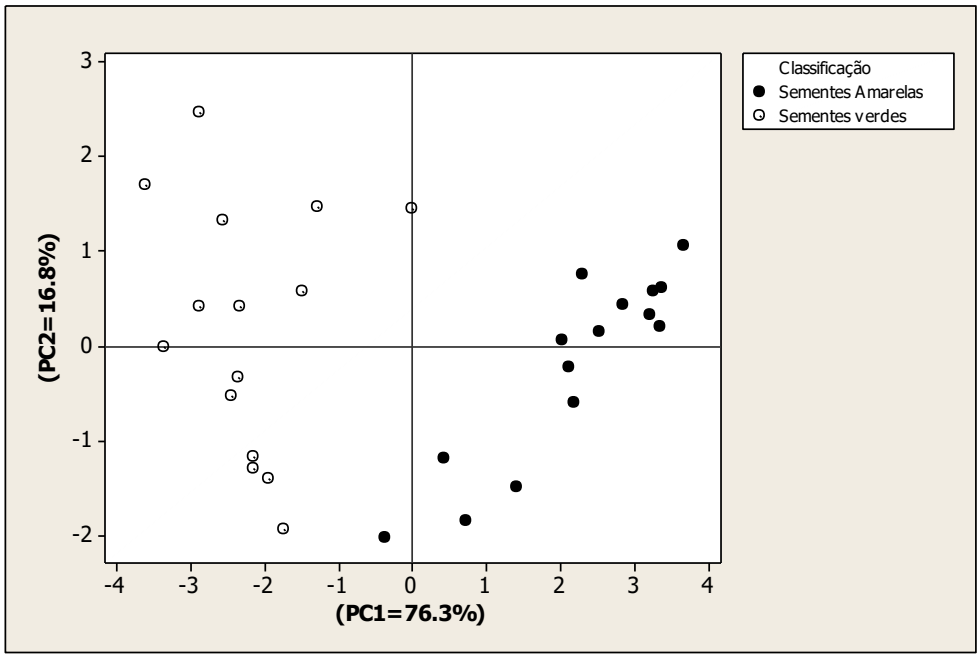
Cultivar	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	3,12 Ba	0,09 Ab	1,60	2,84 Aa	0,20 Ab	1,52
NA 5909 RG (Lote 27)	3,99 Aa	0,10 Ab	2,04	1,43 Ba	0,16 Ab	0,79
Médias	3,55	0,09	1,82	2,14	0,18	1,15
CV (%)	4,23			36,75		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

2.3.5 Qualidade inicial das sementes

Uma visão geral do potencial fisiológico de sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados de cada cultivar é apresentada usando uma análise de componentes principais com os parâmetros de germinação, viabilidade e vigor de sementes (Figura 9). É possível notar a disposição das amostras ao longo das duas primeiras componentes, que foram escolhidas para análise porque ofereceram maior influência em suas distinções, modelando respectivamente 76,3 e 16,8% da variância da matriz dos dados (Figura 9). De forma geral, sementes classificadas como verdes se apresentam relacionados e agrupados e com posicionamento contrário ao grupo de sementes classificadas como amarelas (Figura 9). Isto indica variação na qualidade fisiológica entre as amostras.

Figura 9 - Análise de componentes principais da germinação, plântulas normais, plântulas anormais, sementes mortas, comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas de sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados das diferentes cultivares (5 lotes x 3 repetições x 2 classificações de cor)



A qualidade inicial de sementes verdes e amarelas de lotes do mesmo genótipo produzidos em locais diferentes (Combinação 1) são apresentadas nas Tabelas 5 e 6.

Levando-se em conta o ambiente de produção dos lotes da cultivar 8473 RSF (Tabela 5), foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para a cultivar 8473 RSF quando esta foi produzida em Paraúna-GO e Rio Verde-GO para os parâmetros germinação, plântulas normais e sementes mortas. Em ambos os locais de produção, foi observado menor germinação, plântulas normais e maior mortalidade em sementes verdes. Além disso, analisando o desdobramento dos locais de produção dentro da classificação de cor da semente, sementes verdes apresentaram menor germinação, plântulas normais e maior mortalidade quando produzidas em Paraúna-GO (Lote 7). Efeitos isolados foram constatados para as variáveis plântulas anormais, comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas, e massa seca de plântulas, onde sementes verdes apresentaram os menores resultados médios, com exceção da formação de plântulas anormais.

Soma-se a isso efeitos isolados do local de produção, já que é possível observar maior comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas em resultados médios de sementes (verdes e amarelas) produzidas em Paraúna-GO (Lote 7) (Tabela 5).

Considerando a influência ambiental na qualidade inicial de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG (Tabela 6), foi verificado comportamento diferencial por conta da interação dos fatores Local de produção x Classificação de cor da semente para as variáveis comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas. Sementes verdes da cultivar NA 5909 RG apresentaram menores resultados quando comparadas com as amarelas em ambos os municípios avaliados. E quando se avalia local de produção, sementes amarelas produzidas em Ubiratã-PR exibiram maiores resultados quanto as variáveis citadas (Lote 27). Ausência de significância da interação foi verificada para germinação, plântulas normais, plântulas anormais, sementes mortas e massa seca de plântulas, no entanto, os resultados médios indicam maior germinação, plântulas normais e matéria seca de plântulas originadas de sementes amarelas, além de menor plântulas anormais e mortalidade (Tabela 6).

Nas Tabelas 7 e 8 são dispostos os resultados relativos a influência do genótipo (Combinação 2) de diferentes cultivares na qualidade inicial de sementes verdes e amarelas de lotes produzidos em Paraúna-GO (Tabela 7) e Ubiratã-PR (Tabela 8).

Analisando os resultados dispostos na Tabela 7, não foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente em lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidas em Paraúna-GO para as variáveis analisadas. Segundo os resultados médios, menor germinação, plântulas normais, comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas foi observado em sementes verdes, além de maior mortalidade. Efeitos isolados das cultivares dentro da classificação de cor podem ser observados quando dados médios da cultivar NA 5909 RG (Lote 29) foram inferiores quanto ao comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas (Tabela 7).

Na Tabela 8 verifica-se que foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente nas variáveis germinação, plântulas anormais, sementes mortas, comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas para as cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG

(Lote 27) produzidas em Ubiratã-PR. De forma geral, independente da cultivar, as sementes verdes dos lotes avaliados exibiram menor germinação, plântulas anormais, comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas. Referente ao desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor, menor germinação e maior mortalidade foram observadas em sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23). Maior desenvolvimento de plântulas anormais, menor comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas também foram verificados em sementes amarelas desta cultivar (Lote 23). Não foram constatados efeitos significativos da interação para a variável plântulas normais, no entanto, os dados médios demonstraram que sementes verdes apresentaram menor formação de plântulas normais, assim como as sementes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) (Tabela 8).

Tabela 5 - Influência ambiental (Combinação 1) na qualidade fisiológica (germinação, plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas) e nos parâmetros de vigor (comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas) de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	Germinação (%)**			Plântulas normais (%)**			Plântulas anormais (%)*			Sementes mortas (%)**		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Paraúna-GO (Lote 7)	36,00 Bb	97,33 Aa	66,66	21,33 Bb	84,00 Aa	52,66	16,00	13,33	14,66 B	62,66 Aa	2,66 Ab	32,66
Rio Verde-GO (Lote 8)	60,00 Ab	94,66 Aa	77,33	36,00 Ab	78,66 Aa	57,33	24,00	16,00	20,00 A	40,00 Ba	5,33 Ab	22,66
Médias	48,00	96,00	72,00	28,66	81,33	54,99	20,00 a	14,66 b	17,33	51,33	4,00	27,66
CV (%)		10,64			10,07			40,52			28,00	

Local de produção	Comprimento de raiz (cm)*			Comprimento de parte aérea (cm)*			Comprimento de plântulas (cm)*			Massa seca de plântulas (mg)*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Paraúna-GO (Lote 7)	7,48	14,36	10,92 A	9,85	16,41	13,13 A	17,33	30,77	24,05 A	0,06	0,37	0,22 A
Rio Verde-GO (Lote 8)	0,00	12,68	6,34 B	0,00	10,85	5,42 B	0,00	23,53	11,76 B	0,01	0,28	0,15 B
Médias	3,74 b	13,52 a	8,63	4,92 b	13,63 a	9,27	8,66 b	27,15 a	17,90	0,04 b	0,33 a	0,18
CV (%)		29,31			18,77			22,15			15,30	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 6 - Influência ambiental (Combinação 1) na qualidade fisiológica (germinação, plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas) e nos parâmetros de vigor (comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas) de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	Germinação (%)*			Plântulas normais (%)*			Plântulas anormais (%)*			Sementes mortas (%)*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	49,33	94,66	72,00 A	25,33	81,33	53,33 A	24,00	13,33	18,66 A	50,66	5,33	28,00 A
Paraúna-GO (Lote 29)	37,33	94,66	66,00 A	20,00	77,33	48,66 A	18,66	17,33	18,00 A	61,33	5,33	33,33 A
Médias	43,33 b	94,66 a	69,00	22,66 b	79,33 a	50,99	21,33 a	15,33 b	18,33	56,00 a	5,33 b	30,66
CV (%)		15,70			20,00			46,28			32,83	

Local de produção	Comprimento de raiz (cm)*			Comprimento de parte aérea (cm)**			Comprimento de plântulas (cm)*			Massa seca de plântulas (mg)*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	0,00 Ab	15,25 Aa	7,62	0,00 Ab	13,29 Aa	6,64	0,00 Ab	28,53 Aa	14,26	0,04	0,35	0,20 A
Paraúna-GO (Lote 29)	0,50 Ab	10,97 Ba	5,73	1,50 Ab	8,96 Ba	5,23	2,00 Ab	19,93 Ba	10,96	0,01	0,27	0,14 B
Médias	0,25	13,11	6,68	0,75	11,12	5,93	1,00	24,23	12,61	0,02 b	0,31 a	0,17
CV (%)		16,79			28,43			17,23			17,57	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 7 - Influência genotípica (Combinação 2) na qualidade fisiológica (germinação, plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas) e nos parâmetros de vigor (comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas) de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) e produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	Germinação (%)*			Plântulas normais (%)*			Plântulas anormais (%)			Sementes mortas (%)*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	36,00	97,33	66,66 A	21,33	84,00	52,66 A	16,00	13,33	14,66	62,66	2,66	32,66 A
NA 5909 RG (Lote 29)	37,33	94,66	66,00 A	20,00	77,33	48,66 A	18,66	17,33	18,00	61,33	5,33	33,33 A
Médias	36,66 b	96,00 a	66,33	20,66 b	80,66 a	50,66	17,33	15,33	16,33	62,00 a	4,00 b	33,00
CV (%)		15,95			19,60			53,27			29,90	

Cultivar	Comprimento de raiz (cm)*			Comprimento de parte aérea (cm)*			Comprimento de plântulas (cm)*			Massa seca de plântulas (mg)*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	7,48	14,36	10,92 A	9,85	16,41	13,13 A	17,33	30,77	24,05 A	0,06	0,37	0,22 A
NA 5909 RG (Lote 29)	0,50	10,97	5,73 B	1,50	8,96	5,23 B	2,00	19,93	10,96 B	0,01	0,27	0,14 B
Médias	3,99 b	12,66 a	8,32	5,67 b	12,69 a	9,18	9,66 b	25,35 a	17,50	0,03 b	0,32 a	0,18
CV (%)		31,53			19,70			23,23			13,51	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 8 - Influência genotípica (Combinação 2) na qualidade fisiológica (germinação, plântulas normais, plântulas anormais e sementes mortas) e nos parâmetros de vigor (comprimento de raiz, parte aérea e de plântulas e massa seca de plântulas) de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) e produzidos em Ubiratã-PR

Cultivar	Germinação (%)**			Plântulas normais (%)*			Plântulas anormais (%)*			Sementes mortas (%)**		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	13,33 Bb	82,66 Aa	48,00	0,00	48,00	24,00 B	12,00 Ab	34,66 Aa	23,33	88,00 Aa	17,33 Ab	52,66
NA 5909 RG (Lote 27)	49,33 Ab	94,66 Aa	72,00	25,33	81,33	53,33 A	24,00 Aa	13,33 Ba	18,66	50,66 Ba	5,33 Ab	28,00
Médias	31,33	88,66	60,00	12,66 b	64,66 a	38,66	18,00	24,00	21,00	69,33	11,33	40,33
CV (%)		10,72			16,08			31,10			17,18	

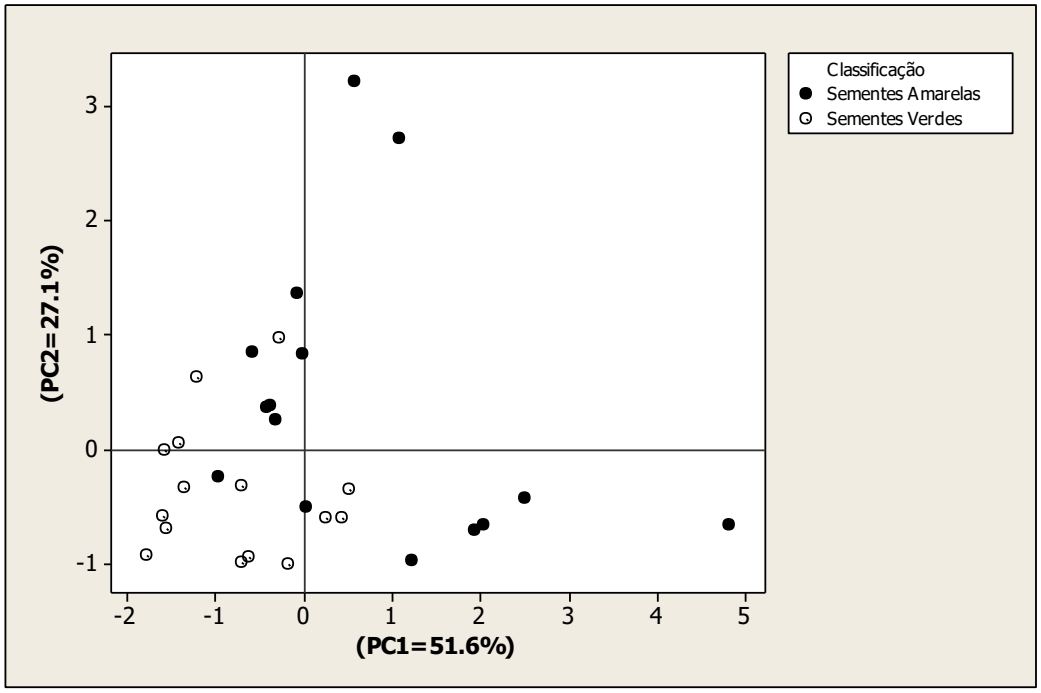
Cultivar	Comprimento de raiz (cm)*			Comprimento de parte aérea (cm)*			Comprimento de plântulas (cm)*			Massa seca de plântulas (mg)*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	0,83 Ab	8,05 Ba	4,44	1,66 Ab	6,71 Ba	4,18	2,50 Ab	14,76 Ba	8,63	0,00 Ab	0,12 Ba	0,06
NA 5909 RG (Lote 27)	0,00 Ab	15,25 Aa	7,62	0,00 Ab	13,29 Aa	6,64	0,00 Ab	28,53 Aa	14,26	0,04 Ab	0,35 Aa	0,20
Médias	0,41	11,65	6,03	0,83	10,00	5,41	1,25	21,64	11,44	0,02	0,23	0,13
CV (%)		30,01			35,20			23,15			27,99	

2.3.6 Validação de genes associados a retenção de clorofila

A validação de genes associados a retenção de clorofila foi realizada por meio de quantificação da expressão relativa dos genes *D1*, *D2*, *PPH2* e *NYC1_1* em sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados (Figura 10 e Tabela 9-12).

Uma visão geral da expressão de genes associados a retenção de clorofila em sementes verdes e amarelas de lotes selecionados de cada cultivar é apresentada usando uma análise de componentes principais com os parâmetros de quantidade relativa normalizada calibrada (CNRQ) para os genes *D1, D2, NYC1-1 e PPH2* (Figura 10). Observa-se a disposição das amostras ao longo das duas primeiras componentes, que foram escolhidas para análise porque ofereceram maior influência em suas distinções, modelando respectivamente 51,6 e 27,1% da variância da matriz dos dados (Figura 10). De forma geral, sementes classificadas como verdes se apresentam relacionadas e agrupadas e com posicionamento contrário ao grupo de sementes classificadas como amarelas (Figura 10) com indicação de variações quanto a expressão dos genes avaliados.

Figura 10 - Análise de componentes principais dos parâmetros de quantidade relativa normalizada calibrada (CNRQ) para os genes *D1, D2, NYC1-1 e PPH2* em sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados das diferentes cultivares (5 lotes x 3 repetições x 2 classificações de cor)



Nas Tabelas 9 e 10 são dispostos os resultados relativos a influência do ambiente (Combinação 1) de diferentes locais de produção na expressão relativa dos genes avaliados (*D1*, *D2*, *NYC1_1* e *PPH2*) em sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Tabela 9) e NA 5909 RG (Tabela 10).

Para a cultivar 8473 RSF (Tabela 9), não foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente na expressão relativa dos genes avaliados (*D1*, *D2*, *NYC1_1* e *PPH2*). No entanto, efeitos isolados foram observados quanto a classificação de cor da semente, onde os valores médios indicaram que sementes classificadas como verdes, quando comparadas com as amarelas, apresentaram menor expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2*. Além disso, para o gene *D1,* efeitos isolados foram observados quanto ao local de produção, já que os valores médios demonstraram que, quando produzidas em Paraúna-GO, as sementes apresentaram menor expressão relativa desse gene (Tabela 9).

Não foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente em lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29) (Tabela 10) para as variáveis

analisadas. Por conta do efeito isolado do fator Classificação de cor da semente, foi verificado, na média, menor expressão relativa dos genes *D1*, *D2* e *PPH2* em sementes verdes. Quanto ao local de produção, em média, menor expressão do gene *NYC1_1* é observada em sementes produzidas em Ubiratã-PR, além de menor expressão do gene *PPH2* em sementes produzidas em Paraúna-GO (Tabela 10).

A expressão relativa dos genes *D1*, *D2*, *NYC1_1* e *PPH2* em sementes verdes e amarelas de lotes de diferentes genótipos produzidos no mesmo local (Combinação 2) é apresentada nas Tabelas 11 e 12.

Em lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidas em Paraúna-GO (Tabela 11), foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente na expressão relativa dos genes *D2* e *PPH2.* Ao avaliar essa interação, foi verificado maior expressão dos genes em questão (*D2* e *PPH2*) em sementes amarelas de ambas as cultivares. Referente ao desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor, maior expressão de *D2* em sementes amarelas foi observada na cultivar 8473 RSF (Lote 7) e, na mesma cultivar, maior expressão de *PPH2* em ambas as sementes (verdes e amarelas). Não foram constatados efeitos significativos da interação na expressão relativa dos genes *D1* e *NYC1_1*, no entanto, segundo os resultados médios, maior expressão de *D1* foi verificada em sementes amarelas e em sementes da cultivar NA 5909 RG (Lote 29) (Tabela 11).

Na Tabela 12 verifica-se que não foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente nas variáveis analisadas para as cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidas em Ubiratã-PR. Por conta do efeito isolado do fator classificação de cor da semente, os valores médios indicaram que sementes classificadas como verdes apresentaram menor expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2* quando comparadas com as amarelas. Quando se observa o fator cultivar, na média, maior expressão foi encontrada em sementes da cultivar NA 5909 RG (Lote 27) na expressão dos genes *D1* e *D2* (Tabela 12).

Tabela 9 - Influência ambiental (Combinação 1) na análise da expressão de genes por RT-qPCR representada como a quantidade relativa normalizada calibrada (CNRQ) para os genes *D1, D2, NYC1-1 e PPH2* em sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	D1*			D2*			NYC1-1			PPH2**		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Paraúna-GO (Lote 7)	0,34	0,52	0,43 B	0,59	1,59	1,09 A	0,68	0,70	0,69	1,24	2,31	1,78 A
Rio Verde-GO (Lote 8)	0,49	0,61	0,55 A	0,86	1,68	1,27 A	0,77	0,79	0,78	1,75	2,91	2,33 A
Médias	0,41 b	0,57 a	0,49	0,72 b	1,64 a	1,18	0,73	0,74	0,73	1,49 b	2,61 a	2,05
CV (%)		10,53			29,54			17,94			37,68	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de T a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 10 - Influência ambiental (Combinação 1) na análise da expressão de genes por RT-qPCR representada como a quantidade relativa normalizada calibrada (CNRQ) para os genes *D1, D2, NYC1-1 e PPH2* em sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	D1**			D2*			NYC1-1*			PPH2*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	0,75	1,08	0,91 A	0,54	0,78	0,66 A	0,50	0,45	0,47 B	0,88	1,58	1,23 A
Paraúna-GO (Lote 29)	0,57	1,02	0,79 A	0,49	0,94	0,72 A	0,74	1,13	0,94 A	0,42	0,80	0,61 B
Médias	0,66 b	1,05 a	0,85	0,52 b	0,86 a	0,69	0,62 a	0,79 a	0,70	0,65 b	1,19 a	0,92
CV (%)		28,66			15,01			30,57			15,40	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de T a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 11 - Influência genotípica (Combinação 2) na análise da expressão de genes por RT-qPCR representada como a quantidade relativa normalizada calibrada (CNRQ) para os genes *D1, D2, NYC1-1 e PPH2* em sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) e produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	D1**			D2*			NYC1-1			PPH2*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	0,34	0,52	0,43 B	0,59 Ab	1,59 Aa	1,09	0,68	0,70	0,69	1,24 Ab	2,31 Aa	1,78
NA 5909 RG (Lote 29)	0,57	1,02	0,79 A	0,49 Ab	0,94 Ba	0,72	0,74	1,13	0,94	0,42 Bb	0,80 Ba	0,61
Médias	0,45 b	0,77 a	0,61	0,54	1,27	0,90	0,71	0,92	0,81	0,83	1,55	1,19
CV (%)		35,68			13,98			24,95			13,84	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de T a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 12 - Influência genotípica (Combinação 2) na análise da expressão de genes por RT-qPCR representada como a quantidade relativa normalizada calibrada (CNRQ) para os genes *D1, D2, NYC1-1 e PPH2* em sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) e produzidos em Ubiratã-PR

Cultivar	D1*			D2*			NYC1-1			PPH2*		
	Classificação			Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	0,57	0,83	0,70 B	0,39	0,64	0,51 B	0,38	0,56	0,47	0,82	1,45	1,14 A
NA 5909 RG (Lote 27)	0,75	1,08	0,91 A	0,54	0,78	0,66 A	0,50	0,45	0,47	0,88	1,58	1,23 A
Médias	0,66 b	0,95 a	0,80	0,47 b	0,71 a	0,59	0,44	0,50	0,47	0,85 b	1,52 a	1,18
CV (%)		17,76			10,16			19,41			20,62	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de T a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

2.4 DISCUSSÃO

A retenção de clorofila em sementes maduras pode ser considerada como um dos principais fatores que afetam negativamente a produtividade e a qualidade dos produtos relacionados (JALINK et al., 1998; SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2016). Na maioria das vezes, esse fenômeno está associado a fatores ambientais desfavoráveis, como seca e temperaturas extremamente elevadas ou baixas (CHUNG et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2016) que resultam em distúrbios das vias constitutivas da degradação da clorofila nas últimas etapas do processo de maturação (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). De forma mais específica, em sementes oleaginosas, a presença de clorofilas residuais compromete a qualidade inicial das sementes (germinação e o vigor) (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009; CHRIST; HÖRTENSTEINER, 2014; TEIXEIRA et al., 2016). Em nosso estudo, em posse de uma grande variabilidade de genótipos, locais de produção, tipos de manejos e porcentagens de sementes verdes nos lotes, comprovamos os efeitos negativos da retenção de clorofila na qualidade inicial de sementes de soja e realizamos a validação de genes associados a retenção de clorofila. Uma abordagem sobre a influência ambiental e genotípica nestes fatores foi apresentada sob condições de cultivo não controladas para confirmação da persistência do problema de redução de qualidade em sementes verdes de soja, já que em condições de cultivo controladas isto foi recentemente comprovado por Teixeira et al. (2016). Para isso, lotes de sementes de soja que apresentaram sementes verdes, de cultivares produzidas em diferentes locais do Brasil na safra 2014/2015, foram organizados em duas combinações (Influência Ambiental e Influência Genotípica - Quadro 5 e 6) e, após a classificação e divisão em amostras de sementes em verdes e amarelas, foram avaliados quanto a porcentagem de sementes verdes, conteúdo de clorofila, qualidade inicial (germinação e vigor) e expressão de genes associados a retenção de clorofila (*D1*, *D2*, *PPH2* e *NYC1_1*). Foi possível observar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes com retenção de clorofila apresentaram menor germinação, vigor e expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2.*

A clorofila, o pigmento mais abundante na terra, é essencial para absorção de energia luminosa durante a fotossíntese (HÖRTENSTEINER; KRÄUTLER, 2011;

CROCE; VAN AMERONGEN, 2014). Durante a senescência da folha, a primeira alteração observável é o amarelecimento de tecidos verdes resultante de um processo de conversão de clorofila em produtos incolores em uma via catabólica de vários passos (TANAKA; TANAKA, 2011). Durante a fase final da maturação, sob a regulação do hormônio vegetal ácido abscísico (ABA), à medida que as sementes começam a perder sua clorofila, elas iniciam concomitantemente o processo de aquisição de tolerância a dessecação, dormência e longevidade (DELMAS et al., 2013; FINKELSTEIN, 2013; ZINSMEISTER et al., 2016).

As influências ambientais têm se tornado cada vez mais determinantes no sistema de produção agrícola de países tropicais. O aquecimento global está associado ao aumento da ocorrência de seca e altas temperaturas em várias partes do mundo e inclusive no Brasil, o que pode comprometer consideravelmente o sistema agrícola brasileiro (NOAA, 2016). Na cultura da soja, diversos estudos demonstraram a associação entre estresses ambientais durante a formação e maturação e a redução da qualidade das sementes (DORNBOS; MULLEN, 1990; EGLI et al., 2005). Além disso, o problema da retenção de clorofila em sementes de soja é principalmente associado a menor ocorrência de chuvas e altas temperaturas durante a maturação das sementes (TEIXEIRA et al., 2016). Em nossos dados, é possível observar que os locais de produção dos lotes selecionados possivelmente ofereceram condições ambientais estressantes propícias para a produção de sementes verdes (Figura 6), já que as porcentagens de sementes verdes dos lotes variaram entre 22 e 55% (Quadro 4). Verificou-se grandes oscilações quanto a precipitação pluvial total (Figura 6D) e temperaturas máximas superiores as indicadas para a cultura (Figura 6B), acima de 30° C segundo Embrapa Soja (2011), nas cidades de Paraúna-GO e Rio Verde-GO. Além disso, constatou-se retenção de clorofila associada a questões pontuais como condições locais específicas que influenciam na maturação de sementes de Ubiratã-PR, já que temperaturas máximas consideradas dentro do limite indicado para a cultura, entre 20 e 30º C segundo Embrapa Soja (2011), foram observadas no local (Figura 6B). Como esperado, sementes classificadas como verdes apresentaram maior conteúdo de clorofila (Cl a e b), independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados (Tabela 1-4).

A retenção de clorofila em sementes, além dos fatores ambientais, deve-se também a componentes genéticos, uma vez que diferentes cultivares podem ter maior

ou menor sensibilidade às condições de estresse e a formação subsequente de sementes verdes (MAILER et al., 2003; PÁDUA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2016). Influências do material genético na retenção de clorofila de sementes verdes e amarelas foram avaliadas (Combinação 2, Tabela 3 e 4). Em Paraúna-GO, maior retenção de Cl a e b foi verificada em sementes verdes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) (Tabela 3) e em Ubiratã-PR, maior retenção de Cl b foi verificada em sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) (Tabela 4). A retenção de clorofila em decorrência de componentes genéticos e condições de estresse por calor e seca durante a maturação foi recentemente observada em sementes de soja por Teixeira et al. (2016). Sementes de cultivar suscetível ao estresse produziu, sob estresse, um nível significativamente maior de sementes verdes, atingindo 22% de sementes verdes contra 1% produzido pela cultivar tolerante. Além disso, o conteúdo de clorofila da semente (Cl a e b) foi variável dependendo da ocorrência de estresse e da suscetibilidade de cultivar (TEIXEIRA et al., 2016). A influência dos componentes genéticos na suscetibilidade das sementes à retenção de clorofila também foi demonstrada por outros autores em sementes de canola e soja (MAILER et al., 2003).

Uma visão global do potencial fisiológico das sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados foi apresentada por meio de uma análise de componentes principais (Figura 9). Podemos verificar de forma clara, grande variação na qualidade fisiológica inicial entre as amostras que se diferenciam quanto a presença de clorofila nas sementes, independente da cultivar ou ambiente de produção das sementes. Diante desses resultados é correto afirmar que a presença de clorofila em sementes fisiologicamente maduras afeta substancialmente a qualidade inicial das sementes, não se tratando apenas de um marcador para o estádio de amadurecimento das sementes.

Ao avaliar o potencial fisiológico das sementes dos lotes selecionados observou-se que sementes classificadas como verdes, com maior retenção de Cl a e b (Tabela 1-4) apresentaram menor germinação e vigor, independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados (Tabela 5-8 e Figura 9). Os fatores que influenciam o potencial fisiológico das sementes regem a capacidade teórica das sementes para expressar suas funções vitais em condições ambientais favoráveis e desfavoráveis (HILHORST; TOOROP, 1997; MARCOS FILHO, 2015). O conceito de condições desfavoráveis varia de acordo com espécies, cultivares e fases de desenvolvimento

das plantas, mas geralmente inclui temperatura, disponibilidade de água, características do solo, proteção de plantas e práticas de manejo (MARCOS FILHO, 2015). Estes fatos confirmam a afirmação de que clorofilas residuais presentes em sementes fisiologicamente maduras reduzem a tolerância das sementes e plântulas a estresses ambientais (SMOLIKOVA et al., 2011; SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016; TEIXEIRA et al., 2016). No nível fisiológico, a redução da tolerância ao estresse das sementes contendo clorofila está associada à atividade insuficiente dos sistemas antioxidantes das plantas, uma vez que o estresse oxidativo, em desenvolvimento em sementes verdes, sobrepõe a capacidade de defesa do organismo vegetal (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016).

Ao abordar as interferências do ambiente de produção das sementes na qualidade inicial (Combinação 1), verifica-se que sementes verdes da cultivar 8473 RSF quando produzidas em Paraúna-GO (Lote 7) apresentaram menor germinação e formação de plântulas normais, além de maior mortalidade (Tabela 5). Este fato pode ser associado com o maior conteúdo de Cl a e b encontrado nessas sementes sendo resultado de altas temperaturas e precipitações pluviais irregulares nesse local (Figura 6). A disponibilidade de água é importante, principalmente, em dois períodos de desenvolvimento da soja, a germinação-emergência e floração-enchimento de sementes (FRANÇA-NETO et al., 2009). Em relação a temperatura, a maturação pode ser acelerada pela ocorrência de altas temperaturas nesta fase (FRANÇA-NETO et al., 2009). Condições de estresse por calor (temperaturas entre 27°C e 35°C) e seca (precipitação irregular) durante a fase de enchimento das sementes diminuíram de forma significativa o peso e o número das sementes produzidas, além de comprometer características fisiológicas como germinação e vigor (DORNBOS; MULLEN, 1990**)**. Egli et al. (2005) ao produzir duas cultivares de soja em condição de estresse por calor (temperaturas de até 36,0° C e 37,6° C) observaram reduções acentuadas na germinação e vigor de sementes. Por outro lado, quando se avalia as interferências dos genótipos (Combinação 2), observa-se que na cidade de Ubiratã-PR sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) resultaram em menor germinação e maior mortalidade (Tabela 8). Neste sentido, deve-se considerar a influência da maior porcentagem de sementes verdes do lote em questão (Figura 8) além do maior teor de Cl b encontrados em sementes verdes dessa cultivar (Tabela 4).

Nos últimos anos, várias enzimas envolvidas no catabolismo de clorofila em sementes foram identificadas: clorofila b redutase (KUSABA et al., 2007), 7-hidroximetil clorofila a redutase (MEGURO et al., 2011), Mg^{2+}-dequelatase (SHIMODA et al., 2016), feofitinases (SCHELBERT et al., 2009), feoforbídeo a oxigenase (PRUŽINSKÁ et al., 2003) e redutase de catabólitos de clorofila vermelha (PRUŽINSKÁ et al., 2007).

Além dessas enzimas, sabe-se que os produtos dos genes *STAY-GREEN* atuam como reguladores chaves da degradação da clorofila, desestabilizando complexas proteínas do pigmento e aumentando a disponibilidade de clorofilas para clivagem por enzimas catabólicas (SATO et al., 2009; CHRIST; HÖRTENSTEINER, 2013; SAKURABA et al., 2015). Recentemente Teixeira et al. (2016) realizaram uma análise global da expressão gênica em associação com análise da expressão de genes por RT-qPCR para demonstrar que a retenção de clorofila em sementes de soja cultivadas sob estresse ambiental por calor e seca está relacionada à perda de expressão de genes catabólicos de clorofila, genes *STAY-GREEN* e também de algumas proteínas fotossintéticas.

Em nosso estudo, nos dedicamos a realizar a validação de genes associados a retenção de clorofila em sementes de soja que foram anteriormente identificados por Teixeira et al. (2016) *(D1*, *D2*, *PPH2* e *NYC1_1*) (Tabela 9-12). *STAY-GREEN* é um gene nuclear que codifica uma proteína de cloroplasto, e seus homólogos existem como genes solteiros ou duplicados em plantas superiores (PARK et al., 2007). Fang et al (2014) descreveram *D1* (*STAY-GREEN 1*) e *D2* (*STAY-GREEN 2*) na soja como dois genes nucleares paralelos desvinculados, cujo mutante recessivo duplo (*d1d1d2d2*) resulta na retenção de clorofila em folhas e sementes. Foi possível observar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes com retenção de clorofila apresentaram menor expressão dos genes *D1* e *D2* (Tabela 9-12). Esta diferença nos níveis de expressão de *STAY-GREEN* entre as sementes de diferentes classificações de cor pode ser suficiente para manter a desmontagem dos complexos de proteína de clorofila e a degradação de clorofila em sementes amarelas, mesmo que as mesmas também tenham sido expostas a estresse por calor e seca.

Algumas associações interessantes podem ser feitas quando se avalia a expressão dos genes *D1* e *D2*. Quando se observa a influência ambiental da cultivar 8473 RFS na expressão do gene *D1* (Tabela 9), em média houve menor expressão

em sementes produzidas em Paraúna-GO, este fato pode ter resultado em maior retenção de clorofila a e b (Tabela 1), além de menor germinação e desenvolvimento de plântulas verificados em sementes verdes produzidas neste local (Tabela 5). Algo parecido foi observado ao analisar a influência genotípica entre as cultivares NS 5959 IPRO e NA 5909 RG produzidas em Ubiratã-PR, já que a cultivar NS 5959 IPRO apresentou maior porcentagem de sementes verdes no lote (Figura 8), menor qualidade inicial (Tabela 8) e, em média, menor expressão dos genes *D1* e *D2* (Tabela 12).

De forma geral, não se observou diferença significativa na expressão de *NYC1_1* (*NON-YELLOW COLORING 1*) entre sementes verdes e amarelas das cultivares avaliadas (Tabela 9-12). No entanto, a cultivar NA 5909 RG quando produzida em Ubiratã apresentou maior conteúdo de clorofila a do que quando produzida em Paraúna-GO (Tabela 2) e esse fato pode estar relacionado com a menor expressão desse gene na ocasião (Tabela 10), já que *NYC1_1* é conhecido por codificar enzimas que atuam na degradação de clorofila b.

A análise da expressão de *PPH2* (*PHEOPHORBIDASE 2*) em nossas amostras de sementes indica que as feofitinases podem desempenhar um papel importante na defitilação nas sementes. A expressão de *PPH2* foi menor em sementes classificadas como verdes (Tabela 9-12). As PPHs parecem desempenhar um papel importante na remoção de fitol em sementes de soja produzidas sob estresse, uma vez que as sementes amarelas não mantêm a coloração verde na mesma extensão que as sementes classificadas como verdes, independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados (Tabela 9-12).

Uma visão global da expressão dos genes avaliados *(D1*, *D2*, *PPH2* e *NYC1_1*) em sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados foi apresentada por meio de uma análise de componentes principais (Figura 10). O comportamento diferencial na expressão dos genes associados a retenção de clorofila é muito claro entre sementes classificadas como verdes e amarelas, independente da cultivar ou ambiente de produção das sementes. Fazendo a análise geral dos dados aqui apresentados, assim como observado por Teixeira et al. (2016), é possível admitir que condições ambientais estressantes (calor e seca) durante a maturação tardia das sementes de soja resultam em retenção de clorofila e expressão prejudica dos genes

SGR 1 e *2* (*D1*, *D2*) e *PPH2,* além de prejuízos na qualidade fisiológica inicial das sementes.

2.5 CONCLUSÃO

Independente da cultivar ou da região de produção, sementes de soja com retenção de clorofila possuem menor qualidade inicial (germinação e vigor) e menor expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2.*

REFERÊNCIAS

AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Embrapa Informática Agropecuária, 2018. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>. Acesso em: 05 abri. 2018.

ALMELA, L.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A; ROCA, M. J. High-performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 870, p. 483-489, 2000.

ASAKURA, T. et al. Global gene expression profiles in developing soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 52, p. 147-53, 2012.

BORRMANN, D. et al. Chemical and biochemical characterization of soybean produced under drought stress. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 676-681, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras Para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009.

CHRIST, B.; HÖRTENSTEINER, S. Mechanism and Significance of Chlorophyll Breakdown. **Journal Of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 1, p. 4-20, 2013.

CHUNG, D. W. et al. The role of pheophorbide a oxygenase expression and activity in the canola green seed problem. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 1, p. 88-97, 2006.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, v. 5, n. 5, 2018. Disponível em: file:///C:/Users/Daiani/Downloads/Boletim_Graos_fevereiro_2018.pdf. Acesso em: 05 maio 2018.

CROCE, R.; VAN AMERONGEN, H. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. **Nature chemical biology**, New York, v. 10, p. 492-501, 2014.

DELMAS, F. et al. ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences,** Washington, v. 110, p. 3888–3894, 2013.

DORNBOS, 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**, Ames, v. 71, p. 373-383, 1990.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2011.** Londrina: Embrapa Soja, 255p. (Sistemas de Produção n.14), 2011.

EGLI, D. B. et al. Air Temperature During Seed Filling and Soybean Seed Germination and Vigor. **Crop Science**, Lexington, v. 45, n. 4, p.1329-1335, 2005.

FANG, C. et al. Concerted evolution of D1 and D2 to regulate chlorophyll degradation in soybean. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 77, n. 5, p. 700-712, 2014.

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

FINKELSTEIN, R. Abscisic acid synthesis and response. **The Arabidopsis Book**, Rockville, v. 11, p. 166, 2013.

HILHORST, H. W. M.; TOOROP, P. E. Review on dormancy, germinability, and germination in crop and weed seeds. **Advances in Agronomy**, Maryland Heights, v. 61, p. 111-165, 1997.

HIRAKURI, M. H. **Impactos econômicos de estresses na produção de soja da safra 2015/16.** Londrina: Embrapa Soja, 2016. 8 p. (Circular Técnica, 125).

HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1807, n. 8, p. 977-988, 2011.

HUDSON, K. A. The Circadian Clock-controlled Transcriptome of Developing Soybean Seeds. **The Plant Genome**, Madison, v. 3, n. 1, p. 3, 2010.

IPCC. **Climate change 2014: mitigation of climate change.** Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, 2014.

JALINK, H. et al. Chlorophyll fluorescence of Brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 437-443, 1998.

KUSABA, M. et al. Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1362–1375, 2007.

MAILER, R. J. et al. The influence of cultivar and environment on the chlorophyll concentration of Australian canola seed. **Australian Journal Of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 43, n. 2, p.169-176, 2003.

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

MEGURO, M. et al. Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3442–3453, 2011.

NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration. Cold and Warm Episodes by Season. National Weather Service**. Climate Prediction Center**. 2016. Disponível em:http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml. Acesso em: 05 jan 2018.

PÁDUA, G. P. et al. Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 150–159, 2009.

PARK, S. Y. et al. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 5, p. 1649–1664, 2007.

PRUŽINSKÁ, A. et al. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., Washington, v. 100, p. 15259-15264, 2003.

PRUŽINSKÁ, A. et al. In vivo participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 369–387, 2007.

SAKURABA, Y.; PARK, S. Y.; PAEK, N. C. The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 38, p. 390-395, 2015.

SATO, Y. et al. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. **Plant J**., Oxford, v. 57, p. 120–131, 2009.

SCHELER, C.; DURNER, J.; ASTIER, J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions**. Current Opinion in Plant Biology,** London, v. 16, p. 534–539, 2013.

SHIMODA, Y.; ITO, H.; TANAKA, A. Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's green cotyledon gene, encodes magnesium-dechelatase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 28, p. 2147–2160, 2016.

SINNECKER, P. et al. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3961–3966, 2002.

SMOLIKOVA, G. N.; LAMAN, N.A.; BORISKEVICH, O. V. Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 58, p. 965–973, 2011.

SMOLIKOVA, G. N.; MEDVEDEV, S. S. Photosynthesis in the seeds of chloroembryophytes. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 63, p. 1–12, 2016.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes**. Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1807, n. 8, p. 968–76, 2011.

TENG, S. S.; CHEN, B. H. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 65, p. 367–373, 1999.

TEIXEIRA, R. N. et al. Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. **BMC Plant Biology**, London, v. 1, p. 16–37, 2016.

ZINSMEISTER et al. ABI5 is a regulator of seed maturation and longevity in legumes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 28, p. 2735-2754, 2016.

CAPÍTULO 3

LONGEVIDADE E QUALIDADE DO ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA COM RETENÇÃO DE CLOROFILA

RESUMO

A longevidade trata-se de uma característica importante para a agronomia e economia já que sua redução resulta em perdas na viabilidade das sementes durante o armazenamento e no rendimento das culturas. Durante a maturação tardia, a longevidade das sementes aumenta progressivamente e se relaciona com a degradação de clorofila. Fatores ambientais e genéticos afetam a retenção de clorofila e comprometem a qualidade de sementes e do óleo extraído promovendo sua oxidação e reduzindo sua vida útil. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da retenção de clorofila na longevidade e qualidade do óleo de sementes de soja considerando influências genéticas e ambientais. Lotes de sementes de soja que apresentaram sementes verdes, de cultivares produzidas em condições reais de cultivo por produtores rurais (condições não controladas) em diferentes municípios do Brasil na safra 2014/2015, foram organizados em duas combinações (Influência Ambiental e Influência Genotípica). Após a classificação e divisão em amostras de sementes verdes e amarelas, foram avaliados quanto ao conteúdo de clorofila, viabilidade inicial, longevidade, parâmetros bioquímicos durante o armazenamento e a qualidade do óleo extraído das sementes. Foi possível observar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes verdes apresentaram menor longevidade devido a maior retenção de clorofila, menor viabilidade inicial e alterações bioquímicas em sementes. Além de apresentarem menor qualidade do óleo, com menor estabilidade oxidativa e menores índices de tocoferóis devida a presença de clorofilas residuais.

Palavras-chave: Sementes verdes. Viabilidade. Armazenamento. Estabilidade oxidativa. Tocoferóis.

ABSTRACT

Longevity is an important agronomic and economic characteristic, since its reduction results in losses in seed viability during storage and crop yield. During late maturation, the longevity of seeds increases progressively and is related to chlorophyll degradation. Environmental and genetic factors affect chlorophyll retention and compromise the quality of seeds and extracted oil, promoting oxidation and reducing their useful life. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of chlorophyll retention on the longevity and quality of soybean oil considering genetic and environmental influence. Soybean seed lots that presented green seeds of cultivars produced under real cultivation conditions by producers (uncontrolled conditions) in different municialities of Brazil in the 2014/2015 harvest season were organized in two combinations (Environmental Influence and Genotypic Influence) and after classification and division into green and yellow seed samples, they were evaluated for chlorophyll content, initial viability, longevity, biochemical parameters during storage and quality of the oil extracted from seeds. It was possible to observe that, regardless of cultivar or production environment, green seeds presented lower longevity due to their higher chlorophyll retention, lower initial viability and biochemical changes, in addition to lower oil quality, lower oxidative stability and lower levels of tocopherols due to the presence of residual chlorophylls.

Keywords: Green seeds. Viability. Storage. Oxidative stability. Tocopherols.

3.1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas globais estão ameaçando habitats naturais e tornando áreas agrícolas do mundo cada vez mais propensas a extremos climáticos (IPCC, 2014; NOAA, 2016), com isso a manutenção da viabilidade das sementes está no centro da conservação dos recursos genéticos e da segurança alimentar (SANO et al., 2016; LEPRINCE et al., 2017). O período total durante o qual as sementes permanecem viáveis durante o armazenamento é definido como longevidade e trata-se de uma característica importante para a agronomia e economia já que sua redução resulta em perdas inesperadas na viabilidade das sementes durante o

armazenamento e afeta negativamente o estabelecimento de plântulas e o rendimento das culturas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016; SANO et al., 2016; LEPRINCE et al., 2017; LIMA et al., 2017).

Conforme afirmam Leprince et al. (2017), apesar da importância central da longevidade e do vigor das sementes na agricultura, a maneira como eles são adquiridos durante o desenvolvimento das sementes ainda é pouco compreendida. Sabe-se que durante a fase final da maturação, conhecida como maturação tardia, a longevidade das sementes aumenta progressivamente, sendo associada a síntese de moléculas protetoras como proteínas LEA, proteínas de choque térmico e RFOs (PRIETO-DAPENA et al., 2006; ROSNOBLET et al., 2007; HUNDERTMARK et al., 2011). Também se verifica a associação com a atividade de antioxidantes, como glutationa e tocoferóis (KRANNER et al., 2006; SATTLER et al., 2004), e com a degradação de clorofila ocorrida nessa fase (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; ZINSMEISTER et al., 2016).

A degradação de clorofila é um passo importante durante o desenvolvimento da semente, pois sua retenção afeta a germinação e vigor de sementes (PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; TEIXEIRA et al., 2016). Além disso, efeitos negativos têm sido verificados quanto a capacidade de armazenamento de sementes e a retenção de clorofila (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; ZINSMEISTER et al., 2016). Mais recentemente, Lima et al. (2017) observaram em sementes de soja que, em nível transcricional, o início da degradação de clorofila é ativado antes da indução da longevidade, o que indica uma possível dependência entre os eventos. No entanto, a relação de causa e efeito entre a longevidade e a retenção de clorofila em sementes permanece indefinida.

Assim como a longevidade, a retenção de clorofila é resultado da influência de fatores genéticos e ambientais que afetam a qualidade das sementes e dos produtos relacionados (PÁDUA et al., 2009a; PÁDUA et al., 2009b; LEPRINCE et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2016). A importância da presença de clorofila em oleaginosas tem sido reconhecida, pois aumenta os custos de processamento e reduzem os lucros dos agricultores (SINNECKER et al., 2002). A clorofila pode ser extraída junto com o óleo, promovendo sua oxidação, reduzindo sua vida útil e produzindo óleo de cor escura, o que é organolépticamente desagradável para os consumidores. Esses problemas são comuns em sementes de canola produzidas nos Estados Unidos e no Canadá, mas

também são observados na soja, principalmente no Brasil (SINNECKER et al., 2002; KULKARNI; DALAI; BAKHSHI, 2006; BORRMANN et al., 2009; FRANÇA-NETO et al., 2012).

Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da retenção de clorofila na longevidade e na qualidade do óleo de sementes de soja, além de considerar a influência ambiental e genotípica nestes fatores.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

Os lotes de sementes de soja foram produzidos em condições reais de cultivo por produtores rurais (condições não controladas) em diferentes regiões e condições ambientais do Brasil na safra de 2014/2015 e cedidos pela Embrapa Soja/Londrina-PR. No total, foram cedidas nove cultivares (Quadro 1) distribuídas em 37 lotes produzidos em municípios dos estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina.

Quadro 1 - Descrição das cultivares avaliadas e seus respectivos grupos de maturação e hábitos de crescimento

Cultivar	Grupo de maturação	Hábito de crescimento
NS 5959 IPRO	5.9	Indeterminado
97Y07	7.0	Indeterminado
8473 RSF	7.4	Indeterminado
71MF00 RR	7.1	Indeterminado
SYN1059 RR	5.9	Indeterminado
NA 5909 RG	6.9	Indeterminado
W 799 RR	7.7	Indeterminado
6266 RSF IPRO	6.6	Indeterminado
M6972 IPRO	6.9	Indeterminado

3.2.2 Teor de água

As sementes de cada lote foram avaliadas quanto ao teor de água por meio de duas amostras, de acordo com o método da estufa a 105 °C ± 3 °C (BRASIL, 2009). Portanto, o tempo de secagem foi de 24 horas, com duas repetições de 25 sementes e os resultados expressos em porcentagem de água.

3.2.3 Porcentagem de sementes verdes

A percentagem de sementes verdes presente nos diferentes lotes foi determinada visualmente utilizando quatro repetições com 100 sementes de cada lote, sendo que com qualquer sinal de pigmentação verde na semente a mesma foi classificada semente “verde”.

3.2.4 Critério de seleção dos lotes e obtenção de sementes verdes e amarelas

Após a determinação da porcentagem de sementes verdes, lotes que apresentaram sementes verdes foram selecionados com a finalidade de avaliar o contraste na longevidade entre sementes verdes e amarelas e a influência ambiental e genotípica neste fator. Para análise da interferência do ambiente, foram selecionados lotes da mesma cultivar produzidos em diferentes municípios e, portanto, em diferentes condições ambientais. Por outro lado, para análise da interferência do genótipo, foram selecionados lotes de diferentes cultivares produzidos no mesmo município e em condições ambientais similares.

Posteriormente, através de análise visual, as sementes dos lotes selecionados foram classificadas e divididas em amostras de sementes verdes, quando apresentaram qualquer sinal de pigmentação verde na semente, e amostras de sementes amarelas, quando não apresentaram sinal de pigmentação verde na semente.

3.2.5 Quantificação de clorofila

As amostras com três repetições de 25 sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados foram liofilizadas e moídas até obtenção de um pó fino para a quantificação de clorofila a e b (Cl a e b) por cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography-HPLC). Ambos os padrões de clorofila a e b foram adquiridos da Sigma (USA). Todos os solventes utilizados foram de nível HPLC.

As extrações de clorofilas foram realizadas sob luz verde de acordo com Teng e Chen (1999), com adaptações. As amostras de sementes secas de 0,5 g foram colocadas em tubo Falcon de 15 ml, ao qual foram adicionados 3 ml de metanol. A

mistura foi homogeneizada em vortex durante 1 minuto e mantida por 1 hora a 10° C no escuro. Em seguida, a mistura foi novamente homogeneizada em vortex durante 1 minuto e centrifugada a 3000 g (4° C) durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo Falcon, a solução foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 µm para HPLC e colocada num frasco âmbar para injeção imediata subsequente.

Para as análises de clorofila por HPLC foram realizadas separações analíticas em uma coluna Shimadzu Shim-Pack GIST (150x2,1 mm - número de série 17C00967). Os pigmentos foram eluídos usando um gradiente linear em 15 minutos, com um sistema de dois solventes: metanol: acetato de amônio (80:20 v/v) e metanol: acetona (80:20 v/v). O volume de injeção foi de 25 µl. O detector de fluorescência (Shimadzu RF-10XL) foi operado a uma excitação de 440 nm, uma emissão de 660 nm e uma taxa de fluxo de 0,8 ml/min (ALMELA et al., 2000). As curvas de calibração foram feitas de 0,01 a 5,0 mg/l para ambas as clorofilas. Alta linearidade foi obtida com coeficientes de correlação de 0,99. As clorofilas a e b foram então quantificadas usando as respectivas curvas de calibração.

3.2.6 Viabilidade inicial

A viabilidade das sementes foi avaliada pelo teste de tetrazólio. A avaliação foi realizada com três repetições de 50 sementes que foram pré-umidecidas usando rolos de papel toalha do tipo germitest, umedecidos com água destilada e mantidos em câmara de germinação a 25° C no escuro por 16 horas (BRASIL, 2009). Posteriormente, as sementes foram transferidas para copos plásticos, totalmente imersos em solução de tetrazólio (2,3,5-trifenil-cloreto de tetrazólio) na concentração de 0,075% e acondicionadas em câmara de germinação a 40° C no escuro por 3 horas (BRASIL, 2009). Após este período as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas individualmente, seccionando-se longitudinalmente através do centro do eixo embrionário com auxílio de bisturi (BRASIL, 2009). As estruturas das sementes foram observadas com auxílio de uma lupa estereoscópica com relação a sua viabilidade observando características como condição e cor dos tecidos após a coloração oferecida pela solução de tetrazólio e pela localização e tamanho das lesões conforme descrição oferecida por França Neto, Krzyzanowski e Costa (1998). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

3.2.7 Longevidade

Para avaliar a longevidade, as sementes verdes e as amarelas foram armazenadas no escuro a 35° C e 75% de umidade relativa (UR) usando recipientes hermeticamente fechados contendo uma solução saturada de NaCl. Em diferentes intervalos de tempo avaliações da qualidade fisiológica das sementes foram realizadas, inicialmente com 7 dias de intervalo até completar 35 dias e, posteriormente com 14 dias de intervalo até completar 77 dias de armazenamento. As avaliações foram realizadas conforme a descrição abaixo:

Germinação: a avaliação da germinação foi realizada com três repetições de 25 sementes, usando rolos de papel toalha do tipo germitest, umedecidos com água destilada e mantidos em câmara de germinação a 25°C no escuro por oito dias (BRASIL, 2009). A porcentagem de germinação foi contabilizada diariamente contando a protrusão da radícula, quando a radícula possuía mais de 2 milímetros de comprimento. Estas contagens sucessivas foram realizadas a fim de se obter curvas de germinação ao longo da avaliação da longevidade.

P10: o tempo (dias) em que a amostra de sementes armazenada resultou em 10% de viabilidade durante o armazenamento foi analisado por contagens da protrusão da radícula ao final do teste de germinação, determinado pelo modelo Ellis e Roberts (1980), onde pode ser calculado com base na equação matemática: $v = K_i – p/\sigma$ (BEWLEY et al., 2013).

Sigma: o Sigma, definido como a taxa de perda de viabilidade, foi analisado por contagens da protrusão da radícula ao final do teste de germinação, determinado pelo modelo Ellis e Roberts (1980), onde pode ser calculado com base na equação matemática: $v = K_i – p/\sigma$ (BEWLEY et al., 2013).

Plântulas normais e anormais: a formação de plântulas normais e anormais foi avaliada após oito dias de embebição, utilizando parâmetros de características de plântulas como descrito em Brasil (2009).

Sementes mortas: as sementes foram consideradas mortas quando, ao final do teste de germinação, não germinaram e apresentaram tecidos coalescentes.

3.2.8 Análises bioquímicas

Aos 0, 14 e 28 dias de armazenamento das sementes verdes e amarelas, foram realizadas análises bioquímicas dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), da extensão da peroxidação lipídica (estimada pelos níveis de malondialdeído-MDA) e da atividade de enzimas do sistema antioxidante (catalase-CAT, superóxido dismutase-SOD, ascorbato peroxidase-APX e guaiacol peroxidase-GPX). Foram coletadas quatro repetições de 25 sementes por tratamento, as quais foram previamente maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer à temperatura de -80° C até o momento das análises descritas a seguir:

Quantificação de H_2O_2: foi realizada com amostras de 100 mg de sementes maceradas. As amostras foram 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 absorbância foi lida em 390 nm e o conteúdo de H_2O_2 foi determinado pela curva padrão.

Estimativa da peroxidação lipídica (MDA): amostras de 100 mg de sementes maceradas foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) contendo 0,67% TCA. O homogeneizado foi centrifugado a 15000 g durante 15 minutos. A uma alíquota de 1,0 ml do sobrenadante, foram adicionados 2,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% em 20% de TCA. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 30 minutos no banho de água e depois arrefecida num banho de gelo. Após centrifugação a 15000 g durante 20 minutos, a absorbância do sobrenadante foi registrada 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.

Extração das enzimas CAT, SOD, APX e GPX: 100 mg por amostra foram homogeneizados com 1ml 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).

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. O consumo de H_2O_2 foi monitorado na absorbância de 240 nm (ε = 36 M^{-1} cm^{-1}) (AEBI, 1984).

Atividade da SOD: foi medida em meio contendo tampão 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.

Atividade da APX: foi medida em meio contendo 200 mM de 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. A oxidação do ascorbato foi monitorada a 290 nm (ε = 2,8 $mM^{-1}cm^{-1}$) (NAKANO; ASADA, 1981).

Atividade da GPX: foi em meio contendo 200 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 20 mM de guaiacol, 2 mM de H_2O_2 e quantidade adequada de extrato enzimático. A oxidação de H_2O_2 foi monitorada a 470 nm (ε = 26,6 $mM^{-1}cm^{-1}$) (SOUZA; MACADAM, 1998).

3.2.9 Análises de qualidade do óleo

O óleo extraído das sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados para avaliação da longevidade das sementes foi determinado em duas repetições quanto ao teor de óleo, teor de tocoferóis e tocotrienóis, teor de clorofila total e estabilidade oxidativa seguindo métodos estabelecidos pela American Oil Chemists' Society (AOCS, 2009) como descrito abaixo:

Teor de óleo: o óleo foi extraído de sementes de soja de acordo com o método oficial Butt-tube AOCS Ac 3–44 (AOCS 2009). As sementes foram moídas até obtenção de um pó fino, acondicionadas em recipientes de 26 mm x 60 mm e extraídas com hexano no aparelho Soxhlet. Os solventes foram retirados dos extratos por evaporação instantânea sob vácuo (Rotavapor RE 121A, Buchi, Switzerland) a temperatura controlada, secos e pesados para obtenção do teor de óleo.

Teor de Tocoferóis e Tocotrienóis: foi realizada por HPLC utilizando o método AOCS Ce 8-89 (AOCS 2009). O equipamento e as condições da análise foram: bomba isocrática Perkin Elmer 200; detector fluorescência Fluorescence Detector Perkin Elmer Series 200a, excitação 290 nm, emissão 330 nm; fluxo de 1,0 mL/min; coluna analítica (Merck) 250x4 mm Li Chrosorb Si 60*5 µm, acoplada à coluna de guarda compatível (Hibar RT 250x4mm Li Chrosorb Si 60, 5mm); fase móvel: hexano/isopropanol 99:1, 1,0 mL/min (solventes grau HPLC filtrados e degaseificados por 10 min em banho ultrassom). A quantificação foi realizada através de curva de padronização externa dos tocoferóis e de padrões diários de referência.

Teor de clorofila: o teor de clorofila foi determinado pelo equipamento automático Lovibond PFX 995 Tintometer, utilizando cubeta de vidro óptico de 51/4, conforme método AOCS Cc 13j-97 (AOCS, 2009).

Estabilidade oxidativa: a estabilidade oxidativa dos óleos foi determinada pelo método AOCS Cd 12b-92 (AOCS 2009). Utilizou-se Rancimat 743 Metrohm Ltd. (Herisau, Switzerland) para medir a estabilidade de óleos (5 g), que foram aquecidos a uma temperatura constante de 110° C. Simultaneamente, o ar no fluxo de 9 l/h borbulhou através dos óleos. O ar efluente contendo ácidos orgânicos voláteis da amostra foi coletado em outro tubo com água destilada (50 ml). A estabilidade dos óleos é expressa por período de indução em horas. Pode ser definido como resistência à oxidação de lipídios. É exatamente o tempo durante o qual a oxidação ocorre a uma taxa constante ou muito baixa.

3.2.10 Análises estatísticas

As análises de correlação de Pearson e as análises de componentes principais foram realizadas usando software Minitab 16. Além disso, foi realizada análise de variância e, quando efeitos significativos foram detectados ($P<0,05$), a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional SISVAR.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Seleção dos lotes e obtenção das amostras para avaliação da longevidade e qualidade do óleo das sementes

No Quadro 2 é encontrado os lotes das cultivares 6266 RSF IPRO (dois lotes), 97Y07 (três lotes), 8473 RSF (três lotes), 71MF00 RR (três lotes), W 799 RR (três lotes), SYN1059 RR (quatro lotes), NS 5959 IPRO (seis lotes), NA 5909 RG (cinco lotes) e M6972 IPRO (oito lotes), resultando no total de 37 lotes avaliados. Além disso, observa-se o local de produção (município e estado) e a porcentagem de sementes verdes dos lotes. Os valores de porcentagem de sementes verdes oscilaram entre zero e 74,5% e apresentaram grande variação entre as diferentes cultivares e locais de produção (Quadro 2).

Quadro 2 - Cultivar, local de produção e sementes verdes (%) dos lotes avaliados

Lote	Cultivar	Local de produção	Sementes verdes (%)
1	6266 RSF IPRO	Planaltina-GO	20,2
2	6266 RSF IPRO	Cristalina-GO	74,5
3	97Y07	Sítio D'Abadia-GO	0,7
4	97Y07	Niquelândia-GO	0,7
5	97Y07	Cristalina-GO	12,2
6	8473 RSF	Rio Verde-GO	2,7
7	8473 RSF	Paraúna-GO	22,0
8	8473 RSF	Rio Verde-GO	22,0
9	71MF00 RR	Ipameri-GO	4,2
10	71MF00 RR	Cristalina-GO	6,5
11	71MF00 RR	Cristalina-GO	15,2
12	W 799 RR	Rio Verde-GO	11,0
13	W 799 RR	Paraúna-GO	23,7
14	W 799 RR	Rio Verde-GO	34,2
15	SYN1059 RR	Cristalina-GO	2,7
16	SYN1059 RR	Ipameri-GO	3,5
17	SYN1059 RR	Cristalina-GO	12,0
18	SYN1059 RR	Cristalina-GO	20,7
19	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	3,0
20	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	4,7
21	NS 5959 IPRO	Campo Novos-SC	5,7
22	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	17,5
23	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	33,5
24	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	66,5
25	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	7,5
26	NA 5909 RG	Rio Verde-GO	7,7
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	22,5
28	NA 5909 RG	Paraúna-GO	38,0
29	NA 5909 RG	Paraúna-GO	55,0
30	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	0,0
31	M6972IPRO	Juscimeira-MT	0,2

32	M6972IPRO	Juscimeira-MT	12,0
33	M6972IPRO	Juscimeira-MT	13,7
34	M6972IPRO	Juscimeira-MT	14,2
35	M6972IPRO	Juscimeira-MT	16,5
36	M6972IPRO	Juscimeira-MT	17,5
37	M6972IPRO	Pedra Preta-MT	17,7

Seguindo o critério de seleção (Ver item 2.4), para avaliar o contraste na longevidade entre sementes verdes e amarelas, do total de 37 lotes, divididos em 9 cultivares (Quadro 2), foram selecionados 5 lotes, divididos em 3 cultivares, com presença de sementes verdes produzidos em diferentes municípios e condições ambientais (Quadro 3). Os teores de água das sementes dos lotes selecionados variaram de 9,06 a 9,71%, enquanto que, as porcentagens de sementes verdes variaram de 22 a 55% (Quadro 3).

Quadro 3 - Cultivar, local de produção, teor de água (%) e sementes verdes (%) dos lotes selecionados para avaliação da longevidade de sementes verdes e amarelas

Lote	Cultivar	Local de produção	Teor de água (%)	Sementes Verdes (%)
7	8473 RSF	Paraúna-GO	9,06	22,0
8	8473 RSF	Rio Verde-GO	9,38	22,0
23	NS 5959 IPRO	Ubiratã-PR	9,71	33,5
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	9,57	22,5
29	NA 5909 RG	Paraúna-GO	9,15	55,0

Através de análise visual, as sementes dos lotes selecionados foram classificadas e divididas em amostras de sementes verdes e amarelas (Figuras 1- 5).

Figura 1 – Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar 8473 RSF produzidas em Paraúna-GO (Lote 7)

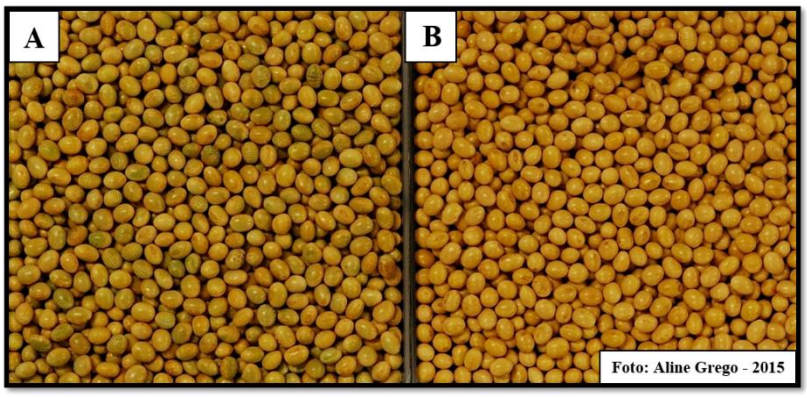


Figura 2 – Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar 8473 RSF produzidas em Rio Verde-GO (Lote 8)

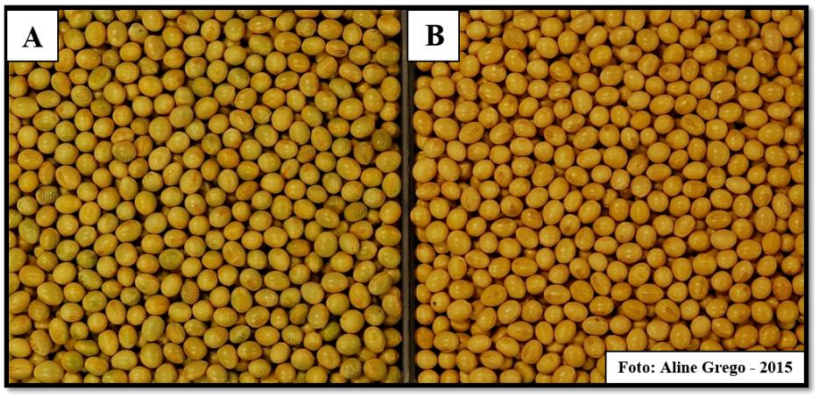


Figura 3 – Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar NS 5959 IPRO produzidas em Ubiratã-PR (Lote 23).

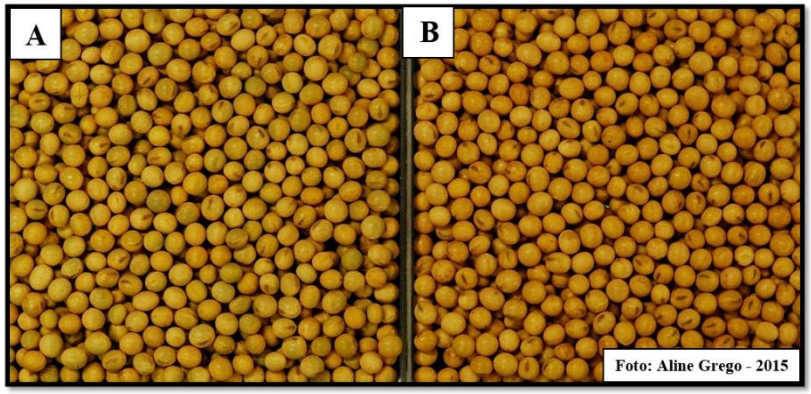


Figura 4 – Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar NA 5909 RG produzidas em Ubiratã-PR (Lote 27)

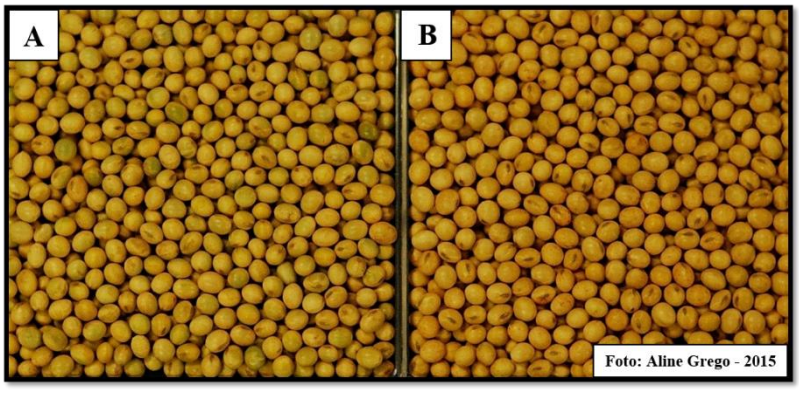
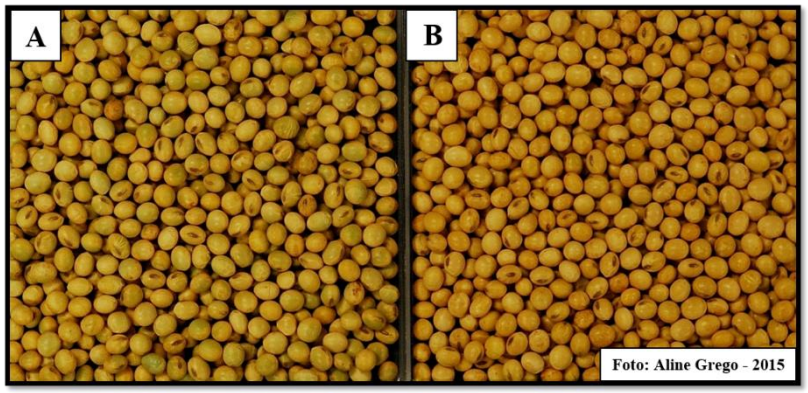


Figura 5 – Sementes de soja classificadas como verdes (A) e amarelas (B) da cultivar NA 5909 RG produzidas em Paraúna-GO (Lote 29)



Para avaliar a influência ambiental e genotípica na longevidade de sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados, duas combinações entre os lotes foram realizadas (Quadro 4 e 5).

Para análise da influência do ambiente de produção (Combinação 1 - Quadro 4) foram selecionadas a cultivar 8473 RSF, com lotes produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) (Figura 1) e Rio Verde-GO (Lote 8) (Figura 2), e a cultivar NA 5909 RG, com lotes produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27) (Figura 4) e Paraúna-GO (Lote 29) (Figura 5). Nessa combinação, avaliando-se o mesmo genótipo, pode-se verificar a interferência das condições ambientais das diferentes cidades de produção nas características avaliadas.

Quadro 4 - Cultivar, local de produção e classificação de cor da semente dos lotes selecionados para avaliação da Influência Ambiental (Combinação 1) na longevidade de sementes verdes e amarelas

Influência Ambiental (Combinação 1)				
Lote	**Cultivar**	**Local de produção**	**Classificação**	
7	8473 RSF	Paraúna-GO	Verdes	Amarelas
8		Rio Verde-GO	Verdes	Amarelas
27	NA 5909 RG	Ubiratã-PR	Verdes	Amarelas
29		Paraúna-GO	Verdes	Amarelas

Por outro lado, para avaliar a influência do genótipo (Combinação 2 - Quadro 5), uma nova combinação foi realizada utilizando lotes produzidos em Paraúna-GO, das cultivares 8473 RSF (Lote 7) (Figura 1) e NA 5909 RG (Lote 29) (Figura 5) e em

Ubiratã-PR, das cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) (Figura 3) e NA 5909 RG (Lote 27) (Figura 4). Na combinação em questão, avaliando-se o mesmo local de produção e condições ambientais similares, pode-se verificar a interferência dos diferentes genótipos nas características avaliadas.

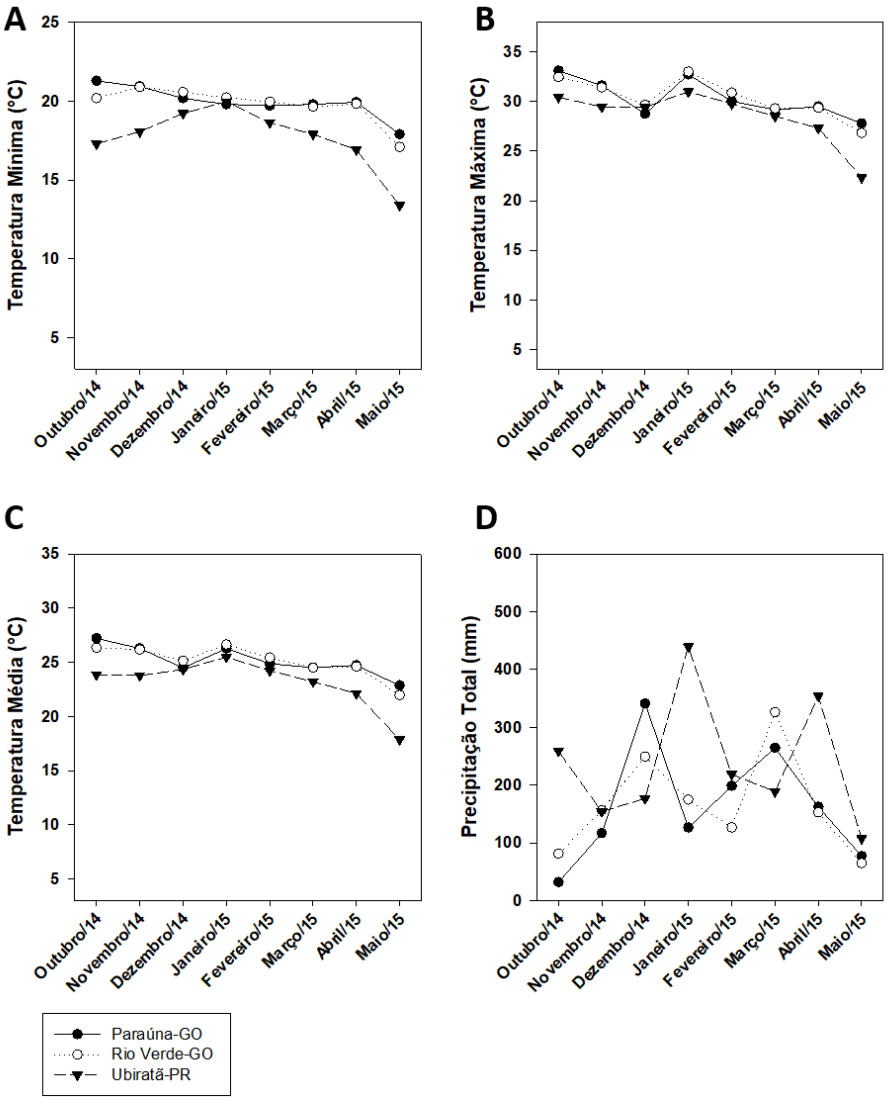
Quadro 5 - Local de produção, cultivar e classificação de cor da semente dos lotes selecionados para avaliação da Influência Genotípica (Combinação 2) na longevidade de sementes verdes e amarelas

Influência Genotípica (Combinação 2)				
Lote	**Local de produção**	**Cultivar**	**Classificação**	
7	Paraúna-GO	8473 RSF	Verdes	Amarelas
29		NA 5909 RG	Verdes	Amarelas
23	Ubiratã-PR	NS 5959 IPRO	Verdes	Amarelas
27		NA 5909 RG	Verdes	Amarelas

3.3.2 Condições climáticas de cultivo

A Figura 6 mostra a temperatura mínima, máxima e média e a precipitação pluvial total nos municípios de produção dos lotes de sementes de soja avaliados, durante os meses de outubro de 2014 a maio de 2015 para referência das condições climáticas durante o ciclo das plantas de soja.

Figura 6 – Médias de temperaturas mínima, máxima e média e precipitação pluvial total mensal durante os meses de outubro de 2014 a maio de 2015 nos municípios de Paraúna-GO, Rio Verde-GO e Ubiratã-PR



Fonte: Agritempo - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (2018).

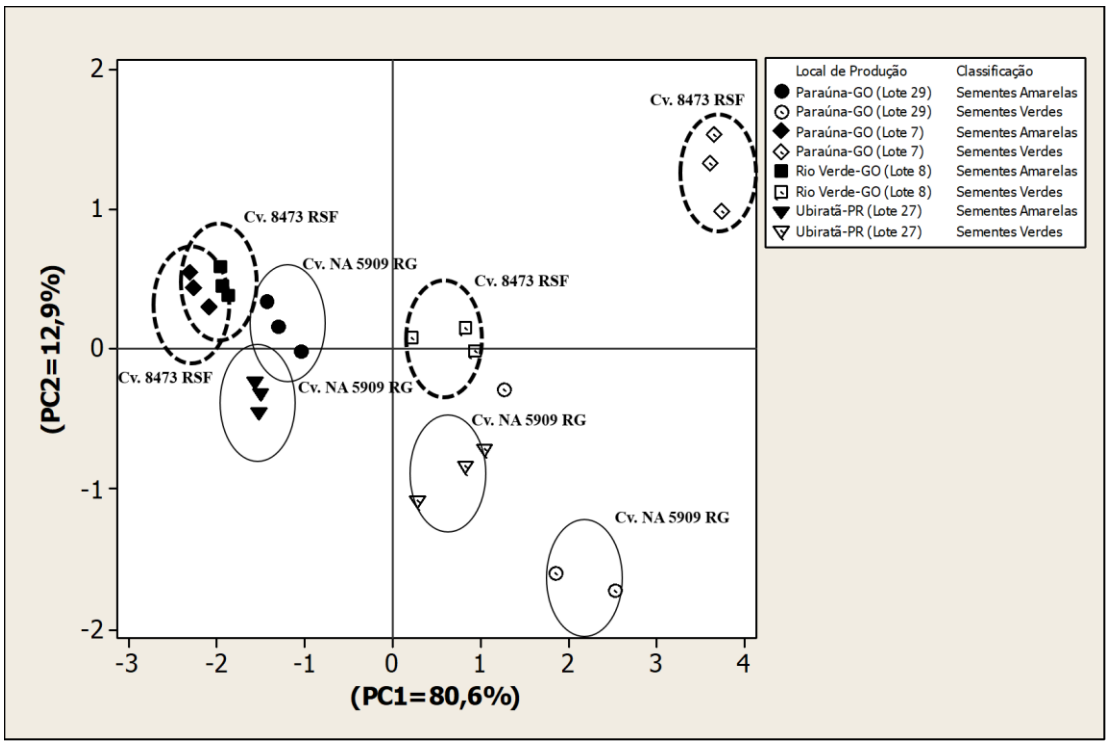
3.3.3 Avaliação da longevidade das sementes

Uma visão geral dos aspectos fisiológicos relacionados a longevidade das sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados é apresentada usando análises de componentes principais para avaliação da influência ambiental (Figura 7) e genotípica (Figura 8) na longevidade das sementes. Em ambas as análises (Figura 7 e 8), que consideram o conteúdo de clorofila (Cl a e b),

viabilidade inicial, tempo necessário para perda de viabilidade durante o armazenamento (P10) e taxa de perda de viabilidade (Sigma), é relevante notar a disposição das amostras ao longo das componentes onde amostras de sementes verdes se apresentam em posição contrária as amostras de sementes amarelas, independente da cultivar ou local de produção avaliados, o que indica considerável variação quanto as características avaliadas entre as amostras.

A influência ambiental na longevidade de sementes verdes e amarelas é observada ao se comparar lotes da mesma cultivar produzidos em locais diferentes (Figura 7). A análise de componentes principais modelou 80,6% e 12,9% da variância da matriz dos dados ao longo das duas primeiras componentes, respectivamente. De forma geral, é possível observar que, mesmo sendo produzidas em locais diferentes, as sementes amarelas dos lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7 e Lote 8) e NA 5909 RG (Lote 27 e 29) se encontram em proximidade ao longo da representação das componentes (Figura 7). Por outro lado, quando lotes da mesma cultivar foram produzidos em locais diferentes as sementes verdes apresentaram variação quanto as características avaliadas, já que suas amostras possuem considerável distância ao longo das componentes (Figura 7).

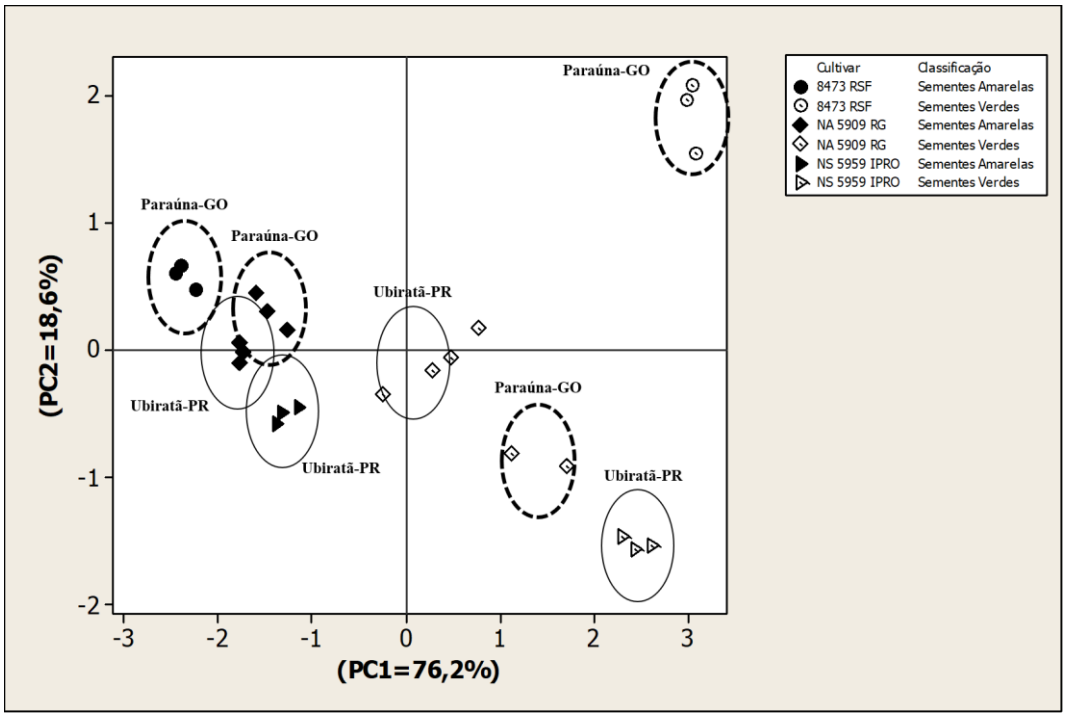
Figura 7 - Análise de componentes principais da influência ambiental (Combinação 1) no conteúdo de Cl a e b, viabilidade inicial, P10 e Sigma em sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7 e 8) e NA 5909 RG (Lote 27 e 29) produzidos em diferentes locais. Círculos com linhas tracejadas indicam amostras de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em diferentes locais e círculos com linhas contínuas indicam amostras de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em diferentes locais



Na Figura 8 observa-se a influência genotípica na longevidade de sementes verdes e amarelas ao se comparar lotes de diferentes cultivares produzidos no mesmo local de cultivo em uma análise de componentes principais que modelou 76,2 % e 18,6% da variância da matriz dos dados ao longo das duas primeiras componentes, respectivamente. Comportamento similar a análise da influência ambiental foi observado já que, independente da cultivar ou local de produção avaliados, amostras de sementes amarelas se apresentam mais próximas e agrupadas e o oposto ocorre para amostras de sementes verdes indicando maior variação quanto as características avaliadas em amostras com presença de clorofila em suas sementes (Figura 8). Além disso, nota-se que amostras (sementes verdes e amarelas) de lotes da cultivar NA 5909 RG mesmo produzidos em locais diferentes (Ubiratã-PR e Paraúna-GO) se

encontram mais próximas e agrupadas do que amostras de lotes das cultivares NA 5909 RG e NS 5959 IPRO que foram produzidas no mesmo local (Ubiratã-PR), sugerindo maior influência genética do que ambiental quanto a variação nos dados avaliados (Figura 8).

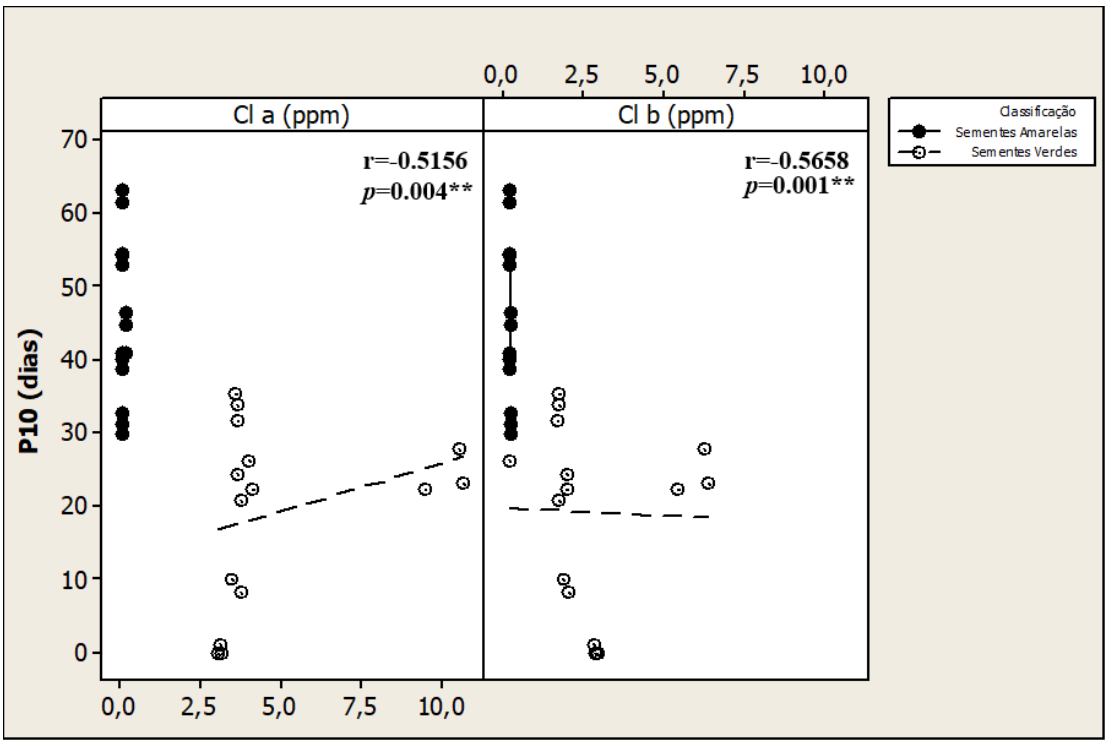
Figura 8 - Análise de componentes principais da influência genotípica (Combinação 2) no conteúdo de Cl a e b, viabilidade inicial, P10 e Sigma em sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF e NA 5909 RG e NA 5909 RG e NS 5959 IPRO produzidos no mesmo local. Círculos com linhas tracejadas indicam amostras de sementes verdes e amarelas de lotes de diferentes cultivares produzidos em Paraúna-GO e círculos com linhas contínuas indicam amostras de sementes verdes e amarelas de lotes de diferentes cultivares produzidos em Ubiratã-PR



A Figura 9 revela análises de correlações simples entre os parâmetros conteúdo de clorofila (Cl a e b) e tempo necessário para perda de viabilidade durante o armazenamento (P10) em todas as amostras dos lotes avaliados. É possível observar que os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre o P10 e o conteúdo de Cl a e b apresentaram valores negativos de r de -0.5156 e -0.5658, respectivamente. Em regra, as correlações negativas significativas indicam que

quanto maior é a presença de clorofila nas sementes menor é o tempo necessário para redução de sua viabilidade ao longo do armazenamento, independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados.

Figura 9 - Correlação entre o conteúdo de clorofila (Cl a e b) e o tempo necessário para perda de viabilidade durante o armazenamento (P10) de sementes verdes e amarelas dos lotes das diferentes cultivares selecionadas (5 lotes x 3 repetições x 2 classificações de cor)



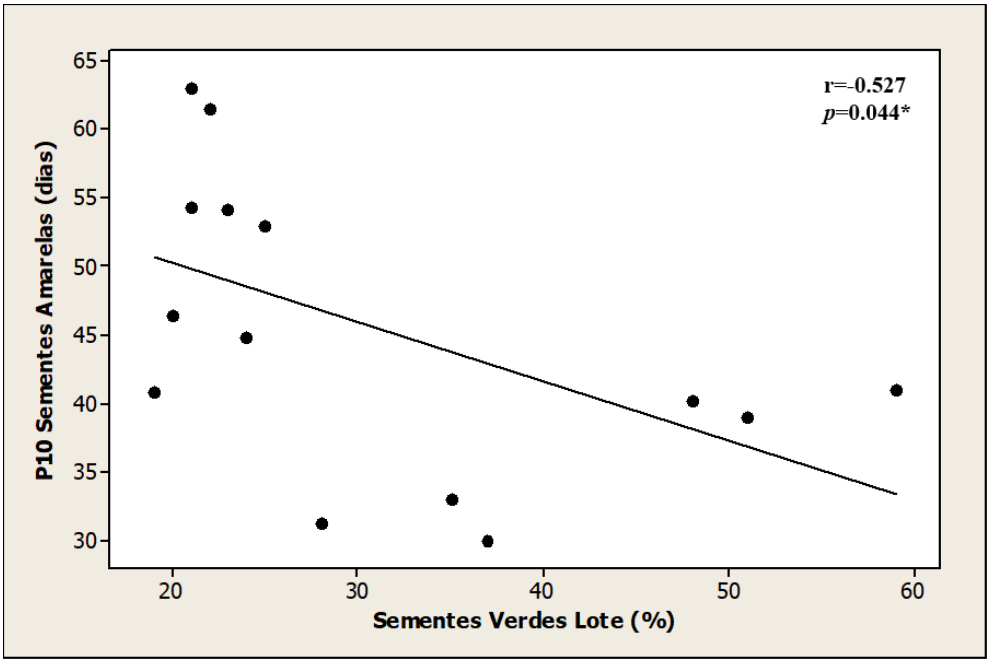
r: coeficientes de correlação de Pearson;

p: nível de significância;

** significativo a 1% de probabilidade.

A correlação entre a porcentagem de sementes verdes do lote e o tempo necessário para perda de viabilidade durante o armazenamento (P10) das sementes amarelas do mesmo é apresentada na Figura 10. A correlação negativa significativa (r=-0.527) aponta que, para todas as cultivares ou ambientes de produção avaliados, quanto maior é a porcentagem de sementes verdes do lote menor é o tempo necessário para redução da viabilidade das sementes amarelas ao longo do armazenamento.

Figura 10 - Correlação entre a porcentagem de sementes do lote e o tempo necessário para perda de viabilidade de sementes amarelas durante o armazenamento (P10) dos lotes das diferentes cultivares selecionadas (5 lotes x 3 repetições)



r: coeficientes de correlação de Pearson;

p: nível de significância;

* significativo a 5% de probabilidade.

3.3.4 Influência ambiental e genotípica no conteúdo de clorofila

O conteúdo de clorofila a (Cl a) e clorofila b (Cl b) em sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados para avaliação da longevidade foram determinados por HPLC (Tabela 1-4).

Nas Tabelas 1 e 2 são dispostos os resultados relativos a influência do ambiente (Combinação 1) de diferentes locais de produção no conteúdo de clorofila (Cl a e b) de sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Tabela 1) e NA 5909 RG (Tabela 2).

Na Tabela 1 foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para a cultivar 8473 RSF nos conteúdos de Cl a e b. Os resultados de Cl a e b dentro de ambos os locais de produção diferiram significativamente entre sementes verdes e amarelas, sendo que as sementes verdes apresentaram os maiores resultados. Considerando a interação local de produção

dentro de cada classificação de cor, foi constatado maior retenção de Cl a e b em sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 7).

Para a cultivar NA 5909 RG (Tabela 2), foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para a variável Cl a, onde foi verificado maior conteúdo do pigmento em sementes verdes dentro de ambos os locais de produção. Tendo em vista o desdobramento da interação local de produção dentro das classificações de cor, foi encontrado maior conteúdo de Cl a em sementes verdes de lotes produzidos em Ubiratã-PR (Lote 27). Não foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação da semente para a variável Cl b, mas efeitos isolados das classificações de cor foram observados, sementes verdes apresentaram maior retenção de Cl b quando comparadas com as amarelas.

Tabela 1 - Influência ambiental (Combinação 1) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Paraúna-GO (Lote 7)	10,27 Aa	0,08 Ab	5,17	6,01 Aa	0,14 Ab	3,07
Rio Verde-GO (Lote 8)	3,67 Ba	0,10 Ab	1,88	1,67 Ba	0,15 Ab	0,91
Médias	6,97	0,09	3,52	3,84	0,15	1,99
CV (%)	7,92			10,94		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 2 - Influência ambiental (Combinação 1) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	3,99 Aa	0,10 Ab	2,04	1,43	0,16	0,79 A
Paraúna-GO (Lote 29)	3,71 Ba	0,21 Ab	1,96	1,96	0,18	1,07 A
Médias	3,85	0,15	2,00	1,70 a	0,17 b	0,93
CV (%)	5,42			45,91		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Nas Tabelas 3 e 4 são dispostos os resultados relativos a influência do genótipo (Combinação 2) de diferentes cultivares no conteúdo de clorofila (Cl a e b) de sementes verdes e amarelas de lotes produzidos em Paraúna-GO (Tabela 3) e Ubiratã-PR (Tabela 4).

Conforme os resultados no conteúdo de Cl a e b da Tabela 3, foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente em lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidas em Paraúna-GO. Os resultados de Cl a e b de ambas as cultivares diferiram significativamente entre sementes verdes e amarelas, sendo que as sementes verdes apresentaram os maiores resultados. Referente ao desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor, maior retenção de Cl a e b foi verificada em sementes verdes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) na cidade em questão (Tabela 3).

Efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente para as variáveis Cl a e b foram constatados em lotes de cultivares produzidas em Ubiratã-PR (Tabela 4). Ambas as cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NS 5959 IPRO (Lote 23) apresentaram maior retenção de Cl a e b em sementes classificadas como verdes. Além disso, em sementes verdes da cultivar NA 5909 RG (Lote 27) observou-se maior conteúdo de Cl a e menor de Cl b, analisando o desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor da semente.

Tabela 3 - Influência genotípica (Combinação 2) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) e produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	10,2 Aa	0,08 Ab	5,17	6,01 Aa	0,14 Ab	3,07
NA 5909 RG (Lote 29)	3,71 Ba	0,21 Ab	1,96	1,96 Ba	0,18 Ab	1,07
Médias	6,99	0,14	3,56	3,98	0,16	2,07
CV (%)	8,14			10,87		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 4 - Influência genotípica (Combinação 2) no conteúdo de Cl a e b de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) e produzidos em Ubiratã-PR

Cultivar	Cl a (ppm)*			Cl b (ppm)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	3,12 Ba	0,09 Ab	1,60	2,84 Aa	0,20 Ab	1,52
NA 5909 RG (Lote 27)	3,99 Aa	0,10 Ab	2,04	1,43 Ba	0,16 Ab	0,79
Médias	3,55	0,09	1,82	2,14	0,18	1,15
CV (%)	4,23			36,75		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

3.3.5 Influência ambiental e genotípica na viabilidade inicial

A viabilidade inicial de sementes verdes e amarelas dos lotes selecionados para avaliação da longevidade foi determinada pelo teste de tetrazólio (Tabela 5-8). O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias. Estas enzimas, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) nos tecidos vivos e essa reação resulta na formação de um composto vermelho, estável e não-difusível (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998). Por outro lado, tecidos não viáveis não reagem e consequentemente não são coloridos ou se o tecido está em deterioração, um vermelho mais intenso é formado, em virtude da maior intensidade de difusão da solução pelas membranas celulares comprometidas de tais tecidos (BULAT, 1961; MOORE, 1973). Em sementes de soja, a observação de tais diferenças de cor, juntamente com o conhecimento de diversas características das sementes, permite categorizar as sementes em viáveis (Classes 1 a 5) e inviáveis (6 a 8) (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998).

De forma geral, de acordo com os dados dispostos nas Tabelas 5, 6, 7 e 8 as sementes verdes apresentaram menor viabilidade inicial quando comparadas com as amarelas do mesmo lote, independente da cultivar ou local de produção avaliados (Combinação 1 e 2).

A viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes do mesmo genótipo produzidos em locais diferentes (Combinação 1) são apresentadas nas Tabelas 5 e 6. Levando-se em conta o ambiente de produção dos lotes da cultivar 8473 RSF

(Tabela 5), foi observado menor viabilidade em sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 7). Considerando a influência ambiental na viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG (Tabela 6), não foi verificado comportamento diferencial por conta da interação dos fatores Local de produção x Classificação da semente. No entanto, resultados médios indicam que sementes produzidas em Paraúna-GO apresentaram menor viabilidade do que aquelas produzidas em Ubiratã-PR (Tabela 6).

Tabela 5 - Influência ambiental (Combinação 1) na viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	**Viabilidade (%)***		
	Classificação		
	Verdes	**Amarelas**	**Médias**
Paraúna-GO (Lote 7)	44,00 Bb	97,33 Aa	70,66
Rio Verde-GO (Lote 8)	62,66 Ab	88,00 Aa	75,33
Médias	53,33	92,66	72,99
CV (%)	9,75		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 6 - Influência ambiental (Combinação 1) na viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	**Viabilidade (%)***		
	Classificação		
	Verdes	**Amarelas**	**Médias**
Ubiratã-PR (Lote 27)	80,00	93,33	86,66 A
Paraúna-GO (Lote 29)	60,00	74,66	67,33 B
Médias	70,00 b	84,00 a	77,00
CV (%)	5,61		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

A viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes de diferentes genótipos produzidos no mesmo local (Combinação 2) é apresentada nas Tabelas 7 e 8. Quando produzidas na cidade de Paraúna-GO, sementes verdes da cultivar 8473 RSF (Lote

7) apresentaram viabilidade reduzida se comparadas com sementes verdes da cultivar NA 5909 RG (Lote 29). Contudo, o oposto foi observado para as sementes amarelas, onde a menor viabilidade foi verificada em sementes da cultivar NA 5909 RG (Lote 29) (Tabelas 7). Tendo em vista lotes das cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidos em Ubiratã-PR, a cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) apresentou menor viabilidade em sementes verdes (Tabelas 8).

Tabela 7 - Influência genotípica (Combinação 2) na viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	Viabilidade (%)*		
	Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	44,00 Bb	97,33 Aa	70,66
NA 5909 RG (Lote 29)	60,00 Ab	74,66 Ba	67,33
Médias	52,00	86,00	69,00
CV (%)	8,03		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 8 - Influência genotípica (Combinação 2) na viabilidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidos em Ubiratã-PR

Cultivar	Viabilidade (%)*		
	Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	53,33 Bb	90,66 Aa	72,00
NA 5909 RG (Lote 27)	80,00 Ab	93,33 Aa	86,66
Médias	66,66	92,00	79,33
CV (%)	5,64		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

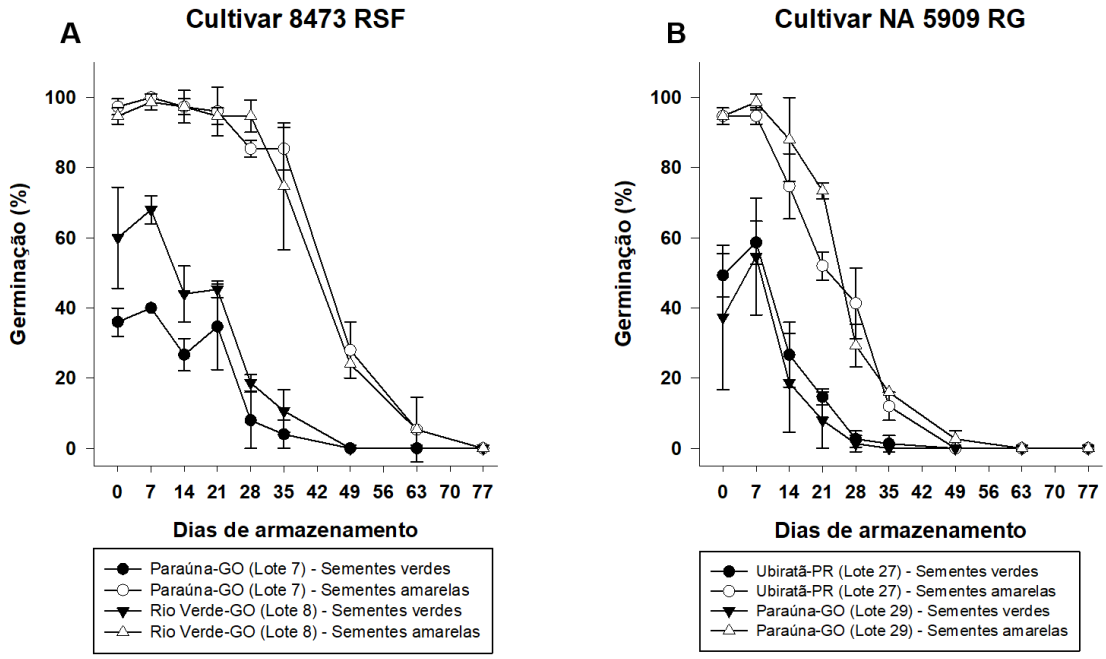
3.3.6 Influência ambiental e genotípica na longevidade

Com a finalidade de avaliar o contraste na longevidade entre sementes verdes e amarelas, as sementes dos diferentes tratamentos foram armazenadas a 75% de UR e 35°C. Em momentos específicos durante o armazenamento, amostras dos

diferentes tratamentos foram avaliadas quanto a germinação como um indicador de viabilidade.

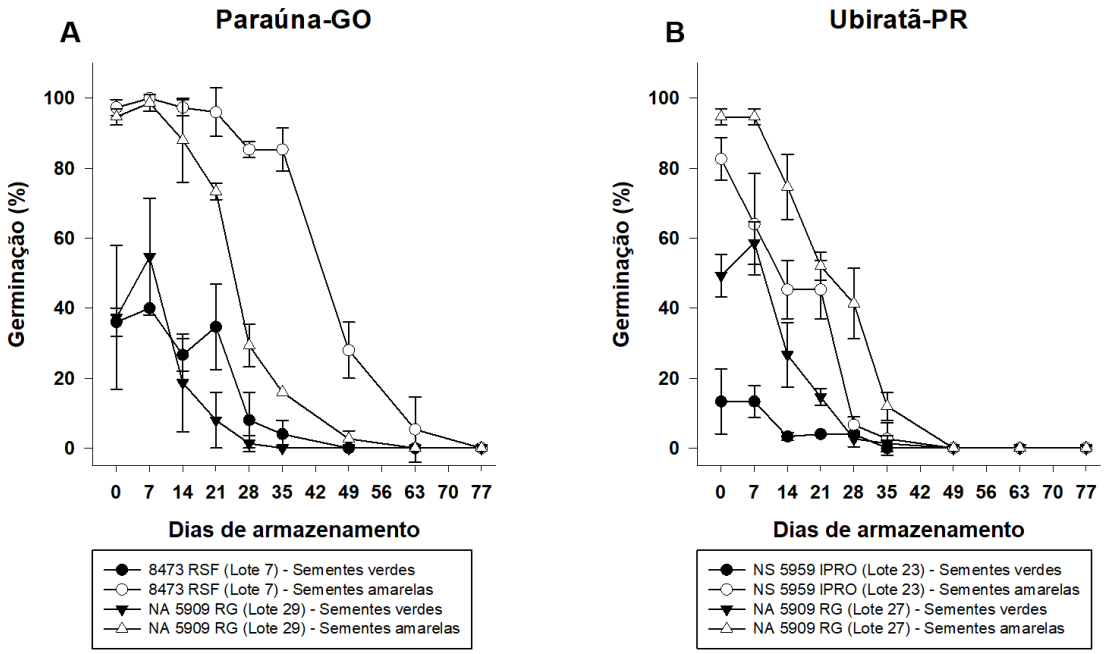
Na Figura 11 são apresentadas as curvas de perda de viabilidade ao longo do tempo para as sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Figura 11A) e NA 5909 RG (Figura 11B), quando estes foram originados de diferentes locais de produção. Dessa forma, uma abordagem quanto as interferências do ambiente de produção na longevidade das sementes verdes e amarelas (Combinação 1) é apresentada. Avaliando a figura observa-se que sementes verdes dos lotes das cultivares 8473 RSF (Figura 11A) e NA 5909 RG (Figura 11B) possuem menor capacidade que sementes amarelas em permanecerem viáveis durante o armazenamento, independentemente do local onde são produzidas. Outra informação importante que pode ser observada é o comportamento similar entre as curvas de perda de viabilidade de sementes verdes de lotes da mesma cultivar, sem grandes diferenças quanto ao local onde foram produzidas, o mesmo foi observado para sementes amarelas (Figura 11A-B).

Figura 11 - Influência ambiental (Combinação 1) na germinação ao longo do teste de longevidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8) (A) e da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29) (B)



Levando-se em conta a Figura 12, onde se avalia a interferência do genótipo na longevidade das sementes (Combinação 2), observa-se as curvas de perda de viabilidade ao longo do tempo para as sementes verdes e amarelas de lotes de diferentes cultivares produzidos em Paraúna-GO (Figura 12A) e Ubiratã-PR (Figura 12B). Sementes verdes dos lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) possuem menor capacidade que sementes amarelas do mesmo lote em permanecerem viáveis durante o armazenamento quando foram produzidas em Paraúna-GO (Figura 12A). O mesmo comportamento foi observado para as sementes verdes das cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidas em Ubiratã-PR (Figura 12B). É importante ressaltar o comportamento divergente entre as curvas de perda de viabilidade de sementes verdes de lotes das diferentes cultivares, mesmo quando produzidos no mesmo local e em condições ambientais similares (Figura 6), o mesmo foi observado para sementes amarelas (Figura 12A-B).

Figura 12 - Influência genotípica (Combinação 2) na germinação ao longo do teste de longevidade de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) e produzidos em Paraúna-GO (A) e da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) e produzidos em Ubiratã-PR (B)



Para compreender quais são os efeitos da retenção de clorofila na longevidade das sementes e o quão rápido é a perda da viabilidade de sementes verdes durante o armazenamento foi feito uso da equação de viabilidade de Ellis e Roberts (1980).

O uso desta equação fornece parâmetros para quantificar a taxa de perda de qualidade da semente durante o armazenamento. Um desses parâmetros calculados neste estudo é o valor de Sigma (*) da equação (Tabela 9-12), que possui relação com a inclinação da curva de perda de viabilidade ao longo do tempo, ou seja, quanto maior é o valor de Sigma, mais inclinada é a curva de perda de viabilidade e menor é o tempo necessário para a morte das sementes. Além disso, foi realizado o cálculo do tempo (dias) em que a amostra de sementes verdes e amarelas armazenadas perdeu 10% da viabilidade durante o armazenamento (P10) (ELLIS; ROBERTS, 1980) (Tabela 9-12). Considerando que as amostras se tratam de sementes com baixa viabilidade inicial, principalmente as sementes verdes (Tabela 5-8), não foi possível

realizar o cálculo do P50 (tempo em que a amostra armazenada perde 50% da viabilidade durante o armazenamento) usualmente usado nesses estudos.

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os resultados relativos a influência do ambiente (Combinação 1) de diferentes locais de produção no Sigma e P10 de sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Tabela 9) e NA 5909 RG (Tabela 10).

Conforme os resultados descritos na Tabela 9, não foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para a cultivar 8473 RSF quando esta foi produzida em Paraúna-GO e Rio Verde-GO para os parâmetros Sigma e P10. Efeitos isolados dentro da classificação de cor da semente foram observados, sementes verdes apresentaram maior valor de Sigma e menor valor de P10 quando comparadas com as amarelas (Tabela 9). Ou seja, sementes verdes apresentaram maior inclinação da curva de perda de viabilidade e menor tempo para que as amostras armazenadas perdessem 10% da viabilidade ao longo do tempo de armazenamento. O mesmo comportamento foi observado para a cultivar NA 5909 RG em lotes produzidos em Ubiratã-PR e Paraúna-GO (Tabela 10).

Tabela 9. Influência ambiental (Combinação 1) no Sigma e P10 de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	**Sigma***			**P10***		
	Classificação			**Classificação**		
	Verdes	**Amarelas**	**Médias**	**Verdes**	**Amarelas**	**Médias**
Paraúna-GO (Lote 7)	22,20	12,38	17,29 A	24,50	56,70	40,60 A
Rio Verde-GO (Lote 8)	18,19	13,05	15,62 A	33,66	56,78	45,22 A
Médias	20,20 a	12,71 b	16,45	29,08 b	56,74 a	42,91
CV (%)	7,71			8,95		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 10 - Influência ambiental (Combinação 1) no Sigma e P10 de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	Sigma*			P10*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	20,89	13,77	18,47 A	23,22	40,06	31,64 A
Paraúna-GO (Lote 29)	24,25	12,70	17,33 A	14,29	44,04	29,16 A
Médias	22,57 a	13,23 b	17,9	18,75 b	42,05 a	30,4
CV (%)	12,28			16,19		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentados os resultados relativos a influência do genótipo (Combinação 2) de diferentes cultivares para os parâmetros Sigma e P10 de sementes verdes e amarelas de lotes produzidos em Paraúna-GO (Tabela 11) e Ubiratã-PR (Tabela 12).

Não foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação da semente em lotes de cultivares (8473 RSF-Lote 7 e NA 5909 RG-Lote 29) produzidas em Paraúna-GO para os parâmetros Sigma e P10 (Tabela 11). Efeitos isolados foram observados. Por conta do fator classificação de cor da semente, foram observados maiores valores de Sigma e menores valores de P10 em sementes verdes. Além disso, efeitos isolados dentro da cultivar foram verificados para P10, onde a cultivar NA 5909 RG (Lote 29) apresentou menores resultados (Tabela 11).

Efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação da semente para as variáveis Sigma e P10 foram constatados em lotes de cultivares produzidas em Ubiratã-PR (Tabela 12). Ambas as cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27), apresentaram maior inclinação da curva de perda de viabilidade (Sigma) e menor tempo para que as amostras armazenadas perdessem 10% da viabilidade ao longo do tempo de armazenamento (P10) em sementes classificadas como verdes (Tabela 12). Além disso, analisando o desdobramento da interação cultivar dentro da classificação de cor da semente, em sementes verdes e amarelas da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) observou-se maior Sigma e menor P10 (Tabela 12).

Tabela 11 - Influência genotípica (Combinação 2) no Sigma e P10 de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	Sigma*			P10*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	22,20	12,38	18,47 A	24,50	56,70	40,60 A
NA 5909 RG (Lote 29)	24,25	12,70	17,29 A	14,29	44,04	29,16 B
Médias	23,22 a	12,54 b	17,88	19,39 b	50,37 a	34,88
CV (%)	13,38			15,30		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 12 - Influência genotípica (Combinação 2) no Sigma e P10 de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidos em Ubiratã-PR

Cultivar	Sigma*			P10*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	34,14 Aa	16,97 Ab	25,55 A	0,48 Bb	31,37 Ba	15,93 B
NA 5909 RG (Lote 27)	20,89 Ba	13,77 Bb	17,33 B	23,22 Ab	40,06 Aa	31,64 A
Médias	27,51 a	15,37 b	21,44	11,85 b	35,71 a	23,78
CV (%)	2,52			7,19		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

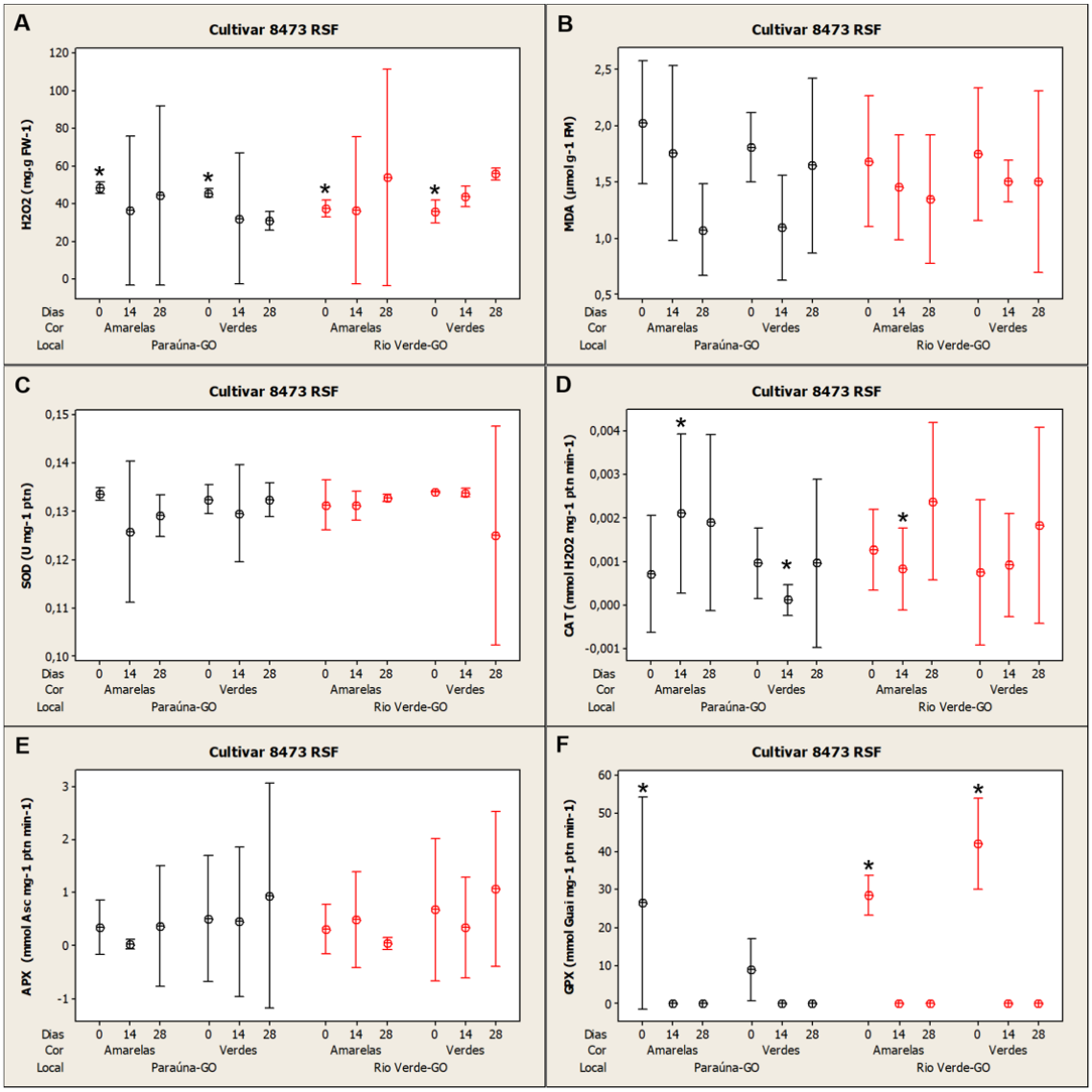
3.3.7 Influência ambiental e genotípica em alterações bioquímicas na longevidade das sementes

Análises bioquímicas foram realizadas em determinados momentos da avaliação da longevidade das sementes verdes e amarelas dos diferentes tratamentos (Figura 13-16 e Tabela 13-16). Mais especificamente aos 0, 14 e 28 dias de armazenamento foram avaliados os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), da extensão da peroxidação lipídica (estimada pelos níveis de malondialdeído-MDA) e da atividade de enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase-SOD, catalase CAT, ascorbato peroxidase-APX e guaiacol peroxidase-GPX). Os resultados médios de intervalos de confiança relativos aos parâmetros bioquímicos avaliados foram apresentados quando se avaliou a influência do ambiente (Combinação 1 -

Figuras 13 e 14) e do genótipo (Combinação 2 - Figuras 15 e 16) ao longo do tempo de armazenamento das sementes e, ao ser constatado efeitos significativos isolados ou da interação em cada tempo de armazenamento, os resultados foram apresentados individualmente (Tabela 13-16).

Na Figura 13 é possível observar os parâmetros bioquímicos avaliados ao longo do tempo de armazenamento em sementes da cultivar 8473 RSF produzidas em Paraúna-GO e Rio Verde-GO. Os níveis de H_2O_2 apresentaram tendência de redução ao longo do tempo de armazenamento em sementes verdes e amarelas produzidas em Paraúna-GO, no entanto, o oposto foi observado em verdes e amarelas produzidas em Rio Verde-GO (Figura 13A). Os níveis de MDA apresentaram tendência de redução em verdes e amarelas de ambos os locais ao longo do tempo (Figura 13B). Quanto as enzimas do sistema antioxidante, a atividade da SOD foi reduzida em amarelas de Paraúna-GO e em verdes de Rio Verde-GO ao longo do tempo (Figura 13C). Verificou-se baixa atividade de CAT em todos os tratamentos avaliados com discreta tendência de aumento em amarelas de Paraúna-GO e verdes e amarelas de Rio Verde-GO (Figura 13D). A atividade da APX aumentou em verdes de ambas as cidades ao longo do tempo (Figura 13E). A atividade de GPX não foi expressiva (Figura 13F).

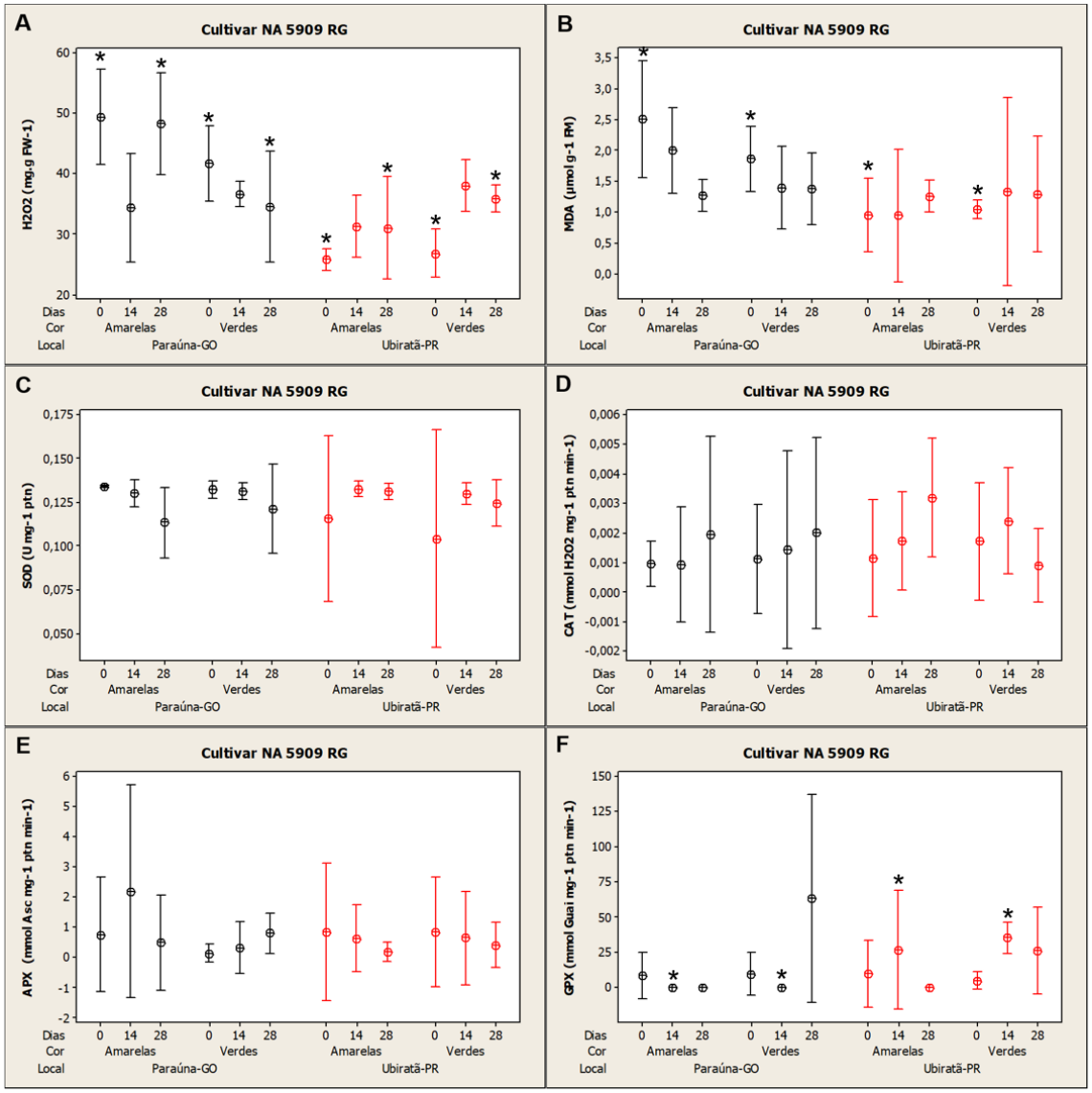
Figura 13 - Influência ambiental (Combinação 1) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)



Os parâmetros bioquímicos avaliados ao longo do tempo de armazenamento em sementes da cultivar NA 5909 RG produzidas em Paraúna-GO e Ubiratã-PR são apresentados na Figura 14. Os níveis de H_2O_2 apresentaram tendência de redução em sementes verdes de Paraúna-GO e de aumento em sementes verdes e amarelas de Ubiratã-PR. Além disso, maiores valores foram observados em amarelas quando produzidas em Paraúna-GO, se comparadas com amarelas produzidas em Ubiratã-PR (Figura 14A). Os níveis de MDA apresentaram tendência de redução em verdes e amarelas de Paraúna-GO e discretos aumentos em verdes e amarelas de Ubiratã-PR ao longo do tempo de armazenamento. No início do armazenamento, maiores

quantidades de MDA foram verificadas em amarelas de Paraúna-GO quando comparadas com amarelas de Ubiratã-PR, mas no final do armazenamento os resultados entre elas tornaram-se semelhantes (Figura 14B). A atividade de SOD seguiu uma disposição de redução em verdes e amarelas de Paraúna-GO e de aumento em verdes e amarelas de Ubiratã-PR (Figura 14C). Verificou-se baixa atividade de CAT em todos os tratamentos com discreta tendência de aumento em verdes e amarelas de Paraúna-GO e amarelas de Ubiratã-PR durante o envelhecimento das sementes (Figura 14D). A atividade de APX aumentou em verdes produzidas em Paraúna-GO e reduziu em verdes e amarelas produzidas em Ubiratã (Figura 14E). A atividade de GPX não foi expressiva (Figura 14F).

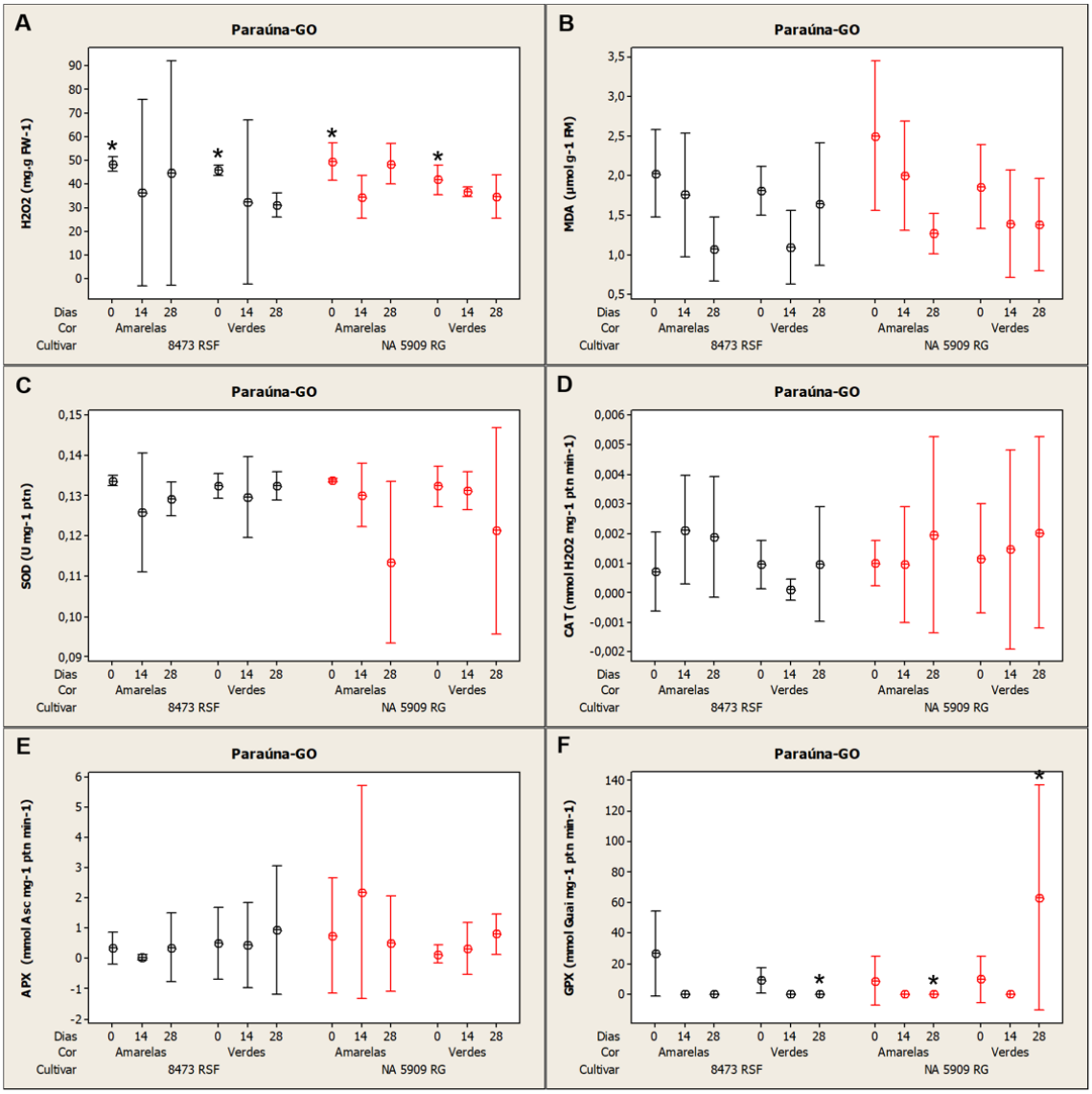
Figura 14 - Influência ambiental (Combinação 1) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)



Na Figura 15 é possível observar os parâmetros bioquímicos avaliados ao longo do tempo de armazenamento em sementes das cultivares 8473 RSF e NA 5909 RG produzidas em Paraúna-GO. Os níveis de H_2O_2 apresentaram tendência de redução em sementes verdes de ambas as cultivares (Figura 15A). Os níveis de MDA apresentaram tendência de redução em verdes e amarelas ao longo do tempo em ambas as cultivares (Figura 15B). A atividade de SOD reduziu em amarelas e verdes de NA 5909 RG e foi constante para 8473 RSF (Figura 15C). Verificou-se baixa atividade de CAT em todos os tratamentos com discreta tendência de aumentos em amarelas de 8473 RSF e em verdes e amarelas de NA 5909 RG ao longo do tempo

(Figura 15D). A atividade de APX aumentou em amarelas de 8473 RSF e verdes de NA 5909 RG (Figura 15E). A atividade de GPX não foi expressiva (Figura 15F).

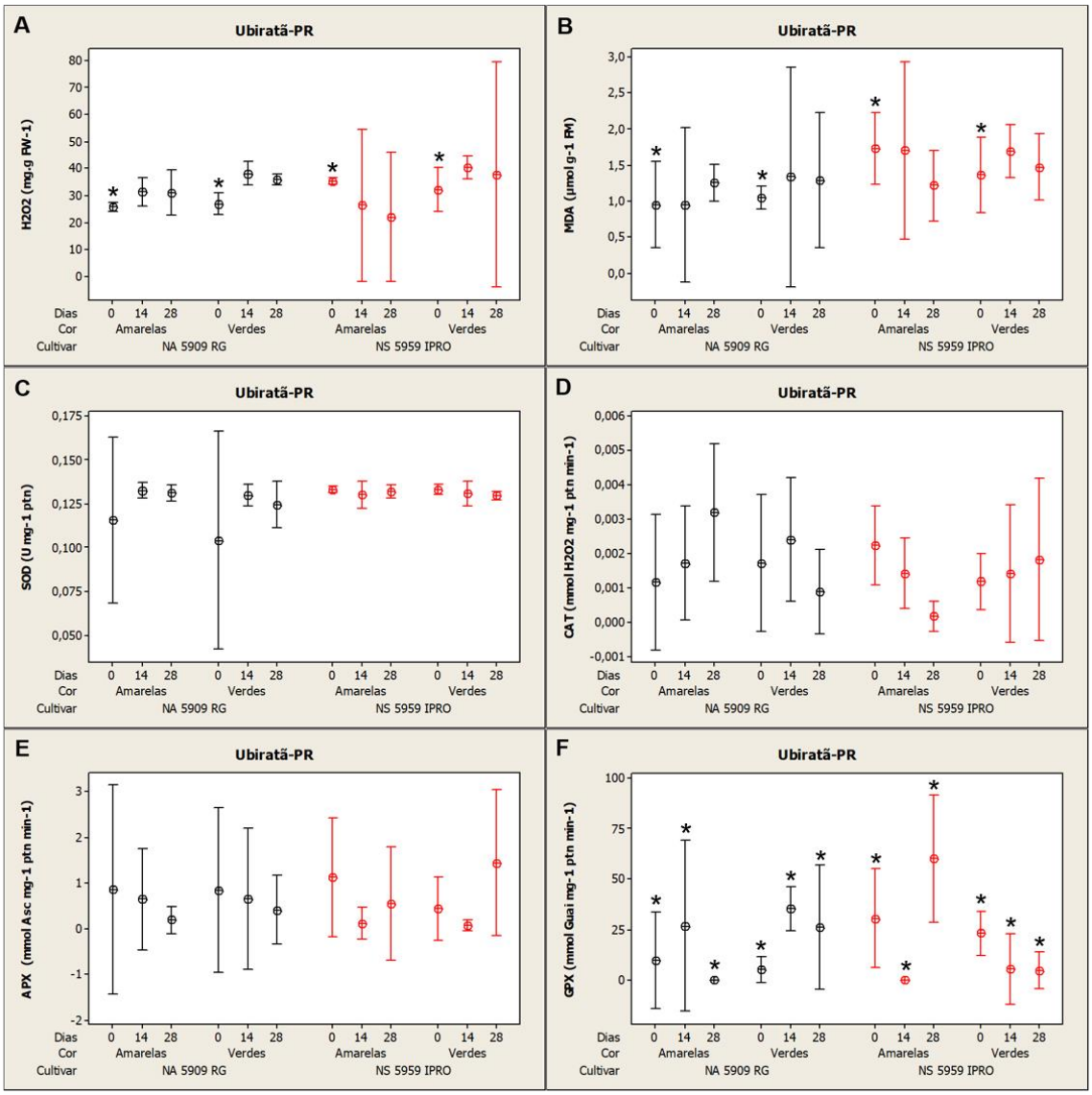
Figura 15 - Influência genotípica (Combinação 2) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidos em Paraúna-GO



Os parâmetros bioquímicos avaliados ao longo do tempo de armazenamento em sementes das cultivares NA 5909 RG e NS 5959 IPRO produzidas em Ubiratã-PR são apresentados na Figura 16. Os níveis de H_2O_2 apresentaram discretos aumentos em sementes verdes e amarelas da cultivar NA 5909 RG e em sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO, além de redução em amarelas de NS 5959 IPRO (Figura 16A).

Os níveis de MDA apresentaram aumentos em verdes e amarelas de NA 5909 RG e reduções em amarelas de NS 5959 IPRO (Figura 16B) ao longo do tempo. A atividade de SOD aumentou em verdes e amarelas de NA 5909 RG e não alteraram para NS 5959 ao longo do armazenamento (Figura 16C). Verificou-se baixa atividade de CAT em todos os tratamentos com discreta tendência de aumentos em amarelas e reduções em verdes de NA 5909 RG e o aposto para NS 5959 IPRO (Figura 16D). A atividade de APX seguiu uma disposição de redução em verdes e amarelas de NA 5909 RG e de aumento em verdes de NS 5959 IPRO (Figura 16E). A atividade de GPX apresentou aumento em verdes de NA 5909 RG e amarelas de NS 5959 IPRO e reduções em verdes de NS 5959 IPRO (Figura 16F).

Figura 16 - Influência genotípica (Combinação 2) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidos em Ubiratã-PR



Além dos resultados médios de intervalos de confiança (Figura 13-16), quando se observou diferença significativa dos efeitos isolados ou da interação em cada tempo de armazenamento para os parâmetros bioquímicos avaliados os mesmos foram apresentados individualmente (Combinação 1/Tabela 13-14 e Combinação 2/Tabela 15-16).

Considerando o ambiente de produção dos lotes da cultivar 8473 RSF (Tabela 13), foi observado que no início do armazenamento (0 dias), em média, sementes produzidas em Paraúna-GO apresentaram maiores níveis de H_2O_2. Comportamento diferencial por conta da interação dos fatores Local de produção x Classificação de

cor da semente foi observado aos 0 dias para atividade da enzima GPX, onde sementes verdes produzidas em Paraúna-GO apresentaram menor atividade quando comparadas com sementes amarelas do mesmo local e com sementes verdes de Rio Verde-GO. Além disso, aos 14 dias para atividade da enzima CAT, sementes verdes produzidas em Paraúna-GO apresentaram menor atividade enzimática do que amarelas do mesmo local, assim como sementes amarelas que foram produzidas em Rio Verde-GO (Tabela 13).

Ainda levando em conta o ambiente de produção dos lotes, segundo os dados médios registrados na Tabela 14 para a cultivar NA 5909 RG foi observado que, em média, sementes produzidas em Ubiratã-PR apresentaram menores níveis de H_2O_2 (0 e 28 dias) e, consequentemente, menor extensão da peroxidação lipídica (MDA) (0 dias). Além disso, aos 14 dias de armazenamento, maior atividade da enzima GPX ocorreu em sementes produzidas no mesmo local (Tabela 14).

Na Tabela 15, ao avaliar a influência dos genótipos 8473 RSF e NA 5909 RG, verifica-se que, em média, sementes verdes apresentam menores índices de H_2O_2 no início do armazenamento (0 dias). Aos 28 dias de armazenamento, levando em conta a interação entre os fatores analisados, maior atividade da enzima GPX foi observada em sementes verdes da cultivar NA 5909 RG (Tabela 15).

A influência genotípica das cultivares NS 5959 IPRO e NA 5909 RG para os parâmetros bioquímicos avaliados é apresentada na Tabela 16. Efeitos isolados dos fatores foram verificados onde, em média, sementes da cultivar NS 5959 IPRO apresentaram maiores níveis de H_2O_2, menores níveis de MDA e maior atividade da enzima GPX no início do armazenamento (0 dias). Aos 14 dias de armazenamento, em média, a atividade da enzima GPX foi menor em sementes da cultivar NS 5959 IPRO. Foi verificado comportamento diferencial por conta da interação dos fatores Cultivar x Classificação de cor da semente para a atividade das enzimas CAT e GPX aos 28 dias de armazenamento. Quando se comparou a classificação de cor, sementes verdes de NS 5959 IPRO apresentaram maior atividade da enzima CAT enquanto que o oposto foi observado em sementes verdes de NA 5909 RG. Soma-se a isso, menor atividade da enzima em questão em sementes amarelas da cultivar NS 5959 IPRO quando se comparou as diferentes cultivares. Já para a enzima GPX, menor atividade foi verificada em sementes amarelas da cultivar NA 5909 RG (Tabela 16).

Tabela 13 - Influência ambiental (Combinação 1) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	0 Dias H_2O_2 (mg.g FW^{-1})*			O Dias GPX (mmol Guai mg^{-1} ptn min^{-1})*			14 Dias CAT (mmol H_2O_2 mg^{-1} ptn min^{-1})**		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Paraúna-GO (Lote 7)	45,69	48,42	47,06 A	8,98 Bb	26,48 Aa	17,73	0,0001119 Ab	0,00211117 Aa	0,0011115
Rio Verde-GO (Lote 8)	36,18	37,58	36,88 B	41,98 Aa	28,53 Aa	35,25	0,0009219 Aa	0,0008341 Ba	0,000878
Médias	40,93 a	43,00 a		25,48	27,50		0,0005169	0,0014726	
CV (%)		6,21			37,64			0,76	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 14 - Influência ambiental (Combinação 1) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	0 Dias H_2O_2 (mg.g FW^{-1})*			0 Dias MDA (µmol g^{-1} FM)*		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	26,84	25,79	26,32 B	1,04	0,95	1,00 B
Paraúna-GO (Lote 29)	41,77	49,48	45,62 A	1,86	2,50	2,18 A
Médias	34,30 a	37,63 a		1,45 a	1,72 a	
CV (%)		9,57			24,54	
Local de produção	**14 Dias GPX (mmol Guai mg^{-1} ptn min^{-1})***			**28 Dias H_2O_2 (mg.g FW^{-1})***		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	35,33	26,77	31,10 A	35,89	31,04	33,46 B
Paraúna-GO (Lote 29)	0,00	0,00	0,00 B	34,63	48,38	41,50 A
Médias	17,7 a	13,4 a		35,26 a	39,71 a	
CV (%)		0,88			12,80	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 15 - Influência genotípica (Combinação 2) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	0 Dias H_2O_2 (mg.g FW^{-1})*			28 Dias GPX (mmol Guai mg^{-1} ptn min^{-1})**		
	Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	45,69	48,42	47,06 A	0,00 Ba	0,00 Aa	0,00
NA 5909 RG (Lote 29)	41,77	49,48	45,62 A	63,27 Aa	0,00 Ab	31,63
Médias	43,73 b	48,95 a		31,63	0,00	
CV (%)		7,30			1,46	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 16 - Influência genotípica (Combinação 2) na atividade bioquímica durante o envelhecimento de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidos em Ubiratã-PR

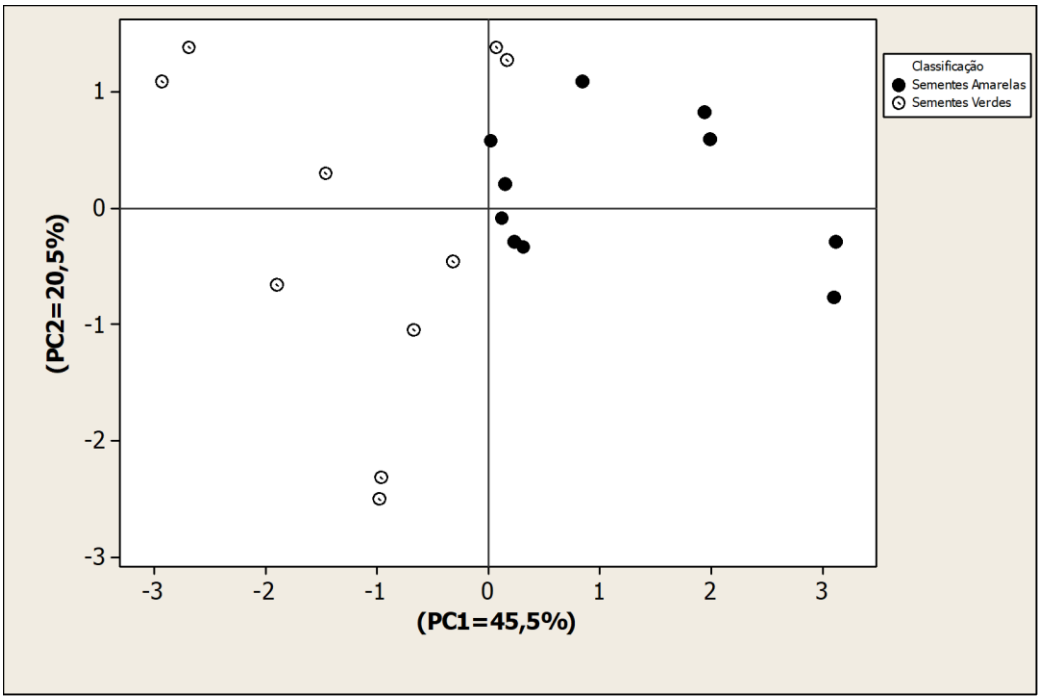
Cultivar	0 Dias H_2O_2 (mg.g FW^{-1})*			0 Dias MDA (µmol g^{-1} FM)*			0 Dias GPX (mmol Guai mg^{-1} ptn min^{-1})*		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	32,19	35,37	33,78 A	1,36	1,73	1,00 B	23,13	30,41	26,80 A
NA 5909 RG (Lote 27)	26,84	25,79	26,32 B	1,04	0,95	1,54 A	4,98	9,84	7,40 B
Médias	29,51 a	30,58 a		1,20 a	1,34 a		14,10 a	20,10 a	
CV (%)		9,93			23,38			0,66	
Cultivar	**14 Dias GPX (mmol Guai mg^{-1} ptn min^{-1})***			**28 Dias CAT (mmol H_2O_2 mg^{-1} ptn min^{-1})***			**28 Dias GPX (mmol Guai mg^{-1} ptn min^{-1})***		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	5,51	0,00	2,80 B	0,0018278 Aa	0,0001857 Bb	0,00100675	4,70 Ab	60,07 Aa	32,38
NA 5909 RG (Lote 27)	35,33	26,77	31,10 A	0,0009024 Ab	0,0032114 Aa	0,0020569	26,23 Aa	0,00 Bb	13,11
Médias	20,42 a	13,40 a		0,0013651	0,00169855		15,46	30,03	
CV (%)		0,87			0,69			0,61	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

3.3.8 Qualidade do óleo das sementes

Além de afetar a qualidade fisiológica das sementes, a retenção de clorofila também reduz a qualidade do óleo extraído em sementes oleaginosas. Neste estudo, alguns parâmetros de qualidade do óleo foram avaliados para compreender a relação entre a longevidade de sementes que apresentam retenção de clorofila com a qualidade do óleo extraído das mesmas. Para isso, o teor de óleo, o conteúdo de clorofila, a estabilidade oxidativa e a presença de tocoferóis (alfa, gama e delta) dos óleos extraídos de sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes selecionados para avaliação da longevidade foram determinados por HPLC e uma análise de componentes principais é apresentada na Figura 17 para uma análise geral dos parâmetros avaliados. É possível verificar acentuada variação na qualidade do óleo quanto as variáveis analisadas já que as amostras de óleo de sementes verdes e amarelas se encontram dispostas em posicionamento contrário ao longo das duas primeiras componentes (PC1=45,5% e PC2=20,5%) (Figura 17).

Figura 17 - Análise de componentes principais do teor de óleo, conteúdo de clorofila total, estabilidade oxidativa e tocoferóis (alfa, gama e delta) de óleo extraído de sementes classificadas como verdes e amarelas dos lotes das diferentes cultivares selecionadas para avaliação da longevidade (5 lotes x 2 repetições x 2 classificações de cor)



3.3.9 Influência ambiental e genotípica na qualidade do óleo das sementes

Nas Tabelas 17 e 18 são dispostos os resultados relativos a influência do ambiente (Combinação 1) de diferentes locais de produção na qualidade do óleo extraído de sementes verdes e amarelas de lotes das cultivares 8473 RSF (Tabela 17) e NA 5909 RG (Tabela 18).

Para a cultivar 8473 RSF (Tabela 17), foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação de cor da semente para as variáveis teor de óleo, conteúdo de clorofila, estabilidade oxidativa e tocoferóis gama e delta. Não foram constatados efeitos significativos da interação para a variável tocoferol alfa.

Na interação classificação de cor da semente dentro dos locais de produção, foi verificado maior teor de óleo em sementes verdes produzidas em Rio Verde-GO (Lote 8). Além disso, quando se avalia os locais de produção dentro da classificação, também foi observado maior teor de óleo em sementes verdes do Lote 8 (Rio Verde-GO) (Tabela 17). Para o conteúdo de clorofila, segundo os referidos dados, a

classificação de cor da semente (verde e amarela) resultaram em maior teor de clorofila no óleo obtido de sementes verdes de ambos os locais de produção. Quando examinados os locais de produção dentro da classificação de cor, foi constatado maior conteúdo de clorofila no óleo obtido de sementes verdes produzidas em Rio Verde-GO (Tabela 17). Como revelado pelos dados de tocoferóis (alfa, gama e delta) dispostos na Tabela 17, efeitos isolados do local de produção e da classificação de cor da semente foram observados para tocoferol alfa, o óleo extraído de sementes amarelas apresentou maior valor, assim como, quando a produção foi realizada em RioVerde-GO. Em ambas as interações, verificou-se maiores resultados de tocoferol gama e delta em óleo de sementes amarelas produzidas em Rio Verde-GO. No entanto, em Paraúna-GO foram observados maiores resultados de tocoferol delta para óleo de sementes verdes (Tabela 17). Tendo em vista os dados de estabilidade oxidativa (Tabela 17), o desdobramento da interação classificação da semente dentro dos locais de produção apresentou diferenças significativas onde óleos extraídos de sementes verdes de ambas as cidades de produção resultaram em menor tempo necessário para a oxidação. Foram observadas menores estabilidades em óleos de sementes produzidas em Paraúna-GO (verdes e amarelas), o que indica efeitos da interação do local de produção dentro da classificação da semente (Tabela 17).

Na Tabela 18 verifica-se que foram constatados efeitos significativos da interação Local de produção x Classificação da semente para a cultivar NA 5909 RG em todas as variáveis de qualidade de óleo analisadas.

Conforme os resultados constantes na Tabela 18, sementes amarelas produzidas na cidade de Paraúna-GO (Lote 29) ofereceram menor teor de óleo extraído quando se comparou diferentes locais de produção entre sementes amarelas e diferentes classificações de cor na mesma cidade. Os resultados no conteúdo de clorofila dentro de ambos os locais de produção diferiram significativamente entre óleos obtidos de sementes verdes e amarelas, sendo que os óleos de sementes verdes apresentaram os maiores resultados. Considerando a interação local de produção dentro de cada classificação de cor, foi constatado maior conteúdo de clorofila no óleo de sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 29) (Tabela 18). Relativo à análise dos conteúdos de tocoferóis (alfa, gama e delta), de forma geral, foi observado que óleos extraídos de sementes verdes apresentaram menores resultados quando comparados com aqueles extraídos de sementes amarelas em

ambos os locais de produção. Além disso, efeitos da interação do local de produção dentro da classificação da semente foram observados em tocoferóis alfa e gama, quando óleos de sementes amarelas e verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 29) ofereceram maior conteúdo. Cabe ressaltar que o contrário foi verificado para tocoferóis delta, onde o maior conteúdo foi encontrado em óleos de sementes produzidas em Ubiratã-PR (Lote 27) (Tabela 18). Foi verificado maior estabilidade oxidativa em óleos de sementes amarelas em ambos os locais de produção na interação classificação da semente dentro dos locais de produção. Quando examinados os locais de produção dentro da classificação, o óleo obtido de sementes verdes apresentou maior estabilidade quando as sementes foram produzidas em Paraúna-GO (Lote 29) (Tabela 18).

Nas Tabelas 19 e 20 são dispostos os resultados relativos a influência do genótipo (Combinação 2) de diferentes cultivares na qualidade do óleo extraído de sementes verdes e amarelas de lotes produzidos em Paraúna-GO (Tabela 19) e Ubiratã-PR (Tabela 20).

Analisando os resultados no teor de óleo da Tabela 19, não foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor semente em lotes das cultivares 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidas em Paraúna-GO. Os resultados do conteúdo de clorofila no óleo de ambas as cultivares diferiram significativamente quando foram extraídos de sementes verdes e amarelas, sendo que quando extraídos de sementes verdes apresentaram os maiores resultados. Referente ao desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor, maior conteúdo de clorofila no óleo foi observado de sementes verdes da cultivar NA 5909 RG (Lote 29) e de sementes amarelas da cultivar 8473 RSF (Lote 7) na cidade em questão (Tabela 19). Considerando os dados de tocoferóis constantes na Tabela 19, é possível observar que diante da classificação de cor dentro das cultivares, foram observados maiores conteúdos de tocoferol alfa em óleos extraídos de sementes amarelas de ambas as cultivares avaliadas, tocoferol gama quando a extração ocorreu em sementes amarelas da cultivar NA 5909 RG (Lote 29) e tocoferol delta em sementes verdes da cultivar 8473 RSF (Lote 7). No desdobramento da interação cultivar dentro das classificações de cor, maior conteúdo de tocoferol alfa foi encontrado em verdes de NA 5909 RG (Lote 29) e gama e delta de 8473 RSF (Lote 7). No mesmo sentido, maior conteúdo de tocoferol gama foi observado em amarelas

de NA 5909 RG (Lote 29) e delta de 8473 RSF (Lote 7) (Tabela 19). Relativo à análise de estabilidade oxidativa dos óleos, a presença de clorofila no óleo originado de sementes verdes determinou menor estabilidade do mesmo em ambas as cultivares. Na interação cultivar dentro das classificações de cor, menores estabilidades foram encontradas em óleos extraídos de sementes (verdes e amarelas) da cultivar 8473 RSF (Lote 7) (Tabela 19).

Na Tabela 20 verifica-se que foram constatados efeitos significativos da interação Cultivar x Classificação de cor da semente em todas as variáveis para as cultivares NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidas em Ubiratã-PR, com exceção da variável teor de óleo.

Os dados relativos ao conteúdo de clorofila indicam maior presença deste pigmento em óleos extraídos de sementes verdes de ambas as cultivares. Além disso, quando se comparam sementes da mesma classificação de cor, maior conteúdo de clorofila foi observado no óleo de sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) (Tabela 20). Os resultados no conteúdo de tocoferóis (alfa, gama e delta) diante da classificação de cor dentro das cultivares diferiram significativamente entre óleos obtidos de sementes verdes e amarelas, sendo que os óleos de sementes verdes de ambas as cultivares apresentaram os maiores resultados. Considerando a interação cultivar dentro de cada classificação de cor, foi constatado maior conteúdo de tocoferóis (alfa, gama e delta) em óleos de sementes verdes e amarelas da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23), com exceção de tocoferol gama em óleo de sementes amarelas (Tabela 20). A estabilidade oxidativa observada no óleo foi menor quando este foi extraído de sementes verdes de ambas as cultivares analisadas. Também é possível observar que na interação cultivar dentro de cada classificação de cor, o óleo proveniente de sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) são mais estáveis a oxidação, enquanto que, quando proveniente de sementes amarelas da cultivar NA 5909 RG (Lote 27), o óleo apresentou maior estabilidade (Tabela 20).

Tabela 17 - Influência ambiental (Combinação 1) na qualidade do óleo extraído de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF produzidos em Paraúna-GO (Lote 7) e Rio Verde-GO (Lote 8)

Local de produção	**Teor de óleo (%)****			**Clorofila (mg/kg)***			**Estabilidade (h)***		
	Classificação			**Classificação**			**Classificação**		
	Verdes	**Amarelas**	**Médias**	**Verdes**	**Amarelas**	**Médias**	**Verdes**	**Amarelas**	**Médias**
Paraúna-GO (Lote 7)	14,84 Ba	16,62 Aa	15,73	3,65 Ba	0,88 Ab	2,26	7,54 Bb	8,07 Ba	7,80
Rio Verde-GO (Lote 8)	19,07 Aa	15,77 Ab	17,42	15,83 Aa	0,77 Ab	8,30	9,15 Ab	13,70 Aa	11,42
Médias	16,95	16,19		9,74	0,82		8,34	10,88	
CV (%)		6,45			1,13			1,42	
Local de produção	**Tocoferóis Alfa (mg/100g)***			**Tocoferóis Gama (mg/100g)***			**Tocoferóis Delta (mg/100g)***		
	Classificação			**Classificação**			**Classificação**		
	Verdes	**Amarelas**	**Médias**	**Verdes**	**Amarelas**	**Médias**	**Verdes**	**Amarelas**	**Médias**
Paraúna-GO (Lote 7)	7,44	13,84	10,64 B	82,07 Aa	79,72 Ba	80,90	21,41 Aa	18,31 Bb	19,86
Rio Verde-GO (Lote 8)	11,47	17,12	14,29 A	78,96 Ab	91,61 Aa	85,28	20,79 Ab	22,70 Aa	21,75
Médias	9,45 b	15,48 a		80,51	85,66		21,10	20,51	
CV (%)		2,25			1,63			1,21	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 18 - Influência ambiental (Combinação 1) na qualidade do óleo extraído de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NA 5909 RG produzidos em Ubirata-PR (Lote 27) e Paraúna-GO (Lote 29)

Local de produção	Teor de óleo (%)*			Clorofila (mg/kg)*			Estabilidade (h)*		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	16,92 Aa	18,03 Aa	17,47	6,53 Ba	0,18 Ab	3,35	6,18 Bb	11,50 Aa	8,84
Paraúna-GO (Lote 29)	17,57 Aa	15,00 Bb	16,28	9,20 Aa	0,22 Ab	4,71	10,34 Ab	12,34 Aa	11,34
Médias	17,24	16,51		7,86	0,20		8,26	11,92	
CV (%)		3,26			1,10			3,10	
Local de produção	**Tocoferóis Alfa (mg/100g)***			**Tocoferóis Gama (mg/100g)***			**Tocoferóis Delta (mg/100g)***		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
Ubiratã-PR (Lote 27)	2,39 Bb	9,98 Ba	6,18	53,28 Bb	67,43 Ba	60,36	18,35 Ab	20,45 Aa	19,40
Paraúna-GO (Lote 29)	9,89 Ab	14,21 Aa	12,05	75,92 Ab	82,87 Aa	79,39	16,89 Ba	17,22 Ba	17,05
Médias	6,14	12,09		64,60	75,15		17,62	18,84	
CV (%)		1,20			1,21			0,98	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 19 - Influência genotípica (Combinação 2) na qualidade do óleo extraído de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) e NA 5909 RG (Lote 29) produzidos em Paraúna-GO

Cultivar	Teor de óleo (%)			Clorofila (mg/kg)*			Estabilidade (h)*		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	14,84	16,62	15,73	3,65 Ba	0,88 Ab	2,26	7,54 Bb	8,07 Ba	7,80
NA 5909 RG (Lote 29)	17,57	15,00	16,28	9,20 Aa	0,22 Bb	4,71	10,34 Ab	12,34 Aa	11,34
Médias	16,21	15,81		6,42	0,55		8,94	10,20	
CV (%)		7,04			0,72			1,23	
Cultivar	**Tocoferóis Alfa (mg/100g)***			**Tocoferóis Gama (mg/100g)***			**Tocoferóis Delta (mg/100g)***		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
8473 RSF (Lote 7)	7,44 Bb	13,84 Aa	10,64	82,07 Aa	79,73 Ba	80,90	21,41 Aa	18,31 Ab	19,86
NA 5909 RG (Lote 29)	9,89 Ab	14,21 Aa	12,05	75,92 Bb	82,87 Aa	79,39	16,89 Ba	17,22 Ba	17,05
Médias	8,67	14,02		78,99	81,30		19,15	17,76	
CV (%)		1,52			1,32			0,86	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

Tabela 20 - Influência genotípica (Combinação 2) na qualidade do óleo extraído de sementes verdes e amarelas de lotes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) e NA 5909 RG (Lote 27) produzidos em Ubiratã-PR

Cultivar	Teor de óleo (%)			Clorofila (mg/kg)*			Estabilidade (h)*		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	17,42	16,93	17,17	9,14 Aa	0,41 Ab	4,77	7,11 Ab	8,17 Ba	7,64
NA 5909 RG (Lote 27)	16,92	18,03	17,47	6,52 Ba	0,18 Ab	3,35	6,18 Bb	11,50 Aa	8,84
Médias	17,17	17,48		7,83	0,29		6,64	9,83	
CV (%)		4,37			3,71			3,86	
Cultivar	**Tocoferóis Alfa (mg/100g)***			**Tocoferóis Gama (mg/100g)***			**Tocoferóis Delta (mg/100g)****		
	Classificação			Classificação			Classificação		
	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias	Verdes	Amarelas	Médias
NS 5959 IPRO (Lote 23)	10,48 Ab	12,58 Aa	11,53	55,47 Ab	64,35 Ba	59,91	20,20 Ab	23,31 Aa	21,75
NA 5909 RG (Lote 27)	2,38 Bb	9,97 Ba	6,18	53,28 Bb	67,43 Aa	60,36	18,35 Bb	20,45 Ba	19,40
Médias	6,43	11,28		54,38	65,89		19,27	21,88	
CV (%)		4,43			1,09			0,98	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% (*) e 5% de probabilidade (**).

3.4 DISCUSSÃO

A redução da longevidade em sementes pode comprometer a conservação dos recursos genéticos e resultar em perdas econômicas devido ao comprometimento no estabelecimento de plântulas e a redução do rendimento das culturas (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016; SANO et al., 2016; LEPRINCE et al., 2017; ZINSMEISTER et al., 2016; LIMA et al., 2017). Prejuízos também são verificados quando lotes de sementes com baixa longevidade possuem sua comercialização impedida, tendo perdido seu vigor e viabilidade (LIMA et al., 2017). Além de comprometer a germinação e o vigor inicial (SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009a; TEIXEIRA et al., 2016), a retenção de clorofila em sementes oleaginosas parece prejudicar a longevidade das sementes (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; ZINSMEISTER et al., 2016; LIMA et al., 2017).

Em nosso estudo, comprovamos os efeitos negativos da retenção de clorofila na longevidade e qualidade do óleo de sementes de soja e apresentamos algumas de suas causas. Além disso, uma abordagem sobre a influência ambiental e genotípica nestes fatores foram apresentadas. Para isso, lotes de sementes de soja que apresentaram sementes verdes, de cultivares produzidas em condições reais de cultivo por produtores da área (condições não controladas) em diferentes municípios do Brasil na safra 2014/2015, foram organizados em duas combinações (Influência Ambiental e Influência Genotípica - Quadro 4-5) e, após a classificação e divisão em amostras de sementes verdes e amarelas, foram avaliados quanto ao conteúdo de clorofila, viabilidade inicial, longevidade, parâmetros bioquímicos durante o armazenamento e a qualidade do óleo extraído das sementes. Foi possível observar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes verdes apresentaram maior retenção de clorofila, menor viabilidade inicial, alterações bioquímicas e menor qualidade do óleo, o que resultou em menor viabilidade das sementes durante o armazenamento e menor qualidade do óleo extraído das mesmas.

Segundo Sano et al. (2016) a longevidade nem sempre é uma força seletiva dominante e podem haver influências dependendo da espécie da planta e das condições ambientais durante a produção das sementes, já que variações são observadas entre sementes de espécies diferentes e entre sementes de uma determinada espécie. O mesmo pode ser afirmado com relação a retenção de clorofila

em sementes, além dos fatores ambientais, a ocorrência de sementes verdes deve-se também a componentes genéticos, uma vez que diferentes cultivares podem ter maior ou menor sensibilidade às condições de estresse e a formação subsequente de sementes verdes (TEIXEIRA et al., 2016).

Em nossos dados, foi possível demonstrar que, independente da cultivar ou local de produção avaliados, a longevidade é alterada em presença de clorofila em sementes de soja. Quando ocorre retenção de clorofila há considerável alteração e instabilidade quanto aos aspectos fisiológicos relacionados a viabilidade inicial e sua manutenção (Figura 7 e 8), com maior redução ao longo do armazenamento (Figura 9). Também foi registrado maior influência genética nos parâmetros avaliados, mesmo quando a produção ocorreu em ambientes diferentes, o genótipo foi predominante quanto a variação nos dados associados a presença de clorofila, viabilidade inicial e longevidade das sementes como foi observado para a cultivar NA 5909 RG (Figura 8).

Neste sentido, é interessante associar os resultados encontrados com possíveis influências das condições ambientais durante a safra 2014/2015 nos municípios de produção dos lotes de sementes de soja avaliados (Figura 6). De forma geral, as cidades de Paraúna-GO e Rio Verde-GO (região Centro-Oeste) apresentaram temperaturas mínimas, máximas e médias superiores as verificadas em Ubiratã-PR (região Sul), além de menores índices de precipitação pluvial (Figura 6). De fato, diferente da região Sul, a região Centro-Oeste tem sido mencionada por alta incidência de estresse por calor (altas temperaturas) e seca (precipitação pluvial irregular) (HIRAKURI, 2016) e por grande ocorrência de sementes verdes presentes no lote de sementes de soja (ZORATO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2016). No entanto, verifica-se que o problema está expandindo para novas regiões, já que é possível observar ocorrência de retenção de clorofila em sementes de soja produzidas na região Sul (Paraná e Santa Catarina), mesmo que com intensidades diferentes e independente do histórico de risco climático do estado (Quadro 2 e Quadro 3) (Ver Capítulo 1).

A intensidade com que ocorre retenção de clorofila em sementes de soja é mensurada através da porcentagem de sementes verdes do lote, sendo que sua influência negativa na germinação e vigor de sementes é confirmada por diversos estudos (PÁDUA et al., 2007; ZORATO et al., 2007; PÁDUA et al., 2009a; RANGEL et al., 2011; FRANÇA-NETO et al., 2012) (Ver Capítulo 1). Em complemento a isso, com base em nossos resultados podemos afirmar que a porcentagem de sementes

verdes do lote está associada redução da longevidade das sementes amarelas do mesmo (Figura 10), o que abre parâmetros para outros questionamentos associados com o controle metabólico das plantas quanto a degradação de clorofila e a aquisição da longevidade em sementes.

No desenvolvimento de sementes de soja, a maturidade fisiológica corresponde ao estágio em que o peso final, germinação, tolerância a dessecação, longevidade e vigor das sementes são adquiridos (RIGHETTI et al., 2015). Durante a maturação das sementes um conjunto de eventos intrincados e sobrepostos ocorrem desde o final da embriogênese até que as sementes se tornem fisiologicamente independentes da planta-mãe (RIGHETTI et al., 2015). Durante essa fase, a perda progressiva de água pelas sementes induz a formação do chamado estado vítreo citoplasmático, uma matriz amorfa semelhante a um estado sólido, onde a mobilidade e o nível de fluidez das moléculas são severamente desaceleradas, impondo um estado de quiescência e conferindo longevidade (BUITINK; LEPRINCE, 2008). Além disso, também se verifica o acúmulo de moléculas protetoras (proteínas LEA, proteínas de choque térmico e RFOs) (PRIETO-DAPENA et al., 2006; ROSNOBLET et al., 2007; HUNDERTMARK et al., 2011), diversos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SATTLER et al., 2004; KRANNER et al., 2006) e a ocorrência de degradação de clorofila (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; ZINSMEISTER et al., 2016).

Em nossos dados, foi possível observar que a ocorrência de retenção de clorofila nas sementes dos lotes selecionados para avaliação da longevidade (Lotes 7, 8, e 29) foi observada diante da exposição das mesmas a condições de estresse como estresse por calor (altas temperaturas) e seca (precipitação irregular) durante a produção das sementes nas cidades de Paraúna-GO e Rio Verde-GO (Tabela 1 e Figura 6). Verificou-se grandes oscilações quanto a precipitação total (Figura 6D) e temperaturas máximas superiores as indicadas para a cultura (Figura 6B), acima de 30° C segundo Embrapa Soja (2011), nas cidades em questão. Além disso, constatou-se retenção de clorofila associada a questões pontuais como condições locais específicas que, possivelmente, influenciaram na formação e maturação das sementes na cidade de Ubiratã-PR (Lote 23 e 27), já que temperaturas máximas consideradas dentro do limite indicado para a cultura, entre 20 e 30º C segundo Embrapa Soja (2011), foram observadas no local (Tabela 2 e Figura 6B). Como esperado, sementes classificadas como verdes apresentaram maior conteúdo de

clorofila (Cl a e b), independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados (Tabela 1-4).

Interferências ambientais na retenção de clorofila de sementes verdes e amarelas foram avaliadas (Combinação 1, Tabela 1 e 2). No entanto, não foi possível associar a retenção de clorofila com a intensidade das condições desfavoráveis do ambiente durante a produção das sementes (Figura 6). Influências do material genético na retenção de clorofila de sementes verdes e amarelas foram avaliadas (Combinação 2, Tabela 3 e 4). Em Paraúna-GO, maior retenção de Cl a e b foi verificada em sementes verdes da cultivar 8473 RSF (Lote 7) (Tabela 3) e em Ubiratã-PR, maior retenção de Cl b foi verificada em sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) (Tabela 4). A retenção de clorofila em decorrência de componentes genéticos e condições de estresse por calor e seca durante a maturação tardia foi recentemente observada em sementes de soja por Teixeira et al. (2016). Sementes de cultivar suscetível ao estresse produziu, sob estresse, um nível significativamente maior de sementes verdes, atingindo 22% de sementes verdes contra 1% produzido por cultivar tolerante. Além disso, o conteúdo de clorofila da semente (Cl a e b) foi variável dependendo da ocorrência de estresse e da suscetibilidade de cultivar (TEIXEIRA et al., 2016).

A degradação de clorofila observada durante a maturação tardia das sementes é um processo de degradação resultante da conversão de clorofila em produtos incolores em uma via catabólica de vários passos, semelhante à descrita para a senescência da folha (HÖRTENSTEINER, 2013; TANAKA; TANAKA, 2011; SAKURABA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016) (Ver Capítulo 2). Acredita-se que este processo seja um processo de "desintoxicação" importante para evitar danos celulares, uma vez que a clorofila é um fotossensibilizador potencial quando não está integrada nos fotossistemas (HÖRTENSTEINER, 2013). Do ponto de vista químico, os elétrons da clorofila facilmente se excitam sob a presença de pequenas quantidades de luz (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). A energia dos elétrons excitados de clorofila geralmente é dissipada por meio de extinção fotoquímica como fluorescência ou calor (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). No entanto, em plastídios de sementes com membranas de tilacides interrompidas, a remoção fotoquímica não opera, portanto, os elétrons excitados são susceptíveis de serem aceitos por oxigênio e como resultado há a formação de ROS e o estresse oxidativo é iniciado (SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). Se a degradação da clorofila não for devidamente

regulada, ocorre uma fotodinâmica grave e a morte celular é induzida (PRUZINSKA et al., 2003; HIRASHIMA et al., 2009; HÖRTENSTEINER; KRAUTLER, 2011). Estas teorias podem explicar a grande deterioração e redução de vigor verificados em sementes que apresentaram retenção de clorofila. Sementes classificadas como verdes, com maior retenção de Cl a e b (Tabela 1-4), apresentaram menor viabilidade inicial, independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados (Tabela 5-8).

Ademais, fica comprovado que reduções na viabilidade inicial são acentuadas por maiores conteúdos de clorofila nas sementes. Menor viabilidade inicial foi observada em sementes verdes da cultivar 8473 RSF produzidas em Paraúna-GO (Lote 7) quando se avaliou a influência do ambiente (Tabela 5) e do genótipo (Tabela 7), sendo que maior conteúdo de Cl a e b (Tabela 1 e 3) foi encontrado na amostra em questão. O mesmo ocorreu para sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) quando comparadas com sementes verdes da cultivar NA 5909 RG (Lote 27) em Ubiratã-PR (Tabela 8), já que as mesmas apresentaram maior conteúdo de Cl b (Tabela 4). Uma vez que a viabilidade das sementes depende, dentre outras coisas, de fatores ambientais durante a produção das sementes (EGLI et al., 2005), os resultados encontrados neste estudo podem ser associados com condições de estresse por calor (altas temperaturas) e seca (precipitação irregular) durante a produção das sementes nos diferentes locais (Figura 6).

A longevidade é um atributo chave da qualidade fisiológica de sementes (SANO et al., 2016; LIMA et al., 2017) e sua ligação com a retenção de clorofila tem sido estudada para maior entendimento da relação entre suas causas e efeitos (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; DELMAS et al., 2013; ZINSMEISTER et al., 2016). Em nosso estudo, sementes de soja classificadas como verdes, com maior retenção de Cl a e b (Tabela 1-4) e menor viabilidade inicial (Tabela 5-8), apresentaram menor longevidade, independente da cultivar ou ambiente de produção avaliados (Figura 11, Figura 12 e Tabela 9-12). As sementes de soja possuem vida útil curta durante o armazenamento, especialmente em ambientes úmidos e tropicais (LIMA et al., 2017). Além disso, o impacto da redução da longevidade em sementes de soja deve ser considerado no estabelecimento das plântulas no campo, especialmente no Brasil, onde grande parte da produção está exposta a variações edafoclimáticas e isso tem resultado em estresses abióticos que afetam drasticamente a produção (HIRAKURI, 2016). Segundo Pommel et al. (2002), a uniformidade espacial e temporal da emergência de plântulas no campo é afetada pelas características do solo (umidade,

temperatura, resistência e resíduos na superfície), equipamentos de plantio (profundidade de semeadura e distribuição das sementes) e qualidade da semente.

Durante o armazenamento, as sementes deterioram-se, perdem vigor e, como resultado, tornam-se mais sensíveis aos estresses durante a germinação e, finalmente, morrem. A velocidade desses eventos depende do teor de água, temperatura de armazenamento e qualidade inicial da semente (WALTERS, 1998; WALTERS et al., 2005). Avaliando os resultados de Sigma e P10 (Tabela 9-12), é correto afirmar que os danos causados por condições ambientais estressantes (altas temperaturas e precipitação irregular) nos diferentes locais de produção (Figura 6) se estendem a comprometer a completa degradação de clorofila (Tabela 1-4), reduzir a qualidade inicial (Tabela 5-8) e reduzir o tempo de viabilidade das sementes durante o armazenamento, fazendo com que a perda de viabilidade e qualidade das sementes verdes durante o armazenamento seja mais rápida quando comparadas com as sementes amarelas do mesmo lote, independente da cultivar ou ambiente de produção. Isso é confirmado por maiores valores de Sigma e menores valores de P10 em sementes verdes, demostrando maior inclinação da curva de perda de viabilidade ao longo do tempo e menor tempo necessário para a morte das sementes (Tabela 9-12 e Figura 9). A retenção de clorofila foi inversamente relacionada à longevidade em sementes, o mesmo comportamento foi observado em sementes de Arabidopsis e Medicago (CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; DELMAS et al., 2013; ZINSMEISTER et al., 2016).

Ao abordar as interferências do ambiente de produção na longevidade das sementes verdes e amarelas (Combinação 1, Figura 11), diante de condições ambientais estressantes (Figura 6), ambos os materiais genéticos avaliados (8473 RSF-Figura 11A e NA 5909 RG-Figura 11B), ofereceram padrão similar entre as curvas de perda de viabilidade de sementes verdes e amarelas, mesmo que o estresse a que as plantas foram submetidas possa ter sido de diferentes intensidades (Figura 6). Por outro lado, quando se avalia as interferências dos genótipos (Combinação 2) em Paraúna-GO (8473 RSF e NA 5909 RG-Figura 12A) e em Ubiratã-PR (NS 5959 IPRO e NA 5909 RG-Figura 12B), verifica-se comportamento divergente entre as curvas de perda de viabilidade dos diferentes materiais genéticos. Nesse contexto, os resultados encontrados levam a uma importante observação, em condições ambientais estressantes a longevidade de sementes verdes e amarelas foi altamente influenciada pelas características genéticas do material vegetal (Figura 8,

Figura 11 e Figura 12), mesmo que o estresse a que as plantas foram submetidas possa ter sido de diferentes intensidades (Figura 6). Ainda avaliando as interferências do genótipo, sementes verdes da cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23) produzidas em Ubiratã-PR apresentaram maior Sigma e menor P10 quando comparada com a cultivar NA 5909 RG (Lote 27) produzidas no mesmo local, este fato pode ser relacionado com a maior retenção de Cl b (Tabela 4) e menor viabilidade (Tabela 8) observadas em sementes verdes dessa cultivar nesse local.

Uma das perspectivas de estudo da relação entre a longevidade e a retenção de clorofila em sementes, relaciona-se com o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) que tem papel importante para vários aspectos da maturação, incluindo tolerância a dessecação, degradação de clorofila e estabilidade no armazenamento de sementes (PHILLIPS et al., 1997; FINKELSTEIN, 2013), além de ser fundamental para a indução de dormência (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; FINKELSTEIN et al., 2008). Considerando que os produtos dos genes STAY-GREEN (SGR) atuam como os principais reguladores da degradação da clorofila, desestabilizando complexos de proteína-pigmento e aumentando a disponibilidade de clorofilas para clivagem por enzimas catabólicas de clorofila (SATO et al., 2009; SAKURABA et al., 2015) (Ver Capítulo 2), os mecanismos de sua regulação transcricional e o papel de ABA neste processo têm sido abordados.

Nesse contexto, o regulador transcricional ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) foi identificado como um candidato promissor para o papel de regulador da atividade de SGR (DELMAS et al., 2013) e indispensável para uma fase de maturação adequada em sementes. De fato, as proteínas SGR estão envolvidas no controle das etapas finais da maturação da semente, isto é, desidratação, degradação da clorofila e início da dormência (NAMBARA; MARION-POLL, 2003; FINKELSTEIN et al., 2008). Outro importante regulador transcricional da maturação das sementes é DELAY OF GERMINATION1 (DOG1), originalmente identificado por seu papel na dormência, mas que também mostrou desempenhar um papel na estabilidade de armazenamento de sementes e na regulação de muitos genes de maturação de sementes em interação com ABI3 (BENTSINK et al., 2006; DEKKERS et al., 2016). Clerkx et al. (2003) demonstraram em sementes de Arabidopsis que o ABI3 está envolvido na regulação de várias características críticas para a viabilidade das sementes: degradação de clorofila, capacidade para sobreviver a longos períodos de armazenamento e indução de dormência. Delmas et al. (2013) trabalhando com a mesma espécie, também

afirmam que este fator de transcrição foi envolvido no desenvolvimento de tolerância a dessecação de sementes e na degradação de clorofilas. No último processo, mostrou-se atuar como regulador de transcrição de genes SGR. Este achado revela que a degradação de clorofila é alcançada por genes da família SGR e que todo esse processo é regulado pelo ABA através de ABI3 (DELMAS et al., 2013).

Além disso, recentemente foi identificado o fator de transcrição ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 (ABI5) bZIP em análises da longevidade de sementes de Medicago (ZINSMEISTER et al., 2016). O estudo dos transcritos revelou ABI5 como regulador de genes com funções relacionadas ao metabolismo de proteínas LEA, RFOs e genes nucleares associados a fotossíntese (PhANGs) (ZINSMEISTER et al., 2016). Alterações no processo de degradação de clorofila parecem afetar negativamente a longevidade das sementes, identificando o ABI5 como um regulador proeminente da maturação tardia de sementes leguminosas (ZINSMEISTER et al., 2016).

A expressão de transcritos que codificam enzimas da via de degradação da clorofila, tais como a clorofila b redutase (NYC1) e STAYGREEN1 (SGR1) (Ver Capítulo 2), parece conduzir a longevidade de sementes (NAKAJIMA et al., 2012; LIMA et al., 2017). Nakajima et al. (2012) concluíram que a expressão da enzima de degradação de clorofila NYC1 mostrou ser regulada por ABA e que a retenção de clorofila reduziu a longevidade e o produção de óleo de sementes de Arabidopsis. Por sua vez, Lima et al. (2017) sugerem que a expressão de genes da via de degradação da clorofila (NYC1 e SGR1) aumenta durante a maturação tardia e que, em nível de transcrição, a degradação de clorofila precede a aquisição da longevidade em sementes de soja. Assim, a retenção de clorofila provavelmente é uma consequência indireta de defeitos nos mecanismos regulatórios de ABA e reflete na alteração de várias características como a longevidade das sementes.

Durante o armazenamento a seco, a viabilidade das sementes diminui gradualmente devido a eventos de deterioração como à oxidação de macromoléculas, sendo este processo acelerado sob condições de alta temperatura e umidade relativa (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Os primeiros sintomas dessa deterioração são a germinação tardia da semente e o comprometimento no estabelecimento de plantas, com perda total de viabilidade observada como incapacidade de germinar, o que muitas vezes resulta em redução no rendimento das culturas (GHASSEMI-GOLEZANI et al., 2010; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016). Sabe-se que a longevidade em sementes

ortodoxas aumenta gradualmente durante a maturação após a aquisição da tolerância à dessecação (VERDIER et al., 2013) devido a formação de um estado vítreo, que reduz a fluidez e a mobilidade do citoplasma e oferece estabilidade dos componentes celulares (BUITINK; LEPRINCE, 2008). Neste estudo, as condições de armazenamento das sementes verdes e amarelas foram fixadas em uma temperatura de 35° C e 75% de umidade relativa (UR), já que essa combinação representa boa relação entre condições que são deletérias o suficiente para induzir a perda de viabilidade e permitir medições dentro de um tempo experimental razoável, mas suficientemente baixas por estar perto do estado vítreo onde o metabolismo não mais ocorre (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016; LIMA et al., 2017). Nessas condições, analises bioquímicas aos 0, 14 e 28 dias de armazenamento foram realizadas em sementes verdes e amarelas para observar possíveis oxidações de moléculas pela ação de ROS (H_2O_2) e peroxidação lipídica (MDA) (Figura 13-16). Além disso, a atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, APX e GPX) (Figura 13-16) também foi investigada.

As ROS desempenham um papel fundamental na regulação de muitos processos biológicos nas plantas (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016). No entanto, elas são consideradas altamente reativas e tóxicas para as células (MITTLER; BLUMWALD, 2015; NOCTOR et al., 2014; SCHMIDT; SCHIPPERS, 2015). Devido à sua toxicidade, bem como ao seu importante papel na sinalização, o nível de ROS nas células precisa ser rigorosamente regulado (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016). Acima de um limiar, a atuação de ROS se encontra na interface entre sinalização e efeitos deletérios causados por estresses abióticos, como estresse por altas e baixas temperaturas, radiação ultravioleta (UV) ou hipóxia (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016). Além disso, do ponto de vista químico, a presença de clorofilas pode facilmente iniciar processos oxidativos, devido ao seu efetivo poder fotossensível de deslocar elétrons (HÖRTENSTEINER, 2000; SMOLIKOVA; MEDVEDEV, 2016). A oxidação de moléculas celulares como lipídios, membranas celulares, ácidos nucleicos e proteínas (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016), mediada por ROS, afeta a longevidade das sementes (GROOT et al., 2012). Em nossos dados, é possível observar a presença de ROS (H_2O_2) (Figura 13-16) em todas

as amostras avaliadas. Devido a sua alta reatividade, as ROS podem levar a danos como a peroxidação lipídica de membranas e de reservas (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016), que foi estimada pela presença de MDA em todas as amostras (Figura 13-16), independente da cultivar ou ambiente de produção analisados. O acúmulo de MDA indica dano oxidativo que leva à lixiviação de componentes celulares importantes e perda de viabilidade e pode ser resultado das condições de estresse por alta temperatura e baixa umidade durante a maturação que resultou em sementes verdes e amarelas (Figura 6) e do próprio processo de envelhecimento (Figura 11, Figura 12 e Tabela 9-12).

Quando a formação de ROS aumenta, antioxidantes são recrutados pelas células para eliminar o excesso de moléculas reativas (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016). Isto foi o que ocorreu em nossa pesquisa, antioxidantes foram recrutados para a limpeza do sistema. De forma geral, foi constatado baixa tendência de atividade de CAT (Figura 13-16), que junto com APX e GPX, participa da eliminação direta de H_2O_2 (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU et al., 2008; FOYER; NOCTOR, 2003). Isso pode ser explicado pela baixa viabilidade inicial e, consequentemente, presença de sementes mortas nas amostras avaliadas (Tabela 5-8). Diante desses resultados, sugere-se que a tentativa de detoxificação de ROS durante o armazenamento de sementes de soja envolveu as enzimas APX e SOD (Figura 13-16). A presença de SOD indica a necessidade de controle de ânion superóxido (O_2^-), uma molécula altamente reativa (BAILLY; EL MAAROUF BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). A GPX não foi atuante em todas as amostras avaliadas porque, provavelmente, as sementes verdes não possuem plastídeos bem formados, comprometendo a atuação da enzima (FOYER; NOCTOR, 2003). Por fim, os danos por estresse oxidativo (H_2O_2 e O_2) foram além da capacidade de reparo das sementes, o que resultou em redução da viabilidade durante o armazenamento das sementes (Tabela 9-12).

A retenção de clorofila em sementes pode ser considerada um dos principais fatores que afetam negativamente a produtividade das culturas e a qualidade de seus produtos (JALINK et al., 1998; SINNECKER et al., 2002; BORRMANN et al., 2009; PÁDUA et al., 2009a; TEIXEIRA et al., 2016; CLERKX et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2012; ZINSMEISTER et al., 2016). Essa influência negativa é especialmente

importante para a qualidade do óleo, obtido a partir de sementes de soja (ZORATO et al., 2007; PÁDUA et al., 2009a; TEIXEIRA et al., 2016). Análises da qualidade do óleo extraído das sementes selecionadas para este estudo possibilitou avaliar a influência da clorofila na qualidade do óleo e sua relação com a longevidade das sementes (Tabela 17-20 e Figura 17).

A soja é uma importante fonte alimentar de proteínas e lipídios para humanos e animais sendo que ambos os compostos constituem cerca de 60% do peso seco total das sementes (NGUYEN et al., 2016). Sabe-se que as concentrações de óleo e proteína das culturas são sensíveis a fatores genéticos e ambientais (NGUYEN et al., 2016). No entanto, grandes alterações no teor de óleo não foram observadas mesmo com as variações de ambiente de produção e genótipos avaliados (Tabela 17-20). Por outro lado, de forma geral, o óleo obtido a partir de sementes verdes apresentou maior conteúdo de clorofila, menor conteúdo de tocoferóis (alfa, gama e delta) e menor estabilidade oxidativa (Tabela 17-20 e Figura 17), independente da cultivar ou ambiente de produção analisados. Estudos realizados em sementes de canola demostraram que a presença de clorofila no óleo é um grave problema enfrentado pelos produtores e pela indústria, sendo que diferentes técnicas foram usadas na tentativa de clareamento do produto (DIOSADY, 2005; KULKARNI et al., 2006; HÖRTENSTEINER; KRÄUTLER, 2000).

A clorofila e a maioria dos seus derivados são compostos lipossolúveis e, portanto, são extraídos com o óleo quando as sementes verdes são trituradas, resultando na produção de óleo bruto de cor escura, o que é comercialmente inaceitável e pode exigir etapas de clareamento adicionais para remover esses pigmentos e, portanto, aumentando significativamente os custos de produção (TAUTORUS; LOW, 1993). Como a clorofila e seus derivados são bons fotossensibilizadores e são capazes de desencadear degradação oxidativa de ácidos graxos, a contaminação de óleos vegetais extraídos e o biodiesel com esses compostos podem reduzir sua qualidade e vida útil (MINGUEZ-MOSQUERA et al., 1990; TAUTORUS; LOW, 1993; DIOSADY, 2005). A estabilidade oxidativa dos óleos é um fator crucial para o transporte e estabilidade de armazenamento a longo prazo (KULKARNI et al., 2006). Recentemente, Nakajima et al. (2012) verificaram que a retenção de clorofila reduziu a longevidade e a produção de óleo de sementes de Arabidopsis.

As sementes de soja contêm vários compostos saudáveis de alta qualidade, incluindo os tocoferóis (LIU, 1997). Esses compostos são antioxidantes lipofílicos naturais que são sintetizados apenas por organismos fotossintéticos, mas são importantes para os seres humanos, já que foram relatados por ajudar na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de aumentar a imunidade (SHINTANI et al., 1998; BRAMLEY et al., 2000). Embora todos os tocoferóis sejam absorvidos igualmente, o alfa tocoferol é o mais ativo em termos de atividade de vitamina E no corpo humano e, portanto, aquele para o qual o interesse é o maior (WARNER, 2003). Beta, gama e delta tocoferol exibem 60, 90 e 98-99% menos de atividade de vitamina E, respectivamente, em comparação com a alfa (KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996). Neste sentido, os resultados aqui encontrados indicam que a retenção de clorofila na semente afeta o conteúdo de tocoferóis (alfa, gama e delta) e compromete as características nutricionais do óleo extraído das mesmas. É importante observar essa relação inversa entre a retenção de clorofila na semente o conteúdo de tocoferóis no óleo quando se considera que maior fornecimento de alfa tocoferol natural vem sendo cada vez mais uma demanda do mercado consumidor (VALENTIN; QI, 2005).

Levando-se em conta a avaliação da qualidade do óleo (Tabela 17-20 e Figura 17), algumas associações podem ser realizadas. Além de maior teor de clorofila, menor conteúdo de tocoferóis e menor tempo necessário para oxidação de compostos no óleo (Tabela 17-20), as sementes verdes que deram originaram a esse óleo, apresentaram maior teor de clorofila (Tabela 1-4), menor viabilidade inicial (Tabela 5-8) e menor longevidade de sementes durante o armazenamento (Tabela 9-12). Isto pode ser explicado pelo fato de que, durante a degradação da clorofila, o fitol liberado via hidrólise é a principal fonte para a biossíntese de tocoferol (VOM DORP et al., 2015). Ademais, para evitar ROS nos cloroplastos, os tocoferóis e a extinção não-fotoquímica através do ciclo de xantofilas atuam de maneira redundante, protegendo assim os lipídios da membrana do tilacoide da fotooxidação (HAVAUX et al., 2005).

Ao abordar as interferências do ambiente de produção das sementes na qualidade do óleo (Combinação 1), verifica-se que o óleo extraído de sementes verdes da cultivar 8473 RSF produzidas em Rio Verde-GO (Lote 8) apresentou maior conteúdo de clorofila e, surpreendentemente, maior estabilidade oxidativa quando comparado ao óleo extraído de sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 7) (Tabela 17). O mesmo ocorreu para a cultivar NA 5909 RG (Tabela 18), o óleo

extraído de sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 29) apresentou maior conteúdo de clorofila e maior estabilidade oxidativa, quando comparado ao óleo extraído de sementes verdes produzidas em Ubiratã-PR (Lote 27). Nesse último caso, observou-se também maior conteúdo de tocoferóis (alfa e gama) no óleo extraído de sementes verdes produzidas em Paraúna-GO (Lote 29). Por outro lado, quando se avalia as interferências dos genótipos (Combinação 2), também se verifica óleos extraídos de sementes verdes com maior conteúdo de clorofila, maior estabilidade oxidativa e maior conteúdo de alfa tocoferol em Paraúna com a cultivar NA 5909 RG (Lote 29) (Tabela 19) e tocoferóis (alfa, gama e delta) em Ubiratã com a cultivar NS 5959 IPRO (Lote 23). Estes aumentos nos teores de tocoferóis podem ser indicativos de uma resposta ao estresse oxidativo dentro do cloroplasto, a fim de proteger os lipídios das membranas dos tilacoides da oxidação, assim como observado por Havaux et al., 2005 e Zinsmeister et al., 2016.

Em posse de uma grande variabilidade de genótipos, ambientes de produção e tipos de manejo, os resultados encontrados em nosso estudo levam a importantes observações. É possível afirmar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes de soja com retenção de clorofila possuem menor viabilidade inicial e menor capacidade em manter sua viabilidade ao longo do armazenamento, o que compromete sua utilização para fins de propagação de plantas. Ao abordar as influências ambientais e genotípicas nas características avaliadas, foi possível observar que, em condições de estresse por calor e seca, o genótipo foi predominante quanto a variação na longevidade das sementes, independente das interferências locais e do histórico de estresse ambiental da região de produção. Além disso, um segundo impacto negativo da retenção de clorofila em sementes de soja foi observado quanto a qualidade nutricional e vida de prateleira do óleo, já que sementes verdes apresentaram maior teor de clorofila, menor conteúdo de tocoferóis e menor tempo necessário para oxidação de compostos presentes no mesmo.

3.5 CONCLUSÃO

Independente da cultivar ou da região de produção, sementes de soja com retenção de clorofila possuem menor longevidade e qualidade inferior do óleo, com presença de clorofilas residuais, menor estabilidade oxidativa e índices de tocoferóis.

REFERÊNCIAS

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

AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Embrapa Informática Agropecuária, 2018. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>. Acesso em: 05 abri. 2018.

ALMELA, L.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A; ROCA, M. J. High-performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 870, p. 483-489, 2000.

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society. 5th ed. Champaign, USA, AOCS, 2009.

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,** Paris, v. 331, p. 806-814, 2008.

BENTSINK, L. et al. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., Washington, v. 103, p. 17042–17047, 2006.

BEWLEY J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy.** 3. ed. New York: Springer, 2013. 408 p.

BORRMANN, D. et al. Chemical and biochemical characterization of soybean produced under drought stress. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 676-681, 2009.

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.

BRAMLEY, P. M. et al. Vitamin E: A critical review.**Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 913−938, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras Para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies,** Paris, v. 331, n. 10, p. 788–95, 2008.

BULAT, H. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v. 26, p. 686-696, 1961.

CLERKX, E. J. M. et al. Characterization of green seed, an enhancer of abi3-1 in Arabidopsis that affects seed longevity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1077–1084, 2003.

DEKKERS, B. J. W. et al. The Arabidopsis DELAY OF GERMINATION 1 gene affects ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) expression and genetically interacts with ABI3 during Arabidopsis seed development. **Plant J**., Oxford, v. 85, p. 451–465, 2016.

DELMAS, F. et al. ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., Washington, v. 110, p. 3888–3894, 2013.

DIOSADY, L. L. Chlorophyll removal from edible oils. Int. J. **International Journal of Applied Science and Engineering**, Toronto, v. 3, p. 81–88, 2005.

EGLI, D. B. et al. Air Temperature During Seed Filling and Soybean Seed Germination and Vigor. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 4, p.1329-1335, 2005.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 45, p. 13- 30, 1980.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2011.** Londrina: Embrapa Soja, 255p. (Sistemas de Produção n.14), 2011.

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

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, London, v. 171, p. 501–523, 2006.

FINKELSTEIN, R. Abscisic acid synthesis and response. **Arabidopsis Book**, v. 11, p. 166, 2013.

FINKELSTEIN, R. et al. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 59, p. 387–415, 2008.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico - Série Sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2012. 15 p. (Circular Técnica, 40).

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

GHASSEMI-GOLEZANI, K. et al. Effects of seed aging on field performance of winter oilseed rape. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 8, n. 1, p. 175–178, 2010.

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

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

GROOT, S. et al. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. **Annals of Botany**, Oxford, v. 110, p. 1149–1159, 2012.

HAVAUX, M. et al. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3451–3469, 2005.

HIRAKURI, M. H. **Impactos econômicos de estresses na produção de soja da safra 2015/16.** Londrina: Embrapa Soja, 2016. 8 p. (Circular Técnica, 125).

HIRASHIMA, M.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Light-independent cell death induced by accumulation of pheophorbide a in Arabidopsis thaliana. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, p. 719-729, 2009.

HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1807, n. 8, p. 977-988, 2011.

HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown in oilseed rape. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 64, p. 137–146, 2000.

HÖRTENSTEINER, S. Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown. **Plant Molecular Biology**, Hague, v. 82, n. 6, p. 505–17, 2013.

HUNDERTMARK, M. et al. The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from Arabidopsis thaliana modulates membrane stability through binding and folding. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, p. 446–453, 2011.

IPCC. **Climate change 2014: mitigation of climate change.** Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, 2014.

JALINK, H. et al. Chlorophyll fluorescence of Brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 437-443, 1998.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L. Å. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, Chicago, v. 31, p. 671−701, 1996.

KRANNER, I. et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? Free Radic. **Biology and Medicine**, Aligarh, v. 40, p. 2155–2165, 2006.

KULKARNI, M. G; DALAI, A. K.; BAKHSHI, N. N. Utilization of green seed canola oil for biodiesel production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 12, p.1886-1893, 2006.

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

LIMA et al. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **PLoS One**, San Francisco, p. 1-25, 2017.

LIU, K. Chemistry and nutritional value of soybean components. **In: Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization.** Boston: Springer, 1997. p. 25−95.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. et al. Pigments Present in Virgin Olive Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 67, n. 3, p. 192–196, 1990.

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, p. 64–70, 2015.

MOORE, R. P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. **Seed Ecology**. London: Butterworth, 1973. p. 347-366.

NAKAJIMA, S. et al. Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, p. 261–273, 2012.

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.

NAMBARA, E.; MARION POLL, A. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 213–217, 2003.

NGUYEN et al. Soybean Seed Development: Fatty Acid and Phytohormone Metabolism and Their Interactions. **Current Genomics**, Hilversum, v. 17, n. 3, p. 241-260, 2016.

NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration. Cold and Warm Episodes by Season. National Weather Service**. Climate Prediction Center**. 2016. URL: http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, Rockville, v. 164, p. 1636–1648, 2014.

PÁDUA, G. et al. Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 150–159, 2009a.

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

PÁDUA, G. et al. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 112–120, 2007.

PHILLIPS, J. et al. Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, p. 4489–4496, 1997.

POMMEL, B. D. et al. Influence of delayed emergence and canopy skips on the growth and development of maize plants: a plant scale approach with CERES-Maize. **European Journal of Agronomy**, Helsinki, v. 16, p. 263–277, 2002.

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

PRUŽINSKÁ, A. et al. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., Washington, v. 100, p. 15259-15264, 2003.

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

RANGEL et al. Presença e qualidade de sementes esverdeadas de soja na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientiarum**. **Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 127-132, 2011.

RIGHETTI, K. et al. Inference of longevity-related genes from a robust co-expression network of seed maturation identifies regulators linking seed storability to biotic defense-related pathways. **Plant Cell,** Rockville, v. 27, p. 2692-708, 2015.

ROSNOBLET, C. et al. The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-elated kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of Medicago truncatula seeds. **Plant J**., Oxford, v. 51, p. 47–59, 2007.

SAKURABA, Y.; PARK, S. Y.; PAEK, N. C. The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 38, p. 390-395, 2015.

SANO, N. et al. 2016. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 57, p. 660–674, 2016.

SATTLER, S. E. et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1419–1432, 2004.

SATO, Y. et al. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. **Plant J**., Oxford, v. 57, p. 120–131, 2009.

SCHMIDT, R.; SCHIPPERS, J. H. M. ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1850, p. 1497–1508, 2015.

SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. **Science**, New York, v. 282, p. 2098−2100, 1998.

SINNECKER, P. et al. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3961–3966, 2002.

SOUZA, I. R. P.; MACADAM, J. W. A transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes decrease in elongation rate of B73 maize (Zea mays) leaf blades. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 4, p. 556-562, 1998.

SMOLIKOVA, G. N.; MEDVEDEV, S. S. Photosynthesis in the seeds of chloroembryophytes. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 63, p. 1–12, 2016.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes**. Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1807, n. 8, p. 968–76, 2011.

TAUTORUS, C. L.; LOW, N. H. Chemical aspects of chlorophyll breakdown products and their relevance to canola oil stability. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 70, n. 9, p. 843–847, 1993.

TENG, S. S.; CHEN, B. H. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 65, p. 367–373, July 1999.

TEIXEIRA, R. N. et al. Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. **BMC Plant Biology**, London, v. 1, p. 16–37, 2016.

VALENTIN, H. E.; QI, Q. Biotechnological production and application of vitamin E: 568 Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 68, n. 4, p. 436-444, 2005.

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**, Rockville, v. 163, p. 757–774, 2013.

VOM DORP, K. et al. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 27, p 2846–2859, 2015.

WALTERS, C.; HILL, L. M.; WHEELER, L. J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, p. 751-758, 2005.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging**. Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, p. 223-244, 1998.

WARNER, K. Effects of antioxidants in frying oils. **Chemistry of frying oils,** Champaign, p. 210-227, 2003.

ZINSMEISTER et al. ABI5 is a regulator of seed maturation and longevity in legumes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 28, p. 2735-2754, 2016.

ZORATO, M. F. et al. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 11–19, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em posse de uma grande variabilidade de genótipos, ambientes de produção e tipos de manejo, uma caracterização da qualidade fisiológica das sementes de soja foi realizada diante da variação na porcentagem de sementes verdes do lote, oferecendo uma análise geral do problema em questão. Embora a influência negativa da porcentagem de sementes verdes do lote sobre a qualidade fisiológica das sementes de soja já tenha sido avaliada anteriormente, os dados aqui apresentados confirmam que os produtores rurais continuam expostos a este problema já que os lotes de sementes aqui avaliados foram produzidos em condições reais de cultivo por produtores rurais (condições não controladas) e podem ser de grande importância para a comunidade técnica e científica. Além disso, observou-se que, embora existam indicações de regiões mais adequadas a produção de sementes de soja devido a menor exposição aos riscos climáticos, a retenção de clorofila também pode ser associada a questões pontuais como condições locais específicas que influenciam na maturação das sementes.

Ademais, comprovamos os efeitos negativos da retenção de clorofila na qualidade inicial de sementes de soja e realizamos a validação de genes associados a retenção de clorofila. Uma abordagem sobre a influência ambiental e genotípica nestes fatores foi apresentada sob condições de cultivo não controladas para confirmação da persistência do problema de redução de qualidade em sementes verdes de soja, já que em condições de cultivo controladas isto foi recentemente comprovado por Teixeira et al. (2016). Foi possível observar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes com retenção de clorofila apresentaram menor germinação, vigor e expressão dos genes *D1*, *D2* e *PPH2.*

Por fim, confirmamos os efeitos negativos da retenção de clorofila na longevidade e qualidade do óleo de sementes de soja e apresentamos algumas de suas causas. Uma abordagem sobre a influência ambiental e genotípica nestes fatores foram apresentadas. É possível afirmar que, independente da cultivar ou ambiente de produção, sementes de soja com retenção de clorofila possuem menor viabilidade inicial e menor capacidade em manter sua viabilidade ao longo do armazenamento, o que compromete sua utilização para fins de propagação de plantas. Ao abordar as influências ambientais e genotípicas nas características avaliadas, foi possível observar que, em condições de estresse por altas temperaturas

e baixa umidade, o genótipo foi predominante quanto a variação na longevidade das sementes, independente das interferências locais e do histórico de estresse ambiental da região de produção. Além disso, um segundo impacto negativo da retenção de clorofila em sementes de soja foi observado quanto a qualidade nutricional e vida de prateleira do óleo, já que o óleo extraído de sementes verdes apresentou maior teor de clorofila, menor conteúdo de tocoferóis e menor tempo necessário para oxidação de compostos presentes no mesmo.

REFERÊNCIAS

BARRY, C. S. et al. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, p. 179–187, 2008.

BENTSINK, L. et al. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., Washington, v. 103, p. 17042–17047, 2006.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BEWLEY J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy.** 3. ed. New York: Springer, 2013. 408 p.

BORRMANN, D. et al. Chemical and biochemical characterization of soybean produced under drought stress. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 676-681, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras Para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Chicester: Jonh Wiley and Sons Ltd, 2015. 1280 p.

BUITINK, J., et al. Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 97, n. 5, p. 2385–2390, 2000.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies,** Paris, v. 331, n. 10, p. 788–95, 2008.

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 & Environment**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.

CHRIST, B.; HÖRTENSTEINER, S. Mechanism and Significance of Chlorophyll Breakdown. **Journal Of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 1, p. 4-20, 2013.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, n. 3, p.1030-1040, 2009.

CLERKX, E. J. M. et al. Characterization of green seed, an enhancer of abi3-1 in Arabidopsis that affects seed longevity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1077–1084, 2003.

DEBEAUJON I.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 403–413, 2000.

DEKKERS, B. J. W. et al. The Arabidopsis DELAY OF GERMINATION 1 gene affects ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) expression and genetically interacts with ABI3 during Arabidopsis seed development. **Plant J**., Oxford, v. 85, p. 451–465, 2016.

DELMAS, F. et al. ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., Washington, v. 110, p. 3888–3894, 2013.

DIOSADY, L. L. Chlorophyll removal from edible oils. Int. J. **International Journal of Applied Science and Engineering**, Toronto, v. 3, p. 81–88, 2005.

DONOHUE K. et al. Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 41, p. 293–319, 2010.

DORNBOS, 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**, Ames, v. 71, p. 373-383, 1990.

EGLI, D. B. et al. Air Temperature During Seed Filling and Soybean Seed Germination and Vigor. **Crop Science**, Lexington, v. 45, n. 4, p.1329-1335, 2005.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2011.** Londrina: Embrapa Soja, 255p. (Sistemas de Produção n.14), 2011.

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

FINKELSTEIN, R. et al. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 59, p. 387–415, 2008.

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico - Série Sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2012. 15 p. (Circular Técnica, 40).

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade.** Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p. (Documentos, 380).

GIBSON, L. R.; MULLER, R. E. Soybean seed quality reductions by high day and night temperature. **Crop Science**, Lexington, v. 36, p.1615-1691, 1996.

GUIAMÉT, J. J. et al. Characterization of Cytoplasmic and Nuclear Mutations Affecting Chlorophyll and Chlorophyll-Binding Proteins during Senescence in Soybean. **Plant physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 227-231, 1991.

HOLDSWORTH M. J.; BENTSINK L.; SOPPE W. J. J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytologist**, London, v. 179, p. 33–54, 2008.

HILHORST, H. W. M.; TOOROP, P. E. Review on dormancy, germinability, and germination in crop and weed seeds. **Advances in Agronomy**, Maryland Heights, v. 61, p. 111-165, 1997.

HORIE, Y. et al. Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in Arabidopsis. **International Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 284, n. 26, p. 17449-17456, 2009.

HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll degradation during senescence. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 55-77, 2006.

HÖRTENSTEINER, S. Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 82, n. 6, p. 505-517, 2013.

HUNDERTMARK, M. et al. The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from Arabidopsis thaliana modulates membrane stability through binding and folding. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, p. 446–453, 2011.

IGLESIAS-FERNANDEZ R.; RODRIGUEZ-GACIO M. C.; MATILLA A. J. Progress in research on dry afterripening. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 69–80, 2011.

ISTA. **International rules for seed testing.** Basserdorf, Switzerland: International Seed Testing Association, 2015.

JALINK, H. et al. Chlorophyll fluorescence of Brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 437-443, 1998.

JIANG, H. et al. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 197-209, 2007.

JOHNSON-FLANAGAN A. M.; MARET L. L. D; POMEROY M. K. Humidification of green canola seed leads to pigment degradation in the absence of germination. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 6, p. 1618–1623, 1994.

KOLCHINSKI, E. M.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T. Vigor de sementes e competição intra-específica em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p.1248-1256, 2005.

KRANNER, I. et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? Free Radic. **Biology and Medicine**, Aligarh, v. 40, p. 2155–2165, 2006.

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

KUCERA B.; COHN M. A.; LEUBNER-METZGER G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 281–307, 2005.

KULKARNI, M. G; DALAI, A. K.; BAKHSHI, N. N. Utilization of green seed canola oil for biodiesel production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 12, p.1886-1893, 2006.

KUSABA, M. et al. Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 4, p. 1362-1375, 2007.

KUSABA, M.; TANAKA, A.; TANAKA, R. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 117, n. 1, p. 221-234, 2013.

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

LOBELL, D. B. et al. Prioritizing Climate Change Adaptation Needs for Food Security in 2030. **Science**, New York, v. 319, n. 5863, p.607–610, 2008.

MAILER, R. J. et al. The influence of cultivar and environment on the chlorophyll concentration of Australian canola seed. **Australian Journal Of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 43, n. 2, p. 169–176, 2003.

MAKINO A.; OSMOND B. Effect of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 355–362, 1991.

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

MEGURO, M. et al. Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3442–3453, 2011.

MORITA, R. et al. Defect in non-yellow coloring 3, an alpha/beta hydrolase-fold Family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. **Plant J**, Oxford, v. 59, p. 940-952, 2009.

NGUYEN, Q. T. et al. Soybean Seed Development: Fatty Acid and Phytohormone Metabolism and Their Interactions. **Current Genomics**, Hilversum, v. 17, n. 3, p. 241-260, 2016.

NAKAJIMA, S. et al. Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, p. 261–273, 2012.

NAMBARA, E. et al. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 20, p. 675–689, 2010.

NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration. Cold and Warm Episodes by Season. National Weather Service**. Climate Prediction Center**. 2016. URL: http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml

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

PÁDUA, G. et al. Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 150–159, 2009a.

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

PÁDUA, G. et al. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 112–120, 2007.

PARK, S. Y. et al. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 5, p. 1649–1664, 2007.

POMMEL, B. D. et al. Influence of delayed emergence and canopy skips on the growth and development of maize plants: a plant scale approach with CERES-Maize. **European Journal of Agronomy**, Helsinki, v. 16, p. 263–277, 2002.

POPINIGS, 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**, Rockville, v. 142, p. 1102–1112, 2006.
PROBERT, R. et al. Seed quality for conservation is critically affected by prestorage factors. **Australian Journal of Botany**, Darwin, v. 55, n. 3, p. 326–335, 2007.

PRUŽINSKÁ, A. et al. In vivo participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 369–387, 2007.

PUTHUR, J. T.; SARADHI, P. P. Developing embryos of Sesbania sesban have unique potential to photosynthesize under high osmotic environment. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 10, p. 1107–1118, 2004.

RAJJOU, L. et al. Seed Germination and Vigor. **Annual Review Of Plant Biology**, Palo Alto, 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**, Paris**,** v. 331, p. 796–805, 2008.

REN, G. et al. Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 1429–1441, 2007.

RIGHETTI, K. et al. Inference of longevity-related genes from a robust co-expression network of seed maturation identifies regulators linking seed storability to biotic defense-related pathways. **Plant Cell,** Rockville, v. 27, p. 2692-708, 2015.

ROSNOBLET, C. et al. The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-elated kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of Medicago truncatula seeds. **Plant J**., Oxford, v. 51, p. 47–59, 2007.

SAKURABA, Y.; PARK, S. Y.; PAEK, N. C. The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 38, p. 390-395, 2015.

SANO, N. et al. 2016. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 57, p. 660–674, 2016.

SATO, Y. et al. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. **The Plant Journal:** for cell and molecular biology, Oxford, v. 57, n. 1, p. 120–31, 2009.

SATTLER, S. E. et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1419–1432, 2004.

SCHELBERT, S. et al. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 767–785, 2009.

SHIMODA, Y.; ITO, H.; TANAKA, A. Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's Green Cotyledon Gene, Encodes Magnesium-Dechelatase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 28, n. 9, p. 2147-2160, 2016.

SINNECKER, P. et al. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3961–3966, 2002.

SMOLIKOVA, G. N.; MEDVEDEV, S. S. Photosynthesis in the seeds of chloroembryophytes. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 63, p. 1–12, 2016.

SOYSTATS. U.S. Soybean Oil: U.S. Vegetable Oils Consumption, 2017. Disponível em: < http://soystats.com/soybean-oil-u-s-vegetable-oils-consumption/>. Acesso em: 05 jan. 2018.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes**. Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1807, n. 8, p. 968–76, 2011.

TAUTORUS, C. L.; LOW, N. H. Chemical aspects of chlorophyll breakdown products and their relevance to canola oil stability. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 70, n. 9, p. 843–847, 1993.

TEIXEIRA, R. N. et al. Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. **BMC Plant Biology**, London, v. 1, p. 16–37, 2016.

THOMAS, H. et al. Expression of the stay-green character introgressed into Lolium temulentum Ceres from a senescence mutant of Festuca pratensis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 92–99, 1999.

THOMAS, H.; HOWARTH, C. J. Five ways to stay green. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 329–337, 2000.

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**, Rockville, v. 163, p. 757–774, 2013.

VOM DORP, K. et al. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 27, p 2846–2859, 2015.

WALTERS C.; BALLESTEROS D.; VERTUCCI V. A. Structural mechanics of seed deterioration: standing the test of time. **Plant Science***,* v. 179, n. 6, p. 565–573, 2010.

WANG, Y.; FREI, M. Stressed Food – The Impact of Abiotic Environmental Stresses on Crop Quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 141, 271–286, 2011.

WASSMANN, R. et al. Chapter 2 Climate Change Affecting Rice Production: The Physiological and Agronomic Basis for Possible Adaptation Strategies. **Advances in Agronomy**, v.101, p. 59–122, 2009.

WHALLEY W. R.; FINCH-SAVAGE W. E. Crop emergence, the impact of mechanical impedance. **Encyclopedia Of Agrophysics**, p. 163-167, 2010.

ZINSMEISTER et al. ABI5 is a regulator of seed maturation and longevity in legumes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 28, p. 2735-2754, 2016.