

CAROLINA PEREIRA CARDOSO

**CONTRIBUIÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE PARA A
AQUISIÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SEMENTES DE SOJA**

Botucatu

2020

CAROLINA PEREIRA CARDOSO

**CONTRIBUIÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE PARA A
AQUISIÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA EM SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido
Amaral da Silva

Botucatu

2020

C268c

Cardoso, Carolina Pereira

Contribuição dos oligossacarídeos da família rafinose para a aquisição da qualidade fisiológica em sementes de soja / Carolina Pereira Cardoso. -- Botucatu, 2020

130 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

1. Sementes. 2. Longevidade de Sementes. 3. Raffinose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CONTRIBUIÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE PARA A AQUISIÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA

AUTORA: CAROLINA PEREIRA CARDOSO

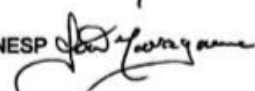
ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

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

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



Voluntário Livre-Docente JOÃO NAKAGAWA
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP



Pesquisador Dr. OLIVIER HENRI LEON LEPRINCE
Research Institute on Horticulture and Seeds / Agrocampus Ouest - Angers - França



Botucatu, 17 de fevereiro de 2020

*À minha amada família,
Magali, Jorge e Mariana,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela sua doce presença em minha vida e pela sua infinita graça que me sustenta a cada dia.

Ao meu orientador, Dr. Evaldo Aparecido Amaral da Silva, que atenciosamente me aconselhou durante o curso, por todo direcionamento e pela excelência sempre pacientemente exigida. Sou grata por todas as oportunidades que foram proporcionadas a mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao professor Dr. Olivier Leprince, Dra. Julia Buitink, Sra. Martine Neveu e toda equipe do Conserto, por toda a disponibilidade a compartilhar o conhecimento, paciência e atenção com meus questionamentos e hospitalidade. Fui extremamente bem recebida por todos e agradeço imensamente por esta oportunidade. Agradeço a instituição Agrocampus Ovest pela infraestrutura oferecida e suporte para a realização do experimento.

A todos do laboratório de sementes da Unesp-Botucatu, os quais juntamente construímos este trabalho: Samara, Larissa, Natalia, Maurício, Thiago Batista, Dennis Souza, Amanda Rithieli, Girlanio, Iago, Ana Carolina, Brunna, Michelane, Keyse e Denise e Daiani. Agradeço imensamente o empenho, disponibilidade, ajuda e sugestões. Aos estagiários do laboratório, com carinho especial: Gabriel, João, Priscilla e Lais. Aos amigos Vinicius e Laryssa. Em especial, agradeço a Valéria Giandoni não somente pelo excelente apoio técnico, mas também pela amizade.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/Botucatu. Em especial ao Prof^o. João Nakagawa e Prof^a. Marcia Sartori.

Aos meus pais, Jorge e Magali, por todo amor, sustento, orientação, amizade e pela maior herança que poderia receber, a fé no nosso Criador.

À minha irmã Mariana, minha fiel defensora, presente em cada decisão, exemplo de parceria e cuidado. Me alegro em saber que sempre a terei ao meu lado.

À minha Avó Leila e amiga por opção, meu maior exemplo de integridade, força e alegria.

Aos meus familiares, sou grata a Deus por uma família tão unida e tão presente em minha vida. Amo muito cada um.

Ao Fernando, por se alegrar nas minhas conquistas e chorar nas minhas derrotas. Que a nossa parceria cresça a cada ano juntos.

Às minhas amigas por todos esses anos caminhando juntas, presentes em todas as dificuldades e conquistas, por todo carinho e motivação.

A todos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional nesses anos vividos.

Muito obrigada!

RESUMO

Os oligossacarídeos da família rafinose (OFR), presentes nas sementes/grãos de soja, são açúcares solúveis considerados fatores antinutricionais para humanos e animais monogástricos, e por isso, limitam o uso da cultura para estes. Entretanto, estes compostos aparentam exercer um papel fundamental na aquisição da qualidade fisiológica das sementes de soja. Diante disso, genótipos mutantes que expressam o fenótipo de baixo ou ultrabaixo teor de OFR têm sido estudados visando à eficiência da alimentação humana e animal. Portanto, é preciso elucidar as funções dos OFR sobre as propriedades da qualidade fisiológica de sementes, a fim de preconizar materiais genéticos de alta qualidade, com capacidade de armazenamento e propagação. Todavia, a qualidade fisiológica e os teores de açúcares solúveis podem ser alterados em função da genética do genótipo ou do ambiente. Por isso, genótipos mutantes em OFR podem apresentar a aquisição da qualidade fisiológica distinta quando produzidos em diferentes ambientes. Objetivou-se com este trabalho elucidar a contribuição dos OFR na aquisição da qualidade fisiológica de sementes de soja em genótipos que expressam teores contrastantes destes. Para tal, foram utilizadas sementes com fenótipos para baixo e ultrabaixo teor de OFR, mutantes nas enzimas rafinose sintase (rs) 2 e rs2 rs3, respectivamente, em comparação a genótipos com alelos funcionais para RS2 (teores normais de OFR), produzidos em três safras. As sementes foram colhidas em diferentes estádios fenológicos durante a fase de maturação destas. Posteriormente, foi avaliado para todos os genótipos estudados em todos estádios colhidos, a germinação, a tolerância à dessecação, o vigor, a longevidade de sementes e a quantificação de açúcares solúveis (OFR, sacarose e galactinol). Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As diferenças encontradas entre as safras experimentais foram avaliadas por meio de análise conjunta. Para todas as safras experimentais, genótipos com teores baixos e ultrabaixos de OFR apresentaram deficiência na aquisição da longevidade, mas não houve diferenças na aquisição do vigor, germinação e tolerância à dessecação quando comparados com genótipos com teores normais destes açúcares. A aquisição da qualidade fisiológica em genótipos com alelos distintos para RS2 e/ou RS3 não se distingue quando cultivados em diferentes condições ambientais, com exceção da longevidade. Ambientes de cultivo favoráveis a aquisição da longevidade diminui a deficiência da característica observada em genótipos com baixo e ultrabaixos teores de OFR.

Palavras-chave: Rafinose. Estaquiose. Verbascose. Germinação. Vigor. Longevidade.

ABSTRACT

The raffinose family of oligosaccharides (OFR), present in soybean seeds/grains, are soluble sugars considered as antinutritional factors for humans and monogastric animals, and therefore, they limit the use of the crop. However, these compounds seem to play a fundamental role in the acquisition of physiological quality of soybean seeds. Thus, mutant genotypes expressing phenotype of low or ultralow content of OFR have been studied aiming at the efficiency of human and animal feeding. Therefore, it is necessary to elucidate the functions of OFR on the properties of physiological seed quality, in order to recommend materials of high-quality genetic material with storability and propagation capacity. The physiological quality and soluble sugar content may be altered in genetic or environmental function. Therefore, mutant OFR genotypes may acquire distinct physiological quality when grown in different environments. The aim of this research was to elucidate the contribution of OFR in the acquisition of the physiological quality of soybean seeds in genotypes that express contrasting contents for these in three experimental crops. For this, seeds with low and ultralow OFR phenotypes, mutants in raffinose synthase (rs) 2 and rs2 rs3, respectively, were used in comparison to genotypes with RS2 functional alleles (normal OFR levels). The seeds were harvested at different phenological stages during their maturation. Subsequently, it was evaluated for all genotypes studied in all harvested stages, germination, desiccation tolerance, vigor, seed longevity and quantification of soluble sugars (OFR, sucrose and galactinol). Experimental data were submitted to analysis of variance with means being compared by Tukey test at 5% probability. The differences between the experimental crops were evaluated by joint analysis. For all experimental crops, low and ultra-low OFR genotypes showed deficiency in longevity acquisition, but there was not observed differences in vigor, germination and desiccation tolerance when compared to genotypes with normal levels of these sugars. The physiological quality acquisition in genotypes with distinct alleles for RS2 and / or RS3 did not change when grown under different environmental conditions, except for longevity. Favorable crop environments for longevity acquisition reduces the deficiency of the characteristic observed in genotypes with low and ultra-low levels of OFR.

Keywords: Raffinose. Stachyose. Verbascose. Germination. Vigor. Longevity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caminho proposto para síntese de OFR	39
Figura 2 - Imagens aéreas das safras experimentais, conduzidas no mesmo local em Botucatu -SP	43
Figura 3 - Variações diárias desde a semeadura à colheita da precipitação e temperatura máxima, média e mínima durante as safras experimentais .	44
Figura 4 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para W82.....	48
Figura 5 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para W82 397	49
Figura 6 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para J RS2 RS3	50
Figura 7 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para J rs2 rs3 mt	51
Figura 8 - Caixas herméticas a 75% UR contendo solução saturada de NaCl usadas para a avaliação da longevidade de sementes	56
Figura 9 - Massa da matéria seca, fresca e conteúdo de água durante o desenvolvimento das sementes do grupo genético Jack	61
Figura 10 - Massa da matéria seca, fresca e conteúdo de água durante o desenvolvimento das sementes do grupo genético Willians	63
Figura 11 - Alterações no conteúdo de sacarose e galactinol durante a maturação de sementes de soja dos genótipos Jack	66
Figura 12 - Acúmulo de OFR durante o desenvolvimento de sementes dos genótipos Jack.....	67
Figura 13 - Esquema para a biossíntese de OFR	68
Figura 14 - Aquisição da germinação de sementes frescas de soja em genótipos que expressam conteúdos diferentes de RFO.....	78
Figura 15 - Tolerância a dessecação representada pela comparação da germinação de sementes frescas entre as de sementes secas para os genótipos Jack, safra de 2018/2019	82
Figura 16 - Tolerância a dessecação representada pela comparação da germinação de sementes frescas entre as de sementes secas para os genótipos Willians, safra de 2018/2019	83

Figura 17 - T50 durante a maturação e maturação tardia de sementes dos genótipos J rs2 rs3 mt e J RS2 RS3 WT em três safras experimentais	95
Figura 18 - T50 durante a maturação e maturação tardia de sementes dos genótipos W82 397 mt e W82 WT em três safras experimentais	96
Figura 19 - Longevidade em P50 (dias) durante a maturação e maturação tardia de	101
Figura 20 - Longevidade em P50 (dias) durante a maturação e maturação tardia de	102
Figura 21 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de J RS2 RS3 WT durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa...	104
Figura 22 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de J rs2 rs3 mt durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa ...	105
Figura 23 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de W82 WT durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa.....	106
Figura 24 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de W82 397 mt durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa ...	107
Figura 25 - Acúmulo de rafinose, estaquiose e verbascose no eixo embrionário e cotilédones e aquisição progressiva de longevidade durante a maturação e maturação tardia de sementes de soja do genótipo Jack, safra de 2017/2018.....	109
Figura 26 - Aquisição da longevidade (P50) entre as safras experimentais pra genótipos Willians (A) e genótipos Jack (B)	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média das condições ambientais (temperatura e precipitação) e duração em dias do período vegetativo e reprodutivo para todas as safras experimentais.....	45
Tabela 2 - Características físicas e químicas do solo a 0-20 cm de profundidade antes da semeadura	45
Tabela 3 - Descrição dos estádios reprodutivos das sementes de soja baseados em Ritchie et al. (1994), Lima et. al. (2017) e Puntel Basso et al. (2018)	47
Tabela 4 - Massa de matéria seca (mg/semente) das sementes dos genótipos Jack em diferentes safras experimentais.....	61
Tabela 5 - Médias para açúcares solúveis em sementes maduras para W82 WT e W82 397 – Safras 2017/2018 e 2018/2019	70
Tabela 6 - Médias para açúcares solúveis em sementes maduras para J RS2 RS3 WT e J rs2 rs3 mt para as safras experimentais de 2017/2018, 2018/2019 e 2019/2019	71
Tabela 7 - Diferenças entre as safras experimentais para o conteúdo de açúcares solúveis no eixo embrionário e cotilédones para sementes de soja dos genótipos Jack	72
Tabela 8 - Efeito de safra experimental para conteúdo de sacarose no eixo embrionário de sementes de soja para genótipos Jack.....	72
Tabela 9 - Mudanças no acúmulo de rafinose e verbascose entre safras experimentais no eixo embrionário de sementes dos genótipos Willians	72
Tabela 10 - Efeito de safra experimental sobre conteúdo de rafinose nos cotilédones de sementes dos genótipos Willians	73
Tabela 11 - Correlação de Pearson entre as médias de temperatura (°C) e os diferentes açúcares avaliados no eixo embrionário e cotilédones das sementes dos genótipos Jack	74
Tabela 12 - Tolerância a dessecação representada pela porcentagem de germinação de sementes frescas em comparação com as de sementes secas para cada estágio reprodutivo nas safras de 2018/2019 e 2019/2019.....	80
Tabela 13 - Porcentagens de plântulas normais de sementes secas em comparação de sementes frescas para as safras de 2018/2019 e 2019/2019.....	81

Tabela 14 - Efeito do estágio de desenvolvimento das sementes sobre a capacidade de desenvolvimento de plântulas normais por sementes secas para genótipos Jack e Willians, safra de 2017/2018	85
Tabela 15 - Efeito de estágio reprodutivo na primeira contagem de plântulas normais originadas por sementes secas dos genótipos Jack, safra 2018/2019..	85
Tabela 16 - Valores de plântulas normais originadas por sementes secas dos genótipos Jack. Safras de 2018/2019 e 2019/2019	86
Tabela 17 - Valores de plântulas normais originadas por sementes secas dos genótipos Willians. Safras de 2018/2019 e 2019/2019	86
Tabela 18 - Valores para plântulas normais de sementes produzidas em diferentes safras experimentais, para genótipos Jack e Willians	88
Tabela 19 - Efeito de safra experimental para a capacidade de desenvolvimento de plântulas normais originadas por sementes dos genótipos Jack.....	88
Tabela 20 - Efeito principal de estágio reprodutivo para comprimento de hipocótilo dos genótipos Jack, safra de 2019/2019	89
Tabela 21 - Valores para comprimento e massa de matéria seca de hipocótilo das plântulas originadas por sementes frescas dos genótipos Jack. Safras de 2018/2019 e 2019/2019	90
Tabela 22 - Efeito de estágio reprodutivo observado sobre o comprimento e massa de matéria seca de hipocótilo. Safra de 2018/2019 e 2019/2019.....	90
Tabela 23 - Valores para comprimento de hipocótilo e massa de matéria seca de raiz das plântulas originadas por sementes dos genótipos Willians. Safra de – 2018/2019 e 2019/2019	91
Tabela 24 - Efeito principal de safra experimental para massa de matéria seca de hipocótilo (MSH) no estágio R7.2 dos genótipos Jack	91
Tabela 25 - Valores de comprimento e massa de matéria seca de plântulas originadas por sementes dos genótipos Jack entre as safras experimentais	92
Tabela 26 - Médias para comprimento de hipocótilo e massa de matéria seca de raiz entre as safras experimentais para os genótipos Willians	93
Tabela 27 - Efeito principal de safra experimental para comprimento de hipocótilo no estágio R7.3 de sementes dos genótipos Willians	93
Tabela 28 - Diferenças entre as safras experimentais dos valores de T50 (horas) – genótipos Jack.....	97

Tabela 29 - Diferenças entre as safras experimentais dos valores de T50 (horas) – genótipos Willians	97
Tabela 30 - Valores de K_i e σ obtidos para o cálculo do P50 (dias) dos genótipos Jack e Willians.....	103
Tabela 31 - Correlação de Pearson da média do P50 de R7.1.1 a R9 entre os açúcares avaliados no eixo embrionário e cotilédone	110
Tabela 32 - Diferenças entre as safras experimentais para os valores de P50 (dias) – Genótipos Jack	112
Tabela 33 - Diferenças entre as safras experimentais para os valores de P50 (dias) – Genótipos Willians.....	112
Tabela 34 - Efeito principal de safra experimental para a longevidade (P50 dias) no estádio R7.3 para os genótipos Jack e R9 para os genótipos Willians	113
Tabela 35 - Correlação de Pearson entre média de temperatura (°C) com o P50 em diferentes períodos de cultivo.....	114

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	A cultura soja	23
2.1.1	Produção e importância econômica da soja	24
2.2	Qualidade de sementes	25
2.2.1	Qualidade fisiológica de sementes	26
2.3	Desenvolvimento e aquisição da qualidade fisiológica de sementes de soja.....	28
2.3.1	Embriogênese	29
2.3.2	Maturação	30
2.3.3	Maturação tardia	33
2.4	Os oligossacarídeos da família rafinose (OFR).....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Caracterização da área experimental e produção sementes de soja ...	41
3.2	Descrição dos genótipos de soja e estádios reprodutivos	46
3.2.1	Genótipos Willians.....	46
3.2.2	Genótipos Jack	46
3.2.3	Estádios reprodutivos	46
3.3	Avaliações	52
3.3.1	Determinação do teor de água	52
3.3.2	Massa da matéria seca e fresca de sementes.....	52
3.3.3	Secagem de sementes.....	53
3.3.4	Aquisição da qualidade fisiológica de sementes.....	53
3.3.4.1	<i>Germinação.....</i>	<i>53</i>
3.3.4.2	<i>Tolerância a dessecação.....</i>	<i>54</i>

3.3.4.3	<i>Capacidade da semente em desenvolver plântulas normais</i>	54
3.3.4.4	<i>Tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50)</i>	54
3.3.4.5	<i>Comprimento e massa de matéria seca de raiz e hipocótilo de plântulas</i>	55
3.3.4.6	<i>Longevidade de sementes</i>	55
3.4	Análise estatística	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Prováveis interações entre OFR, qualidade fisiológica e ambiente de cultivo	59
4.2	Conteúdo de água e massa da matéria fresca e seca das sementes ...	59
4.3	Quantificação de açúcares solúveis	64
4.3.1	Perfil de acúmulo de açúcares solúveis ao final da maturação e durante a maturação tardia de sementes de soja do grupo Jack (Safrade 2017/2018)	64
4.3.2	Quantificação de açúcares solúveis ao final da maturação de sementes de soja do grupo Jack e Willians	69
4.4	Envolvimento dos OFR na aquisição da qualidade fisiológica	76
4.4.1	Envolvimento dos OFR na aquisição da germinação	77
4.4.2	Envolvimento dos OFR na aquisição da tolerância à dessecação	78
4.3.3	Envolvimento dos OFR na aquisição do vigor de sementes	84
4.3.3.2	<i>Comprimento e massa da matéria seca de raiz e parte aérea das plântulas germinadas</i>	88
4.3.3.3	<i>Tempo médio para que estas atinjam 50% de protrusão (T50)</i>	94
4.4.4	Envolvimento dos OFR na aquisição da longevidade	99
5	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos solúveis predominantes em sementes/grãos de soja são a sacarose e os oligossacarídeos da família rafinose (OFR), do tipo rafinose, verbascose e estaquiose (OBENDORF; GÓRECKI, 2012; HOU et al. 2009). A sacarose é uma fonte importante de energia para humanos e animais, entretanto, sabe-se que a presença de OFR para animais monogástricos é indesejável, devido a estes serem incapazes de converter os OFR em energia metabolizável, resultando em baixa eficiência energética (CROMWELL, 2012; KAR-LILIENTHAL et al., 2005). Semelhantemente, em humanos, o consumo do grão resulta em desconforto digestivo (SUAREZ et al., 1999).

O aumento dos teores de sacarose juntamente com a redução ou a eliminação dos OFR nas sementes/grãos de soja é alvo atraente para o mercado da cultura (SEBASTIAN et al., 2000). Por outra perspectiva, os OFR aparentam exercer um papel importante na fisiologia de sementes de soja, sendo sugerido como um dos fatores envolvidos na aquisição dos atributos da qualidade fisiológica de sementes (LIMA et al., 2017; SALVI et. al, 2016). Apesar da variedade de estudos que relacionam o acúmulo de OFR durante o desenvolvimento de sementes soja, a associação destes com a aquisição da qualidade fisiológica destas ainda não é totalmente entendido.

A qualidade fisiológica de sementes é determinada, dentre outros aspectos, pelo seu potencial fisiológico, o qual pode ser definido pela capacidade da semente em realizar suas funções vitais para sua sobrevivência (FINCHSAVAGE; BASSEL, 2016; MUGNOL; EICHELBERGER, 2008). Sementes de alta qualidade fisiológica apresentam maior velocidade de germinação, vigor e longevidade. Desse modo, demonstram estabelecimento superior da cultura, refletindo, portanto, na produtividade da lavoura (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; HENNING, 2010; SCHUCH et al., 2009).

Genótipos mutantes que expressam o fenótipo para baixo ou ultrabaixo teor de OFR têm sido estudados visando à eficiência da alimentação humana e animal (VALENTINE, et al., 2017; BILYEU; WIEBOLD, 2016), mas as alterações nas constituições genéticas que envolvem a síntese destes açúcares podem alterar todo o padrão de acúmulo destes. Uma das estratégias para a diminuição destes açúcares é por meio da mutação na enzima rafinose sintase (RS) (OBENDORF et al., 2009;

HITZ et al., 2002), que resulta em aumento no teor de sacarose e diminuição nos teores de rafinose, estaquiose e verbascose.

Assim como a qualidade fisiológica, o padrão de acúmulo de açúcares solúveis responde a características genéticas com a interação ambiental, pois em genótipos de soja quando cultivados em ambientes de temperaturas amenas há favorecimento da produção de sacarose em detrimento de OFR (BILYEU; WIEBOLD, 2016). Por outra perspectiva, genótipos mutantes para RS podem apresentar alterações no seu fenótipo apresentando acréscimo na produção de OFR quando produzidos em condições ambientais favoráveis. Até o momento não há um consenso sobre a influência do ambiente no acúmulo desses açúcares (HAGELY; PALMQUIST; BILYEU, 2013).

Genótipos de soja com fenótipo para baixos teores de OFR podem apresentar qualidade fisiológica inferior em suas sementes produzidas, tornando inviável a sua propagação. Quando estes materiais são cultivados em ambientes favoráveis para o acúmulo de açúcares solúveis, as deficiências fisiológicas em suas sementes podem ser atenuadas. Portanto, em função da influência ambiental e genética, a aquisição da qualidade fisiológica de sementes de genótipos de soja com alelos distintos de RS pode apresentar variações quando estes são cultivados em diferentes ambientes.

Por isso, é preciso aprofundar as relações dos OFR com as propriedades da qualidade fisiológica de sementes de soja em diferentes condições ambientais para que seja possível o avanço no desenvolvimento de materiais de alta qualidade nutricional, mas com alta qualidade fisiológica de suas sementes.

Neste contexto, objetiva-se o entendimento da contribuição dos oligossacarídeos da família rafinose para a aquisição dos atributos da qualidade fisiológica de sementes de soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), originária da China, teve o início de sua domesticação há 5.000 anos (CHUNG; SINGH, 2008). A difusão do cultivo da cultura sucedeu pela Europa, seguido pelos Estados Unidos com a chegada ao Brasil em 1882, no estado da Bahia (BONETTI, 1981).

A partir do estado do Rio Grande do Sul, surgem em 1960 as primeiras lavouras comerciais. Na época, a alta demanda por óleo e proteína em todo o mundo incentivou a expansão do cultivo de soja, devido à cultura ser proteica, energética e de alto valor econômico (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). Neste cenário, o melhoramento genético preconizou a introdução de cultivares adaptadas às condições edafológicas de todo o território nacional, promovendo então a rápida expansão da sojicultura brasileira. Atualmente, a cultura da soja é alvo de pesquisas que objetivam o aumento da produtividade e expansão do cultivo do grão (BORNHOFEN et al., 2015).

A espécie pertence à classe das Angiospermas e família das Fabaceas, é uma planta anual, hermafrodita e autógama. O sistema radicular é pivotante, caracterizado por conter inúmeros nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio. O porte da planta de soja varia conforme o ambiente de cultivo e o genótipo do vegetal, podendo chegar até 1,5 metros de altura (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER., 2007).

A composição, qualidade nutricional e funções físico-químicas do grão de soja permitem que este apresente diversos usos na indústria e na alimentação humana e animal (SHERMAN-BROYLES et al., 2014). Dos produtos mais conhecidos da soja se destacam o farelo e o óleo extraído do grão. O farelo de soja tem presença marcante na produção animal, por ser um suplemento proteico de 44% a 48% de proteína. Já o óleo extraído, é utilizado domesticamente como óleo de cozinha, em indústrias e como biodiesel. Devido as suas propriedades, este também é empregado na fabricação de tintas, cosméticos e outros diversos produtos (MISSÃO, 2006).

A maioria das cultivares apresenta aproximadamente 41% de proteína e 20% de óleo em peso seco (NATARAJAN et al., 2013) e 15% em açúcares solúveis, na

sua maioria sacarose e oligossacarídeos da família rafinose (OFR) (HSU; HADLEY; HYMOWITZ, 1973; SCHWEIZER; HORMAN, 1981; OBENDORF et al., 1998).

Apesar da presença no grão de soja de elementos benéficos e essenciais para a alimentação humana e animal, como proteínas, lipídeos e metabólitos secundários antioxidantes e anticancerígenos (VAN DIE et al., 2014), o consumo do grão possui algumas restrições por possuir compostos denominados fatores antinutricionais. Dentre eles, em destaque estão os OFR, que consistem em açúcares solúveis não digeridos por humanos e animais monogástricos pela incapacidade do sistema digestivo destes em converter os OFR em energia metabolizável, resultando em flatulências, má digestão e redução da eficiência energética na produção animal (KARR-LILIENTHAL et al., 2005).

Diante disso, é de interesse econômico e nutricional a produção de cultivares de soja com teores reduzidos de OFR e outros fatores antinutricionais. Contudo, não se sabe até o momento qual o provável impacto da redução destes compostos na semente de soja sobre a fisiologia e propagação desta, bem como no desenvolvimento da cultura em campo, podendo ser agronomicamente inviável o cultivo destes materiais.

2.1.1 Produção e importância econômica da soja

A cultura da soja detém grande expressão no cenário nacional e internacional, uma vez que a *commodity* agrícola carrega um complexo de produção capaz de envolver valores e países importantes na importação e exportação de seu grão e subprodutos (MACHADO; ASSIS, 2010).

A soja é o terceiro grão com maior produção mundial, correspondendo a 362,075 milhões de toneladas na safra de 2018/2019 (USDA, 2019). O Brasil e os Estados Unidos aparecem na liderança de produção, aferida na safra de 2019 em 114,843 milhões de toneladas e 123,664 milhões de toneladas (USDA, 2019) respectivamente, sendo capazes de suprir suas necessidades internas com excedente para a exportação e abastecimento dos estoques da China, Argentina e outros países (FIESP, 2018). O Brasil destaca-se como o maior exportador e segundo maior produtor do grão (CONAB, 2019). Para o panorama nacional, as perspectivas futuras são otimistas. A expectativa para o país nas próximas safras é de aumento na

exportação, produção e na área cultivada com a cultura. O alto consumo e a diminuição dos estoques mundiais (USDA, 2019) solicitam o incremento da produção de soja. Há, portanto, espaço para o Brasil alcançar a liderança não apenas no volume de grão produzido, mas também em se tornar o principal fornecedor de soja para a China.

Neste cenário, a sojicultura no Brasil, juntamente com os Estados Unidos, se apresenta-se como a principal mantenedora dos estoques mundiais, sendo indiretamente responsável pela cadeia de produtos originados da cultura. Portanto, deve-se investir em estratégias de manejo que viabilizem lavouras rentáveis e produtivas, bem como a produção de sementes de qualidade com alta capacidade de armazenamento e propagação.

2.2 Qualidade de sementes

O sucesso do cultivo e a produtividade da cultura da soja são dependentes de diversos fatores, como a escolha da cultivar utilizada, ambiente de cultivo, tratamentos culturais e a qualidade da semente empregada. O uso de sementes de alta qualidade é um fator preponderante para o sucesso da lavoura (MARCOS FILHO, 2015).

Sementes de alta qualidade dão origem a plântulas bem desenvolvidas e vigorosas, com maior velocidade de germinação e apresentam maior resistência a condições adversas de cultivo, resultando, portanto, em um adequado estabelecimento da cultura em campo e assim maior chances de elevadas produtividades (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; HENNING, 2010).

A expressão da interação de quatro componentes define a qualidade de sementes, sendo estes: genético, físico, fisiológico e sanitário (AMBROSANO, 1999). A qualidade genética da semente é relacionada à sua pureza varietal, potencial de rendimento, precocidade, estatura e estrutura de plantas, entre outros. Já a qualidade sanitária, é definida pela presença de patógenos que causam danos as sementes. A pureza e a condição física, como teor de água, densidade e injúrias mecânicas da semente caracterizam a qualidade física (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999). Por fim, a qualidade fisiológica é a capacidade da semente em desempenhar suas funções essenciais para sua sobrevivência (MUGNOL; EICHELBERGER, 2008), reunindo informações sobre sua germinação, vigor e longevidade (POPINIGIS, 1973;

FINCHSAVAGE; BASSEL, 2015). Sementes com maior longevidade apresentam maior capacidade de armazenamento permanecendo viável por maiores períodos (VERDIER et. al. 2013).

Diante do exposto, fica evidente a importância da produção de sementes de alta qualidade fisiológica para garantir a propagação de cultivares com conservação de seus atributos genéticos e fisiológicos objetivando o adequado estabelecimento e produtividade da lavoura.

2.2.1 Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade fisiológica de sementes é o atributo responsável pelo desempenho de funções essenciais para a sobrevivência destas, reunindo informações sobre a germinação, viabilidade, vigor e longevidade (MUGNOL; EICHELBERGER, 2008).

Sementes com alta qualidade fisiológica apresentam maior velocidade de germinação e emergência (FRANÇA NETO; HENNING, 1992), originam plântulas normais com bom desenvolvimento inicial em campo (SCHUCH et al., 2009), além de apresentarem maior resiliência frente a condições não adequadas no ambiente de cultivo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

A germinação de sementes é conceituada pela perspectiva morfológica, bioquímica, fisiológica e agrônômica. Jann e Amen (1980) definem que morfológicamente a germinação é a transformação do embrião em plântula, bioquimicamente, esta consiste na diferenciação de processos oxidativos e de síntese para retomada de processos bioquímicos participantes do crescimento vegetativo e do desenvolvimento. Pelo ponto de vista fisiológico, a germinação consiste na reativação do metabolismo, reinício da transcrição do genoma resultando no rompimento do tegumento para o começo do crescimento do eixo embrionário, este evidenciado pela protrusão de radícula (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1975; JANN; AMEN, 1980). Por fim, o critério agrônômico ou tecnológico vai adiante, inclui o desenvolvimento inicial da plântula (MARCOS FILHO, 2015) definindo a propriedade pela reativação do crescimento do eixo embrionário até a formação de uma plântula (MARCOS FILHO, 2015; COPELAND; McDONALD, 1995). Ademais as diversas definições, todas corroboram que a germinação compreende na retomada do

metabolismo e uma série de reações bioquímicas que resultam no desenvolvimento do eixo embrionário.

A germinação de sementes obtida em laboratório raramente se repete quando semeadas em campo. A diferença da germinação a campo de sementes de um mesmo lote pode ser por efeito do diferente vigor entre estas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Dentre as várias conceituações de vigor existentes, estas concordam que este consiste em um conjunto de propriedades que levariam a semente a germinar rapidamente e produzir plântulas vigorosas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Perry (1972) propôs para o conceito, a seguinte definição: “vigor de sementes é uma propriedade fisiológica determinada pelo genótipo e modificada pelo ambiente, que governa a sua capacidade de dar rapidamente origem a uma plântula no solo, bem como, a sua capacidade de resistir a uma série de fatores ambientais. A influência do vigor da semente pode persistir durante a vida da planta e afetar a produção”.

A capacidade de germinação (ou sobrevivência) após a perda de água da semente é um atributo nomeado por tolerância à dessecação (DEKKERS et al., 2015). Entretanto, sobreviver no estado seco não indica que a semente permanecerá viável nesta condição (LEPRINCE et al., 2017). Para isso, a longevidade de sementes é o atributo que confere a capacidade da semente em permanecer viável em determinado período (SANO et al., 2016) constituindo um dos mecanismos adaptativos que permitem sementes de uma população de plantas se disperse no tempo (LEPRINCE et. al., 2017), sendo importante para os valores agrônômicos e ecológicos.

A dessecação é um processo que ocorre no desenvolvimento de sementes, e durante isso, há uma transformação do citoplasma celular em um fluído de alta viscosidade, conhecido como “estado vítreo” (BUITINK; LEPRINCE, 2008). Este estado permite uma estabilização das atividades metabólicas da semente, e conseqüentemente, uma severa diminuição da velocidade das reações associadas com a deterioração (BUITINK et al., 2000; WALTERS; HILL; WHEELER, 2005). Isso é possível devido à atuação de mecanismo de proteção e reparo da semente, o qual envolve componentes que evitam a desnaturação de proteínas e desestabilização de membranas durante a perda de água (CHATELAIN et al., 2012; OGE et al., 2008).

Sementes de soja, por serem ortodoxas, conseguem sobreviver à dessecação e permanecer vivas enquanto armazenadas no estado seco e em temperaturas

baixas (BEWLEY et al., 2013). Entretanto, as sementes desta cultura apresentam baixa vida útil (baixa longevidade) durante o armazenamento, sendo influenciada por fatores intrínsecos como composição química, viabilidade inicial, estágio de maturação, e extrínsecos, como temperatura e umidade do ambiente de armazenamento (BEWLEY et al., 2013).

Entretanto, como observado por Ellis e Roberts (1980), a perda da viabilidade das sementes é progressiva durante o armazenamento, seguindo um padrão sigmoide, indicando que reações deteriorativas ocorrem durante o armazenamento e não são cessadas por completo. Bewley et. al (2013), confirmam que o envelhecimento de sementes, este causado pelas reações de deterioração, resulta na perda da capacidade destas em formar plântulas normais. Diante disso, pode se concluir que quanto menor a longevidade da semente, mais intensas são as reações de envelhecimento, resultando em menor a capacidade destas em formar plântulas normais. Desta forma, a baixa longevidade pode afetar negativamente o estabelecimento da cultura (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

A capacidade de germinação, a tolerância à dessecação, vigor e a longevidade de sementes são atributos que resultam de um conjunto de processos moleculares e celulares adquiridos durante o desenvolvimento de sementes.

Portanto, é preciso entender os mecanismos e fatores que regulam estas propriedades para elucidar a aquisição da qualidade fisiológica de sementes, para que seja possível a otimização da produção e reprodução de sementes com o máximo potencial fisiológico.

2.3 Desenvolvimento e aquisição da qualidade fisiológica de sementes de soja

A qualidade fisiológica de sementes, como descrito anteriormente, é um atributo complexo por envolver vários componentes. O processo de aquisição da qualidade fisiológica ocorre ao longo do desenvolvimento de sementes, onde as propriedades que compõe este atributo, como germinação, tolerância à dessecação, vigor e longevidade, são adquiridas em fases distintas, por mecanismos moleculares e bioquímicos diferentes que se interagem com o meio ambiente (BEWLEY et al., 2013).

O desenvolvimento de sementes é um processo iniciado pelo óvulo fecundado seguido de uma sequência de eventos, controlada geneticamente, capaz de promover a diferenciação de tecidos, expansão destes e acúmulo de reservas, onde o fim é caracterizado pelo decréscimo do conteúdo de água (WEBER; BORISJUK; WOBUS, 2005). Até o momento, o desenvolvimento de sementes é composto por três períodos: embriogênese, maturação e a fase de maturação tardia (BEWLEY et al., 2013).

A soja é uma cultura autógama, onde as flores são perfeitas contendo órgãos reprodutivos masculinos e femininos que se autofecundam (GAZZONI, 2017). Com as flores ainda fechadas, o grão de pólen é liberado da antera e fixado ao estigma da flor. O grão de pólen origina o tubo polínico, o qual caminha pelo estilete até o interior do ovário para a liberação dos gametas. Para soja, a formação do tubo polínico e a fecundação pode levar um período de 8 a 10 horas dependendo de vários fatores como temperatura e disponibilidade hídrica. Além disso, a disponibilidade de Boro e Cálcio é fundamental para a germinação e desenvolvimento do tubo polínico (MARCOS FILHO, 2015).

O tubo polínico ao atingir o ovário, a autofecundação da soja se inicia quando os dois núcleos reprodutivos do grão de pólen são liberados no interior do saco embrionário. Pela dupla fertilização, ocorre a união dos gametas masculinos provenientes do grão de pólen com os núcleos polares e a oosfera do óvulo, resulta na origem do núcleo endospermático ($3n$) e do zigoto ($2n$), respectivamente (COPELAND; MCDONALD, 1995). Após todo este processo e a partir destas estruturas a fase de embriogênese é iniciada.

2.3.1 Embriogênese

O processo de embriogênese é controlado geneticamente e é iniciado onde diversas divisões celulares no zigoto resultam na formação do embrião e o núcleo endospermático, em endosperma. Neste período, há o aumento da largura e comprimento das sementes mediante as divisões e expansões celulares, mantendo elevada a umidade dos tecidos (POLLOCK e ROSS, 1972). Em sementes de soja, o endosperma é consumido durante a formação do embrião, assim os cotilédones assumem a função de tecido de reserva (GOLDBERG; BARKER; PEREZ-GRAU, 1989).

Após a fecundação, a partir do zigoto ($2n$), este é envolvido por parede celular e ocorrerá uma divisão mitótica para a formação da célula apical, que será precursora da formação do embrião, e da célula basal, que originará o suspensor, que é uma estrutura transitória a qual será digerida com o desenvolvimento do embrião, com função de sustentação a este, absorção e transferência de nutrientes e reguladores de crescimento do tecido materno ao embrião em formação. Injúrias nesta estrutura afeta o desenvolvimento do embrião (MARCOS FILHO, 2015).

Durante as fases da embriogênese estruturas são formadas que constituirão os tecidos e meristemas do embrião maduro. Ao final da embriogênese, a semente de soja terá as estruturas essenciais para seu desenvolvimento, que consistem no embrião (eixo embrionário e os cotilédones) e o tegumento. Em conjunto, o embrião maduro apresentará todos os órgãos primordiais de uma futura planta: camada epidérmica, meristema radicular e apical, tecido vascular, células parenquimáticas, cotilédones e eixo embrionário (MARCOS FILHO, 2015).

O desenvolvimento do tegumento ocorre no processo de embriogênese, onde este é originado dos integumentos do óvulo, primina e secundina, e formam a testa e o tegma, respectivamente. O tegumento é um tecido fundamental na semente, responsável pela proteção, trocas gasosas e ajuda na manutenção da viabilidade das sementes (DEBEAUJON et al 2018).

Com todas as estruturas diferenciadas, o embrião maduro seria capaz de germinar a não ser pela presença do ácido abscísico (ABA), o qual é sintetizado pelo tecido maternal no início da embriogênese até atingir um pico ao final da histodiferenciação. Neste momento, a síntese e a concentração deste hormônio são responsáveis pela inibição da viviparidade (ou germinação das sementes ainda imaturas) dos embriões formados (RAVAGHAN, 2002). Após o pico atingido, o teor do ABA decresce linearmente durante a fase de maturação, momento o qual o hormônio atribuirá esta e outras funções para a sequência do desenvolvimento de sementes e para a aquisição da qualidade fisiológica (OKAMOTO et al., 2006).

2.3.2 Maturação

Após a embriogênese, a segunda fase do processo é a fase de maturação, conhecida por enchimento de sementes. Neste momento, a semente aumenta em tamanho e matéria seca, havendo expansão, alongamento celular e síntese de

substâncias de reservas que serão responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e energia necessários para a germinação (GUTIERREZ et al., 2007). O sucesso da germinação da semente em formação é fortemente dependente deste momento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012), uma vez que neste ocorre um conjunto de eventos metabólicos que determinarão a composição global da semente (HAJDUCH, 2005).

Nesta fase, há produção de proteínas envolvidas no metabolismo de divisão e crescimento celular, mas estas apresentam um decréscimo ao longo do processo de embriogênese. Em contrapartida, há um incremento no acúmulo de proteínas envolvidas no metabolismo de defesa e em proteínas que serão armazenadas. Já para os açúcares, a sacarose, glicose e frutose serão acumuladas chegando ao máximo no final da fase de maturação (HADJUCH., 2005). Na fase de maturação tardia, parte da sacarose acumulada será convertida em oligossacarídeos da família rafinose. O teor de óleo apresenta um rápido aumento correspondendo a mais de 30% do óleo total da semente é acumulado nesta fase.

O teor máximo de ABA atingido no final do processo de embriogênese na soja, decresce linearmente chegando a teores bem baixos próximo a maturidade fisiológica (R7.2), momento o qual as sementes são desligadas da planta mãe. Próximo a este momento, ainda na fase de maturação, em R7.1, os teores menores de ABA permitem a aquisição da capacidade de germinação (a qual foi suprimida pelo mesmo hormônio no final da histodiferenciação) (BEWLEY et al., 2013; OKAMOTO et al., 2006).

O processo de enchimento de sementes é regulado geneticamente, mas sofre influências ambientais. Para a soja, altas temperaturas (maiores que 30 graus) e estresse hídrico resulta em queda na produtividade das sementes, e há redução na massa, tamanho, vigor e na germinação da semente formada (DORNBOS; MULLEN, 1990). Além disso, a disponibilidade de nutrientes à planta mãe deve ser adequada, uma vez que a nutrição da planta mãe possui estreita relação com a qualidade fisiológica da semente (SÁ, 1994). Altas temperaturas durante o enchimento de sementes resultam em diminuição do teor de óleo, proteína e sacarose. Em adição, há um acréscimo na incidência de sementes duras quando em altas temperaturas, fenômeno prejudicial para a germinação e emergência rápida e uniforme em campo, em função da dificuldade e atraso da embebição (GIBSON; MULLEN, 1996; SPEARS; TEKRONY; EGLI, 1997).

A duração da fase de maturação de sementes para a cultura da soja dura em torno de 4 a 5 semanas (HAJDUCH, 2005) e pode variar entre genótipos (ZANAKIS;

ELLIST; SUMMERFIELD 1994). O término da fase de maturação e início da fase de maturação tardia não são totalmente elucidados por variar significativamente entre as espécies, além disso, essas fases podem ser sobrepostas (LEPRINCE et al., 2017).

Consensualmente, utiliza-se o momento em que as sementes cessam o acúmulo de reservas, expansão e alongamento celular para definir o final da fase de maturação e início de fase de maturação tardia para espécies em geral. Outros marcadores relacionados a fase de maturação tardia são o acúmulo de oligossacarídeos da família rafinose, início da aquisição da longevidade, perda do conteúdo de água e de clorofila (LEPRINCE et al., 2017).

Para a cultura da soja, Lima et al. (2017) observaram que o final do enchimento de sementes foi no início da fase R7.2, coincidindo com a abscisão das sementes na planta mãe. Um estágio anterior a este, em R7.1, o programa molecular de acúmulo de reservas ainda é ativo, com presença evidente da expressão de transcritos envolvidos no processo de crescimento e na síntese de reservas como amido, lipídeos e proteínas. Em R7.2 estes eventos já não são evidentes, e a nível molecular, o enchimento de sementes é cessado.

Na transição de R7.1 para R7.2, há o início da degradação de clorofila e perda de água, considerados marcadores característicos da fase de maturação tardia. Entretanto, apenas em R7.2 o enchimento de sementes de fato é molecularmente cessado, e há a presença de outros marcadores da fase de maturação tardia, como o início do acúmulo de oligossacarídeos da família rafinose e início da aquisição da longevidade de sementes (LIMA et al., 2017; VALÁRIO et al., 2016). Dessa maneira, o início da fase de maturação tardia sobrepõe o final da fase de maturação do desenvolvimento de sementes de soja.

Em R7.2, é observada a aquisição da tolerância a dessecação, a qual consiste na habilidade da semente sobreviver e reidratar sem que haja danos irreversíveis após a remoção de água parcial ou quase total das células (LEPRINCE; BUITINK, 2010). A tolerância a dessecação é um mecanismo que é fortemente regulado geneticamente não sendo influenciado pelas condições ambientais a qual a semente é produzida (LEPRINCE et al., 2017). A aquisição da característica é fundamental neste momento, devido a expressiva perda de água adiante a este estágio na fase de maturação tardia.

A fase de maturação é fundamental para a aquisição da qualidade fisiológica, por definir a semente em tamanho e composição, e adquirir a germinação e a tolerância à dessecação. Entretanto, estudos afirmavam que a máxima qualidade

fisiológica da semente é coincidente no momento da maturidade fisiológica, o qual consiste no momento de máximo acúmulo de matéria seca (para soja em R7.2). Ao contrário do que é estabelecido, após este momento ainda há um aumento no vigor e a aquisição progressiva da longevidade, indicando um aumento na qualidade fisiológica (BEWLEY et al., 2013; ZANAKIS; ELLIST; SUMMERFIELD, 1994).

Portanto, as fases finais no período de maturação tardia são fundamentais para a maximização da qualidade fisiológica.

2.3.3 Maturação tardia

A fase de maturação tardia para as sementes de soja é caracterizada pela expressiva perda de água (dessecação), degradação da clorofila, e aquisição progressiva da longevidade e vigor de sementes. Este período é dependente das condições do ambiente das sementes em produção, onde é influenciada pelas condições hídricas e térmicas (RIGHETTI et al., 2015; DUCATTI, 2018). Há relatos na literatura de que a longevidade de sementes de soja é favorecida quando estas são cultivadas em condições térmicas elevadas, ao redor de 30°C (LIMA et al., 2017; BASSO, 2018; PROBERT; DAWS; HAY, 2009; ZANAKIS; ELLIST; SUMMERFIELD, 1994).

O momento ideal da colheita das sementes é dado no estágio R9, onde haverá o máximo vigor e com o máximo acúmulo de moléculas protetoras, reparadoras e antioxidantes. Entretanto, alta umidade e precipitação pluvial no momento da pré colheita podem resultar em deterioração e assim prejudicar a longevidade das sementes adquiridas (PERISSATO, 2019). Essa deterioração será agravada se tais condições estiverem associadas com condições de elevadas temperaturas (FRANÇA NETO; HENNING, 1984).

O processo de dessecação na fase de maturação tardia leva as sementes de soja a atingirem um teor de água próximo a 10% do seu peso seco (LIMA et al., 2017). Ao final da dessecação, o citoplasma das sementes, que originalmente apresentava um estado líquido, passa para um estado vítreo, que consiste em um líquido de viscosidade extremamente alta que impõe baixa mobilidade das moléculas com severa diminuição nas reações deteriorativas (BALLESTEROS; WALTERS, 2011; BUITINK; LEPRINCE, 2004; LEOPOLD; SUN; BERNAL-LUGO, 1994). As sementes precisam ser tolerantes à dessecação para o alcance do estado vítreo, o qual é

importante para a longevidade de sementes (LEPRINCE et al., 2017). A tolerância a dessecação e a longevidade de sementes são adquiridas em momentos distintos, mas compartilham de mecanismos semelhantes que promovem a sua aquisição (LEPRINCE et al., 2017).

Anteriormente ao processo de secagem (final da fase de maturação) e na fase de maturação tardia mecanismos de proteção e reparo são instalados. O mecanismo de proteção é envolvido na longevidade de sementes, onde promove estabilização e proteção celular durante a secagem, atua na formação do estado vítreo e na quiescência, incluindo também, a produção de antioxidantes que evitarão o acúmulo de moléculas oxidativas durante o armazenamento (BALLESTEROS; WALTERS, 2011; BUITINK; LEPRINCE, 2004). Já o mecanismo de reparo, age sobre os danos que são acumulados gradualmente sobre o DNA, RNA e proteínas durante o armazenamento, envolvendo a atuação de enzimas e outros compostos que atuarão durante o processo de embebição das sementes (SANO et al., 2016).

Para sobreviver no estado seco a semente deve evitar os danos celulares durante os processos de secagem e na subsequente reidratação para a germinação (BEWLEY et al., 2013). Para isso, moléculas protetoras são acumuladas durante a fase de maturação tardia na cultura da soja, as quais são: os açúcares não redutores (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001), proteínas abundantes tardias de embriogênese (LEAs) (CHATELAIN et al., 2012; HUNDERTMARK et al., 2011), proteínas de choque térmico (HSPs) (DAPENA et al., 2006), proteínas contra estresses (SUGLIANI et al., 2009), um conjunto de defesas contra estresses oxidativos, entre eles a glutathione (KRANNER et al., 2006) e tocoferóis (SATTTLER et al., 2004).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres promovem danos oxidativos em proteínas, lipídeos, membranas DNA e RNA (SANO et al., 2016). O acúmulo excessivo destes danos induz progressivamente a perda do vigor e capacidade de germinação até a morte irreversível do embrião. Dessa forma, o acúmulo de mecanismos antioxidantes durante a fase de maturação tardia favorece a longevidade pela atenuação e controle do excesso destas reações danosas (SANO et al., 2016). Mesmo diante de tantos mecanismos de proteção (seja pela manutenção da integridade das estruturas ou por mecanismos antioxidantes), a semente ainda acumula danos durante o armazenamento. Por isso, os mecanismos de reparo agirão sobre os danos que são acumulados gradualmente sobre o DNA, RNA e proteínas

durante e após o armazenamento, envolvendo a atuação de enzimas e outros compostos que atuarão durante o processo de embebição das sementes (SANO et al., 2016).

Na fase de maturação tardia a degradação de clorofila acompanha a perda de água. A presença de clorofila é prejudicial à qualidade fisiológica de sementes (FRANÇA NETO et al., 2012). A semente de soja adquire a tolerância a dessecação antes da completa degradação de clorofila, dessa maneira, o pigmento não tem relação com a aquisição desta característica e a sua degradação está envolvida na aquisição de vigor e longevidade de sementes (LEPRINCE et al., 2017). Sugere-se que a degradação da clorofila sirva como substrato (oriundo da sua degradação) para a síntese de tocoferóis, que consiste em um antioxidante envolvido na longevidade de sementes (SANO et al., 2016). Em estudos, sementes maduras que foram incapazes de degradar o pigmento na fase de maturação tardia apresentam vigor e longevidade reduzida (ARRUDA et al., 2016; CLERKX et al., 2003; DEKKERS et al., 2016). A degradação de clorofila é prejudicada em condições de estresses térmicos, levando a retenção do pigmento e prejudicando a qualidade de sementes (TEIXEIRA et al., 2016).

Os componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos e membranas celulares apresentam interações hidrofílicas e hidrofóbicas que são essenciais para a manutenção destas estruturas no estado funcional tridimensional (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). A remoção da água e a subsequente reidratação pode danificar tais estruturas e perder a sua funcionalidade. Durante o processo de secagem, as proteínas abundantes de embriogênese (LEAs) e proteínas de choque térmico (sHSPs) são acumuladas antes da perda de água e estão fortemente relacionadas a aquisição da tolerância a dessecação (DEKKERS et al., 2015). As LEAs e as sHSPs são sintetizadas a partir da metade da fase de maturação e com acúmulo progressivo até a secagem final das sementes (R9) (SANO et al., 2016). A ausência de aminoácidos hidrofóbicos e a presença de lisina e glicina tornam as LEAs muito hidrofílicas e conferem alta solubilidade. Na abstenção de água, as sHSPs e as LEAs se associam com membranas e macromoléculas, e dessa maneira, exercem um papel de substituição de água, onde atuarão contra a desnaturação de proteínas e desestabilização de membranas, protegendo contra danos irreversíveis (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Diante da coincidência do acontecimento da aquisição da tolerância à dessecação e progressiva aquisição da longevidade com o início e progressivo acúmulo de açúcares solúveis não redutores no desenvolvimento de sementes, denominados oligossacarídeos da família rafinose (OFR) do tipo rafinose, verbascose e estaquiose, foi proposto o envolvimento destes açúcares na aquisição destes atributos (OBENDORF, 1997). Para a cultura da soja, Lima et al. (2017) observou o início do acúmulo de OFR no final do enchimento de sementes com seu máximo constatado na fase de maturação tardia.

Há uma variedade de estudos sobre o acúmulo de OFR durante o desenvolvimento de sementes soja, mas, a relação destes com a aquisição da qualidade fisiológica de sementes ainda não é totalmente elucidada.

2.4 Os oligossacarídeos da família rafinose (OFR)

Os carboidratos solúveis predominantes em sementes de soja são a sacarose e os oligossacarídeos da família rafinose (OFR), do tipo rafinose, verbascose e estaquiose (DIERKING; BILYEU, 2009). A sacarose é uma fonte importante de energia para humanos e animais, entretanto, os efeitos dos OFR sobre a fisiologia de sementes e na nutrição humana e animal são divergentes.

Até o momento, sabe-se que a presença de OFR para animais monogástricos é indesejável devido a estes serem considerados fatores antinutricionais (RACKIS, 1975). Para os mesmos, o uso do grão de soja é amplamente utilizado devido ao seu alto valor proteico, e a presença da sacarose em alta quantidade do grão é um gargalo para o aumento da eficiência energética. Deste modo, o aumento dos teores de sacarose juntamente com a redução ou a eliminação dos OFR nas sementes/grãos de soja é alvo atraente para o mercado da cultura.

Todavia, os OFR aparentam exercer um papel importante na fisiologia de sementes de soja (SALVI et. al, 2016), mas a função destes açúcares na aquisição da qualidade fisiológica de sementes ainda não é compreendida (LIMA et al., 2017). Diante disso, a redução dos OFR em sementes de soja pode afetar a qualidade fisiológica destas com reflexos negativos sobre a propagação, armazenamento e estabelecimento da cultura em campo.

Na literatura, algumas evidências são propostas para justificar a possível participação dos OFR na aquisição dos atributos da qualidade fisiológica de sementes. Hipoteticamente, acreditava-se que tais açúcares poderiam ser utilizados como fonte energética para a germinação, uma vez que de fato ocorre uma rápida decomposição destes após o momento de embebição de sementes durante o processo germinativo (BLÖCHL; PETERBAUER; RICHTER, 2008). Entretanto, Dierking e Bilyeu (2009) ao comparar a germinação de sementes de soja que expressavam níveis baixos de OFR com sementes de soja expressando teores normais para este, não verificaram diferenças significativas entre o potencial germinativo destes, indicando que os OFR não são fontes de energia essenciais requeridos para que ocorra o processo germinativo.

Diante da coincidência do acontecimento da aquisição da tolerância à dessecação com o início do acúmulo de OFR no desenvolvimento de sementes, foi proposto o envolvimento destes açúcares na proteção destas durante o processo de dessecação (OBENDORF, 1997), pela possível habilidade dos açúcares solúveis em estabilizar as membranas celulares. (CROWE et al., 1987). A substituição de água por OFR pode favorecer a formação do estado vítreo (KOSTER; LEOPOLD, 1988) de forma a proteger contra os danos nas membranas das sementes causadas pela desidratação, e também por manterem os lipídios destas em fase fluida (CROWE et al., 1987) bem como a estrutura de suas proteínas (IMAMURA et al., 2003).

Bailly et al., (2001), ao estudarem o desenvolvimento de sementes de feijão, constataram a aquisição da tolerância à dessecação coincidente com o acúmulo de OFR. Com isso, afirmam que o metabolismo de oligossacarídeos pode estar envolvido na aquisição da tolerância a dessecação durante do desenvolvimento de sementes de feijão, mas que estes não estão relacionados ao vigor.

A literatura aponta relação do vigor de sementes com OFR para espécies leguminosas e outras espécies (BERNAL-LUGO; CARL LEOPOLD, 1992; LIU et al., 2014; VANDECASTEELE et al., 2011), mas para a soja há relatos que os OFR não são envolvidos com a aquisição deste atributo (DIERKING; BILYEU, 2009; NEUS; FEHR; SCHNEBLY, 2005).

A rafinose é sintetizada a partir da sacarose, pela adição de galactinol com a reação sendo mediada pela enzima rafinose sintase (RFS). Adiante a rafinose, uma subsequente adição de galactinol forma a estaquiose e em seguida a verbascose, onde as reações são mediadas pelas enzimas estaquiose sintase (STS) e verbascose

sintetase (VBS), respectivamente (Figura 1) (OBENDORF et al., 2009). Lima et al. (2017) verificaram em seu trabalho, que o aumento da taxa rafinose+estaquiose/sacarose aumenta durante o enchimento de sementes, o que indica que a conversão dos OFR é de fato a partir da sacarose. No momento que esta taxa chegou a ser igual a 1, as sementes se tornaram tolerantes à dessecação, logo, é possível inferir como mais uma evidência da possível participação dos OFR sobre a aquisição da tolerância a dessecação.

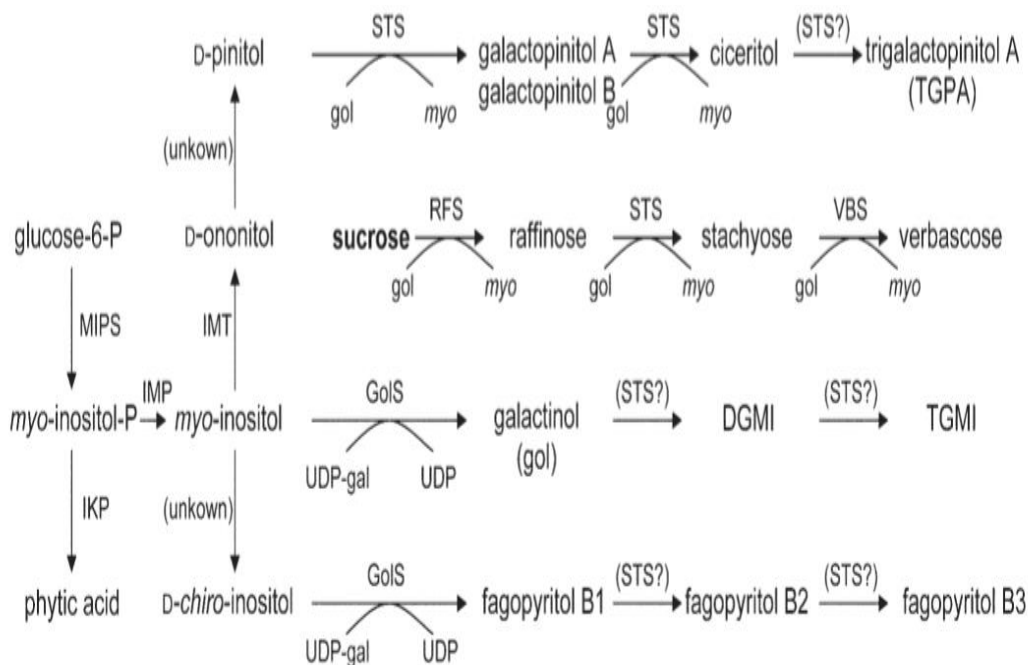
Alguns estudos demonstram que os OFR não estão relacionados com a longevidade de sementes (BUTINK et al., 2000; CLERKX et al., 2003), como Bentsink et al. (2000), que não encontraram relação entre o teor de OFR com a armazenabilidade de sementes em *Arabidopsis thaliana*. Outros estudos, propõem uma possível contribuição destes com a longevidade de sementes devido a ação de tais açúcares não redutores (OFR) contra danos oxidativos, por meio da atenuação de reações oxidativas e liberação das moléculas tóxicas derivadas dessas reações durante o armazenamento (LEPRINCE et al., 2017; NISHIZAWA-YOKOI; YABUTA; SHIGEOKA, 2008). Em *Arabidopsis thaliana*, foi observada aquisição progressiva da longevidade na fase de maturação tardia, concomitantemente com a contínua síntese de OFR (BAUD et al., 2002; FAIT et al., 2006), indicando uma possível participação destes açúcares na aquisição progressiva desta característica.

Genótipos mutantes que expressam o fenótipo para baixo ou ultrabaixo teor de OFR têm sido estudados visando à eficiência da alimentação humana e animal. Uma das estratégias para a diminuição destes açúcares é por meio da subexpressão da enzima rafinose sintase (RFS). De acordo com os caminhos propostos para a síntese desses açúcares por Obendorf et al. (2009), a baixa ou nula atividade da RFS impediria a produção dos açúcares que seriam formados subsequentemente a rafinose (Figura 1).

As alterações nas constituições enzimáticas participantes na produção destes açúcares podem alterar todo o padrão de acúmulo destes. Em pesquisas, sementes de soja mutantes para RFS expressaram fenótipo para baixo teor de rafinose e estaquiose, e alto teor de galactinol. Diante disso, é possível observar que o galactinol realmente não foi convertido em rafinose, e o baixo teor de rafinose limitou o acúmulo de estaquiose mesmo na presença normal da enzima estaquiose sintase (STS) (HITZ et al., 2002; SEBASTIAN et al., 2000).

Obendorf et al. (2009) confirmaram a alteração no padrão de acúmulo de OFR ao compararem a formação de sementes de soja entre genótipo mutante para a enzima RFS com genótipo tipo selvagem (o qual apresenta as suas funções normais para a enzima em questão). Durante o desenvolvimento das sementes, os teores de rafinose para o mutante permaneceram constantes e quase nulos, e ao final, teores superiores de sacarose e inferiores para estaquiose e verbascose em relação ao tipo selvagem. Opostamente, o genótipo tipo selvagem demonstrou um pico na síntese de rafinose concomitante com o de queda no teor de sacarose, e ao final do desenvolvimento de suas sementes, apresentou valores elevados no teor total de OFR, enquanto o mutante, teores muito baixos para estes. Diante disso, fica evidente a que a inibição da enzima rafinose sintase limita o acúmulo de todos os outros açúcares que são derivados da rafinose, alterando os teores totais de OFR na semente/grão produzido.

Figura 1 - Caminho proposto para síntese de OFR



Legenda: DGMI, digalactosyl mio-inositol; TGMI, trigalactosyl mio-inositol; gol, galactinol; GoIS, galactinol sintase (CE 2.4.1.123); IMP, mio-inositol-fosfato monofosfatase (EC 3.1.3.25); IMT, mio-inositol 4-metiltransferase (CE 2.1.1.129); MIPS, Mio-inositolphosphate sintase (EC 5.5.1.4); Mio, mio-inositol; RFS, rafinose sintase (EC 2.4.1.82); STS, estaquiose sintase (EC 2.4.1.67), (STS?) indica que o STS é proposto por extrapolação, mas não foi demonstrado experimentalmente; UDP, difosfato uridina; UDP-GAL, uridina difosfato galactoside; VBS, verbascose sintase

Fonte: Obendorf et al. (2009)

Genótipos de soja com o mesmo alelo para RS2 produzem um perfil semelhante de carboidratos na semente de soja, entretanto, mesmo que pequenas, há variações nos teores de açúcares solúveis acumulados quando estes são cultivados em diferentes ambientes (HAGELY; PALMQUIST; BILYEU, 2013). Assim, genótipos mutantes para rs2 apresentam menor quantidade de OFR em relação a genótipos com alelos funcionais para RS2, embora estes genótipos possam ser favorecidos para o acúmulo destes oligossacarídeos quando cultivados em ambientes com temperaturas mais quentes (BILYEU; WIEBOLD, 2016). A literatura ainda não é clara quanto ao comportamento do acúmulo de OFR frente as condições térmicas. Alguns relatos indicam que a sacarose é favorecida em ambientes mais amenos (BILYEU; WIEBOLD, 2016)., e por consequência, menores seriam a conversão e, assim menores os OFR nessas condições.

O silenciamento gênico ou a subexpressão de genes que regulam a atividade de enzimas participantes no processo de síntese dos OFR, por aumentarem o teor de sacarose e diminuírem os de rafinose, estaquiose e verbascose, demonstra ser eficiente para a produção de materiais com maior qualidade nutricional para humanos e animais. Em adição, o ambiente de cultivo pode favorecer a diminuição de OFR mesmo em genótipos com genes funcionais para RS2.

Por outra perspectiva, devido à possível contribuição destes açúcares para a aquisição dos atributos da qualidade fisiológica, a propagação destes materiais poderá ser inviável, com as suas sementes produzidas podendo apresentar baixa armazenabilidade, baixo vigor, emergência de plântulas reduzida e desuniforme, e dessa maneira resultar em um deficiente estabelecimento do estande de plantas com reflexos negativos até a produtividade final.

Portanto, é preciso o entendimento do envolvimento dos OFR na aquisição da qualidade fisiológica, para que seja possível a produção de ferramentas para o alcance de materiais superiores, com competitividade de mercado e de alta qualidade nutricional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área experimental e produção sementes de soja

Três safras experimentais foram conduzidas para verificar o comportamento e a repetibilidade sob diferentes condições ambientais do padrão de aquisição da qualidade fisiológica de genótipos com baixo e ultrabaixo teor de OFR, mutantes para rafinose sintase (rs) 2 e mutante para rs2 e rs3 respectivamente. A primeira, no ano agrícola de 2017/2018, foi semeada em 1 de dezembro de 2017, a segunda cultivada no agrícola de 2018/2019, semeada em 1 de dezembro de 2018, e a terceira em 21 de janeiro de 2019 (Figura 2). As safras foram conduzidas no mesmo local experimental no município de Botucatu – SP na Latitude de 22° 50 ' 30" Sul e Longitude de 48° 25' 26.6" Oeste, onde a região apresenta altitude de 810 metros. O solo da área experimental é classificado como nitossolo vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006).

Os dados de precipitação pluvial e de temperatura nos períodos de condução dos experimentos foram obtidos através dos registros Departamento de Recursos Naturais – Setor de Climatologia da Universidade Estadual Paulista de Botucatu – SP (Figura 3). As condições ambientais durante a fase vegetativa e reprodutiva da cultura estão descritas na Tabela 1.

As características físico químicas do solo foram determinadas antes da instalação do experimento e estão apresentadas na Tabela 2. Com base nas informações obtidas das análises de solo foi realizada a calagem deste com antecedência de dois meses ao primeiro plantio e a adubação mineral no momento da semeadura.

Para a primeira safra, as parcelas foram adaptadas devido ao limitado número de sementes de cada material genético em estudo, onde estas constituíram-se de três linhas de 5 metros (m) de comprimento espaçadas a 0,45 m. Para a segunda e terceira safra, cada parcela consistiu em 12 linhas de 5 m de comprimento espaçadas a 0,45 m. Foram consideradas úteis as linhas centrais, desprezando-se 0,5 m de suas extremidades. A semeadura foi realizada manualmente para todas as safras distribuindo-se 15 sementes por m^{-1} linear. Uma semana após a emergência foi

realizada a contagem do número de plantas, estabelecendo-se a densidade de 12 plantas por m⁻¹ linear.

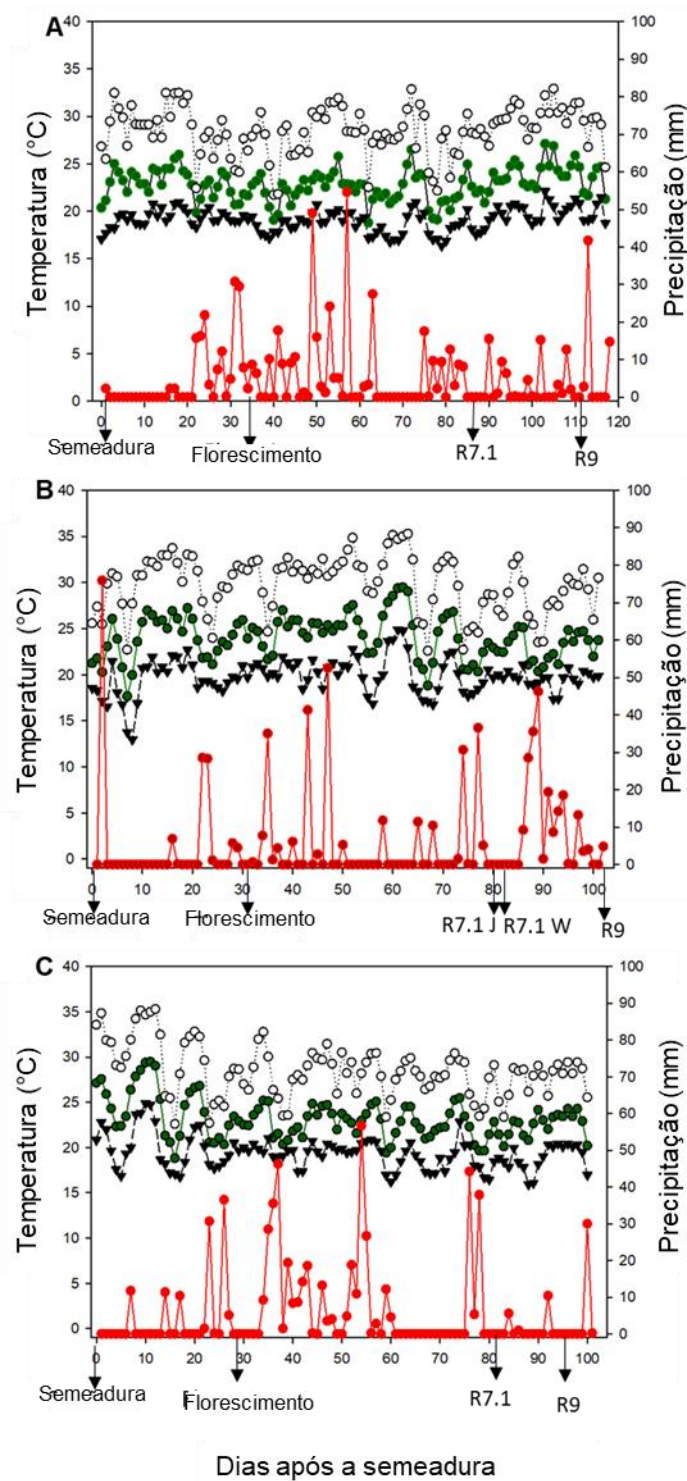
No dia da semeadura, as sementes foram tratadas com um fungicida Carbendazim + Thiram na dose de 2 mL/kg de sementes, Vitavax ® Thiram 200 SC (Carboxanilida + Dimetilditiocarbamato) na dose de 250 mL/100 kg de sementes, e foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp utilizando-se o produto Biomax ® na dose de 1.6 mL/kg de sementes. Durante o desenvolvimento da cultura da soja, o controle fitossanitário e os demais tratos culturais foram realizados conforme a necessidade e as recomendações para esta (EMBRAPA, 2011). Foi realizada a irrigação das plantas com intuito de evitar estresses por seca durante o desenvolvimento das plantas, não sendo mensurada a quantidade de água fornecida, mas realizada até a aproximada saturação do solo em dias secos. A colheita foi realizada manualmente em diferentes estádios reprodutivos das sementes, os quais serão descritos adiante.

Figura 2 - Imagens aéreas das safras experimentais, conduzidas no mesmo local em Botucatu -SP



Legenda: (A) Primeira safra (2017/2018) no período vegetativo; (B) Segunda safra (2018/2019) no período reprodutivo; (C) Segunda safra (2018/2019) no período reprodutivo à esquerda e terceira safra (2019/2019) no período vegetativo à direita.

Figura 3 - Variações diárias desde a semeadura à colheita da precipitação e temperatura máxima, média e mínima durante as safras experimentais



Legenda: Temperatura máxima (círculos abertos), média (círculos verdes) e mínima (triângulos pretos) e precipitação diária (círculos vermelhos). (A) Safra 2017/2018, (B) Safra 2018/2019, (C) Safra 2019/2019. J e W significam grupo genético de Jack e Willians.

Tabela 1 - Média das condições ambientais (temperatura e precipitação) e duração em dias do período vegetativo e reprodutivo para todas as safras experimentais

Genótipos/ Estádios	Total de dias	$\sum$ de dias >30°C	T°C Média	T°C Máxima	T°C Mínima	Precipitação (mm)
Jack e Willians		2017/2018				
Semeadura à colheita	111	34	23	28	19	568
Semeadura ao florescimento	35	8	23	28	19	172
Florescimento a R7.1	53	14	22	28	19	337
Florescimento a R9	76	26	23	29	19	396
R7.1 a R9	23	12	24	30	20	74
Grupo Jack		2018/2019				
Semeadura à colheita	101	58	24	30	20	618
Semeadura ao florescimento	33	20	24	30	19	152
Florescimento a R7.1	48	33	25	30	20	264
Florescimento a R9	68	38	24	30	20	467
R7.1 a R9	20	5	23	28	20	203
Grupo Willians		2018/2019				
Semeadura à colheita	102	59	24	30	20	623
Semeadura ao florescimento	33	20	24	30	19	152
Florescimento a R7.1	51	33	24	30	20	264
Florescimento a R9	70	39	24	30	20	471
R7.1 a R9	19	6	23	28	20	208
Jack e Willians		2019/2019				
Semeadura à colheita	95	25	23	29	19	561
Semeadura ao florescimento	28	16	24	30	20	107
Florescimento a R7.1	54	9	23	29	19	436
Florescimento a R9	67	9	23	28	19	453
R7.1 a R9	13	0	22	27	19	17

Tabela 2 - Características físicas e químicas do solo a 0-20 cm de profundidade antes da semeadura

Ano	pH	MOS d/dm ³	P resin mg/dm ³	H ⁺ AL	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CTC	SB	V%
				mmolc/dm ³						
2017	4.8	23	25	48	2,9	22	10	84	36	42
2018	4	35	45	74	3,7	34,8	11	124	50	40

MOS: matéria orgânica do solo, CTC: capacidade de troca catiônica; SB: saturação de bases

3.2 Descrição dos genótipos de soja e estádios reprodutivos

Foram utilizados genótipos de soja que apresentam fenótipos contrastantes para os teores de OFR em dois grupos genéticos: Genótipos Willians e Genótipos Jack. Em cada grupo, foi comparado um genótipo mutante no gene Rafinose Sintase com um genótipo com funções normais para este (tipo selvagem). As sementes foram fornecidas pelo Professor Olivier Leprince, pesquisador na Universidade Agrocampus Ouest – Angers - França.

3.2.1 Genótipos Willians

Willians 82 é um genótipo de grupo de maturação III adaptado a altas latitudes (BERNARD; CREMEENS., 1988) e possui alelos normais para rafinose sintase 2 (RS2), apresentando fenótipo para teores normais de OFR, e será nomeado neste trabalho como tipo selvagem W82. O mutante W82 397 (RS2 p.Thr107Ile) contém um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no alelo de RS2 que resultou em uma mutação “*missense*” com a codificação para um aminoácido diferente. O fenótipo resultante deste mutante é para baixo teor de OFR (BILYEU; WIEBOLD, 2016).

3.2.2 Genótipos Jack

O genótipo de soja Jack RS2 RS3 foi utilizado como tipo selvagem por apresentar genes funcionais para RS2 e RS3, com fenótipo para teores normais de OFR. Este é classificado como grupo de maturação II com maturidade relativa 2.9, ou seja, super-precoce e com melhor adaptabilidade para altas latitudes (NICKELL et al., 1990). O mutante J rs2 rs3 16-435 apresenta deleção de nucleotídeos nos alelos de RS2 e RS3 que resultaram na abstenção de um aminoácido ocorrendo fenótipo para ultrabaixo teor de OFR, será chamado neste trabalho como J rs2 rs3 mt.

3.2.3 Estádios reprodutivos

As sementes foram coletadas durante os estádios reprodutivos da fase final de maturação e maturação tardia, conhecidos por serem os momentos os quais as sementes adquirem as propriedades fisiológicas como germinação, tolerância a dessecação, vigor e longevidade (LIMA et al., 2017). As sementes foram selecionadas a partir das informações morfofisiológicas existentes na literatura dos estádios reprodutivos de sementes de soja. As imagens 4,5,6,7 retratam as características durante toda a maturação e maturação tardia para os genótipos em estudo.

Não foi possível realizar a marcação das idades das sementes em dias após florescimento (DAF), por isso, neste trabalho foi utilizado o padrão estágio para a coleta destas. A campo, foi identificado o estágio de cada genótipo quando a parcela de cultivo deste apresentou mais de 50% das plantas em um determinado estágio.

Tabela 3 - Descrição dos estádios reprodutivos das sementes de soja baseados em Ritchie et al. (1994), Lima et. al. (2017) e Puntel Basso et al. (2018)

Estádios Reprodutivos	Características da vagem	Morfologia da semente
R _{7.1}	Totalmente verde	Semente verde com eixo embrionário amarelado
R _{7.1.1}	Verde com pontos amarelos	Semente verde com 25% da superfície amarelada
R _{7.1.2}	Verde com pontos amarelos	Semente verde com 50% da superfície amarelada
R _{7.2}	Amarelada com pontos verdes	Tegumento amarelado, mas com pontos verdes ao centro
R _{7.3}	Completamente amarela	Tegumento amarelado completamente com superfície brilhante. As sementes são desconectadas das vagens.
R _{8.1}	Amarelada com pontos marrons	Tegumento amarelado e completamente opaco. Consistência da semente é emborrachada
R _{8.2}	Marrom com pontos amarelos	Tegumento amarelado e completamente opaco. Semente sem a consistência emborrachada, mas não é completamente dura.
R ₉	Completamente marrom e seco	Tegumento marrom e semente seca

Figura 4 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para W82



* Barras brancas significam 20mm

Figura 5 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para W82 397



* Barras brancas significam 20mm

Figura 6 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para J RS2 RS3



* Barras brancas significam 20mm

Figura 7 - Vagens e sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento para J rs2 rs3 mt



* Barras brancas significam 20mm

3.3 Avaliações

Na primeira safra (2017/2018), foram colhidas sementes nos estádios R7.1.1, R7.1.2, R7.2, R7.3, R8.2 e R9 com intuito de uma caracterização inicial da aquisição da qualidade fisiológica dos materiais. Imediatamente após a colheita as sementes foram secas para a realização dos testes: germinação, tempo médio para ocorrência de 50% de germinação e longevidade. Nesta safra foi identificado o padrão de acúmulo de açúcares solúveis para os genótipos Jack, mutante e selvagem, uma vez que são os genótipos com maior contraste em OFR. Foi avaliado para as sementes secas em todos os estádios reprodutivos os teores de galactinol, sacarose e OFR, do tipo rafinose, estaquiose e verbascose.

A partir dos primeiros resultados obtidos, duas outras épocas de cultivos (2018/2019 e 2019/2019) foram instaladas para confirmação destes e realizado estudo de outros parâmetros, como tolerância a dessecação, massa da matéria seca e fresca de sementes e comprimento e massa da matéria seca de raiz e parte aérea. As sementes para estas épocas foram colhidas nos estádios R7.1, R7.2, R7.3, R8.1 e R9, com a intenção de complementar os estádios faltantes na primeira safra (R7.1 e R8.1). O teor de açúcar solúvel foi determinado em R9 para todos os genótipos dos dois grupos genéticos em 2018/2019, e para 2019/2019, apenas para as sementes maduras do grupo Jack.

3.3.1 Determinação do teor de água

Imediatamente após a colheita das sementes, foi mensurado o teor de água destas pelo método da estufa a 105°C durante 24 horas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com 4 repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem, em base úmida.

3.3.2 Massa da matéria seca e fresca de sementes

A partir das sementes imediatamente coletadas (frescas), 4 repetições de 10 sementes foram pesadas em balança analítica de precisão e submetidas a 60°C até a estabilização do peso seco. Após, as sementes foram pesadas na mesma balança para a mensuração da massa de matéria seca das sementes. Os resultados foram

expressos em mg por semente. Foi mensurado para as safras de 2018/2019 e 2019/2019.

3.3.3 Secagem de sementes

As sementes frescas colhidas para cada etapa e para cada genótipo, foram submetidas à secagem rápida com gel de sílica, conforme metodologia utilizada por Basso et al. (2018). Quatro repetições de 100 sementes foram pesadas imediatamente após a colheita e, posteriormente, colocadas sobre uma tela em caixa do tipo gerbox com sílica gel a 15% de umidade relativa (UR), a qual foi monitorada por um data logger e mantida a uma temperatura controlada de 20°C. A cada 6 horas, as sementes foram pesadas novamente para monitorar a diminuição do teor de água. Com base nos dados de conteúdo de água medidos anteriormente para as respectivas sementes, antes da preparação do teste, os valores de conteúdo de água foram calculados até atingir 10% do peso fresco (base úmida). Durante a secagem rápida, o teor de água calculado foi verificado pelo método descrito anteriormente. Em seguida, as sementes secas foram embaladas em caixas de papelão e armazenadas em câmara fria (10°C 40% UR) para as posteriores avaliações.

3.3.4 Aquisição da qualidade fisiológica de sementes

As sementes de cada estágio/genótipo foram armazenadas e submetidas aos testes descritos a seguir para a caracterização da aquisição da germinação, tolerância a dessecação e longevidade. O vigor, por ser uma característica multigênica (LI et al., 2017), foi avaliado pela comparação dos resultados dos seguintes testes: capacidade da semente em desenvolver plântulas normais, tempo necessário para as sementes atingirem 50% da germinação (T50), comprimento e massa da matéria seca de raiz e hipocótilo das plântulas desenvolvidas pelas sementes germinadas.

3.3.4.1 Germinação

A aquisição da germinação foi avaliada para as safras de 2018/2019 e 2019/2019 utilizando 4 repetições de 25 sementes no estado fresco. Estas foram distribuídas uniformemente em folhas de papel toalha (Germitest®) umedecidas com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco e

confeccionados os rolos (3 folhas por rolo). Os rolos foram acondicionados dentro de sacos plásticos fechados mantidos em germinador regulado à temperatura de 25°C por oito dias. As sementes as quais protruíram a radícula com o tamanho maior que 2mm foram consideradas germinadas.

3.3.4.2 Tolerância a dessecação

Foi avaliada para as safras de 2018/2019 e 2019/2019, onde as sementes foram consideradas tolerantes a dessecação a partir do momento em que estas germinaram (considerando a protrusão da radícula maior que 2mm) após o processo de secagem a 10% de umidade, conforme descrito anteriormente. Para investigar se existem danos nas plântulas desenvolvidas pelas sementes após o processo de secagem, foi contabilizado a porcentagem de plântulas normais desenvolvidas pelas sementes após a secagem, as quais apresentam todas as estruturas diferenciadas e bem desenvolvidas, sendo classificadas de acordo pela RAS (BRASIL, 2009). Os estádios analisados foram entre R7.1 a R8.1, uma vez que em R9 a umidade de sementes em campo já era próxima a 10%, não havendo necessidade de secagem.

3.3.4.3 Capacidade da semente em desenvolver plântulas normais

As sementes no estado seco para as três safras experimentais (3 repetições de 15 sementes para a safra 2017/2018 e 4 repetições de 25 sementes para 2018/2019 e 2019/2019), foram submetidas ao teste de germinação descrito anteriormente, entretanto, foi mensurado ao 5º e 8º dia após a instalação do teste a somatória de plântulas normais desenvolvidas pelas sementes secas. As plântulas normais foram classificadas partir de avaliações visuais, conforme descrito pela RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagens.

3.3.4.4 Tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50)

As sementes secas dos diferentes estádios/genótipos foram colocadas em placas de Petri (3 repetições de 15 sementes para a safra 2017/2018 e 4 repetições de 25 sementes para 2018/2019 e 2019/2019), entre papéis filtro e umedecidas com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco. As

placas foram mantidas em germinador regulado à temperatura constante de 25°C sem fotoperíodo. As leituras foram realizadas de 6 em 6 horas, adotando como critério para a germinação a protrusão da radícula com comprimento igual ou superior a 2 mm. O tempo requerido para germinação de 50% das sementes viáveis (T50) foi calculado por meio da análise de dados de germinação acumulada usando o módulo de ajuste de curva do software Germinator (JOONSEN et al., 2010) e os resultados expressos em horas.

3.3.4.5 Comprimento e massa de matéria seca de raiz e hipocótilo de plântulas

Quatro repetições de 10 sementes secas foram semeadas sobre linha traçada longitudinalmente no terço superior do papel substrato (Germitest®) previamente umedecido (com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco), com o hilo voltado para a porção inferior deste, com intuito de orientar o crescimento da plântula de forma retilínea (NAKAGAWA, 1999). As repetições, na forma de rolos, foram mantidas verticalmente em germinador, a 25 °C e ausência de luz. Com auxílio de régua milimetrada, foi medido o comprimento do hipocótilo e da raiz primária das plântulas desenvolvidas pelas sementes semeadas após sete dias da instalação do teste. A partir da média do comprimento das partes de todas as plântulas, os resultados foram expressos em centímetros. Com as mesmas plântulas, foi isolado hipocótilo e a raiz primária por repetição para a mensuração da massa de matéria seca destes. As partes foram mantidas em estufa de circulação de ar a 60 °C até estabilização da massa. Após, foi feita a pesagem do material em balança de precisão (0,0001 g) com os resultados expressos massa média em gramas de matéria seca.

3.3.4.6 Longevidade de sementes

Anteriormente a instalação do teste, as sementes secas foram mantidas a 75% UR a 20°C por 24 horas. Após essa umidificação, aproximadamente 150 sementes foram dispostas sobre tela em caixas herméticas de modo a não se sobreponham. A umidade relativa (UR) interna das caixas foi de 75%, obtida por meio de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (Figura 8). Estas foram armazenadas em ambiente controlado a 35°C conforme metodologia descrita por Zinsmeister et al. (2016). As sementes foram retiradas das caixas e submetidas ao teste de germinação

conforme descrito anteriormente (3 repetições de 15 sementes para a safra 2017/2018 e 4 repetições de 25 sementes para 2018/2019 e 2019/2019) durante diferentes momentos de armazenamento até a verificação da perda da capacidade de germinação destas. Com os dados obtidos, foi elaborada a curva sigmoide de distribuição da longevidade dos genótipos para os diferentes estádios ao longo do armazenamento. Os resultados de longevidade foram definidos como tempo (em dias) para que as sementes percam 50% da viabilidade durante o armazenamento (P50) através do modelo da equação de Probit: $v = K_i - p/\sigma$ (v = viabilidade em dias; K_i = germinação inicial; p = morte esperada; e σ = inclinação da reta) (ELLIS; ROBERTS, 1980).

Figura 8 - Caixas herméticas a 75% UR contendo solução saturada de NaCl usadas para a avaliação da longevidade de sementes



C

Fonte: PERISSATO, 2019.

3.3.5 Determinação de açúcares solúveis

A determinação de açúcares solúveis foi feita de acordo com a metodologia utilizada por Lima et al (2017). Os eixos embrionários e cotilédones foram isolados das sementes secas para a determinação de açúcares solúveis. Foram avaliadas 3 repetições de 5 eixos embrionários e 3 repetições de 9 cotilédones para a mensuração

dos teores de galactinol, sacarose e OFR (rafinose, estaquiose e verbascose) por genótipo/estádio. As partes, assim que separadas, foram imersas ao nitrogênio líquido e após foram liofilizadas por 72 horas. As partes liofilizadas foram moídas até virarem um pó seco. Foi pesado aproximadamente 20 mg deste pó para cada repetição e adicionadas uma solução de 40 µl de melezitose (4 g/L) como controle interno, juntamente com 1 ml de metanol a 80% (v/v) à mistura. As amostras foram incubadas por 15 min a 76 °C e, em seguida, o metanol foi evaporado em um speed-vacuum (Mi Four Vac, Genevac) por 2 horas a 40°C. O sedimento originado foi ressuspenso em 1 ml de água ultrapura e centrifugado para 5 min a 4°C a 13.500 g (R5417, Eppendorf). O sobrenadante foi diluído de 20 a 50 vezes. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Dionex Corp., Sunnyvale, CA) usando uma pré coluna AS11 troca iônica e uma coluna Dionex CarboPac PA1 (2 x 250 mm) a uma vazão constante de 0,25 ml / min de 0,1 M NaOH. Os açúcares foram detectados por amperometria. Foi determinado* o teor de água do macerado para cada repetição. Sua natureza e concentração foram determinadas por comparação com padrões de concentrações conhecidas. Os teores dos açúcares foram expressos em mg/mg de peso seco.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela comparação entre o mutante e o tipo selvagem dentro de cada grupo genético, não comparando os grupos genéticos entre si. Cada safra experimental foi avaliada isoladamente para cada grupo genético sob o delineamento de blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 2x6 com três repetições para a primeira safra, e fatorial 2x5 com quatro repetições para a segunda e terceira safra. Os tratamentos consistiram em dois genótipos (mutante e um tipo selvagem) e seis estádios de desenvolvimento de sementes de soja para a primeira safra, e cinco para a segunda e terceira safra. As diferenças encontradas para os tratamentos entre as safras foram avaliadas por meio de análise conjunta, onde cada estágio de desenvolvimento foi avaliado isoladamente, comparando 3 safras experimentais com 2 genótipos (mutante e tipo selvagem) para cada grupo genético.

Os dados obtidos foram analisados quanto a normalidade e homocedasticidade não sendo necessária de transformação dos dados. Posteriormente, os dados

experimentais foram submetidos a análise de variância com as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade por meio do *software* AgroStat[®]. As correlações de Pearson foram realizadas a partir do *software* Minitab 16.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prováveis interações entre OFR, qualidade fisiológica e ambiente de cultivo

O estudo deste trabalho objetivou entender se os OFR contribuem para a aquisição da qualidade fisiológica de sementes de soja. Por meio da comparação de genótipos contrastantes de teores de OFR buscou-se o entendimento se a ausência ou presença dos OFR possa favorecer ou reduzir as propriedades fisiológicas das sementes. Embora, os genótipos mutantes possam apresentar diferenças na qualidade fisiológica das sementes em relação aos seus tipos selvagens não necessariamente são derivadas da ausência dos OFR. A expressão das características genéticas interage com as condições ambientais para a expressão do fenótipo (HOOD-NIEFER et al., 2012; GANGOLA et al., 2013), e por isso, os mutantes geneticamente modificados podem se comportar de forma distinta em função de condições ambientais diferentes, expressando pior ou melhor qualidade fisiológica em suas sementes.

Frente a isso, três safras experimentais foram conduzidas para verificar se as condições ambientais alteram o comportamento dos genótipos. Se a qualidade fisiológica for adquirida de forma distinta entre o mutante e o tipo selvagem, haverá a suspeita de que isto decorreu do ambiente e/ou da ausência dos OFR. Se quando analisadas essas sementes das três safras experimentais com diferenças ambientais e o comportamento fenotípico permanecer, haverá indícios que as diferenças encontradas na qualidade fisiológica de fato são genéticas.

As variáveis analisadas foram avaliadas isoladamente para cada safra de cultivo a fim de detectar se houve diferença na aquisição da qualidade fisiológica para os genótipos com teores reduzidos de OFR, e por análise conjunta, verificar se o comportamento entre os genótipos permanece diante das diferenças ambientais observadas.

4.2 Conteúdo de água e massa da matéria fresca e seca das sementes

O conteúdo de água das sementes entre os genótipos mutantes e tipo selvagem, nos dois grupos genéticos, não se diferenciaram estatisticamente nos estádios avaliados e entre épocas de cultivo. De forma semelhante, para os dois

grupos genéticos, nas duas safras avaliadas, o maior valor de massa da matéria fresca foi encontrado em R7.1, e é coincidente com o maior conteúdo de água entre os estádios avaliados. Ao longo dos estádios, há a diminuição do conteúdo de massa de matéria fresca concomitante com a diminuição do teor de água. No estádio R7.3, há perda expressiva de água, onde os valores próximos a 55% de umidade diminuem para cerca de 12% até ao início do estádio R9 (Figura 9 e 10).

Para o grupo Jack, na safra de 2018/2019, observou-se interações estatísticas entre genótipo e estádio de desenvolvimento para massa de matéria fresca, onde em todos os estádios, o mutante deste grupo (J rs2 rs3 mt) foi superior em todos eles. Na massa de matéria seca, não foi observada interação estatística entre os fatores genótipo e estádio, mas efeito principal para cada um, onde o mutante permanece com os valores superiores. O mesmo comportamento foi observado estatisticamente para essas variáveis na época tardia (2019/2019), confirmando que o mutante neste grupo desenvolve sementes mais pesadas. O efeito principal para estádio na massa de matéria fresca foi observado nos duas safras avaliadas, onde em 2018/2019, foi observado o maior valor em R7.2, não se diferenciando de R7.3, e na época tardia (2019/2019), em R7.1, não se diferenciando de R7.2 e R7.3 (Figura 9).

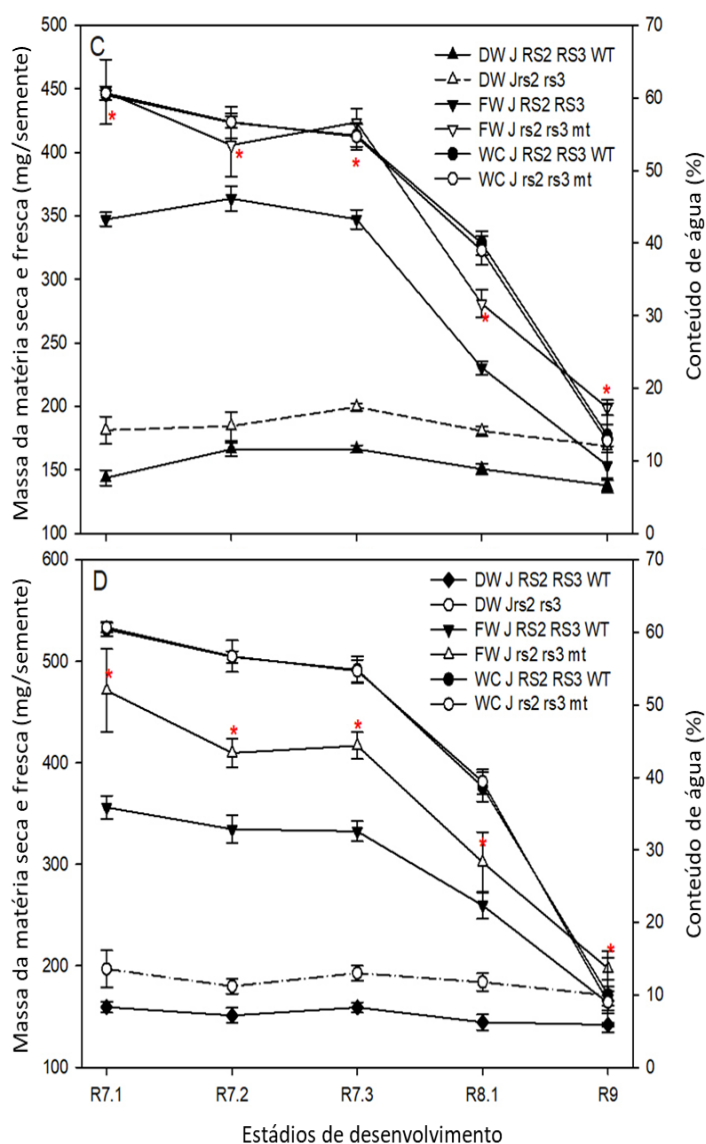
Pela análise conjunta, no grupo Jack, os valores de massa de matéria fresca entre os anos não apresentaram diferenças estatísticas. Já para a matéria seca, a análise conjunta realizada entre as épocas de cultivo para cada estádio não apresentou diferenças estatísticas com exceção de R7.1 e R7.3. Para estes estádios, o efeito principal da safra de cultivo está apresentado na tabela 4 com as médias para o estádio de cada safra. Para R7.1, os maiores valores foram para a terceira safra (safra de 2019/2019), e para R7.3, a matéria seca deste foi favorecida na segunda safra (2018/2019) (Tabela 4). De acordo com a Figura 3, o maior índice pluviométrico em R7.1 foi encontrado na terceira safra, e para R7.3, na segunda época de cultivo. Provavelmente a maior quantidade de chuva dentro de cada safra ambiental nestes estádios cooperou para o maior acúmulo de massa seca de sementes de cada genótipo.

Tabela 4 - Massa de matéria seca (mg/semente) das sementes dos genótipos Jack em diferentes safras experimentais

Safr	Estádios	
	R7.1	R7.3
2018/2019	162,4b	182,8 ^a
2019/2019	178,2a	175,95b

*Médias seguidas pela mesma letra (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Figura 9 - Massa da matéria seca, fresca e conteúdo de água durante o desenvolvimento das sementes do grupo genético Jack



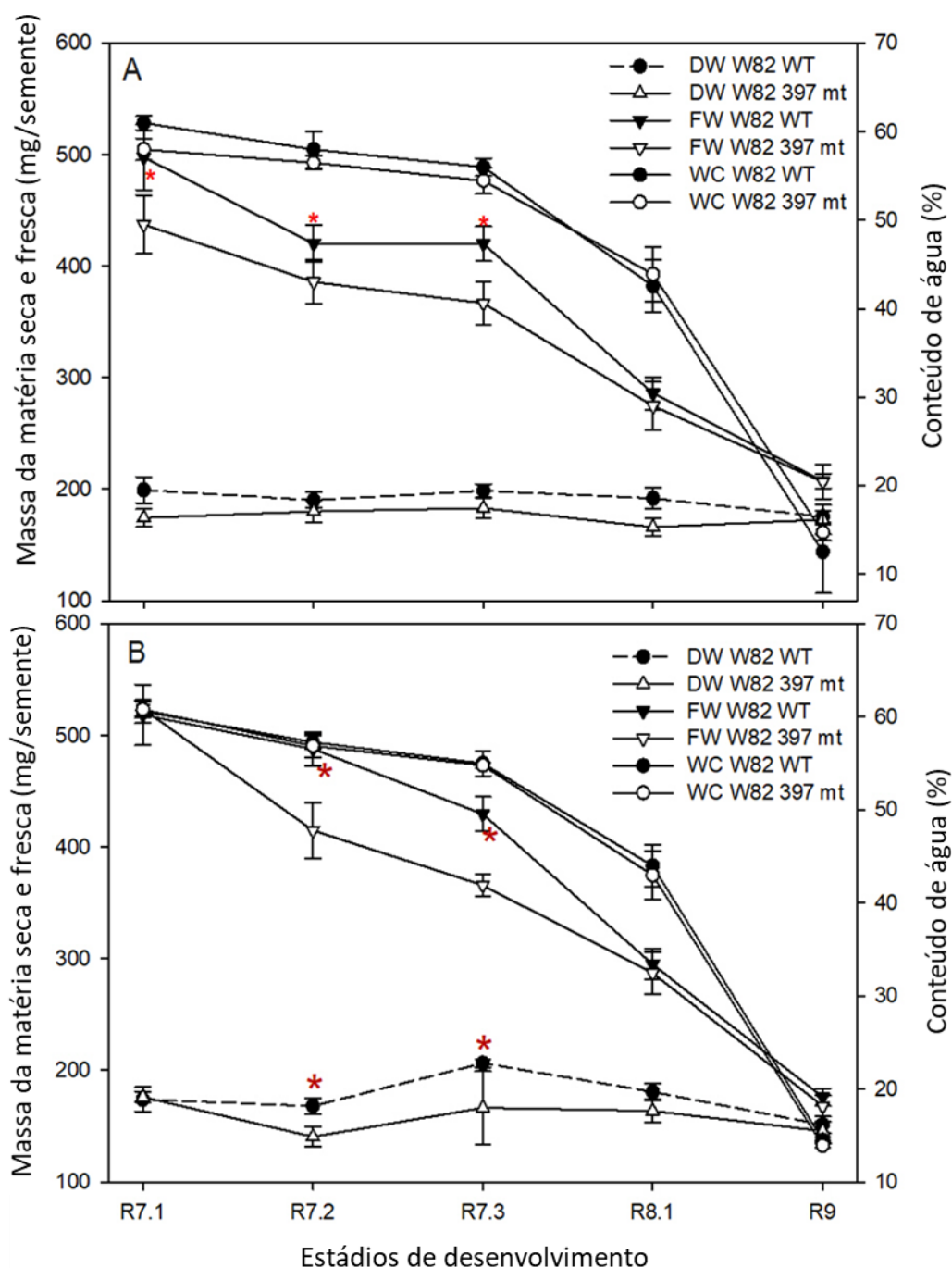
Legenda: Massa da matéria seca (DW), fresca (FW) e conteúdo de água (WC). Os dados são médias de 4 repetições de 10 sementes e as barras representam o desvio padrão. Valores para a safra 2018/2019 (C) e para safra de 2019/2019 (D).

Já para o grupo Willians, de forma contrária ao grupo Jack, os valores para o tipo selvagem (W82 WT) sobressaem aos do mutante. Na safra de 2018/2019, para a massa de matéria fresca, o WT foi superior em R7.1, R7.2 e R7.3, e para a outra safra, 2019/2019, em R7.2 e R7.3, com os outros estádios não se diferindo estatisticamente entre os genótipos. Em relação a massa de matéria seca, em 2018/2019, foi observado efeito principal para genótipo e estádio, onde o W82 WT permanece com as maiores médias e em R7.3 foi observado peso seco superior, mas não se difere dos demais estádios com exceção a R9. Para a mesma variável, dentro da outra época, foi observada interação estatística em R7.2 e R7.3, também com o W82 WT superior ao seu mutante. O estádio com sementes de maior peso seco para W82 WT foi em R7.3, não se diferindo de R8.1, e para o mutante de Willians (W82 397), em R7.1, mas não se difere de R7.3 e R8.1 (Figura 10). A análise conjunta entre os anos não encontrou diferenças estatísticas entre os valores para a massa de matéria fresca e seca, com exceção a R9, onde a época de 2018/2019 foi cerca de 15% superior para a época de 2019/2019.

De forma geral, o maior acúmulo de massa de matéria seca foi encontrado próximo ao estádio R7.3, concomitante com a expressiva perda de água. Lima et al. (2017) observou o mesmo comportamento para o processo de dessecação neste estádio, maior acúmulo de matéria seca em R7.2 mantendo os valores em R7.3, estádio o qual foi observada a maturidade fisiológica com o completo desligamento das sementes na planta mãe, ambos eventos considerados como marcadores morfológicos para o início da fase de maturação tardia.

Não foi observado uma diferença expressiva das variáveis entre as safras de cultivo avaliadas. A massa fresca e seca de sementes se diferem entre os genótipos mutante e tipo selvagem dentro de cada grupo. Entre as safras avaliadas, o comportamento entre os genótipos permanece, onde no grupo Willians, o mutante produz sementes mais leves, e no Jack, mais pesadas. As diferenças encontradas podem ser em função das modificações genéticas em seus mutantes. A literatura aponta que as modificações na enzima rafinose sintase alteram o padrão de acúmulo de açúcares solúveis em sementes de soja (OBENDORF et al., 2009), e assim, modificam a sua composição, e provavelmente também o seu peso.

Figura 10 - Massa da matéria seca, fresca e conteúdo de água durante o desenvolvimento das sementes do grupo genético Willians



Legenda: Massa da matéria seca (DW), fresca (FW) e conteúdo de água (WC). Os dados são médias de 4 repetições de 10 sementes e as barras representam o desvio padrão. Valores para a safra 2018/2019 (A) e para safra de 2019/2020 (B).

O peso seco da semente de soja é composto, de forma global, por proteínas, lipídios e carboidratos, onde cerca de 15% destes é acumulado em sacarose e OFR (OBENDORF et al., 2009). Foi encontrada em pesquisa correlação positiva entre a

estaquiose e teor de proteína, sacarose e óleo, e negativa entre sacarose e proteína (WILCOX; SHIBLES, 2001). Alterações para o silenciamento de enzimas de rafinose sintase aumentam o conteúdo de sacarose e galactinol e diminuem de OFR (HITZ et al., 2002) em consequência, é esperado, portanto, que o fenótipo para estes genótipos teria também a diminuição dos teores de proteína e aumento dos teores de óleo.

O perfil de acúmulo de OFR se difere entre genótipos com diferentes alelos para RS, por isso, podem influenciar de maneiras distintas na quantidade de outros componentes acumulados refletindo no peso seco final da semente. Neste trabalho, foi avaliado as alterações nos teores de açúcares solúveis que serão descritas adiante.

4.3 Quantificação de açúcares solúveis

4.3.1 Perfil de acúmulo de açúcares solúveis ao final da maturação e durante a maturação tardia de sementes de soja do grupo Jack (Safr de 2017/2018)

Os valores para a safra 2017/2018 do grupo Jack para açúcares solúveis do tipo galactinol e sacarose estão apresentados na figura 11 e para rafinose, estaquiose e verbascose, na figura 12. Para galactinol, foi encontrada interação estatística entre genótipo e estágio, onde em todos os estádios o J rs2 rs3 mt apresentou teores superiores em relação ao seu tipo selvagem, no eixo embrionário e cotilédones. O acúmulo máximo no eixo embrionário de galactinol para J rs2 rs3 mt foi em R7.1.2 com 25,72 mg/mg por peso seco (PS), e o mínimo em R9 (8,74 mg/mg PS), e para o J RS2 RS3 WT, os teores de galactinol não se diferiram estatisticamente entre os estádios no eixo embrionário, variando de 1,52 mg/mg PS, em R7.1.1, a 0,11 mg/mg PS, em R9. Nos cotilédones, o pico de acúmulo de galactinol do mutante foi em R7.2 (4,8 mg/mg PS), não se diferenciando estatisticamente de R7.3 (4,7 mg/mg PS) e R7.1.2 (4,4 mg/mg PS), valores menores em relação ao eixo embrionário. Para o WT, nos cotilédones, este apresenta um aumento de galactinol em R9 (1,1 mg/mg PS), não diferenciando estatisticamente de R7.1.1 e R7.1.2 (0,68 e 0,89mg/mg PS).

O J rs2 rs3 mt acumula cerca 98% a mais de galactinol que o J RS2 RS3 WT no ponto de seu máximo acúmulo no eixo embrionário (R7.1.2) e no cotilédone (R7.2). No eixo embrionário, ao final da maturação (R9), mesmo com valores mais baixos, o

contraste entre ambos os genótipos permanece em 98%. Já para o cotilédone, as diferenças entre o mutante e tipo selvagem se atenuam, se diferenciando em 40%.

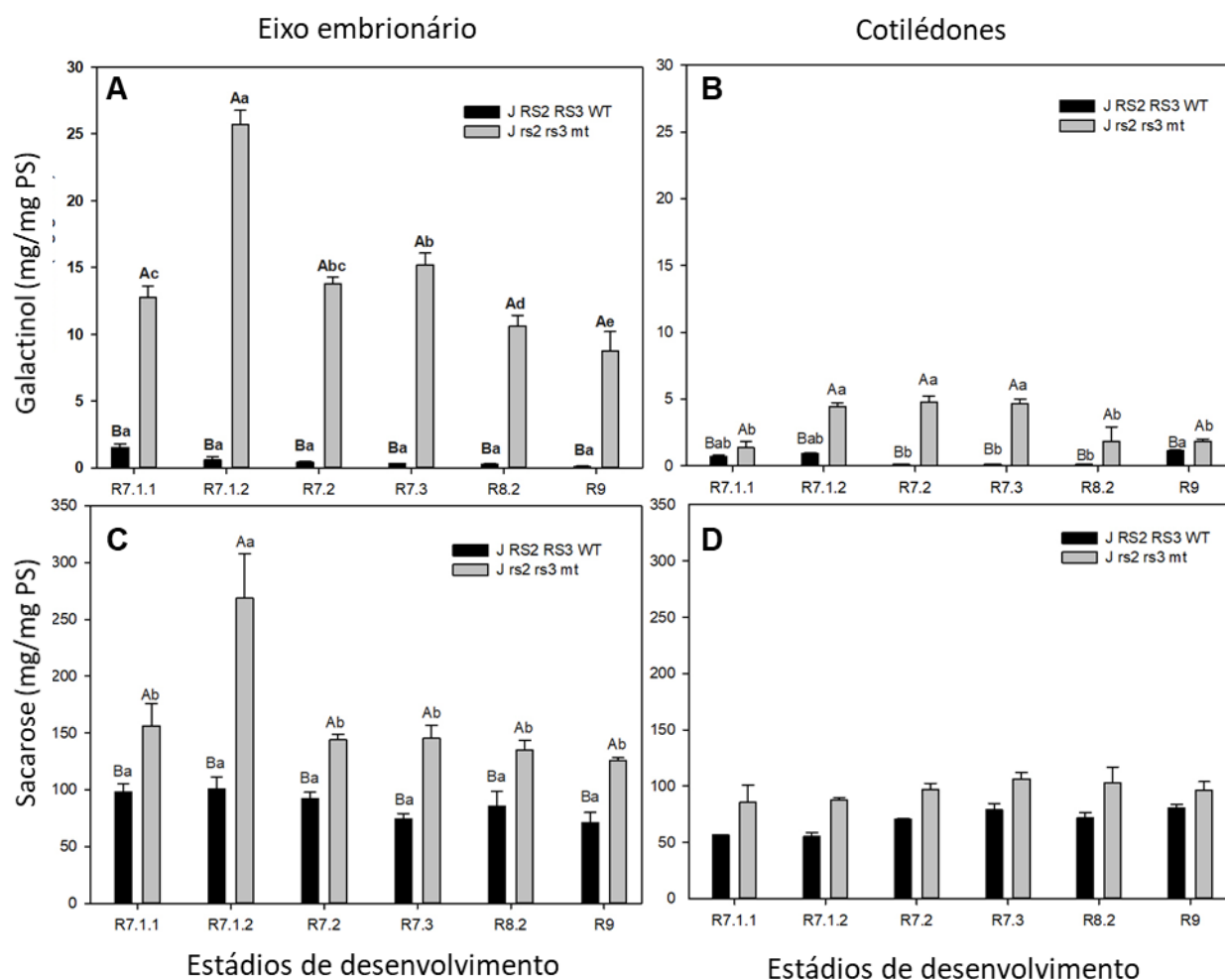
Em relação a sacarose, novamente os teores para o mutante são superiores ao tipo selvagem, no eixo embrionário e cotilédone. Para o eixo embrionário, foi encontrada interação estatística entre os fatores, onde para o mutante, há um pico de acúmulo do açúcar em R7.1.2 (268,7 mg/mg PS), com os outros estádios não se diferenciando entre si. O acúmulo de sacarose não se diferiu estatisticamente entre os estádios do WT, variando de 98,26 mg/mg PS (R7.1.1) a 71,29 mg/mg PS (R9). Já para cotilédone, não foi obtida interação estatística entre os fatores, mas efeito principal para genótipo com o maior deles sendo o J rs2 rs3 mt, e efeito principal para estádio, onde os valores de R7.1.1 e R7.1.2 são inferiores aos demais. Para o tipo selvagem os valores variam de 56,36 mg/mg PS (R7.1.1) a 80,69 mg/mg PS (R9), e para o mutante, 85,4 mg/mg PS (R7.1.1) a 96,1 mg/mg PS (R9).

Em relação ao acúmulo de rafinose, há um progressivo aumento para este no tipo selvagem com os valores saindo de 9,11 mg/mg PS em R7.1.1 ao máximo de acúmulo em R9 de 16,72 mg/mg PS, no eixo embrionário. Para o cotilédone, os valores de rafinose não se diferenciaram estatisticamente entre os estádios, com média geral de 7,79 mg/mg PS. Os valores de rafinose para J rs2 rs3 mt são ínfimos, variando de 0,37 mg/mg PS (R7.1.1) a 1,79 mg/mg PS (em R9) para o eixo embrionário, e nulos no cotilédone.

Para a estaquiose, novamente os valores para tipo selvagem são superiores em todos os estádios para o açúcar em relação ao mutante. Os valores para o mutante entre os estádios não se diferenciam entre si, com média geral de 20,31 mg/mg PS e 2,49 mg/mg PS, no eixo embrionário e cotilédone, respectivamente. Já para o WT, no eixo embrionário, os valores de R7.1.1, R7.1.2 e R7.2 estão ao redor de 94 mg/mg PS, e em R7.3 há um progressivo aumento até a R8.2, de 106,2 mg/mg PS a 114,7 mg/mg PS, respectivamente, atingindo o máximo em R8.2 de 122,55 mg/mg PS, sendo estatisticamente igual a R9. Para o cotilédone, os valores de estaquiose são menores em R7.1.1 e R7.1.2 em relação a R7.2, R7.3, R8.2 e R9, indicando uma possível estabilização no acúmulo do açúcar neste tecido para o tipo selvagem.

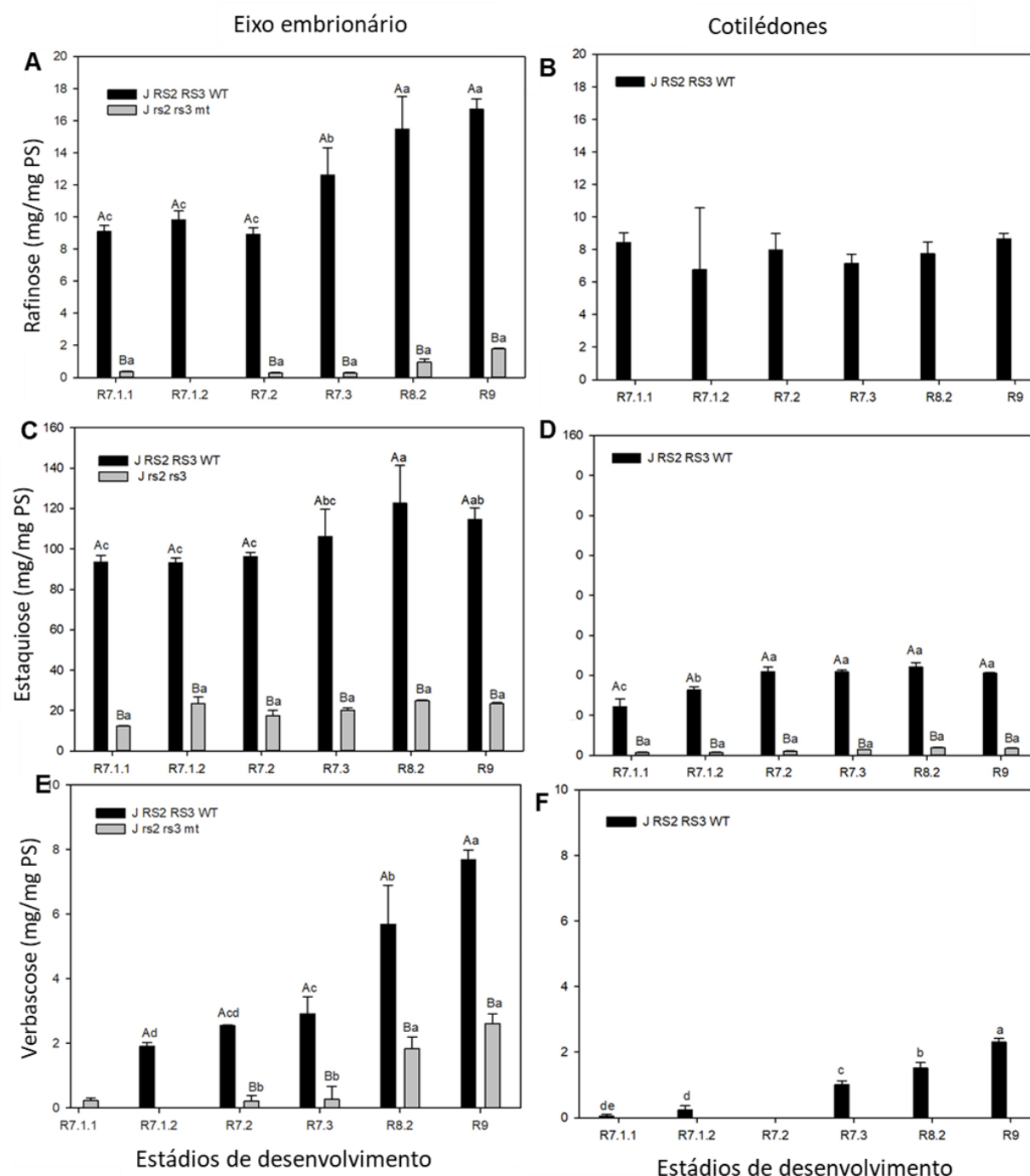
A verbascose é acumulada progressivamente no eixo embrionário para o mutante e o tipo selvagem, atingindo um pico em R9 de 2,62 mg/mg PS e 7,68 mg/mg PS, respectivamente, e no cotilédone, o pico atingido ao final da maturação para O WT é de 2,31 mg/mg PS e os teores para J rs2 rs3 mt são nulos

Figura 11 - Alterações no conteúdo de sacarose e galactinol durante a maturação de sementes de soja dos genótipos Jack



Legenda: Conteúdo de galactinol no eixo embrionário e cotilédones (A-B), conteúdo de sacarose no eixo embrionário e cotilédones (C-D) para J rs2 rs3 mt em cinza e para J RS2 RS3 em preto. (PS) Peso seco. Os dados representam a média de 3 repetições e as barras o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente para os estádios de cada genótipo, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula não difere estatisticamente entre os genótipos.

Figura 12 - Acúmulo de OFR durante o desenvolvimento de sementes dos genótipos Jack

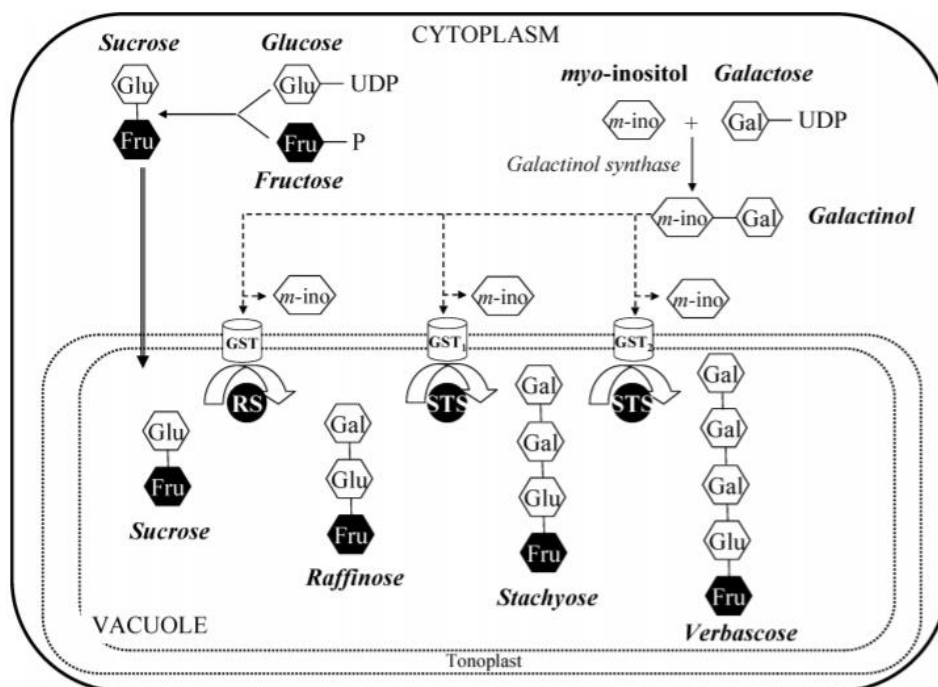


Legenda: Conteúdo de rafinose no eixo embrionário e cotilédones (A-B), conteúdo de estaquiose no eixo embrionário e cotilédones (C-D), conteúdo de verbascose no eixo embrionário e cotilédones (E-F) para J rs2 rs3 mt em cinza e para J RS2 RS3 em preto.(PS) Peso seco. Os dados representam a média de 3 repetições e as barras o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente para os estádios de cada genótipo, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula não difere estatisticamente entre os genótipos.

Para todos os açúcares avaliados, o acúmulo destes no eixo embrionário foi superior ao dos cotilédones, no mutante e tipo selvagem. No tipo selvagem, observou-se teores inferiores de sacarose, quantidades quase nulas de galactinol, e o progressivo acúmulo de OFR, sendo acumulada em maior quantidade a estaquiose, e em menor, a verbascose. No eixo embrionário, para o tipo selvagem, a rafinose, estaquiose e verbascose corresponde cerca de 12%, 82% e 6% do total de OFR acumulado. Semelhantemente, no cotilédone, corresponde respectivamente a 17%, 79% e 4% (rafinose, estaquiose e verbascose) do total de OFR.

De acordo com os resultados, o genótipo mutante na enzima rafinose sintase (J rs2 rs3 mt) tem o padrão de acúmulo de açúcares solúveis alterado ao longo do desenvolvimento das sementes. A sacarose produzida pela planta durante a fotossíntese é transloucada da folha para as sementes. Durante fase de o processo de dessecação de sementes de soja, esta é convertida em rafinose pela adição de galactinol, e onde sucessivas adições de galactinol formarão a estaquiose e a verbascose. Logo, sem a atuação de alguma rafinose sintase, os teores de galactinol e sacarose são maiores devido a estes serem substratos para produção de OFR (Figura 13) (MARTÍNEZ-VILLALUENGA; FRIAS; VIDAL-VALVERDE, 2008).

Figura 13 - Esquema para a biossíntese de OFR



Legenda: GST: galactosil transferase; RS: rafinose sintase; STS: estaquiose sintase

Fonte: (MARTÍNEZ-VILLALUENGA; FRIAS; VIDAL-VALVERDE, 2008).

A alta quantidade de sacarose e galactinol em todos os estádios para J rs2 rs3 mt indica a deficiência de conversão destes açúcares em OFR. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos com genótipos mutantes para rafinose sintase, onde estes, apresentam aumento expressivo nos teores de sacarose e diminuição de OFR (DIERKING; BILYEU, 2009; HITZ et al., 2002; OBENDORF et al., 2009; VALENTINE et al., 2017)

Diante da coincidência do acúmulo de OFR com a aquisição da tolerância a dessecação e longevidade no desenvolvimento de sementes (KOSTER; LEOPOLD, 1988; LIMA et al., 2017) é proposto que genótipos com alterações no perfil de acúmulo de açúcares solúveis tenham modificações na aquisição destas características. Em adição, a presença de OFR é sugerida como importante fonte de energia atuante na germinação (PETERBAUER; RICHTER, 2001). As relações entre a quantidade de OFR, galactinol e sacarose com a aquisição da qualidade fisiológica dos genótipos avaliados neste estudo serão descritas ao longo do trabalho.

4.3.2 Quantificação de açúcares solúveis ao final da maturação de sementes de soja do grupo Jack e Willians

Ao final da maturação, foram encontradas diferenças importantes entre o mutante e o tipo selvagem para o grupo Jack para os teores acumulados de OFR, galactinol e sacarose. Os teores para estes açúcares foram avaliados em sementes de R9 para Willians e Jack (mutantes e selvagens) nas safras experimentais (safras de 2017/2018 e 2018/2019 para o grupo Willians e Jack nas três) a fim de verificar a repetibilidade do contraste no acúmulo de açúcares solúveis entre o tipo selvagem e o mutante de cada grupo genético e as suas relações com a qualidade fisiológica de sementes. A tabela 5 e 6 apresenta os valores dos açúcares para cada grupo genético, avaliando isoladamente cada época de cultivo.

Nas safras avaliadas, para os dois grupos genéticos, os tipos selvagens apresentam teores de sacarose e galactinol em quantidades semelhantes entre os tecidos (eixo embrionário e os cotilédones), e para OFR, há maior acúmulo no eixo embrionário. Nos mutantes, foi encontrado alto teor de galactinol e sacarose no eixo embrionário, e mesmo em quantidades baixas, maior acúmulo de OFR neste tecido.

Diversas rafinoses sintases (RS) atuam no processo de conversão da sacarose e galactinol em rafinose, mas a literatura indica que a RS2 é a principal responsável

pela formação do perfil de carboidratos solúveis (BILYEU; WIEBOLD, 2016; VALENTINE et al., 2017). O genótipo J rs2 rs3 mt apresenta uma dupla mutação, nas enzimas rafinose sintase 2 e 3, enquanto, o W82 397, apenas em rs2. Devido a mais de uma rafinose sintase estar silenciada, espera-se que o primeiro mutante, tenha menor capacidade de conversão de sacarose em OFR do que em relação ao segundo (W82 397 rs2), resultando em menor quantidade de acúmulo de rafinosídeos e maior quantidade de galactinol e de sacarose.

No ano de 2017/2018, no eixo embrionário, o mutante W82 397 acumula 11,6 mg/mg PS e 32,2 mg/mg PS a menos que o W82 WT para rafinose e estaquiose, respectivamente, enquanto, o J rs2 rs3 acumula 14,9 mg/mg PS e 91,2 mg/mg PS a menos que o JRS2 RS3. Para a sacarose, W82 397 acumula 25,8 mg/mg PS, e Jrs2 rs3 54,7 mg/mg PS a mais que os respectivos tipos selvagens. O contraste entre o mutante e o tipo selvagem foi maior para o grupo Jack, onde o duplo mutante Jrs2 rs3 detém menor capacidade de produção de OFR e consequentemente maior acúmulo de sacarose em comparação ao W82 397.

Tabela 5 - Médias para açúcares solúveis em sementes maduras para W82 WT e W82 397 – Safras 2017/2018 e 2018/2019

2017/2018					
Genótipo	Galactinol	Sacarose	Rafinose	Estaquiose	Verbascose
Eixo embrionário (mg/mg PS)					
W82 WT	0,1b	60,8b	23,7a	103,3a	7,7a
W82 397mt	2,2a	86,6a	12,1b	71,1b	7,1a
Cotilédones (mg/mg PS)					
W82 WT	0b	63,7a	9,9a	41,2a	3,3a
W82 397mt	0,7a	74a	4,3b	28,6b	2,4b
2018/2019					
Eixo embrionário (mg/mg PS)					
W82 WT	1,6b	65,9b	20,2a	104a	5,7a
W82 397mt	4,3a	88,8a	0b	78b	0b
Cotilédones (mg/mg PS)					
W82 WT	0b	61,7b	8,7	41,5a	1,5b
W82 397mt	1a	78,7a	3b	31,6b	2,7a

*Médias seguidas pela mesma letra (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 6 - Médias para açúcares solúveis em sementes maduras para J RS2 RS3 WT e J rs2 rs3 mt para as safras experimentais de 2017/2018, 2018/2019 e 2019/2019

2017/2018					
Genótipo	Galactinol	Sacarose	Rafinose	Estaquiase	Verbascode
Eixo Embrionário (mg/mg PS)					
J RS2 RS3 WT	0,1b	71,3b	16,7a	114,7a	7,7a
J rs2 rs3 mt	8,7a	126a	1,8b	23,5b	2,6b
Cotilédones (mg/mg PS)					
J RS2 RS3 WT	1,1b	80,7a	8,67a	41,1a	2,31a
J rs2 rs3 mt	1,8a	96a	0	3,41b	0b
2018/2019					
Genótipo	Galactinol	Sacarose	Rafinose	Estaquiase	Verbascode
Eixo Embrionário (mg/mg PS)					
J RS2 RS3 WT	0,1b	79,5b	14,4a	106a	6,8a
J rs2 rs3 mt	8,8a	128,7a	3,3b	30,9b	2,7b
Cotilédones (mg/mg PS)					
J RS2 RS3 WT	1,4b	79,5a	6,3a	40,2a	2,2a
J rs2 rs3 mt	2,2a	93,6a	0,7b	7,6b	0,6b
2019/2019					
Eixo Embrionário (mg/mg PS)					
J RS2 RS3 WT	0,2b	86,8b	10,2a	114,9a	4,2a
J rs2 rs3 mt	11,3a	141,2a	1,1b	18,6b	1,8b
Cotilédones (mg/mg PS)					
J RS2 RS3 WT	0b	84,5b	8,3a	51,9	1,4a
J rs2 rs3 mt	3,1a	106,5a	0b	2,9b	0b

*Médias seguidas pela mesma letra (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Foi realizada por meio de análise conjunta a investigação se houve diferenças entre o acúmulo de açúcares solúveis entre as safras experimentais para as sementes maduras. Foi observado que os valores para rafinose do JRS2 RS3 foram maiores na primeira safra para o eixo embrionário, e nos cotilédones, maiores na primeira e terceira safra. Para este mesmo genótipo, os valores de estaquiase foram maiores no cotilédone para a terceira safra (Tabela 7). A verbascode para J rs2 rs3 mt e J RS2 RS3 foi maior para a primeira, mas também na segunda safra (Tabela 7). Para Willians, os oligossacarídeos do tipo rafinose e verbascode foram maiores na primeira safra no eixo embrionário e cotilédones dos dois genótipos (Tabela 9 e 10). Os teores de galactinol e sacarose variaram entre os cultivos, mas não houve uma tendência clara entre os genótipos e tecidos avaliados (Tabela 8 e 7).

Tabela 7 - Diferenças entre as safras experimentais para o conteúdo de açúcares solúveis no eixo embrionário e cotilédones para sementes de soja dos genótipos Jack

	2017/2018	2018/2019	2019/2019	2017/2018	2018/2019	2019/2019
Genótipos	Eixo embrionário (mg/mg PS)			Cotilédones (mg/mg PS)		
Galactinol						
J RS2 RS3 WT	-	-	-	1,1bA	1,4bA	0bB
J rs2 rs3 mt	-	-	-	1,8aB	2,2aB	3,1aA
Rafinose						
J RS2 RS3 WT	16,7aA	14,4aB	10,2aC	8,7aA	6,3aB	8,3aA
J rs2 rs3 mt	1,8bA	3,3bA	1,1bA	0bA	0,72bA	0bA
Estaquiose						
J RS2 RS3 WT	-	-	-	41aB	40,2aB	51,8aA
J rs2 rs3 mt	-	-	-	3,4bA	7,5bA	2,8bA
Verbascose						
J RS2 RS3 WT	7,7aA	6,8aA	4,2aB	2,3aA	2,2aA	1,4aB
J rs2 rs3 mt	2,6bAB	2,8bA	1,8bB	0bB	0,59bA	0bB

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Efeito de safra experimental para conteúdo de sacarose no eixo embrionário de sementes de soja para genótipos Jack

Safra	Sacarose no eixo embrio embrionário (mg/mg PS)
2017/2018	98,6b
2018/2019	104,1ab
2019/2019	114a

*Médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 9 - Mudanças no acúmulo de rafinose e verbascode entre safras experimentais no eixo embrionário de sementes dos genótipos Willians

Genótipos	2017/2018	2018/2019
Eixo embrionário (mg/mg PS)		
Rafinose		
W82 WT	23,7aA	20,2aB
W82 397 mt	12,1bA	0bB
Verbascode		
W82 WT	7,7aA	5,7aB
W82 397 mt	7,1aA	0bB

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Efeito de safra experimental sobre conteúdo de rafinose nos cotilédones de sementes dos genótipos Willians

Safra	Rafinose Cotilédones (mg/mg PS)
2017/2018	7,1a
2018/2019	5,8b

*Médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Para esclarecer a influência ambiental sobre o acúmulo dos açúcares avaliados foi realizado a correlação simples de Pearson destes com a temperatura média observada no período vegetativo, reprodutivo e o período do momento próximo o qual foi observado o início de acúmulo de OFR até o estágio final de desenvolvimento das sementes (R7.1.1 a R9) (Tabela 11).

No período vegetativo, da semeadura ao florescimento, foi observada para todos os genótipos (com exceção de J rs2 rs3), principalmente no eixo embrionário, correlação negativa de rafinose e verbascose com a temperatura média no período vegetativo, e positiva para sacarose de JRS2 RS3 e galactinol de W82 e W82 397 com a temperatura média. Logo temperaturas superiores no período vegetativo podem influenciar positivamente a produção de sacarose e galactinol em detrimento da menor conversão destes para OFR.

Ao analisarmos o período de florescimento até R7.1, as correlações observadas no período vegetativo se mantem com exceção do genótipo J rs2 rs3, o qual apresentou correlação positiva para OFR com a temperatura média para este momento. Portanto, ao contrário dos outros materiais, os dados indicam que para este genótipo o acúmulo de OFR nos cotilédones é favorecido quando as sementes estão maturadas em temperaturas superiores.

Interessantemente, no momento o qual os açúcares sacarose e galactinol são convertidos em OFR, (aproximadamente de R7.1.1 a R9), para todos os genótipos é observada uma inversão das correlações observadas no período vegetativo. Neste período os dados se correlacionaram negativamente com a temperatura média para sacarose e galactinol, e positivamente para rafinose e verbascose.

Tabela 11 - Correlação de Pearson entre as médias de temperatura (°C) e os diferentes açúcares avaliados no eixo embrionário e cotilédones das sementes dos genótipos Jack

Genótipo	Açúcar/ Tecido da semente	Semeadura ao florescimento	T°C Média Florescimento a R7.1.1	R7.1.1 a R9
J RS2 RS3	Eixo embrionário			
	Galactinol	-	-	-
	Sacarose	0,709*	-	-0,802*
	Rafinose	-0,762*	-	0,97*
	Estaquiose	-	-	
	Verbascose	-0,668*	-	0,931*
	Cotilédones			
	Galactinol	-	-	0,775*
	Sacarose	-	-	-
	Rafinose	-	-0,957*	
	Estaquiose	-	-	-0,759*
	Verbascose	-	-	0,834*
J rs2 rs3	Eixo embrionário			
	Galactinol	-	-	-
	Sacarose	-	-	-0,881*
	Rafinose	-	-	-
	Estaquiose	-	-	-
	Verbascose	-	-	-
	Cotilédones			
	Galactinol	-	-	-0,882*
	Sacarose	-	-	-
	Rafinose	-	0,689*	-
	Estaquiose	-	0,675**	-
	Verbascose	-	0,907*	-
W82	Eixo embrionário			
	Galactinol	0,976*	0,976*	-0,976*
	Sacarose	-	-	-
	Rafinose	-0,897*	-0,897*	0,897*
	Estaquiose	-	-	-
	Verbascose	-0,922*	-0,922*	0,922*
	Cotilédones			
	Galactinol	nd	Nd	nd
	Sacarose	-	-	-
	Rafinose	-	-	-
	Estaquiose	-	-	-
	Verbascose	-0,939*	-0,939*	0,939*
W82 397	Eixo embrionário			
	Galactinol	0,973*	0,973*	-0,973*
	Sacarose	-	-	-
	Rafinose	-0,984*	-0,984*	0,984*
	Estaquiose	-	-	-
	Verbascose	-0,998*	-0,998*	0,998*
	Cotilédones	-	-	-

Coeficientes significativos () P = 0.05. Não detectado (nd)

Diante dos resultados, temperaturas inferiores no período vegetativo e maiores temperaturas no período de conversão de sacarose e galactinol em OFR (no período reprodutivo, de R7.1.1 a R9) aparenta favorecer o acúmulo destes oligossacarídeos em detrimento da sacarose e galactinol, com exceção de J rs2 rs3.

Alguns trabalhos indicam que menores temperaturas durante o enchimento de sementes resultam em maior acúmulo de sacarose e menor de OFR, mas que as diferenças dependem do genótipo em estudo não havendo uma tendência para todos (BILYEU; WIEBOLD, 2016b; KUMAR et al., 2010). Byleu e Wiebold (2016), ao estudarem o padrão de acúmulo de açúcares solúveis em genótipos mutantes para rafinose sintase observaram que temperaturas mais baixas durante a fase de enchimento de sementes é fortemente correlacionada com o aumento da sacarose e decréscimo de estaquiose. Neste trabalho este comportamento foi observado, onde durante o enchimento de sementes e maturação foi observada correlação positiva entre a temperatura média com o OFR, logo menores temperaturas resultam em menor acúmulo deste.

Por mais que verificada as correlações descritas acima, não foi observado um comportamento claro entre o acúmulo de açúcares avaliados em função das safras experimentais. De fato, o acúmulo destes compostos é influenciado pelas condições ambientais, mas são necessários mais estudos com contrastes mais expressivos nas temperaturas durante o estágio reprodutivo e vegetativo para a investigação do comportamento do perfil de acúmulo de OFR, sacarose e galactinol. Por mais que haja diferenças entre condições ambientais neste presente estudo, ainda não foram suficientemente eficazes para atender esta questão.

Em função da safra avaliada, a tendência permanece entre os grupos genéticos a qual os mutantes para rs2 e/ou rs3 apresentam quantidades significativamente menores de OFR, e maiores de galactinol e sacarose em relação aos seus tipos selvagens. Entre os oligossacarídeos, o maior acumulado foi a estaquiose para todos os genótipos. Espécies leguminosas tendem a acumular maior quantidade de estaquiose do que em rafinose e verbascose (HORBOWICZ; OBENDORF, 1994). Em adição, o grupo Jack permanece com maior contraste entre o mutante e tipo selvagem do que em relação ao grupo Willians. A mesma tendência foi observada por Hagely et al. (2013), onde embora haja variação nos perfis de carboidratos para cada genótipo, diferentes genótipos com o mesmo alelo para RS2 tendem a produzir um perfil semelhante de carboidratos acumulados na semente de soja.

Com a possibilidade do envolvimento dos OFR nos atributos de qualidade fisiológica de sementes, genótipos com menores quantidades destes podem resultar em influências mais expressivas na aquisição da longevidade, tolerância a dessecação e germinação. Identificado que o grupo Jack detém maiores diferenças nos teores de açúcares solúveis entre o mutante e tipo selvagem, espera-se que, se presente a interação de OFR com a aquisição da qualidade fisiológica de sementes, o contraste para a aquisição destas características seja mais forte para este grupo do que em relação ao grupo Willians. Semelhantemente, em condições ambientais que favoreçam o acúmulo de OFR para os mutantes, podem reduzir o as diferenças entre os tipos selvagens de cada grupo.

Assim como a composição química da semente, a aquisição da qualidade fisiológica pode ser alterada em função dos fatores do ambiente de cultivo, como temperatura, luz e disponibilidade hídrica (BEWLEY et al., 2013). Estresses hídricos e térmicos podem diminuir a duração da fase de maturação e maturação tardia (RIGHETTI et al., 2015) bem como a germinação, peso e vigor de sementes (DORNBOS; MULLEN, 1991; EGLI; WARDLAW, 1980; PUTEH et al., 2013).

Logo, o fenótipo observado para aquisição da qualidade das sementes com baixo OFR podem ser em função do ambiente ou da ausência destes açúcares. Identificado que os genótipos apresentam contrastes em seus teores de OFR, foi buscado o entendimento do envolvimento dos OFR na aquisição da qualidade fisiológica, por meio da comparação do desempenho dos genótipos contrastantes para os teores de oligossacarídeos na aquisição da germinação, da tolerância à dessecação, do vigor e da longevidade. Para verificar a repetibilidade do comportamento observado sob diferentes condições ambientais, o experimento foi realizado em três safras de cultivo.

4.4 Envolvimento dos OFR na aquisição da qualidade fisiológica

A aquisição da qualidade fisiológica de sementes de soja para genótipo comercial foi investigada por Lima et al. (2017), onde se inicia em R7.1 com a aquisição da germinação, R7.2 a tolerância a dessecação e um acúmulo progressivo do vigor e longevidade a partir deste estágio até o ultimo estágio R9. A concomitante aquisição da qualidade fisiológica com o acúmulo progressivo de rafinose, estaquiose e verbascose, é um dos indícios para o envolvimento destes açúcares com a aquisição

dos atributos fisiológicos da semente (BAUD et al., 2002; FAIT et al., 2006; LIMA et al., 2017).

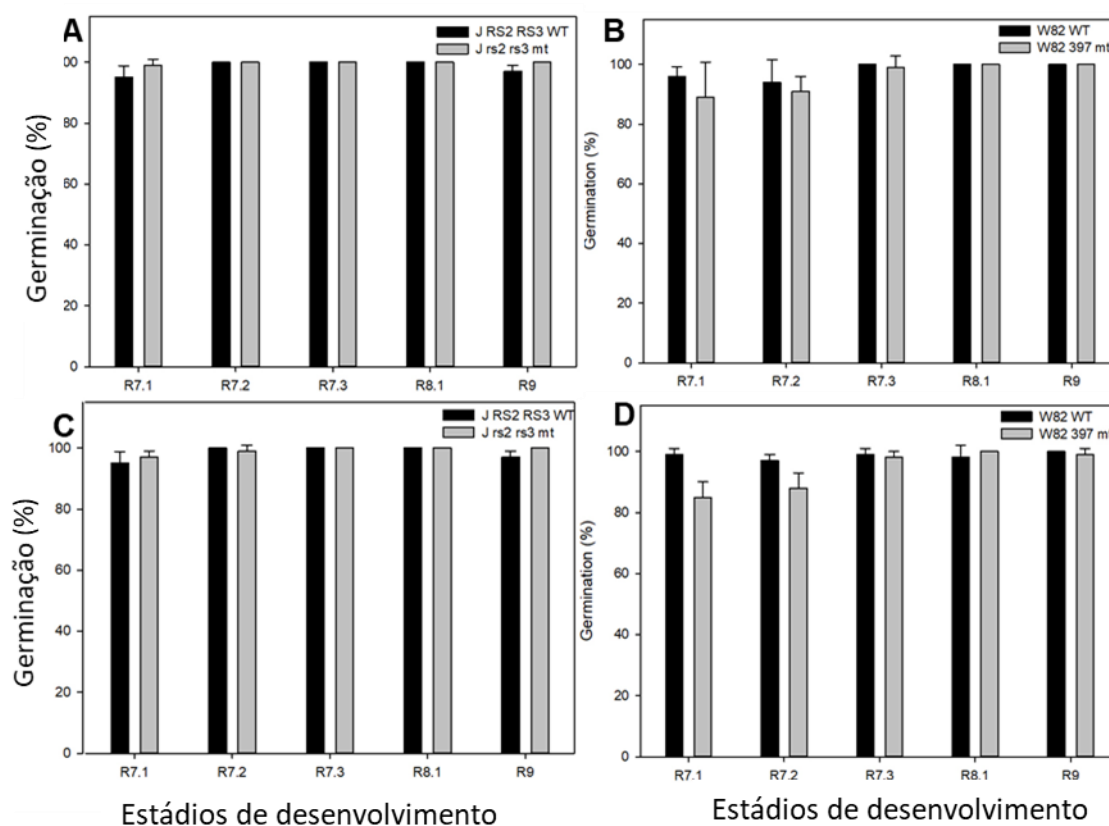
Neste trabalho foi identificado que existem diferenças na quantidade de acúmulo de açúcares solúveis como galactinol, sacarose e OFR ao longo dos estádios R7.1 e R9 em genótipos com alelos distintos para RS2 e/ou RS3, mas que não houve um padrão bem definido do perfil destes açúcares acumulados em função das condições ambientais das safras avaliadas. Por isso, foi investigado o comportamento da aquisição da germinação, tolerância a dessecação, vigor e longevidade de materiais contrastantes em OFR, os quais foram cultivados em diferentes ambientes e apresentaram mesmo que pouco expressivas, diferenças na quantidade de açúcares solúveis acumulados. Foi buscado também se as alterações observadas na aquisição da qualidade fisiológica destes genótipos se relacionam em função do ambiente de cultivo e com as diferenças que este resultou no acúmulo de OFR.

4.4.1 Envolvimento dos OFR na aquisição da germinação

Para todos os genótipos, a germinação das sementes frescas apresentou valores próximos a 100% em R7.1, os quais permaneceram em todos os estádios avaliados, com exceção de W82 397 mt o qual apresentou 89% e 85% de germinação na safra de 2018/2019 e 2019/2019, respectivamente no primeiro estádio avaliado (Figura 14). Por mais que as médias encontradas sejam menores que nos demais genótipos, são suficientes para caracterizar a presença da capacidade de germinação deste em R7.1. Para um genótipo comercial de soja, a capacidade de germinação foi observada no mesmo estádio fenológico (LIMA et al., 2017).

Diante dos resultados, não foi observada relação entre a aquisição da germinação e a presença de OFR, uma vez que esta foi adquirida no mesmo momento e com a mesma eficiência em genótipos que apresentam baixo e ultrabaixo teor destes açúcares. Perto do estádio R9, os teores de água para os genótipos são próximos a 12% e a germinação estimada a 100%, portanto, há indícios que a ausência destes açúcares não afeta a aquisição da germinação das sementes.

Figura 14 - Aquisição da germinação de sementes frescas de soja em genótipos que expressam conteúdos diferentes de RFO



Legenda: (A-B) Genótipos de Jack e Willians para a safra de 2018/2019. (C-D) Genótipos de Jack e Willians para a safra de 2019/2019. Barras representam o desvio padrão.

4.4.2 Envolvimento dos OFR na aquisição da tolerância à dessecação

A tolerância a dessecação consiste na habilidade da semente sobreviver e reidratar sem que haja danos irreversíveis após a remoção de água parcial ou quase total das células (LEPRINCE; BUITINK, 2010), sendo fundamental para a longevidade de sementes de soja, uma vez que para estas sobreviverem no estado seco, primeiro precisam tolerar a dessecação (LEPRINCE et al., 2017).

Pela coincidência da aquisição da tolerância a dessecação com o início do acúmulo de OFR, em R7.2 para soja, estes são sugeridos como importantes compostos participantes na aquisição da característica (KOSTER; LEOPOLD, 1988). Em adição, os OFR são sugeridos como agentes protetores durante a dessecação e na reidratação para a germinação de sementes secas, devido a suposta habilidade destes em estabilizar as estruturas celulares prevenindo contra danos estruturais

(OBENDORF, 1997; CROWE et al., 1987). No estágio R7.1, as médias para a germinação do estado fresco são superiores à média da germinação no estado seco, indicando que os genótipos já adquiriram a germinação, mas ainda são intolerantes ou parcialmente intolerantes a dessecação. A partir de R7.2 as médias para a germinação no estado seco se igualam estatisticamente para as do estado fresco, indicando que todos os genótipos foram completamente tolerantes a dessecação, e estes resultados permanecem ao longo dos estágios (Tabela 12), com exceção de W82 397 em R7.2 (safra 2019/2019) (Tabela 12), onde este apresentou 88% de germinação no estado fresco e 100% no estado seco. Por mais que as médias se difiram estatisticamente, o valor para as sementes fresca está próximo a 90%, considerado suficiente para caracterizar a capacidade de germinação. Os resultados corroboram com o trabalho de Lima et al. (2017) no qual foi observado o início da aquisição da tolerância a dessecação no estágio R7.2.

Tabela 12 - Tolerância a dessecação representada pela porcentagem de germinação de sementes frescas em comparação com as de sementes secas para cada estágio reprodutivo nas safras de 2018/2019 e 2019/2019

Genótipo/estado físico da semente	Estádios Reprodutivos			
	R7.1	R7.2	R7.3	R8.1
Genótipos Jack				
2018/2019				
JRS2 RS3 Fresca	95aA	100aA	100aA	100aA
JRS2 RS3 Seca	33bB	99aA	100aA	96aA
2019/2019				
JRS2 RS3 Fresca	98aA	100aA	100aA	100aA
JRS2 RS3 Seca	65bB	100aA	100aA	100aA
2018/2019				
Jrs2 rs3 Fresca	99aA	100aA	100aA	100aA
Jrs2 rs3 Seca	59bB	100aA	100aA	100aA
2019/2019				
Jrs2 rs3 Fresca	92aA	100aA	100aA	100aA
Jrs2 rs3 Seca	40bB	97aA	100aA	100aA
Genótipos Willians				
2018/2019				
W82 Fresca	96aA	94aA	100aA	100aA
W82 Seca	27bB	100aA	100aA	100aA
2019/2019				
W82 Fresca	99aA	100aA	100aA	100aA
W82 Seca	61bB	97aA	99aA	98aA
2018/2019				
W82 397 Fresca	89aB	91aAB	99aAB	100aA
W82 397 Seca	51bB	99aA	100aA	100aA
2019/2019				
W82 397 Fresca	85aC	88bBC	98aAB	100aA
W82 397 Seca	38b	100aA	100aA	100aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as plântulas normais originadas pelas sementes a partir do momento em que estas toleram a dessecação por completo (Tabela 13), com exceção do genótipo W82 WT (safra 2018/2019) no estágio R7.3, apresentando 91% de plântulas normais desenvolvidas após a secagem, onde anteriormente, as médias foram estimadas em 100%. Mesmo na presença de diferenças estatísticas, o alto valor observado indica que as plântulas se desenvolveram sem anormalidades após o processo de secagem e reidratação. As plântulas normais originadas após o processo de dessecação para sementes com fenótipo para baixo e ultrabaixo teor de açúcares solúveis em comparação com teores normais destes, estão retratadas na figura 15 e 16, e aparentemente, foram ambas se desenvolveram vigorosamente.

Os resultados obtidos demonstram que a tolerância a dessecação em genótipos com baixas quantidades de OFR foi adquirida no mesmo momento que em genótipos com maiores teores para este. Em adição, as sementes com baixas quantidades de OFR quando submetidas a germinação subsequentemente ao processo de secagem desenvolvem plântulas normais e não apresentam danos as estruturas diferenciadas (Tabela 13).

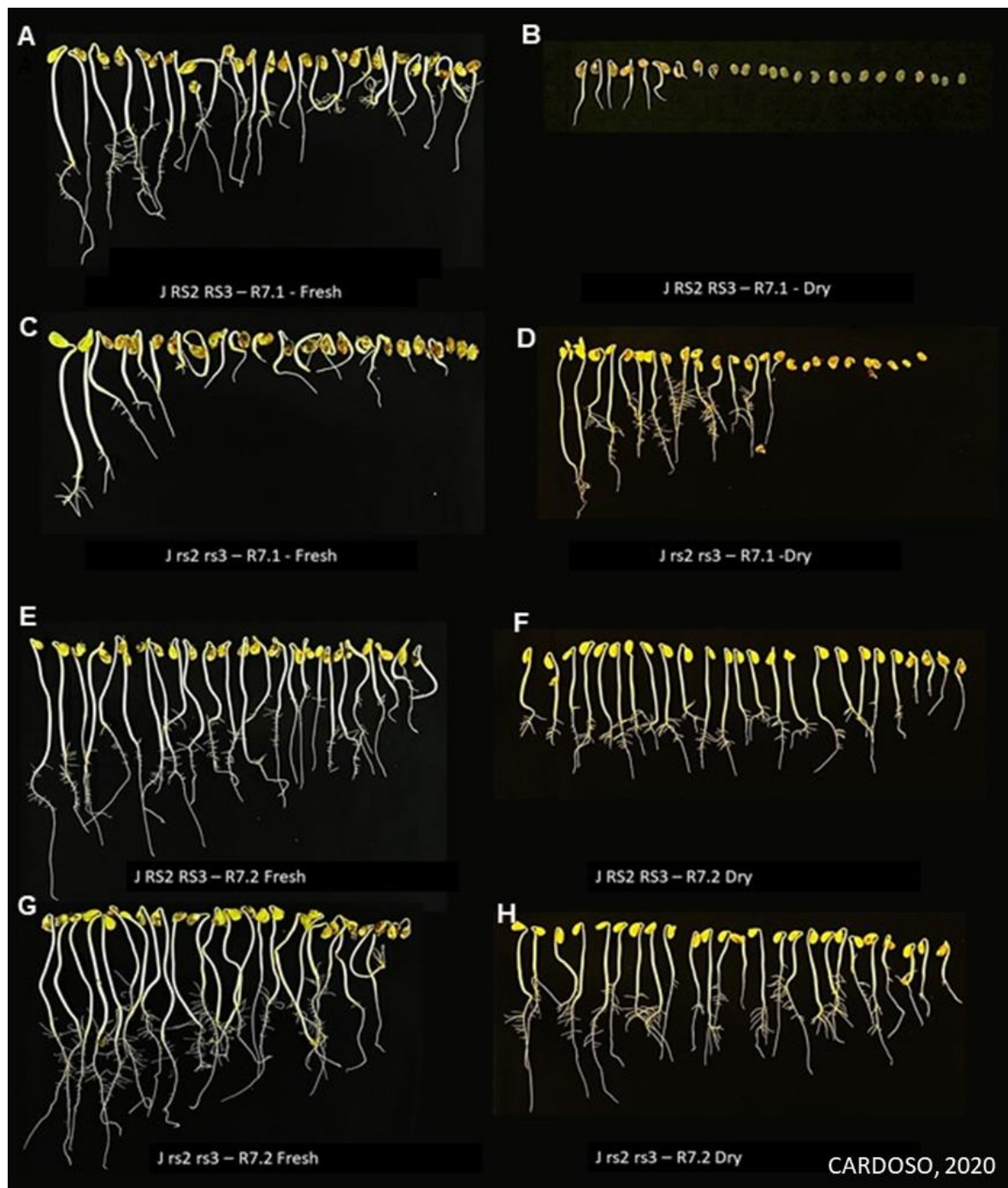
Entre as safras, não foram observadas diferenças em relação a aquisição da tolerância a dessecação entre os grupos genéticos, comprovando que a característica de fato é um mecanismo fortemente regulado geneticamente, não sendo influenciado pelas condições ambientais a qual a semente é produzida (LEPRINCE et al., 2017).

Tabela 13 - Porcentagens de plântulas normais de sementes secas em comparação de sementes frescas para as safras de 2018/2019 e 2019/2019

Genótipo/ estado físico da semente	Estádios Reprodutivos			
	R7.1	R7.2	R7.3	R8.1
Genótipos Jack				
2018/2019				
JRS2 RS3 Fresh	76aB	99aA	100aA	99aA
JRS2 RS3 Dry	26bB	95aA	98aA	92aA
2019/2019				
JRS2 RS3 Fresh	94aA	93aA	98aA	99aA
JRS2 RS3 Dry	59bB	97aA	99aA	99aA
2018/2019				
Jrs2 rs3 Fresh	86aB	100aA	100aA	100aA
Jrs2 rs3 Dry	47bB	95aA	99aA	97aA
2019/2019				
Jrs2 rs3 Fresh	46aB	99aA	100aA	99aA
Jrs2 rs3 Dry	36aB	95aA	99aA	100aA
Genótipos Willians				
2018/2019				
W82 Fresh	89aB	92bAB	100aA	97aAB
W82 Dry	18bC	100aA	91bB	99aAB
2019/2019				
W82 Fresh	74aB	97aA	99aA	98aA
W82 Dry	59bB	99aA	99aA	97aA
2018/2019				
W82 397 Fresh	69aC	85bB	98aA	100aA
W82 397 Dry	40bB	98aA	98aA	100aA
2019/2019				
W82 397 Fresh	66aC	82bB	98aA	100aA
W82 397 Dry	29bB	100aA	100aA	100aA

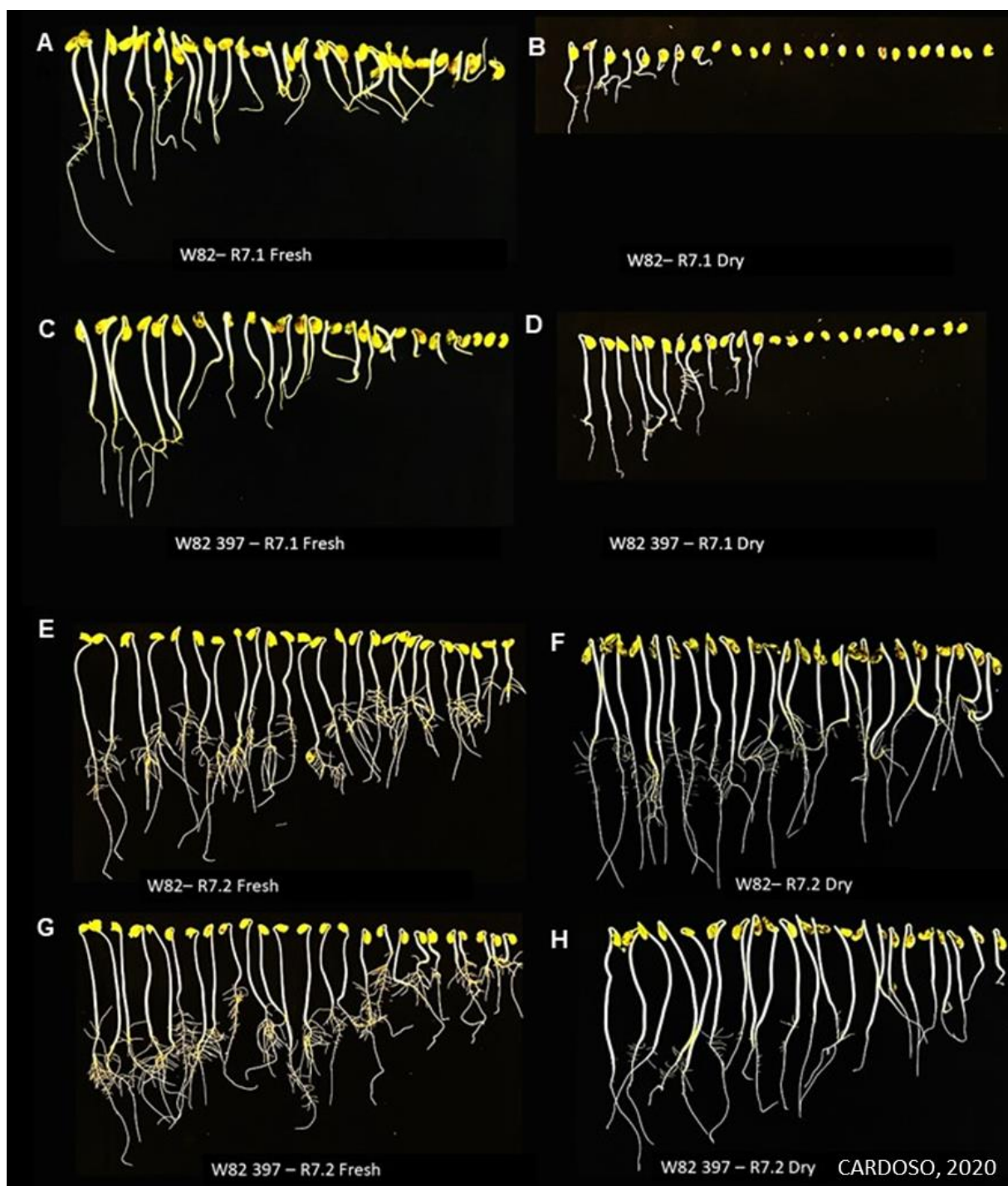
*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Figura 15 - Tolerância a dessecação representada pela comparação da germinação de sementes frescas entre as de sementes secas para os genótipos Jack, safra de 2018/2019



Legenda: (A-C) Plântulas provenientes de sementes frescas no estágio R7.1 dos genótipos tipo selvagem e mutante. (B-D) Plântulas provenientes de sementes secas em sílica gel até atingirem 10% de conteúdo de água no estágio R7.1 dos genótipos tipo selvagem e mutante. (E-G) Plântulas provenientes de sementes frescas no estágio R7.2 dos genótipos tipo selvagem e mutante. (F-H) Plântulas provenientes de sementes secas em sílica gel até atingirem 10% de conteúdo de água no estágio R7.2 dos genótipos tipo selvagem e mutante.

Figura 16 - Tolerância a dessecação representada pela comparação da germinação de sementes frescas entre as de sementes secas para os genótipos Willians, safra de 2018/2019



Legenda: (A-C) Plântulas provenientes de sementes frescas no estágio R7.1 dos genótipos tipo selvagem e mutante. (B-D) Plântulas provenientes de sementes secas em sílica gel até atingirem 10% de conteúdo de água no estágio R7.1 dos genótipos tipo selvagem e mutante. (E-G) Plântulas provenientes de sementes frescas no estágio R7.2 dos genótipos tipo selvagem e mutante. (F-H) Plântulas provenientes de sementes secas em sílica gel até atingirem 10% de conteúdo de água no estágio R7.2 dos genótipos tipo selvagem e mutante.

Outros trabalhos também não observaram o envolvimento dos OFR na aquisição da tolerância a dessecação em sementes de soja, (BLACK et al., 1999; BEWLEY et al., 2013; HAGELY; PALMQUIST; BILYEU, 2013). Por mais que a tolerância a dessecação não seja afetada pela quantidade limitada de OFR, não é possível afirmar a inexistência da relação destes com a característica. Sementes de soja em estádios iniciais de maturação (intolerantes a dessecação) quando secas lentamente foram tolerantes a dessecação, e nos eixos embrionários dessas sementes foi encontrado teores de rafinose e estaquiose (BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1992), indicando uma possível participação destes açúcares na aquisição da característica.

A literatura aponta que a estabilidade das membranas celulares durante a perda de água pode ser dada pela integração das LEAs, HSPs e OFR uma vez que estes compostos se associam com as moléculas e mantêm a integridade destas durante o processo de secagem (SANO et al., 2016; WEHMEYER; VIERLING, 2000). Dessa maneira, sementes com baixos e ultrabaixos teores de OFR podem continuar a adquirir a tolerância a dessecação pela atuação conjunta de outros componentes estabilizadores e protetores, e não pela irrelevância destes açúcares na aquisição da característica. Todavia, mais estudos devem ser realizados para a elucidação deste fenômeno. Os genótipos mutantes para rs2 toleram o estado seco sem danos as plântulas formadas as suas sementes.

4.3.3 Envolvimento dos OFR na aquisição do vigor de sementes

Os OFR são propostos por exercerem função como promotores da longevidade, vigor e germinação de sementes (BLÖCHL; PETERBAUER; RICHTER, 2007; DOWNIE et al., 2003; EGERT et al., 2015; KOSTER; LEOPOLD, 1988). Em espécies leguminosas, a taxa de conversão entre sacarose e OFR é um indicador de vigor (VANDECASTEELE et al., 2011).

4.3.3.1 Capacidade da semente em desenvolver plântulas normais

Nos dois grupos genéticos, para a safra de 2017/2018 não foi observada interação estatística entre os fatores genótipos x estádios para as variáveis, mas

apenas efeito principal para estádio (Tabela 14) com o estádio R7.1.1 sendo menor que os demais. Nas safras de 2018/2019 e 2019/2019 foi observada interação estatística entre os fatores genótipo e estádio para os dois grupos genéticos nas duas variáveis (Tabela 16 e 17) com exceção para a primeira contagem de plântulas normais desenvolvidas do grupo genético Jack (aos cinco dias após instalação do teste) na safra de 2018/2019 (tabela 15), o qual foi observado apenas efeito principal para estádio com R7.1 apresentando menor valor e os outros estádios não se diferenciando entre si.

De maneira geral, a interação observada mostra que o estádio R7.1 tem as menores médias para o desenvolvimento de plântulas normais aos 5° e 8° dia após a instalação do teste, e não há uma tendência observada entre os mutantes e os tipos selvagens, onde dependendo do ano, um apresenta maiores médias que o outro. A partir de R7.2 a capacidade de desenvolver plântulas normais na germinação é dada da mesma maneira para genótipos com teores contrastantes de OFR e na mesma velocidade após a instalação do teste, onde em apenas 5 dias após a germinação, quase 100% das plântulas desenvolvidas apresentam todas as estruturas bem diferenciadas. Os valores observados nestes estádios se mantem até R9.

Tabela 14 - Efeito do estádio de desenvolvimento das sementes sobre a capacidade de desenvolvimento de plântulas normais por sementes secas para genótipos Jack e Willians, safra de 2017/2018

Grupo genético	Estádios Reprodutivos					
	R7.1.1	R7.1.2	R7.2	R7.3	R8.2	R9
Primeira contagem de plântulas normais (5 dias, %)						
Jack	59b	90a	93a	92 ^a	86a	90a
Willians	60c	82b	96a	96 ^a	87ab	96a
Contagem total de plântulas normais (8 dias, %)						
Jack	69b	93a	96a	92 ^a	97a	97a
Willians	71b	86a	96a	97 ^a	92a	98a

*Médias seguidas pela mesma letra (linha) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 15 - Efeito de estádio reprodutivo na primeira contagem de plântulas normais originadas por sementes secas dos genótipos Jack, safra 2018/2019

Primeira contagem de plântulas normais (5 dias, %)				
Estádios reprodutivos				
R7.1	R7.2	R7.3	R8.2	R9
33b	78a	93a	78a	79 ^a

*Médias seguidas pela mesma letra (linha) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 16 - Valores de plântulas normais originadas por sementes secas dos genótipos Jack. Safras de 2018/2019 e 2019/2019

Genótipo	Estádios Reprodutivos				
	R7.1	R7.2	R7.3	R8.1	R9
Primeira contagem de plântulas normais (5 dias, %)					
2019/2019					
J RS2 RS3 WT	59aB	96aA	96aA	95aA	96aA
J rs2 rs3 mt	21bB	92aA	98aA	93aA	90aA
Contagem total de plântulas normais (8 dias, %)					
2018/2019					
J RS2 RS3 WT	26bC	95aA	98aA	92aAB	81bB
J rs2 rs3 mt	47aB	95aA	99aA	97aA	97aA
2019/2019					
J RS2 RS3 WT	59aB	97aA	99aA	99aA	98aA
J rs2 rs3 mt	36bB	95aA	99aA	100aA	95aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 17 - Valores de plântulas normais originadas por sementes secas dos genótipos Willians. Safras de 2018/2019 e 2019/2019

Genótipo	Estádios Reprodutivos				
	R7.1	R7.2	R7.3	R7.1	R7.2
Primeira contagem de plântulas normais (5 dias, %)					
2018/2019					
W82 WT	18bC	99aA	79bB	96aA	95aA
W82 397 mt	38aB	93aA	94aA	98aA	95aA
2019/2019					
W82 WT	58aB	97aA	97aA	95aA	96aA
W82 397 mt	28bB	98aA	94aA	97aA	96aA
Contagem total de plântulas normais (8 dias, %)					
2018/2019					
W82 WT	18bB	100aA	91bA	99aA	99aA
W82 397 mt	40aB	98aA	98aA	100aA	99aA
2019/2019					
W82 WT	59aB	99aA	99aA	97aA	97aA
W82 397 mt	29bB	100aA	100aA	100aA	98aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Para verificar as diferenças entre as safras experimentais por meio da análise conjunta, selecionamos os estádios em comum das três safras avaliadas (R7.2, R7.3 e R9) para a porcentagem de plântulas normais desenvolvidas pelas sementes secas após o 5° e 8° dia da instalação do teste de germinação.

O grupo Willians não apresentou diferenças entre os anos para os estádios R7.2 e R9, apenas para R7.3 para o genótipo W82 (tipo selvagem). Este genótipo, no estádio R7.3, apresentou 79% de plântulas normais originadas ao 5 dia após a

instalação do teste na segunda safra, e as outras safras mantendo as médias maiores que 95% (Tabela 18). O mutante W82 397 deste grupo apresentou médias maiores que 94% para as duas variáveis em questão em todas as safras de cultivo.

Em relação ao grupo Jack, no estádio R7.3, a análise conjunta detectou efeito principal para safra experimental (Tabela 19) nas duas variáveis em estudo (plântulas normais desenvolvidas ao 5° e 8° dia após a instalação do teste), com os dois genótipos não se diferenciando entre si nas três culturas avaliadas. A safra de 2017/2018 apresentou menores valores, para o grupo Jack em R7.3, entretanto, as médias indicam que 92% de plântulas normais foram desenvolvidas ao 5° e 8° dia. Os valores apresentados são altos e caracterizam um bom potencial fisiológico para estas sementes, por mais que sejam inferiores aos outros anos de cultivo.

Ainda para este grupo, a análise conjunta apresentada na tabela 18, indica que para o genótipo JRS2 RS3 WT obteve menor capacidade de produção de plântulas normais ao 5° dia de leitura após a instalação do teste para o estádio R7.2 (68%), e para o estádio R9 ao 8° dia de leitura (81%) para a segunda safra.

Pode-se concluir que a capacidade de produção de plântulas normais após o 5° e 8° da instalação do teste não se difere entre os mutantes e os tipos selvagens, onde de maneira geral, as médias são superiores a 95%. A análise conjunta mostra diferenças pontuais e não há uma mudança expressiva entre estas, principalmente no tipo selvagem de cada grupo com menores médias na safra 2 (2018/2019). As diferenças encontradas na primeira contagem de plântulas normais são superadas na contagem final da leitura, indicando que a capacidade pode ter até obtido um leve atraso, mas na leitura final as médias são próximas de 90%.

Tabela 18 - Valores para plântulas normais de sementes produzidas em diferentes safras experimentais, para genótipos Jack e Willians

Genótipos	Safra experimental		
	2017/2018	2018/2019	2019/2019
Primeira contagem de plântulas normais (5 dias, %)			
		R7.2	
J RS2 RS3 WT	91aA	68bB	96aA
J rs2 rs3 mt	96aA	87aA	92aA
		R7.3	
W82 WT	95aA	79bB	97aA
W82 397	95aA	94aA	94aA
Contagem total de plântulas normais (8 dias, %)			
		R9	
J RS2 RS3 WT	98aA	81bB	98aA
J rs2 rs3 mt	98aA	97aA	95aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 19 - Efeito de safra experimental para a capacidade de desenvolvimento de plântulas normais originadas por sementes dos genótipos Jack

Safra experimental		
2017/2018	2018/2019	2019/2019
Primeira contagem de plântulas normais (5 dias, %)		
	R7.3	
92b	93ab	97a
Contagem total de plântulas normais (8 dias, %)		
	R7.3	
92b	98a	99a

* Médias seguidas pela mesma letra (linha) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

4.3.3.2 Comprimento e massa da matéria seca de raiz e parte aérea das plântulas germinadas

As plântulas originadas pelas sementes entre os genótipos são uniformemente desenvolvidas com todas as suas estruturas bem diferenciadas, mesmo na limitação de OFR. A alta capacidade de produção de plântulas normais é componente fundamental de sementes altamente vigorosas. Não obstante, o alongamento do hipocótilo é um processo crucial para elevar os cotilédones e o epicótilo a superfície do solo e garantir a emergência das plântulas (FINCH-SAVAGE, 2010). Por isso, além da normalidade destas, foi avaliado o comprimento e massa de matéria seca das suas

estruturas, hipocótilo e raiz, nas épocas de cultivo de 2018/2019 e 2019/2019 nas sementes secas.

Para o grupo Jack, em relação ao comprimento de hipocótilo, para 2019/2019, a análise fatorial apenas detectou efeito principal para estágio (Tabela 20), com R7.1 sendo no mínimo 9 cm menor em relação aos outros estádios, os quais não se diferiram entre si. Em 2018/2019, houve interação entre os fatores, onde o mutante apresenta hipocótilo do mesmo comprimento que o selvagem em R7.3, R8.1 e R9. As diferenças entre JRS2 RS3 e J rs2rs3 são mínimas para o comprimento de hipocótilo, ao contrário da massa da matéria seca deste. Jrs2 rs3 mt desenvolve hipocótilos do mesmo comprimento, mas estes são mais pesados que o do tipo selvagem JRS2 RS3, nos estádios R7.2 a R9 (Tabela 21). Para o comprimento de raiz, em 2019/2019 a única diferença encontrada entre os genótipos é em R7.3, com o mutante sendo cerca de 4 cm maior. Para 2018/2019, o mutante apresentou médias inferiores com exceção no estágio R9 para esta variável. Estes resultados refletiram na massa de matéria seca de raiz, onde em 2018/2019 o mutante Jrs2 rs3 continua com os menores valores, e em 2019/2019 não houve diferenças entre estes, exceto em R7.3.

Semelhantemente, em relação ao grupo Willians, há um acréscimo nestas variáveis de R7.1 para R7.2, se mantendo até R9. Para comprimento de raiz e massa seca de hipocótilo não foi encontrada diferenças entre os genótipos (Tabela 22). Entretanto, o W82 397 (mutante em rs2) apresenta maior elongação de hipocótilo em relação ao tipo selvagem W82 em todos os estádios, nos dois anos avaliados. Para massa seca de raiz, em 2018/2019, não há um comportamento bem expresso, onde os valores variam entre os genótipos dependendo do estágio (Tabela 23), provavelmente, devido a análise ter sido realizada não apenas com plântulas normais, mas contabilizando também as anormais quando presentes, e assim, ter afetado as médias observadas.

Tabela 20 - Efeito principal de estágio reprodutivo para comprimento de hipocótilo dos genótipos Jack, safra de 2019/2019

Comprimento de hipocótilo (cm)				
Estádios				
R7.1	R7.2	R7.3	R8.1	R9
4,4b	13,1a	13a	13,6a	14,3a

* Médias seguidas pela mesma letra (linha) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 21 - Valores para comprimento e massa de matéria seca de hipocótilo das plântulas originadas por sementes frescas dos genótipos Jack. Safras de 2018/2019 e 2019/2019

Genótipo	Estádios				
	R7.1	R7.2	R7.3	R8.1	R9
Comprimento de hipocótilo (cm)					
2018/2019					
J RS2 RS3 WT	10,4aC	15,8aA	12,8aBC	12,2aBC	13,3aAB
J rs2 rs3 mt	3,8bB	12,9bA	13,5aA	12,7aA	13,6aA
Comprimento de raiz (cm)					
2018/2019					
J RS2 RS3 WT	13,6aC	19,2aA	19,5aA	18,5aAB	16,9aB
J rs2 rs3 mt	3,9bD	9,5bC	12,7bB	12,2bB	15,5aA
2019/2019					
J RS2 RS3 WT	5,2aB	16,8aA	16,3bA	17,4aA	16,8aA
J rs2 rs3 mt	5,3aC	15,8aB	20,8aA	17,5aB	17,7aB
Massa da matéria seca de hipocótilo (mg)					
2018/2019					
J RS2 RS3 WT	219aC	302,5bB	312,5bAB	333,4bAB	360,4bA
J rs2 rs3 mt	106,8bB	414,1aA	454,2aA	429,8aA	419,6aA
2019/2019					
J RS2 RS3 WT	111,8aC	373,3bAB	391,52aA	308,9bB	303bB
J rs2 rs3 mt	133,4aC	480aA	340,8aB	448,9aA	409,6aAB
Massa de matéria seca de raiz (mg)					
2018/2019					
J RS2 RS3 WT	62aC	77,1aB	97aA	87,6aAB	78aB
J rs2 rs3 mt	20,4bB	52,5bA	62,5bA	59bA	65,4bA
2019/2019					
J RS2 RS3 WT	17,9aC	75,5aA	76bA	81,22aA	57,6aB
J rs2 rs3 mt	24,3aD	82,52aB	110,9aA	88,75aB	64,8aC

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 22 - Efeito de estágio reprodutivo observado sobre o comprimento e massa de matéria seca de hipocótilo. Safra de 2018/2019 e 2019/2019

Estádio				
R7.1	R7.2	R7.3	R8.1	R9
Comprimento de raiz (cm)				
2018/2019				
5,9b	19,6a	19,2a	20,2a	20,4a
2019/2019				
8,7b	19,5a	20,8a	17,8a	20,2a
Massa de matéria seca de hipocótilo (mg)				
2018/2019				
111b	392a	387a	401a	338a
2019/2019				
115,3b	319,5a	378,9a	287,6a	334,4a

* Médias seguidas pela mesma letra (linha) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 23 - Valores para comprimento de hipocótilo e massa de matéria seca de raiz das plântulas originadas por sementes dos genótipos Willians. Safra de – 2018/2019 e 2019/2019

Genótipos	Estádios Reprodutivos				
	R7.1	R7.2	R7.3	R8.1	R9
Comprimento de hipocótilo (cm)					
2018/2019					
W82 WT	2bC	10,2bAB	8,7bB	11,5bA	9,3bAB
W82 397 mt	6,5aC	15,1aB	15,9aAB	17,9aAB	18,2aA
2019/2019					
W82 WT	4,1aC	11,6bB	12,4bAB	9,9bB	16,5aA
W82 397 mt	6,9aB	17,5aA	19aA	17,8aA	17,2aA
Massa de matéria seca de raiz (mg)					
2018/2019					
W82 WT	20,6aD	110,2aAB	100,7bBC	134,8aA	82,3aC
W82 397 mt	32,2aC	81,8bB	120aA	86,6bB	80,3aB
2019/2019					
W82 WT	24,8aC	84aAB	108,4aA	60,2bB	82,4aB
W82 397 mt	25,9aB	82,95aA	77,67bA	81,8aA	74,15aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Foi observado um salto na capacidade de alongamento do hipocótilo e raiz, e massa de matéria seca destes, a partir de R7.2 com poucas diferenças até R9 para todos os genótipos em estudo. A análise conjunta foi realizada para verificar as diferenças entre as variáveis para os estádios R7.2 a R9. Para os estádios dentro das variáveis com resultados significativos, as menores médias aparecem com maior frequência no ano de 2018/2019 para o grupo Jack (Tabela 24 e 25). Para o grupo Willians, foram menores as diferenças encontradas e não sendo possível indicar uma frequência entre as variáveis, para os genótipos e anos de cultivo (Tabela 26 e 27).

Tabela 24 - Efeito principal de safra experimental para massa de matéria seca de hipocótilo (MSH) no estágio R7.2 dos genótipos Jack

Safra	MSH (mg)
2018/2019	358,3b
2019/2019	426,6a

*Médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 25 - Valores de comprimento e massa de matéria seca de plântulas originadas por sementes dos genótipos Jack entre as safras experimentais

Genótipos	Safras experimentais	
	2018/2019	2019/2020
Comprimento de hipocótilo (cm)		
R8.1		
J RS2 RS3 WT	12,2aB	15,06aA
J rs2 rs3 mt	12,7aA	12,2aA
Massa de matéria seca de hipocótilo (mg)		
R7.3		
J RS2 RS3 WT	312,5bB	391,5aA
J rs2 rs3 mt	454,2aA	340,8bB
Comprimento de raiz (cm)		
R7.2		
J RS2 RS3 WT	19,2aA	16,8aB
J rs2 rs3 mt	9,5bB	15,8aA
R7.3		
J RS2 RS3 WT	19,5aA	16,3bB
J rs2 rs3 mt	12,8bB	20,8aA
R8.1		
J RS2 RS3 WT	18,5aA	17,4aA
J rs2 rs3 mt	12,2bB	17,5aA
Massa de matéria seca de raiz (mg)		
R7.2		
J RS2 RS3 WT	77,1aA	75,5aA
J rs2 rs3 mt	52,4bB	82,52aA
R7.3		
J RS2 RS3 WT	97,05aA	76bB
J rs2 rs3 mt	62,52bB	110,9aA
R8.1		
J RS2 RS3 WT	87,6aA	81,2aA
J rs2 rs3 mt	58,9bB	88,75aA
R9		
J RS2 RS3 WT	78aA	57,6aB
J rs2 rs3 mt	65,4bA	64,85aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 26 - Médias para comprimento de hipocótilo e massa de matéria seca de raiz entre as safras experimentais para os genótipos Willians

Genótipos	Safra experimental	
	2018/2019	2019/2019
Comprimento de hipocótilo (cm)		
R9		
W82 WT	9,3bB	16,5aA
W82 397 mt	18,2aA	17,2Aa
Massa de matéria seca de raiz (mg)		
R7.2		
W82 WT	110,2aA	84,1aB
W82 397 mt	81,9bA	82,9aA
R7.3		
W82 WT	100,7bA	108,4aA
W82 397 mt	120aA	77,7bB
R8.1		
W82 WT	134,8aA	60,2bB
W82 397 mt	86,7bA	81,9aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 27 - Efeito principal de safra experimental para comprimento de hipocótilo no estágio R7.3 de sementes dos genótipos Willians

R7.3	
Safra	C.H. (cm)
2018/2019	12,3b
2019/2019	15,7a

* Médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$)
CH: comprimento de hipocótilo.

Em resumo, os mutantes nos dois grupos genéticos não apresentaram inferioridades para o desenvolvimento de plântulas pelas suas sementes. Opostamente ao esperado, o mutante J rs2 rs3 desenvolve hipocótilos de mesmo comprimento, porém mais pesados que o tipo selvagem J RS2 RS3, e o mutante W82 397 apresenta maior capacidade de alongamento em relação ao tipo selvagem W82. Este comportamento perdurou entre os anos avaliados. Os resultados observados não indicam que a superioridade nem inferioridade entre os genótipos quanto a capacidade de produção de plântulas normais, alongamento de hipocótilo e comprimento de raiz. Sugere-se que a capacidade de alongamento de plântulas e raízes entre os genótipos possam ser mais expressas quando mensuradas apenas plântulas normais e ainda quando o teste instalado e avaliado no escuro. O

crescimento de plântulas na ausência de luz é inteiramente heterotrófico, dependendo apenas das reservas presentes no eixo embrionário e cotilédones das sementes, e com isso, demonstra a real capacidade de alongamento que as sementes em estudo apresentam (BASSO et al., 2018).

4.3.3.3 Tempo médio para que estas atinjam 50% de protrusão (T50)

Observou-se a partir dos resultados anteriores que mesmo em genótipos com teores ultrabaixos de OFR as sementes produzem plântulas normais e vigorosas a partir do estágio R7.2. Além disso, foi avaliada a velocidade da protrusão da radícula para a investigação se a presença dos OFR pode influenciar na velocidade do processo germinativo pelo teste de T50.

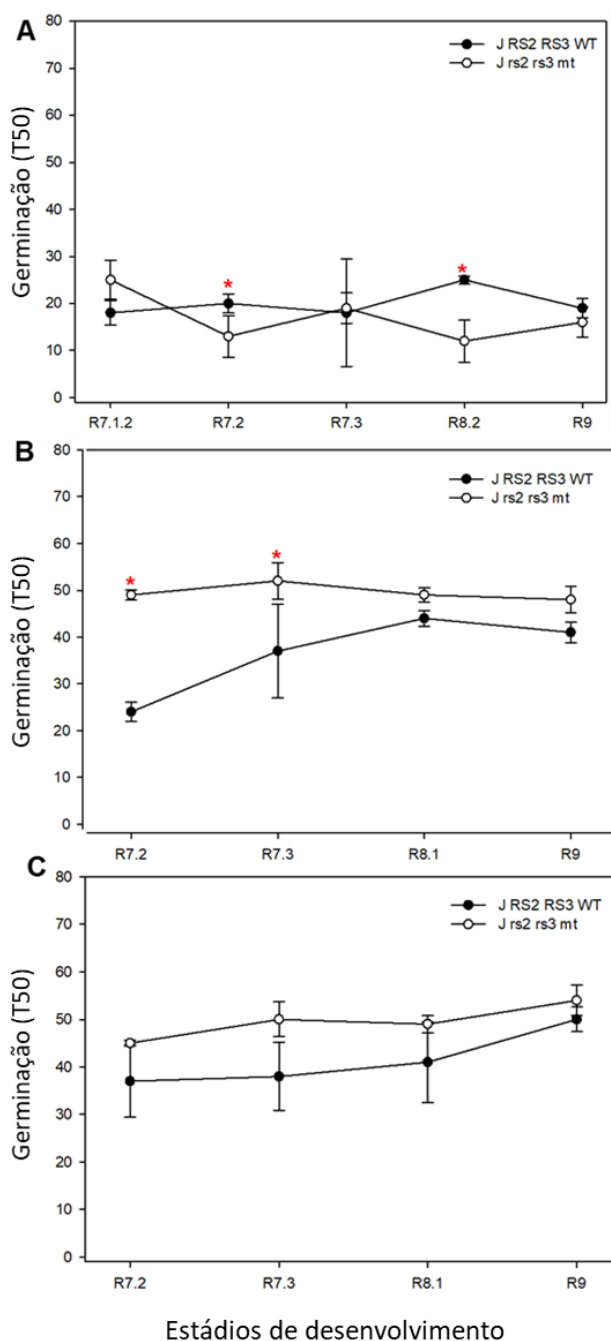
O teste de T50 objetiva o estudo do tempo em que as sementes levaram para atingir 50% de protrusão da radícula. Sementes com menores valores de T50 indicam maior velocidade neste processo, portanto, mais vigorosas. É necessária muita energia para que ocorra o processo germinativo (BEWLEY; BLACK, 1994). Hipoteticamente, a literatura aponta que a sacarose e os OFR são fontes de energia para este processo devido a estes estarem em maior quantidade na semente (PETERBAUER; RICHTER, 2001).

De acordo com os resultados expressos na figura 17 e 18 poucas são as diferenças estatísticas encontradas entre os materiais contrastantes em OFR. Para o grupo Jack (Figura 17), foi encontrada diferenças para o estágio R7.2 e R8.2 no primeiro ano experimental com o mutante apresentando maior velocidade de protrusão radicular, e no segundo ano, em R7.2 e R7.3. Para o segundo e terceiro ano, o tipo selvagem apresenta menor T50 em todos os estágios, mas são pequenas e sem diferenças estatísticas além das descritas anteriormente. Em relação ao grupo Willians, a única diferença estatística observada está para o primeiro ano de cultivo em R7.3 (Figura 18). Neste ano e em 2018/2019, o tipo selvagem apresenta as menores médias para T50, entretanto, uma inversão foi observada no ano de 2019/2019, onde o mutante apresentou maior velocidade no processo. Foi realizado o teste de correlação de Pearson mas não foram observadas correlações significativas que indicam o envolvimento dos OFR com o T50.

Não há diferenças bem definidas entre os genótipos, e de forma semelhante as médias para a variável é dada nos estágios, sem diferenças entre estes. Dierking e

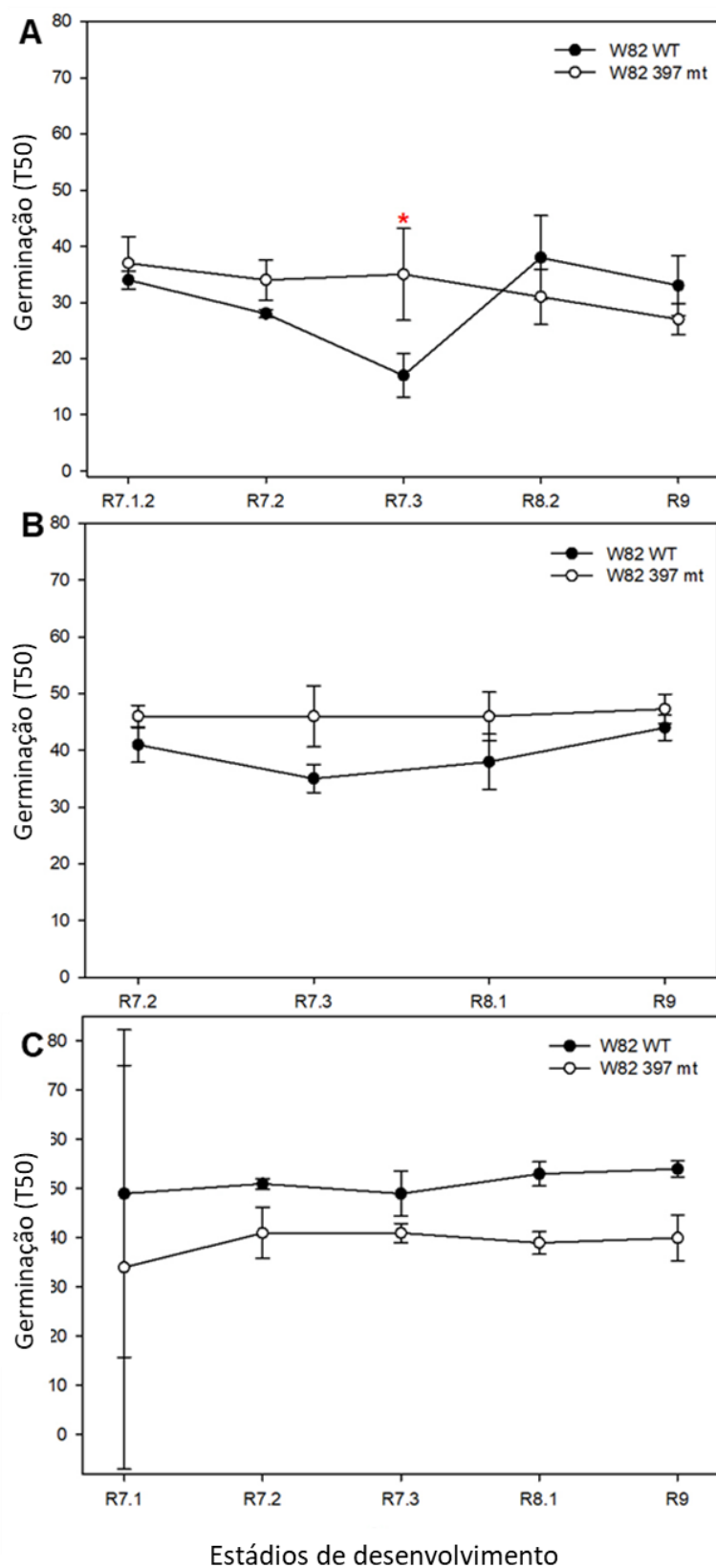
Bilyeu (2009) também não encontraram diferenças na germinação de sementes de soja com teores contrastantes de OFR, e ainda concluem que os OFR não são fontes essenciais de energia durante o processo germinativo, uma vez que também não encontraram diferenças na velocidade deste processo.

Figura 17 - T50 durante a maturação e maturação tardia de sementes dos genótipos J rs2 rs3 mt e J RS2 RS3 WT em três safras experimentais



Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019.

Figura 18 - T50 durante a maturação e maturação tardia de sementes dos genótipos W82 397 mt e W82 WT em três safras experimentais



Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2020.

Mesmo sem as diferenças marcantes entre os genótipos, o T50 sofreu variações entre as safras. Por isso, a análise conjunta foi realizada utilizando os estádios em comum entre os três cultivos (R7.2, R7.3 e R9). Pela figura 17, a aquisição da velocidade de protrusão da radícula foi favorecida entre os estádios na época 1 para o grupo Jack. A análise conjunta apresentou diferenças estatísticas em R9 e R7.2 para os ensaios (Tabela 28), mostrando que para os dois genótipos, a época 1 favoreceu a variável. Em R9, o tempo para a protrusão de 50% da radícula das sementes foi aproximadamente duas vezes mais rápido para o primeiro cultivo do que em relação ao segundo e terceiro. De forma semelhante, o T50 para os dois genótipos do grupo Willians foi favorecido na primeira época de cultivo em R7.2, R7.3 e R9 (Tabela 29).

Tabela 28 - Diferenças entre as safras experimentais dos valores de T50 (horas) – genótipos Jack

Genótipos	T50		
	2017/2018	2018/2019	2019/2019
R7.2			
J RS2 RS3 WT	20aB	24bB	37bA
J rs2 rs3 mt	13bB	49aA	45aA
R9			
J RS2 RS3 WT	20aC	41bB	50bA
J rs2 rs3 mt	16aC	48aB	54aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 29 - Diferenças entre as safras experimentais dos valores de T50 (horas) – genótipos Willians

Genótipos	T50		
	2017/2018	2018/2019	2019/2019
R7.2			
W82 WT	28bC	41bB	51aA
W82 397 mt	34aC	46aA	41bB
R7.3			
W82 WT	17bC	35bB	50aA
W82 397 mt	35aB	46aA	41bAB
R9			
W82 WT	33aC	44aB	54aA
W82 397 mt	27bB	44aA	40bA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

No geral, as menores médias de T50 foram observadas para a primeira safra experimental (2017/2018), a qual as condições térmicas foram menos estressantes que o cultivo das demais safras. Alta temperatura durante o enchimento de sementes é caracterizada como condição estressante que pode limitar a taxa de desenvolvimento destas (SPEARS; TEKRONY; EGLI, 1997) refletindo em sementes de menor vigor. A primeira e última safra apresentaram menores temperaturas, entretanto o T50 foi melhor apenas para a primeira. Provavelmente, as diferenças entre estas pode ser devido a duração da fase de R7.1 a R9, a qual totalizou 20 dias para a primeira e para a terceira apenas 13 dias (Tabela 1), e provavelmente, a menor duração da segunda implica no menor tempo para acúmulo de moléculas associadas ao vigor.

Não foram encontradas diferenças entre o vigor das sementes pelos parâmetros avaliados entre genótipos com teores contrastantes de OFR. Foi observada algumas diferenças pontuais entre as safras de cultivo, mas que não alteraram o contraste e comportamento dos genótipos observados.

Por mais que em outras espécies já fora observado o envolvimento de OFR com o vigor (LIU et al. 2014; BERNAL-LUGO; LEOPOLD, 1992), em sementes de soja as evidências são menores. Neus et al. (2005) não encontraram diferenças entre o vigor, emergência a campo e produtividade de sementes de soja ao comparar genótipos com variantes alelos de RS2. A velocidade de germinação também não foi afetada na ausência de OFR (DIERKING; BYLEU, 2009).

Obendorf et al. (2008), ao estudar a germinação em baixas temperaturas, caracterizando um estresse as sementes, observaram que genótipos de soja com baixo teor de estaquiase e rafinose foram tolerantes ao estresse da mesma forma que genótipos com teores altos para estes oligossacarídeos. O autor acrescenta que os maiores teores encontrados de alfa galactiosídeos de ciclitól nos cotilédones possam ter contribuído para a tolerância ao estresse e expressão do vigor em sementes com limitação de rafinose e estaquiase.

Os alfa galactiosídeos de ciclitól são produzidos na rota metabólica dos OFR (conhecidos também como alfa galactosídeos de sacarose), onde ambos utilizam o *myo-inositol* como substrato direto ou indireto. *Myo-inositol* é substrato para a produção de fagopiritois e galactinol. Galactinol é substrato para a produção de OFR. Por isso, a mutação da enzima rafinose sintase aumenta os teores de alfa galactiosídeos de ciclitól, como fagopiritol e galactinol e diminui os de OFR

(OBENDORF et al., 2012; HITZ et al., 2002). Sementes de soja com alelo recessivo na rafinose sintase que expressam fenótipo para baixa rafinose e estaquiose acumulam alta concentração de fagopiritois (OBENDORF et al., 2009) e estes são compostos de reserva nas sementes (OBENDORF; GÓRECKI, 2012). Por causa do grande acúmulo destes compostos quanto limitado o de OFR, é proposto que estes compostos possam atuar como substitutos na expressão do vigor e tolerância a dessecação (HORBOWICZ; OBENDORF, 1994; OBENDORF et al., 2008).

Os genótipos mutantes para rs2 e/ou rs3 apresentaram maiores teores de galactinol neste presente estudo, e é possível que a tolerância a dessecação e o vigor não foram afetados devido a maior presença deste composto. Em adição, seria interessante a mensuração da quantidade de fagopiritóis nestes genótipos para a confirmação do envolvimento e substituição pelos alfa-galactiosídeos de ciclitol na ausência de OFR.

Ademais, o vigor é expresso por uma variedade de genes que contribuem com a característica (CHENG et al., 2013; DARGAHI; TANYA; SRINIVES, 2014; LIU et al., 2014; XIE et al., 2014). Por isso a partir dos resultados não se pode concluir que não há relação de OFR com a propriedade, porque na ausência destes, outros genes ainda atuam para a expressão do vigor.

O estudo do vigor foi avaliado para as sementes secas após poucos dias de armazenamento. A longevidade de sementes é o atributo responsável pela retenção das propriedades fisiológicas como germinação e vigor durante o armazenamento (BEWLEY et al., 2013). Por isso, foi realizado o estudo da longevidade para a verificação se as sementes anteriormente vigorosas irão apresentar reduções após determinados períodos armazenadas.

4.4.4 Envolvimento dos OFR na aquisição da longevidade

A longevidade foi definida através do tempo (em dias) necessário para que as sementes percam 50% da viabilidade inicial (P50), utilizando a equação proposta por Ellis e Roberts (1980) " $v = K_i - p/\sigma$ (v = viabilidade em dias; K_i = germinação inicial; p = morte esperada; e σ = inclinação da reta). Para o cálculo do P50, as médias de porcentagem de germinação obtidas durante o armazenamento foram transformadas para Probit, e estes valores foram submetidos a uma regressão linear, a qual relaciona o tempo de armazenamento com os probits. Por meio da regressão, foi obtido o K_i e

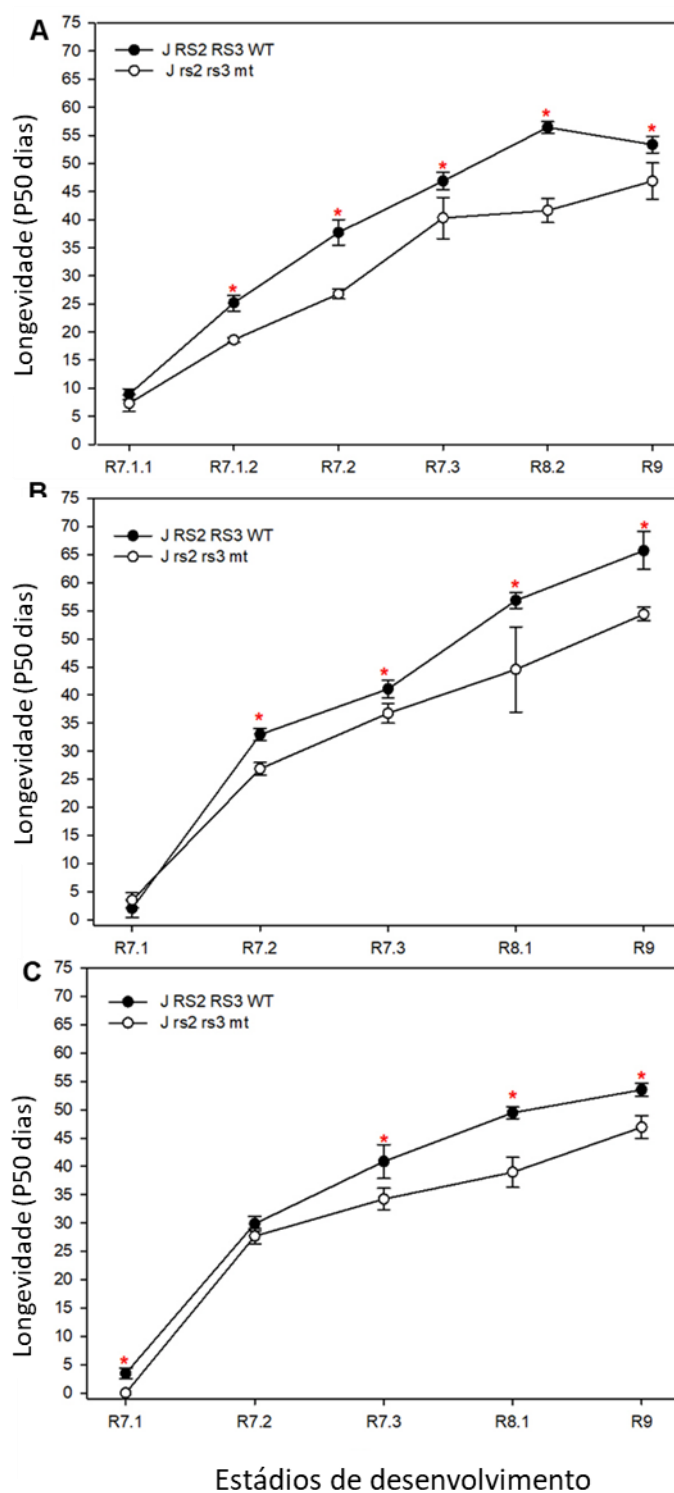
o σ (que se refere ao tempo necessário para a viabilidade decrescer 1 Probit). O σ é referente ao processo de envelhecimento, e quanto maior for este valor, mais tempo a semente leva para perder a viabilidade, portanto, mais longa esta seria. Na tabela 30, estão descritos os valores de K_i e σ para todos os genótipos, estádios e safras de cultivo, e os valores de P50 estão apresentados nas figuras 19 e 20, para o grupo Jack e Willians, respectivamente.

Para ilustrar a curva de caimento da longevidade ao longo do armazenamento, foi elaborada a curva sigmoidal de distribuição da longevidade dos genótipos para os diferentes estádios ao longo do armazenamento, que estão apresentadas para J RS2 RS3 WT e J rs2 rs3 mt nas figuras 21 e 22, e para W82 WT e W82 397 mt nas figuras 23 e 24, respectivamente.

Diferentemente dos outros atributos avaliados, a longevidade de sementes foi adquirida de forma distinta entre os genótipos de baixo ou ultrabaixo teor de OFR em comparação aos de teores normais (tipos selvagens). Com exceção de R7.1 e R7.1.1 que são parcialmente tolerantes a dessecação, os estádios avaliados para todos os genótipos apresentaram aproximadamente 100% da radícula das sementes protruídas anteriormente ao armazenamento, e ao longo deste, a perda da germinação das sementes foi progressiva sendo mais lenta quanto maior o estágio fenológico (Figuras 21 a 24). O aumento da longevidade ao longo da maturação das sementes em estudo pode ser observado na Tabela 30, onde os valores para σ são progressivos ao longo da maturação, indicando que quanto maior o estágio fenológico, mais tempo a semente leva a perder a viabilidade durante o armazenamento.

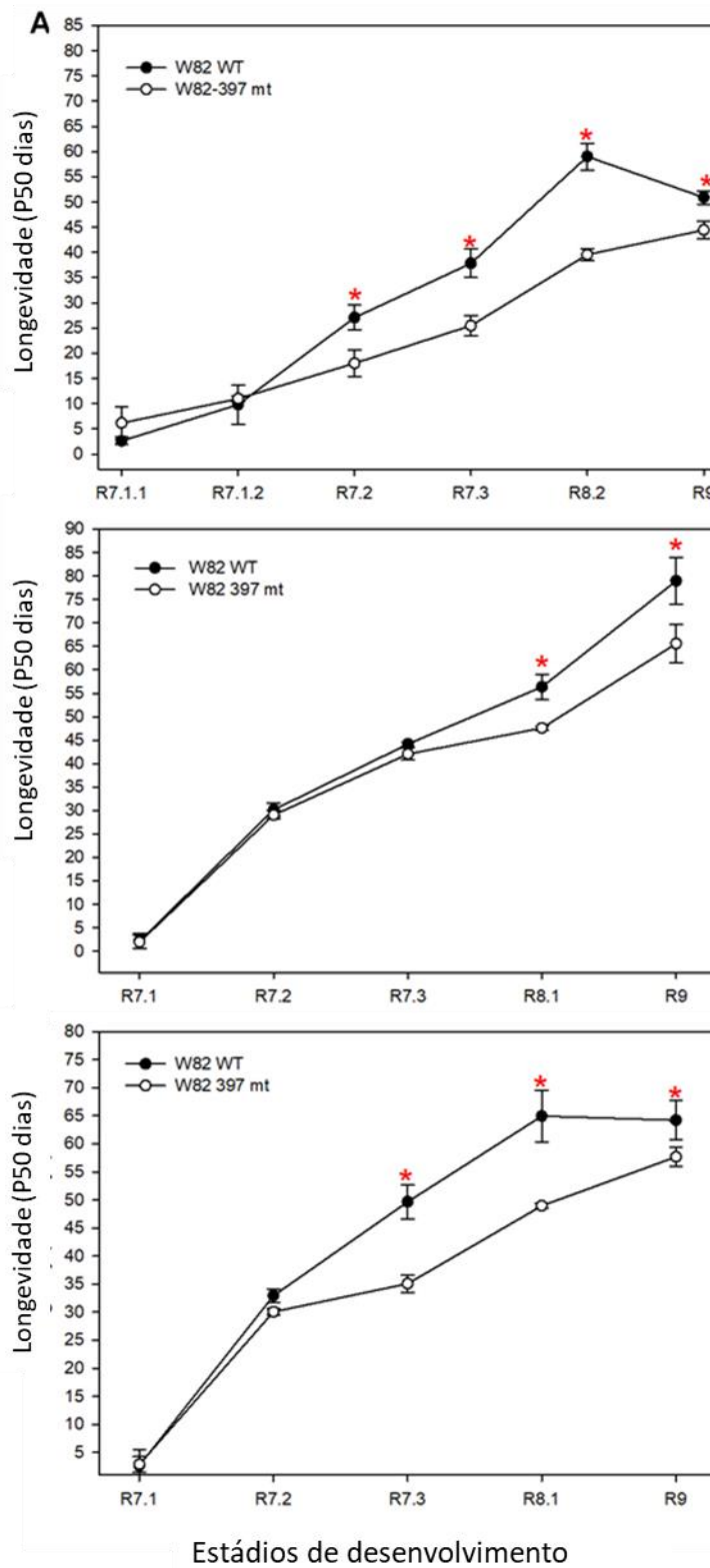
Entretanto, de maneira geral, mesmo com o aumento progressivo da longevidade a partir de R7.2 para todos os genótipos, os genótipos mutantes em rs2 e/ou rs3 obtiveram menor P50 em todos os estádios em relação aos seus tipos selvagens, indicando que aquisição da longevidade foi prejudicada na limitação de OFR. As diferenças significativas entre os genótipos para os estádios estão descritas na figura 19 e 20, onde o P50 foi estatisticamente significativo sendo superior para J RS2 RS3 em todos os estádios avaliados, com exceção de R7.1.1 safra de 2017/2018, R7.1 (2018/2019) e R7.2 (2019/2019). Para Willians, a o W82 97 foi estatisticamente superior em R7.2, R7.3, R8.2 e R9 para 2017/2018, R8.1 e R9 para 2019/2019 e R7.3, R81 e R9 para a safra de 2019/2019

Figura 19 - Longevidade em P50 (dias) durante a maturação e maturação tardia de JRS2 RS3 WT e Jrs2 rs3 mt em todas as safras experimentais



Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019. As barras representam o desvio padrão.

Figura 20 - Longevidade em P50 (dias) durante a maturação e maturação tardia de W82 WT e W82 397 mt em todas as safras experimentais

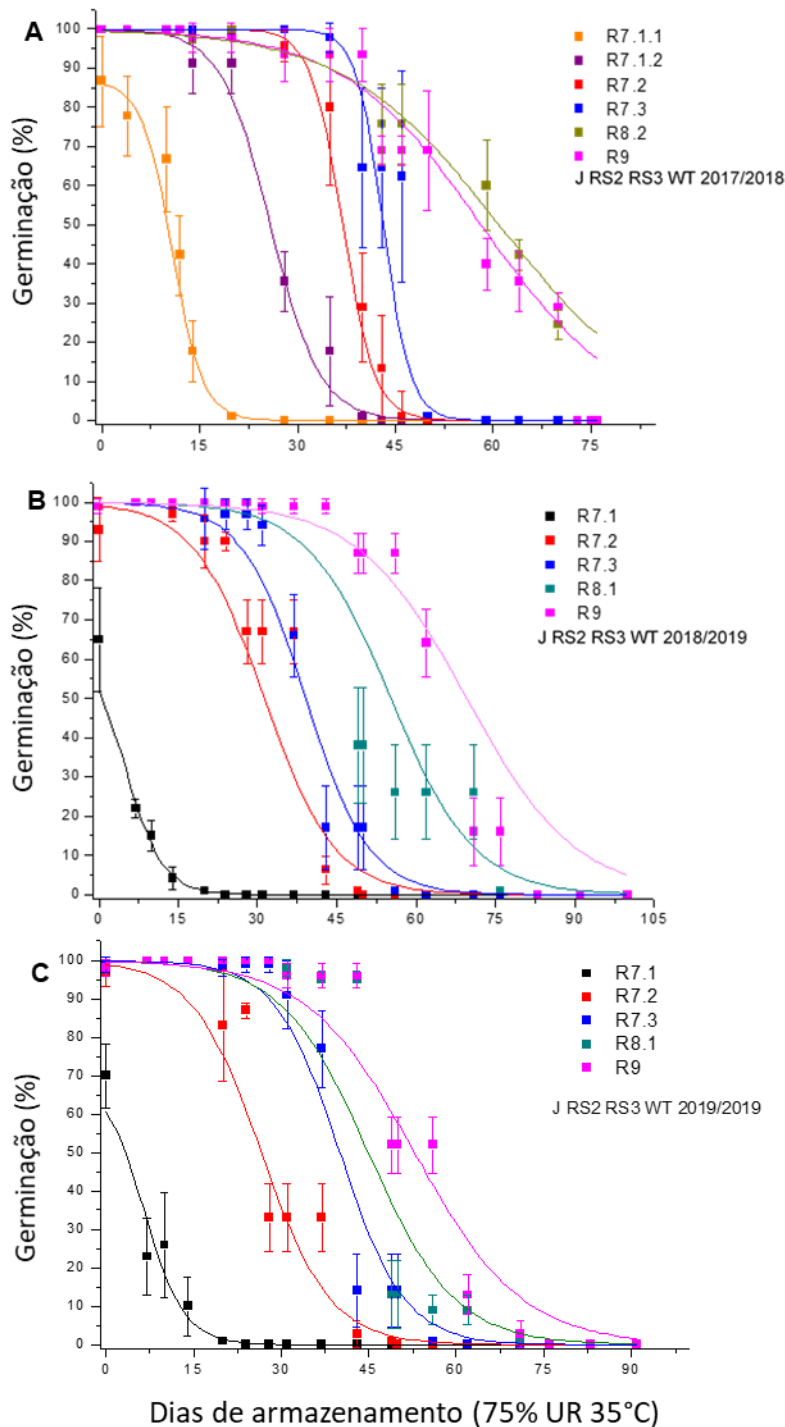


Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019. As barras representam o desvio padrão.

Tabela 30 - Valores de Ki e σ obtidos para o cálculo do P50 (dias) dos genótipos Jack e Willians

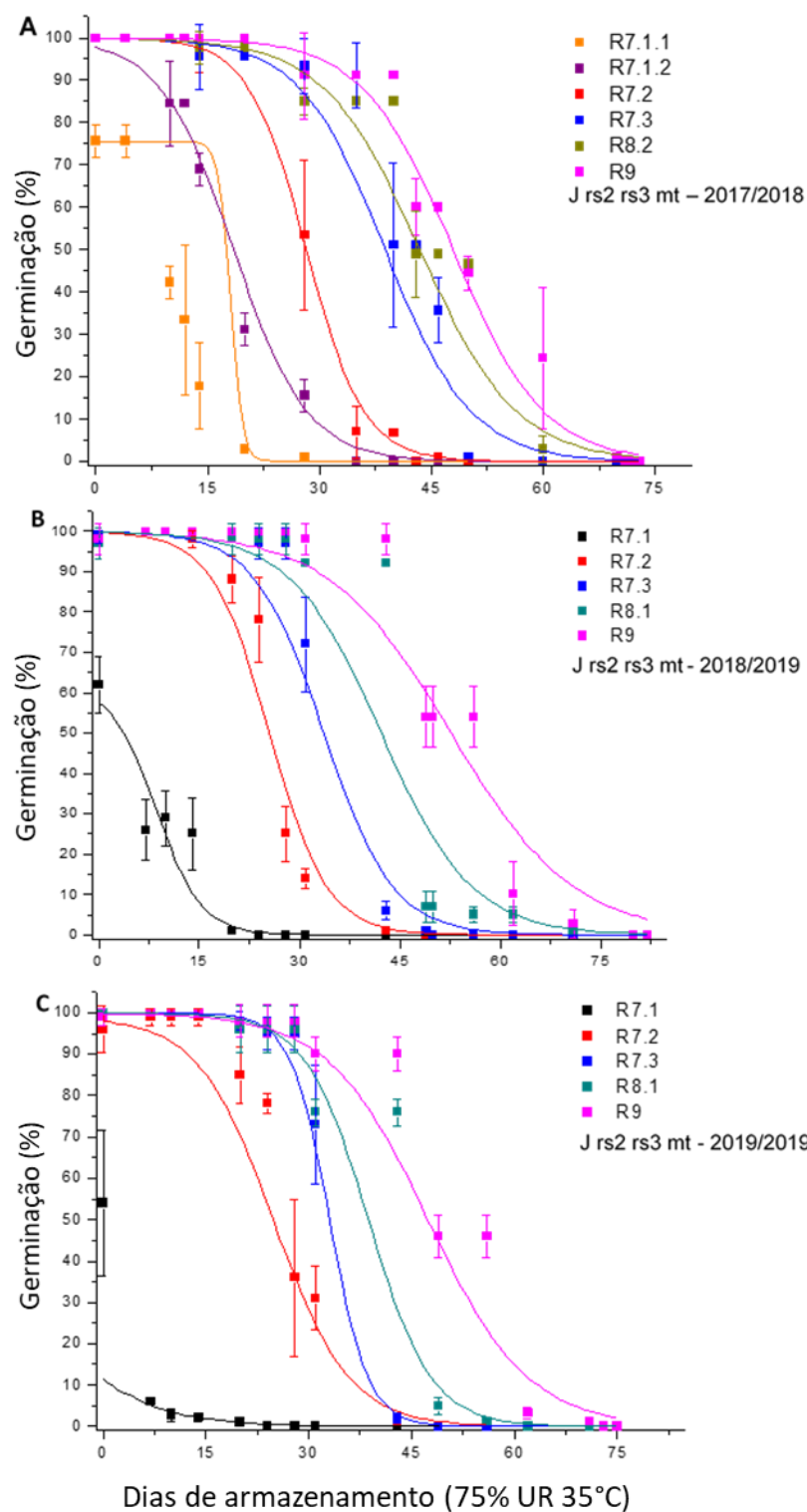
Genótipos Willians												
Estádios	W82 WT						W82 397 mt					
	2017/2018		2018/2019		2019/2019		2017/2018		2018/2019		2019/2019	
	Ki	σ	Ki	σ	Ki	σ	Ki	σ	Ki	Σ	Ki	σ
R7.1	-	-	5,2	9,7	5,4	8,1	-	-	5,25	8,48	5,4	7,5
R7.1.1	5,3	8,9	-	-	-	-	5,9	7,4	-	-	-	-
R7.1.2	6,4	7,9	-	-	-	-	6,5	7,5	-	-	-	-
R7.2	8,5	7,8	8,7	8,2	8,9	8,5	7,4	7,5	8,6	8,1	9,1	7,4
R7.3	8,0	12,9	9,1	10,8	8,9	12,6	7,5	10,1	8,6	11,8	9,3	8,2
R8.1	-	-	8,8	14,7	8,4	18,9	-	-	8,8	12,6	8,9	12,6
R8.2	8,3	16,4	-	-	-	-	7,7	15,2	-	-	-	-
R9	8,3	15,7	9,0	19,6	9,0	16,0	7,6	16,7	8,8	17,1	8,6	15,9
Genótipos Jack												
Estádios	J RS2 RS3 WT						Jrs2 rs3 mt					
	2017/2018		2018/2019		2019/2019		2017/2018		2018/2019		2019/2019	
	Ki	σ	Ki	σ	Ki	σ	Ki	σ	Ki	Σ	Ki	σ
R7.1	-	-	5,3	7,4	5,5	7,3	-	-	5,4	8,6	4,6	8,8
R7.1.1	6,6	5,9	-	-	-	-	5,9	8,0	-	-	-	-
R7.1.2	8,3	7,6	-	-	-	-	7,8	6,7	-	-	-	-
R7.2	9,1	9,2	8,4	9,7	8,7	8,2	8,4	8,0	8,8	7,0	8,5	8,1
R7.3	9,2	11,1	9,1	10,1	9,2	9,7	8,8	10,7	9,3	8,6	9,2	8,2
R8.1	-	-	9,2	13,5	9,3	11,6	-	-	9,0	11,2	9,0	9,7
R8.2	8,7	15,4	-	-	-	-	8,4	12,3	-	-	-	-
R9	8,4	15,8	9,2	15,7	9,1	12,9	8,7	12,6	9,2	12,9	9,0	11,8

Figura 21 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de J RS2 RS3 WT durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa



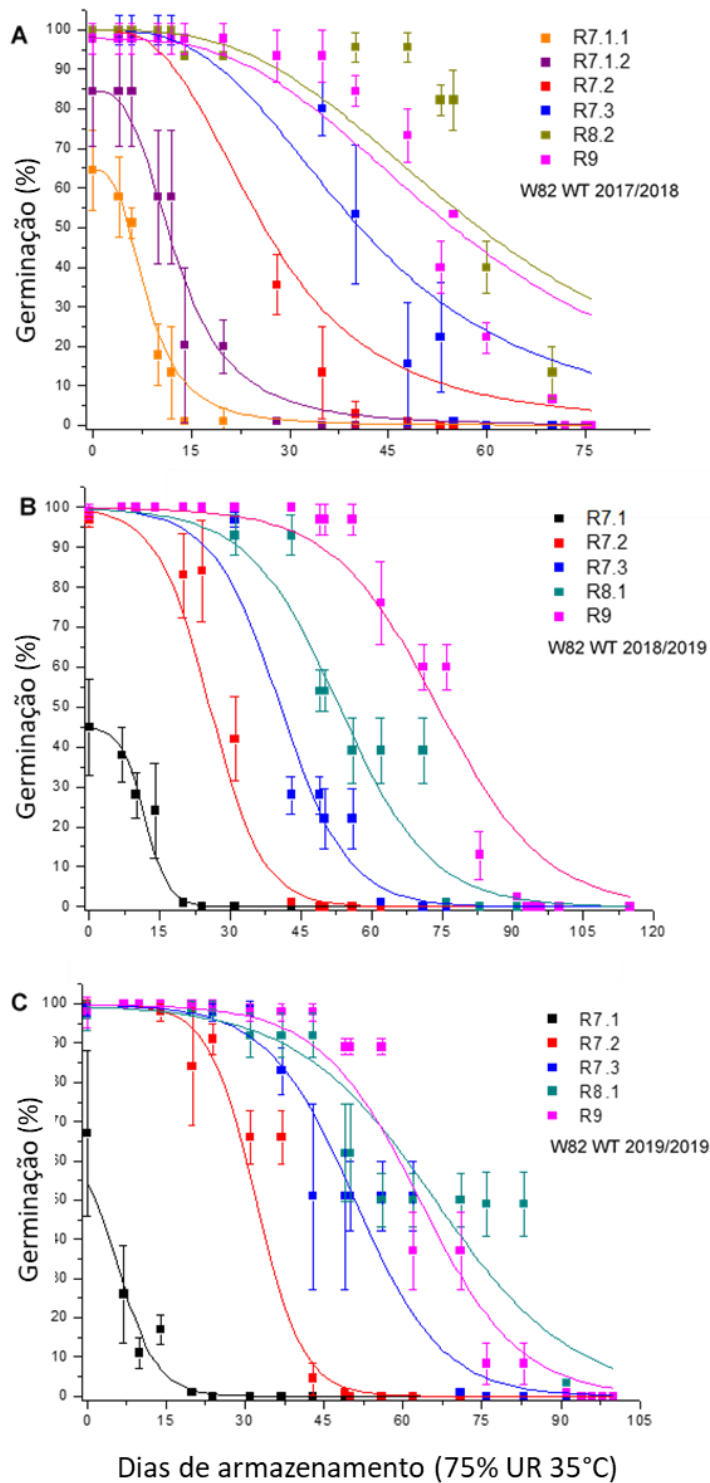
Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019. As barras representam o desvio padrão.

Figura 22 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de J rs2 rs3 mt durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa



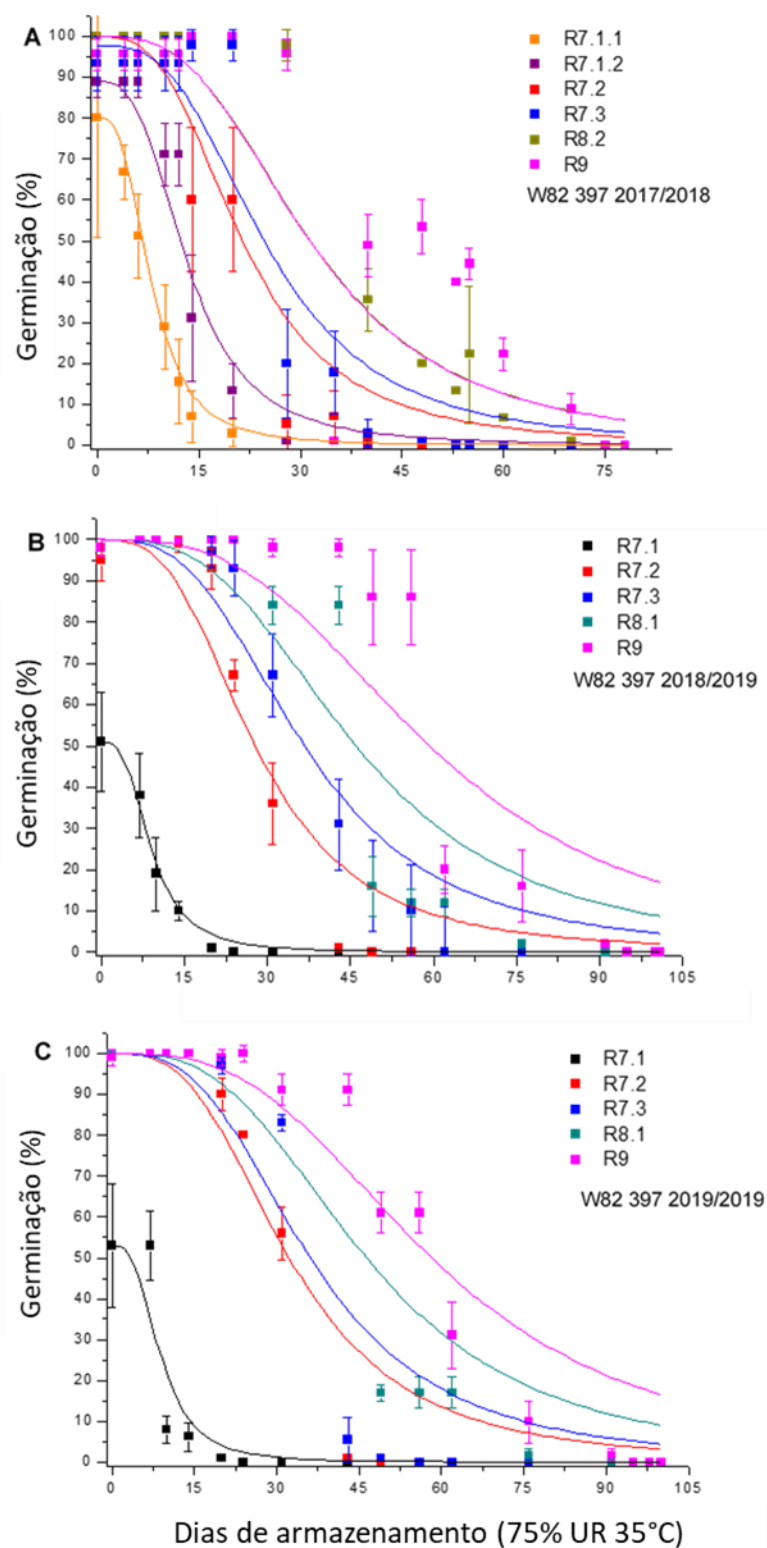
Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019. As barras representam o desvio padrão.

Figura 23 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de W82 WT durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa



Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019. As barras representam o desvio padrão.

Figura 24 - Porcentagem de germinação das sementes coletadas de W82 397 mt durante o armazenamento destas a 35°C e 75% de umidade relativa



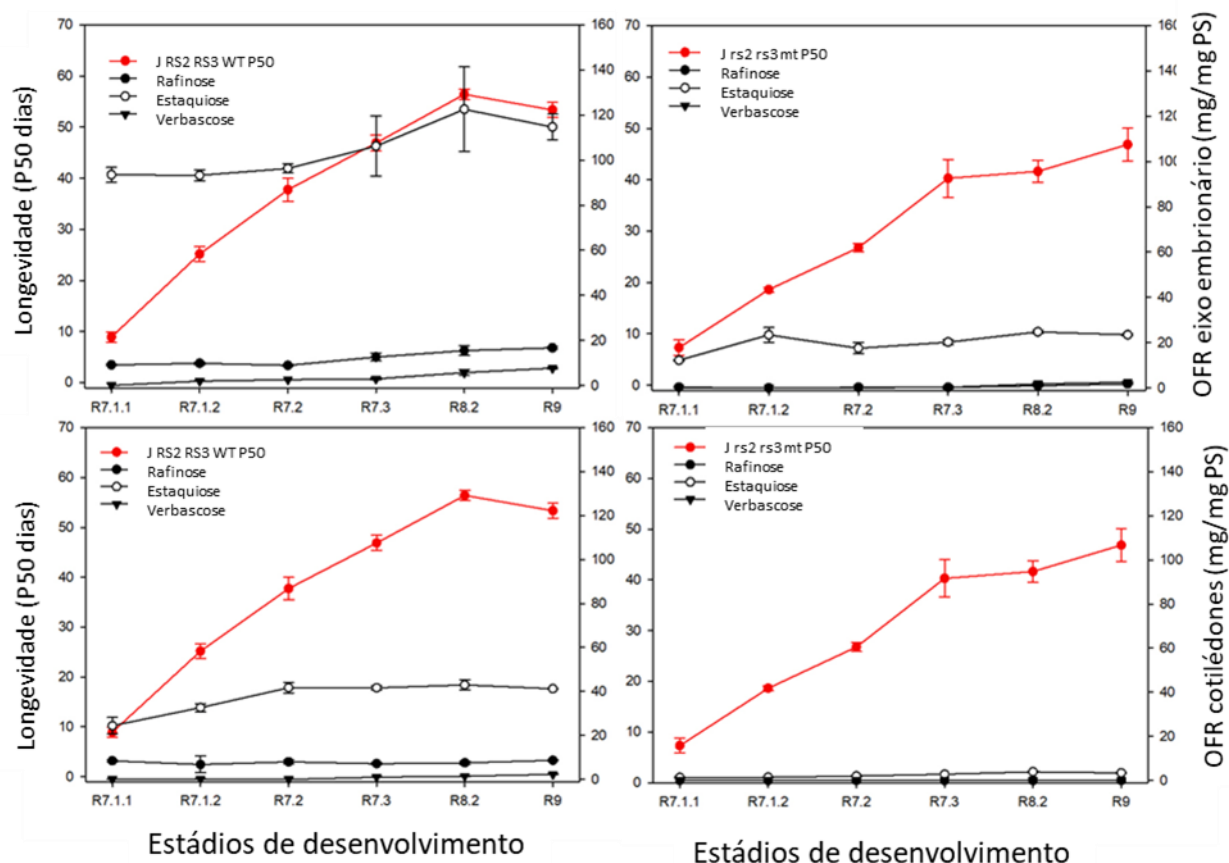
Legenda: (A) Safra de 2017/2018, (B) safra de 2018/2019, (C) safra de 2019/2019. As barras representam o desvio padrão.

Durante o armazenamento de sementes ocorrem reações deteriorativas e de envelhecimento, onde inicialmente é expresso pela perda da capacidade de alongamento do hipocótilo, caracterizando a perda do vigor, até as sementes serem incapazes de protrundir a radícula (BASSO, 2018), caracterizando a perda da germinação. Quanto mais intensos são os processos deteriorativos, menor será o tempo para que a germinação e o vigor sejam reduzidos. As sementes mais longevas, são capazes de permanecer mais tempo viáveis no armazenamento devido à maior resistência contra estas reações danosas.

Devido ao acúmulo progressivo de compostos de proteção e reparo como proteínas LEA'S, HPSPs, OFR e um conjunto de defesas contra estresses oxidativos com o concomitante aumento da longevidade, é proposto o envolvimento destes na aquisição desta característica (LIMA et al., 2017). Dessa maneira, quanto maior o estágio de maturação avaliado, maior será o tempo para que as sementes percam 50% da germinação (P50), pois provavelmente, quanto o maior acúmulo destes compostos protetivos e de reparo tornam a semente mais resistente as reações deteriorativas, e, portanto, mais longevas.

Por mais que em R9 seja esperada a maior longevidade de sementes devido ao máximo acúmulo de compostos protetores e de reparo, o menor P50 observado em R9 em relação a R8.1 para W82 WT (safra 2019/2019) e menor que R8.2 para W82 WT e J RS2 RS3 (safra 2017/2018), pode ter sido um resultado da deterioração em pré colheita. Para a safra de 2019/2019, o genótipo W82 ficou 4 dias em campo após a chegada de R9 e por isso foi submetido a alta precipitação pluvial ocorrente neste momento. De forma semelhante, as sementes em R9 para a primeira safra (2017/2018) foram expostas a alta precipitação pluvial e temperaturas anteriormente a serem colhidas, o que pode ter resultado em deterioração e assim menor longevidade (Figura 3). Entretanto, para a última exceção, foi observado um pico de estaquiose em R8.2, sendo concomitante com o maior P50 neste estágio (Figura 25), sugerindo mais uma evidência da participação dos OFR para a aquisição da longevidade.

Figura 25 - Acúmulo de rafinose, estaquiose e verbascose no eixo embrionário e cotilédones e aquisição progressiva de longevidade durante a maturação e maturação tardia de sementes de soja do genótipo Jack, safra de 2017/2018



Os mutantes com fenótipo para baixo e ultrabaixo teor de OFR apresentaram aquisição da longevidade prejudicada, mostrando menor P50 na maioria dos estádios. Por isso, foi investigado se há correlação entre o P50 e os OFR. A correlação de Pearson foi realizada entre os valores do P50 de R7.1.1 a R9 com as médias encontradas para cada açúcar nos mesmos estádios, para os dois tecidos avaliados (eixo embrionário e cotilédone), para o grupo Jack safra 2017/2018 (Tabela 31).

Foi observada uma significativa correlação positiva entre o P50 e todos os OFR no genótipo J RS2 RS3 WT e no J rs2 rs3 mutante, quando presente o açúcar avaliado. Para a estaquiose, foi observada correlação positiva muito forte com o P50, quando presente no cotilédone e forte no eixo embrionário, para os dois genótipos. Não foi observada correlação significativa para rafinose no cotilédone do J RS2 RS3, ao contrário do eixo embrionário, o qual forte correlação positiva foi observada para o tipo selvagem, e moderada para o mutante. A verbascose, quando presente, foi

fortemente positivamente correlacionada com o P50, em todos os tecidos avaliados, com exceção do eixo embrionário do mutante, apresentando moderada correlação positiva. Para galactinol e a sacarose, foi encontrada uma significativa forte correlação negativa com o P50 para o eixo embrionário do tipo selvagem, entretanto, no cotilédone, significativa forte correlação positiva foi encontrada para este genótipo. Para o mutante, em relação a sacarose e galactinol, apenas a sacarose apresentou correlação moderada com o P50 no cotilédone.

Tabela 31 - Correlação de Pearson da média do P50 de R7.1.1 a R9 entre os açúcares avaliados no eixo embrionário e cotilédone

Genótipo	Tecido da semente	Açúcar	P50	
			r	p
J RS2 RS3 WT	Eixo embrionário	Galactinol	-0,891*	0
		Sacarose	-0,715*	0,001
		Rafinose	0,779*	0
		Estaquiose	0,722*	0
		Verbascose	0,864*	0
	Cotilédone	Galactinol	-0,263	0,291
		Sacarose	0,863*	0
		Rafinose	0,001	0,998
		Estaquiose	0,925*	0
		Verbascose	0,79*	0
J rs2 rs3 mt	Eixo embrionário	Galactinol	-0,434	0,093
		Sacarose	-0,471	0,066
		Rafinose	0,651*	0,006
		Estaquiose	0,727*	0,001
		Verbascose	0,687*	0,003
	Cotilédone	Galactinol	0,028	0,915
		Sacarose	0,612*	0,009
		Rafinose	nd ^b	nd ^b
		Estaquiose	0,916*	0
		Verbascose	nd ^b	nd ^b

Coeficientes significativos a () P = 0,05. b= não detectado.

Os resultados indicam que os oligossacarídeos em estudo podem desenvolver um papel na aquisição da longevidade. Outros trabalhos já indicaram uma possível correlação entre os OFR com a longevidade em diversas espécies (HORBOWICZ; OBENDORF, 1994). Em *Megicardo truncalata* foi observada a correlação positiva com

a aquisição da longevidade com o acúmulo de estaquiose (ROSNOBLET et al., 2007; VERDIER et al., 2013). A correlação negativa da sacarose e longevidade também foi observada por Lima (2017). A diminuição da sacarose correlacionada com o aumento do P50 (correlação negativa) pode ser sugerida pela conversão desta em OFR, onde quanto maiores são os teores de oligocassarídeos, originados a partir da sacarose, maior o P50 encontrado (correlação positiva).

Neste trabalho foi encontrado indícios para uma relação direta entre os OFR e a aquisição da longevidade, mas não foi elucidado como estes atuam na aquisição da longevidade. Essa questão ainda não é esclarecida pelos trabalhos encontrados na literatura e apresenta controvérsias. Durante o processo de dessecação, o citoplasma das sementes que anteriormente estavam no estado líquido, passam para o vítreo. A teoria da substituição de água por OFR indica que estes participam na tolerância a dessecação e imposição do estado vítreo (KOSTER; LEOPOLD, 1988), de forma a proteger contra os danos nas membranas das sementes causadas pela desidratação, e também por mantém os lipídios destas em fase fluida (CROWE et al, 1987) bem como a estrutura de suas proteínas (IMAMURA et al., 2003).

Em adição, os OFR são propostos por aumentar a viscosidade do estado vítreo e assim diminuir a velocidade das reações deteriorativas por diminuir a mobilidade citoplasmática. Entretanto, Buitink et al. (2000) não encontraram resultados para espécies de *Capsicum annuum* e *Impatiens walleriana* que suportam a hipótese. Outros estudos, propõem uma possível contribuição destes com a longevidade de sementes devido a ação de tais açúcares não redutores (OFR) contra danos oxidativos, por meio da atenuação de reações oxidativas e liberação das moléculas tóxicas derivadas dessas reações durante o armazenamento (LEPRINCE, et al., 2017; NISHIZAWA-YOKOI; YABUTA; SHIGEOKA., 2008).

Outra função dos OFR seria indiretamente com a longevidade, onde estes seriam importantes como fonte de energia. Rosnoblet et al. (2007) relata que a estaquiose pode ser importante para a germinação após o armazenamento. Supondo que durante o armazenamento as sementes possam consumir outras fontes de carboidratos além dos OFR, estes poderiam assumir a função energética no processo germinativo após o armazenamento. Por isso, seria interessante em estudos futuros o estudo metabólico das sementes durante o armazenamento e na germinação destas após este período.

A longevidade é um atributo fortemente influenciado pelas condições ambientais incidentes no período vegetativo e reprodutivo como luz, temperatura, água e nutrição (CONTRERAS; BENNETT; METZGER, 2008; ELLIS, 1993; HE et al., 2014; NAGEL et al., 2015; RIGHETTI et al., 2015). A plasticidade da longevidade foi exibida entre as safras experimentais, onde o P50 em R9, atingiu valores distintos sendo superior para a safra de 2018/2019 nos dois grupos genéticos, para os mutantes e tipos selvagens. Foi realizada a análise conjunta com os estádios em comum (R7.2, R7.3 e R9) das três safras experimentais para a identificação das diferenças da aquisição da longevidade observadas entre estas.

Entre os estádios analisados pela análise conjunta, foi observado para o grupo Jack diferenças para R7.2 para o genótipo JRS2 RS3 (Tabela 32) e efeito principal para safra em R7.3 (Tabela 34) onde em ambos é verificado menor valor na safra de 2019/2019. Para o grupo Willians, para o mutante e selvagem, os maiores valores para R7.2 estão na safra de 2019/2019 e para R7.3, estão na safra de 2018/2019 e 2019/2019, respectivamente (Tabela 33). Para R9, o maior P50 foi observado na safra de 2018/2019 (Tabela 34).

Tabela 32 - Diferenças entre as safras experimentais para os valores de P50 (dias) – Genótipos Jack

Genótipos	P50 (dias)		
	2017/2018	2018/2019	2019/2019
R7.2			
J RS2 RS3 WT	38aA	33aB	30aC
J rs2 rs3 mt	27bA	27bA	28bA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 33 - Diferenças entre as safras experimentais para os valores de P50 (dias) – Genótipos Willians

Genótipos	P50 (dias)		
	2017/2018	2018/2019	2019/2019
R7.2			
W82 WT	27aC	30aB	33aA
W82 397 mt	18bB	29aA	30bA
R7.3			
W82 WT	38aC	44aB	50aA
W82 397 mt	25bC	42aA	35bB

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (linha) e minúscula (coluna) não se diferem estatisticamente por teste Tukey ($p < 0,05$).

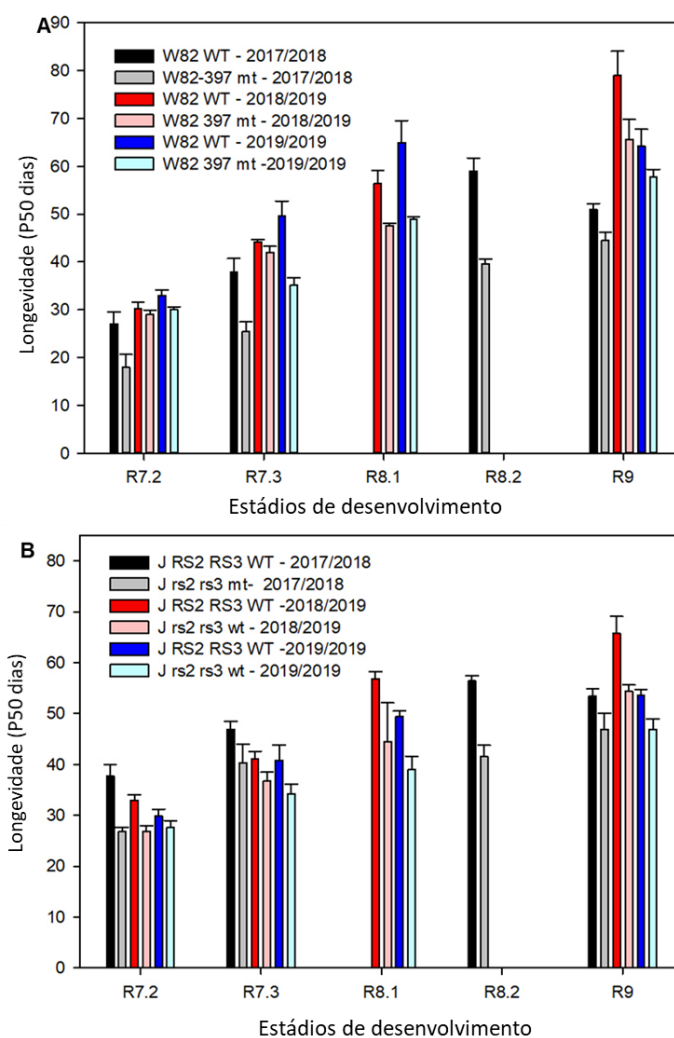
Tabela 34 - Efeito principal de safra experimental para a longevidade (P50 dias) no estágio R7.3 para os genótipos Jack e R9 para os genótipos Willians

Safra experimental	P50	
	Grupo genético / estágio de maturação	
	Willians (R9)	Jack (R7.3)
2017/2018	48B	44A
2018/2019	72A	39AB
2019/2019	61AB	38B

* Médias seguidas pela mesma letra (coluna) não se diferem por teste Tukey ($p < 0,05$)

A longevidade de ambos os mutantes e tipos selvagens são afetados pelas condições ambientais das safras, mas em todas elas, o atraso da longevidade dos mutantes permaneceu, indicando que aparentemente os contrastes observados entre os materiais contrastantes em OFR é de natureza genética (Figura 26).

Figura 26 - Aquisição da longevidade (P50) entre as safras experimentais pra genótipos Willians (A) e genótipos Jack (B)



Para as sementes maduras, em R9, pela Figura 26 observou-se que a longevidade foi favorecida na safra de 2018/2019 (2° safra) para os dois grupos genéticos. Na safra de 2017/2018 Jrs2 rs3 apresentou P50 de 46 dias e o JRS2 RS3, 54 dias. Uma adição de quase 10 dias no P50 foi observada para a segunda safra onde o mutante apresentou 54 dias e o tipo selvagem, 65 dias. Logo, os valores do mutante na segunda safra alcançam o P50 que o seu tipo selvagem apresentou na primeira e terceira safra. De forma semelhante a segunda safra favoreceu as sementes maduras do grupo Willians, onde o W82 397 de 44 dias subiu para 65 dias, valor maior ainda que o seu tipo selvagem apresentou na primeira safra. Ainda que a longevidade dos tipos selvagens permaneça superior em todas as safras, foi observado que a característica foi favorecida na safra de 2018/2019 em todos os genótipos (sementes maduras).

Os valores de longevidade dos mutantes do segundo cultivo alcançam ou superam os valores os quais os seus tipos selvagens apresentaram no primeiro e último cultivo experimental. Foi observado que o número de dias acima de 30°C para a safra com maior P50 em R9 (2018/2019) foi superior em mais de 13 dias e 20 dias respectivamente em relação a primeira e terceira nas fases de maturação e maturação tardia (Tabela 1), caracterizando ter sido a safra de maiores temperaturas. Diante disso, a correlação de e foi realizada para confirmar se o aumento no P50 para as sementes maduras observadas tem relação com a temperatura (Tabela 35).

Tabela 35 - Correlação de Pearson entre média de temperatura (°C) com o P50 em diferentes períodos de cultivo

Genótipo	Temperatura °C Média			Σ dias acima de 30°C		
	Semeadura ao florescimento	Florescimento a R7.1	Florescimento a colheita	Semeadura ao florescimento	Florescimento a R7.1	Florescimento a colheita
J RS2 RS3	-	-	0,948*	0,739*	0,922*	0,749*
J rs2 rs3	-	0,831*	0,874*	-	0,864*	0,732*
W82	0,885*	0,977*	0,807*	0,974*	-	-
W82 397	0,905*	0,971*	0,777*	0,978*	-	-

Coeficientes significativos a () P = 0.05.

Foi observada correlação positiva entre o P50 com a temperatura média do período reprodutivo e vegetativo, e entre a somatória de dias acima de 30°C para todos os genótipos em todo o ciclo de cultivo. Diversos são os relatos na literatura de

que a longevidade de sementes de soja é favorecida quando estas são cultivadas em condições térmicas elevadas (LIMA et al., 2017; PROBERT; DAWS; HAY, 2009; ZANAKIS; ELLIST; SUMMERFIELD, 1994) e aqui encontrou-se mais uma evidencia que temperaturas altas possam favorecer a longevidade de sementes.

Kochanek et al. (2010) observaram que para sementes de *Wahlenbergia tumidifructa* P. J. Sm. (Campanulaceae) temperaturas amenas no período vegetativo favorecem a longevidade antes mesmo das sementes existirem. Semelhantemente, Basso (2018) observou uma correlação negativa da longevidade de sementes de soja com a somatória de dias acima de 30°C no período vegetativo. Ao contrário do citado, observou-se que altas temperaturas no período vegetativo se correlacionaram positivamente com a longevidade das sementes dos genótipos em estudo.

É relatado que altas temperaturas prejudicam a aquisição da germinação, vigor e rendimento das sementes de soja (DORNBOS; MULLEN, 1991). Mas, para longevidade, pode ser sugerido que estas condições térmicas antecipam o programa de aquisição desta propriedade (LIMA et al., 2017) levando as sementes adquirirem-na mais cedo, e quando em R9, devido ao acúmulo progressivo, os valores estarem mais altos do que em relação as sementes maduras produzidas em ambientes amenos.

Neste estudo, não foi encontrada uma safra com tendência clara para o maior acúmulo de OFR, mas encontramos uma com um expressivo aumento na longevidade das sementes (safra de 2018/2019). Diversos são os fatores envolvidos na longevidade (LEPRINCE et al., 2017; SANO et al., 2016), e por isso, outros fatores cooperaram para o aumento do P50, entre eles, os OFR.

Foi identificado, portanto, onde os OFR participam na aquisição da qualidade fisiológica. Apesar de teores baixos e ultrabaixos de OFR não afetarem negativamente o vigor, a germinação e a tolerância a dessecação, a longevidade parece ser prejudicada. Foi observado que mesmo diante das diferenças ambientais, a tendência foi constante entre as safras avaliadas, onde os mutantes apresentaram menores longevidades em relação ao seu tipo selvagem em todas elas. A aquisição da tolerância a dessecação, vigor e germinação não variaram entre cultivos experimentais, e não foi observada diferenças entre os mutantes e tipos selvagens para a aquisição destas características. Outros trabalhos devem ser realizados para o entendimento de como estes açúcares atuam na aquisição da longevidade, para

que estratégias sejam desenvolvidas para a manutenção da propriedade das sementes de materiais com baixo OFR.

Genótipos de soja com teores reduzidos de oligossacarídeos são alvos para o mercado, uma vez que estes são considerados fatores antinutricionais (RACKIS, 1975). A diminuição de OFR e o aumento de sacarose resultam em melhoria na eficiência da alimentação animal e aumento da qualidade nutricional para humanos (SEBASTIAN et al., 2000). Mesmo diante de ferramentas e benefícios provados para o alcance deste fenótipo, a ausência destes açúcares pode diminuir a longevidade de sementes, e assim, tornando inviável a sua propagação, cultivo e comércio.

O recorrente aumento na produção de soja em ambientes tropicais apresenta redução na longevidade das sementes desenvolvidas neste ambiente (NKANG; UMHO, 1996). Genótipos que apresentam fenótipo para baixa longevidade quando produzidos neste ambiente poderão ter a deficiência agravada da aquisição da característica das sementes produzidas. Foi observado que os materiais mutantes tiveram a deficiência atenuada quando em condições favoráveis para aquisição da longevidade.

Uma das estratégias para a produção de materiais com baixo teor de OFR seria a produção de campos sementes destes em lugares apropriados para a aquisição da longevidade. Em adição, seria interessante o estudo da longevidade destas sementes quando armazenadas em condições ideais de temperatura e umidade. Mesmo com a provável participação direta dos OFR na longevidade de sementes, espera-se que sementes de baixos teores para estes quando armazenadas em condições que resultem em menor envelhecimento de sementes, e assim, os impactos negativos sobre a longevidade sejam atenuados.

5 CONCLUSÕES

1) Genótipos com teores baixos e ultrabaixos de OFR apresentam deficiência na aquisição da longevidade, mas não há diferenças na aquisição do vigor, germinação e tolerância a dessecação quando comparados com genótipos com teores normais destes açúcares.

2) A aquisição da qualidade fisiológica em genótipos com alelos distintos para RS2 e/ou RS3 não se distinguem quando cultivados em diferentes condições ambientais, com exceção da longevidade. Ambientes de cultivo favoráveis a aquisição da longevidade diminuem a deficiência da característica observada em genótipos com baixo e ultrabaixos teores de OFR.

Perspectivas futuras de pesquisas sobre o possível envolvimento dos OFR com a longevidade de sementes

A) Tegumento – Visualmente as sementes dos mutantes apresentaram rachaduras no tegumento antes mesmo do processo de secagem e ainda em sementes imaturas. No mutante rs2 rs3, a rachadura tegumentar foi mais expressa. O tegumento é responsável pela manutenção da longevidade de sementes (MCABEE et al., 2006) e por isso seria interessante um estudo deste tecido para a verificação se o envolvimento dos OFR com a longevidade se dá pelo envolvimento destes com a integridade tegumentar.

B) Tocoferol – Visualmente, a coloração das sementes foi diferente entre os genótipos do mesmo grupo genético, onde em R9, os mutantes apresentaram diferenças visuais com colorações mais claras, nas sementes imaturas e maduras, em todos os estádios fenológicos, em relação ao seu tipo selvagem. Existe relação descrita entre o teor de tocoferol com a coloração de sementes, onde as mais escuras apresentam maior teor deste antioxidante. A presença de antioxidantes é fundamental para a manutenção da longevidade de sementes (SANO et al, 2016). Por isso, seria interessante a mensuração de tocoferol e outros componentes antioxidantes para investigação da relação indireta com OFR e tocoferol.

C) Armazenamento em condições ideais: O armazenamento a condições ideais de temperatura, luz e umidade relativa (de forma que diminua os processos de deterioração/envelhecimento) não foi avaliado para estes materiais. Entretanto, após um ano de armazenamento em condições controladas não foi observada reduções na emergência de plântulas em campo das sementes mutantes rs2 e/ou rs3. Por isso, é interessante avaliar a longevidade de sementes dentro das condições ideais para a verificação da viabilidade de armazenamento de genótipos com baixo e ultrabaixo OFR.

D) Como fonte de energia após o armazenamento: Rosnoblet et al. (2007) relata que a estaquiose pode ser importante para a germinação após o armazenamento. Supondo que durante o armazenamento as sementes possam consumir outras fontes de carboidratos além dos OFR, estes poderiam assumir a função energética no processo germinativo após o armazenamento. Por isso, seria interessante em estudos futuros o estudo metabólico das sementes durante o armazenamento e na germinação destas após este período.

REFERÊNCIAS

- AMBROSANO, E. J. Efeitos da adubação nitrogenada e com micronutrientes na qualidade de sementes do feijoeiro cultivar IAC-Carioca. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 393-399, 1999.
- ARRUDA, M.H. et al. Qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja com diferentes percentuais de sementes esverdeadas. **Magistra**, Bahia, v. 28, n. 2, p. 194-200, 2016.
- BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 357, p. 701-708, 2001.
- BALLESTEROS, D.; WALTERS, C. Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. **The Plant Journal**, v. 68, n. 4, p. 607–619, 2011.
- BASSO, P. D. **Contribution to the characterization of the acquisition of the emergency vigor during seed maturation**. 2018. 267 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.
- BAUD, S. et al. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiological Biochemistry**, v. 40, p. 151-160, 2002.
- BENTSINK, L.C. et al. Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1595-1604, 2000.
- BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, C. A. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. **Plant Physiology**, v. 98, n. 3, p. 1207–1210, 1992.
- BERNARD, R.L.; CREMEENS, C.R. Registration of 'Williams 82' soybean. **Crop Science**, v. 28, n. 6, p. 8, 1988.
- BEWLEY J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013, 408 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum press, 1994, 445 p.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, n. 3, p. 1055-1066, 1997.
- BILYEU, K. D.; WIEBOLD, W. J. Environmental Stability of Seed Carbohydrate Profiles in Soybeans Containing Different Alleles of the Raffinose Synthase 2 (RS2) Gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1071–1078, 2016.

BLACK, M. et al. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, v. 120, n. 2, p. 463–471, 1999.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 225–230, 1992.

BLÖCHL, A. et al. Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. **Planta**, v. 228, n. 1, p. 99–110, 2008.

BLÖCHL, A.; PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 8, p. 1093–1096, 2007.

BONETTI, L.P. **Distribuição da soja no mundo: origem histórica e distribuição**. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed) A soja no Brasil. Campinas: ITAL, 1981.181 p.

BORNHOFEN, E. et al. Épocas de semeadura e desempenho qualitativo de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, 2015.

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

BUITINK, J. et al. Molecular mobility in the cytoplasm: An approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 5, p. 2385–2390, 2000.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state. **Cryobiology**, v. 45 n. 3, p. 215-228, 2004.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state, 2008. **Comptes rendus biologies**, v. 331, n. 10, p. 788-795, 2008.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

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**, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.

CHENG, X. et al. Dynamic Quantitative Trait Loci Analysis of Seed Reserve Utilization during Three Germination Stages in Rice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

CHUNG, G.; SINGH, R.J. Broadening the genetic base of soybean: a multidisciplinary approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 5, p. 295-341, 2008.

CLERKX, E. J. M. et al. Characterization of green seed, an enhancer of *abi3-1* in *Arabidopsis* that affects seed longevity. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 1077–1084, 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**. Disponível em:

[file:///C:/Users/Usuario/Downloads/BoletimZGraosZjunhoZ2018%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/BoletimZGraosZjunhoZ2018%20(1).pdf).

Acessado em 27, dez. 2019

CONTRERAS, S.; BENNETT, MA.; METZGER, J.D. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability and storability. **Hort Science**, v. 43, p. 845–852. 2008.

COPELAND, L.O.; MC DONALD, M.B. **Principles of Seed Science and Technology** Chapman and Hall. New York. 1995. 181 p.

CROMWELL, G. L. **Soybean Meal – An Exceptional Protein Source**. University of Kentucky. 2012. Disponível: <http://www.soymeal.org/ReviewPapers/SBMExceptionalProteinSource.pdf>. Acessado em 17, jul. 2019.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **The Biochemical journal**, v. 242, n. 1, p. 1–10, 1987.

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

DARGAHI, H.; TANYA, P.; SRINIVES, P. Mapping of the genomic regions controlling seed storability in soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Genetics**, v. 93, n. 2, p. 65–370, 2014.

DEBEAUJON, I. et al. Seed coat development and dormancy. **Annual Plant Reviews online** p. 25-49, 2018.

DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.

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. **The Plant Journal**, v. 85, n. 4, p. 451–465, 2016.

DIERKING, E. C.; BILYEU, K. D. Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 12, p. 1329–1335, 2009.

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**, Ottawa, v. 71, n. 2, p. 373-383, 1991.

DOWNIE, B. et al. Expression of a galactinol synthase gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 1347–1359, 2003.

DUCATTI, K.R. **Vigor de sementes de soja: estudos fisiológicos e moleculares relacionados ao déficit hídrico**. 2018, 149 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

EGERT, A. et al. Evidence for water deficit-induced mass increases of raffinose family oligosaccharides (OFRs) in the leaves of three *Craterostigma* resurrection plant species. **Frontiers in Physiology**, v. 22, n. 6, p. 206, 2015.

EGLI, D.B.; WARDLAW, I.F. Temperature Response of Seed Growth Characteristics of Soybeans 1. **Agronomy Journal, Madison**, v. 72, n. 3, p. 560-564, 1980.

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

ELLIS, R. Seed Production Environment, Time of Harvest, and the Potential Longevity of Seeds of Three Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**, v. 72, n. 6, p. 583–590, 1993.

ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. Towards a rational basis for testing seed quality. **Seed production**, p. 605-635, 1980.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja–região central do Brasil 2012 e 2013**. Embrapa Soja, Londrina, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Centro nacional de pesquisa em solos, Rio de Janeiro, 2006.

FAIT, A. et al. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v. 142, p. 839-854, 2006.

FARIAS, J.R.; NEPOMUCENO A.L.; NEUMAIER N. Ecofisiologia da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**. 2007.

FIESP. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. **Safrá mundial de Soja**. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safrá-mundial-de-soja/>. Acessado em 17, jul. 2018

FINCH-SAVAGE, W. E. et al. Towards a genetic understanding of seed vigour in small-seeded crops using natural variation in Brassica oleracea. **Plant Science**, v. 179, p. 582-589, 2010.

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

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **DIACOM - Diagnóstico completo da qualidade da semente de soja**. Londrina: EMBRAPA CNPSO, Circular Técnica 10, 1992. 22 p.

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

FRANÇA NETO, J.B. et al. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico - Série Sementes**. Londrina: Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E), Londrina, v. 91, 2012. 15 p.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica da semente**. Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E), Londrina, v. 9, p. 5-24, 1984.

GANGOLA, M.P. et al. Genotype and growing environment interaction shows a positive correlation between substrates of raffinose family oligosaccharides (OFR) biosynthesis and their accumulation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 20, p. 4943 - 4952, 2013

GAZZONI, D. L. **SOJA E ABELHAS**. EMBRAPA SOJA. 2017. Disponível em: <www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>. Acesso em: 6 jan. 2020.

GIBSON, L.R.; MULLEN, R.E. Soybean seed quality reductions by high day and night temperature. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 6, p. 1615-1619, 1996.

GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J.; PEREZ-GRAU, L. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. **Cell**, Cambridge v. 56, n. 2, p. 149-160, 1989.

GUTIERREZ, L. et al. Combined networks regulating seed maturation. **Trends in plant science**, v. 12, n. 7, p. 294-300, 2007.

HAGELY, K. B.; PALMQUIST, D.; BILYEU, K. D. Classification of distinct seed carbohydrate profiles in soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1105–1111, 2013.

HAJDUCH, M. A. Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. **Plant physiology**, v. 137, n. 4, p. 1397–1419, 2005.

HE, H. et al. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 22, p. 6603–6615, 2014.

HITZ, W. D. et al. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 128, n. 2, p. 650–660, 2002.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanism of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.

HOOD-NIEFER, S.D. et al. Effect of genotype and environment on the concentrations of starch and protein and the physicochemical properties of starch

from, field pea and fababean. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 1, p. 141-150, 2012.

HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R. L. Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. **Seed Science Research**, v. 4, n. 4, p. 385-405, 1994.

HOU, A. et al. Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. **International Journal of Agronomy**, p. 8, 2009.

HSU, S.H.; HADLEY, H.; HYMOWITZ, T. "Changes in Carbohydrate Contents of Germinating Soybean Seeds". **Crop Science**, v. 13, p. 407-410, 1973.

HUNDERTMARK M. et al. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Science**. v. 21, p. 165–173, 2011.

IMAMURA, K. et al. Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 266-274, 2003.

JANN, R.C.; AMEN, R.D. What is germination? In: Khan, A.A. (Ed.). **The Physiology and Biochemistry of Seed Domancy and Germination**. 2.ed. New York: Elsevier/North Holland Inc, 1980. p.7-28

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

KARR-LILIENTHAL, L. K. et al. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v. 97, n. 1, p. 1–12, 2005.

KOCHANNEK, J. et al. Pre-zygotic parental environment modulates seed longevity. **Austral Ecology**, v. 35, n. 7, p. 837-848, 2010.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant physiology**, v. 88, n. 3, p. 829–32, 1988.

KRANNER, I. et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 12, p. 2155–2165, 2006.

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

KUMAR, V. et al. Sucrose and Raffinose Family Oligosaccharides (OFRs) in Soybean Seeds As Influenced by Genotype and Growing Location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 5081–5085, 2010.

LEOPOLD, A. C.; SUN, W. Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds: Analysis and function. **Seed Science Research**, v. 4, n. 3, p. 267-274, 1994.

LEPRINCE, O. et al. Late seed maturation: Drying without dying, Oxford University Press. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 4, p. 827-841, 2017.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: From genomics to the field. **Plant Science**, v. 179, p. 554–564, 2010.

LI, T. et al. Regulation of seed vigor by manipulation of raffinose family oligosaccharides in maize and *Arabidopsis thaliana*. **Molecular plant**, v. 10, n. 12, p. 1540-1555, 2017.

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

LIMA, J.J.P. **Physiological and molecular studies during acquisition of longevity in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds**. 2016, 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

LIU, L. et al. Dynamic Quantitative Trait Locus Analysis of Seed Vigor at Three Maturity Stages in Rice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e15732, 2014.

MACHADO, L.A.; ASSIS, P.D. Produção de palha e forragem por espécies anuais e perenes em sucessão à soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 4, 2010

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015, p. 626 – 627.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015, p. 572- 573.

MARCOS FILHO, J. Importância do potencial fisiológico da semente de soja. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 21-24, 2013.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; França Neto, J.deB. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-20.

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 33-35, 1994b.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. da. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Alpha-Galactosides: Antinutritional Factors or Functional Ingredients? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 4, p. 301–316, 2008.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 2 ed. Great Britain. Wheaton & Co. Ltd., Exeter. 1975.

MCABEE, J. M. et al. ABERRANT TESTA SHAPE encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation and growth of Arabidopsis ovule integuments. **The Plant Journal**, v. 46, n. 3, p. 522–531, 2006.

MISSÃO, M.R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de ciências empresariais**, v. 3, n. 1, p. 7-15, 2006.

MUGNOL, D.; EICHELBERGER, L. **Qualidade de sementes**. Resumos - Passo Fundo: Mostra de Iniciação Científica EMBRAPA Trigo, 2008.

MUNDSTOCK, C.M., THOMAS, A.L. **Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

NAGEL, M, et al. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 6, p. 1011–1022, 2015.

NAKAGAWA, J. **Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-24.

NATARAJAN, S. et al. Transgenic soybeans and soybean protein analysis: an overview. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 61, n. 48, 2013.

NEUS, J. D.; FEHR, W. R.; SCHNEBLY, S. R. Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. **Crop Science**, v. 45, n. 2, p. 589–592, 2005.

NICKELL, C.D. et al. Registration of “Jack” Soybean. **Crop Science**, v. 30 n. 6, p. 1365, 1990.

NISHIZAWA-YOKOI, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, n. 11, p. 93-99, 2008.

NKANG, A.; UMHO, E. O. Six month storability of five soybean cultivars as influenced by stage of harvest, storage temperature and relative humidity. **Seed Science and Technology**, v. 25, p. 93–99, 1996.

OBENDORF, R. L. et al. Accumulation of Soluble Carbohydrates during Seed Development and Maturation of Low-Raffinose, Low-Stachyose Soybean. **Crop Science**, v. 49, n. 1, p. 329, 2009.

OBENDORF, R. L. et al. Imbibitional chilling sensitivity and soluble carbohydrate composition of low raffinose, low stachyose soybean seed. **Crop Science**, v. 48, n. 6, p. 2396–2403, 2008.

OBENDORF, R. L.; GÓRECKI, R. J. Soluble carbohydrates in legume seeds. **Seed Science Research**, v. 22, n. 04, p. 219–242, 2012.

OBENDORF, R.L. et al. Soluble oligosaccharides and galactosyl cyclitols in maturing soybean seeds in planta and in vitro. **Crop Science**, v. 38, n. 1, p. 78-84, 1998.

OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance (Review Update). **Seed Science Research**, v. 7, n.2, p. 63-74, 1997.

OGE, L. et al. Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase1 Is Involved in Both Seed Longevity and Germination Vigor in Arabidopsis. **The plant cell online**, v. 20, n. 11, p. 3022–3037, 2008.

OKAMOTO, et al. ABA synthesis genes, dormancy, and germination. **Plant Physiology**, v. 141, p. 97-107, 2006.

PERISSATO, S. M. **Interação genótipo ambiente na produtividade, qualidade fisiológica e incidência de sementes verdes em soja (*Glycine Max L.*)** 2019, 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

PERRY, D. A. Seed vigour and field establishment, **Hort. Abst.**, v. 42, p. 334-392, 1972.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, n. 3, p. 185–197, 2001.

POLLONOCK, B.M.; ROSS, E.E. **Seed and seedling vigor**. In: KOZLOWSKY, T.T. Seed Biology, New York, Academic Press, 1972.

POPINIGIS, F. **Effects of the physiological quality of seed on field performance of soybeans (*Glycine max (L.) Merrill*) as affected by population density**. 87f. Thesis. (PhD in Agronomy) - Mississippi State University. 1973.

PRASAD, P.V.V.; JAGADISH, S.V.K. Field crops and the fear of heat stress—opportunities, challenges and future directions. **Procedia Environmental Sciences**, v. 29, p. 36-37, 2015.

PROBERT, R. et al. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. **Australian Journal of Botany**, Darwin, v. 55, n. 3, p. 326-335, 2007.

PROBERT, R. J.; DAWS, M. I.; HAY, F. R. Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. **Annals of Botany**, v. 104, n. 1, p. 57-69, 2009.

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

PUTEH, A.B. et al. Soybean [*Glycine max (L.) Merrill*] seed yield response to high temperature stress during reproductive growth stages. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 7, n. 10, p. 1472, 2013.

RACKIS, J.J. Oligosaccharides of food legumes: Alpha-galactosidase activity and the flatus problem. **ACS Publications**, p. 207-222, 1975.

RAGHAVAN, V. Induction of vivipary in Arabidopsis by silique culture: implications for seed dormancy and germination. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 5, p. 766-776, 2002.

RIGHETTI, K. et al. Inference of longevity-related genes from a robust coexpression network of seed maturation identifies regulators linking seed storability to biotic defense-related pathways. **Plant Cell**, v. 27, n. 10, p. 2692–2708, 2015.

RITCHIE, S. W. et al. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1994, p. 20.

ROSNOBLET, C. et al. The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of Medicago truncatula seeds. **The Plant Journal**, v. 5, n. 11, p. 47-59, 2007.

SÁ, M. E. de. **Importância da adubação nitrogenada na qualidade de sementes**. In: SÁ, M. E.; BUZZETTI, S. Importância da adubação na qualidade dos produtos agrícolas. São Paulo: Icone, 1994. Cap.4, p.65-98.

SALVI, P. et al. Differentially expressed galactinol synthase (s) in chickpea are implicated in seed vigor and longevity by limiting the age induced ROS accumulation. *Scientific reports*, v.6, n. 35088, 2016.

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

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

SCHUCH, L.O.B.; KOLCHINSKI, E.M.; FINATTO, J.A. Qualidade fisiológica da semente e desempenho de plantas isoladas em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 01, p.144-149, 2009.

SCHWEIZER, T.F.; HORMAN, I. Purification and structure determination of three α -D-galactopyranosylcyclitols from soya bean. **Carbohydrate Research**, v. 95, n. 1, p. 61-71, 1981.

SEBASTIAN, S.A. et al. **Soybean germplasm with novel genes for improved digestibility**. In J.K. Drackley (ed.) Soy in animal nutrition. Federation of Animal Science Societies, Savoy, IL, 2000. p. 56-73.

SHERMAN-BROYLES, S. et al. The wild side of a major crop: Soybean's perennial cousins from Down Under. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 10, p. 1651–1665, 2014.

SPEARS, J. F.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Temperature during seed filing and soybean seed germination and vigor. **Seed Science and Technology**, v. 25, p. 233-244, 1997.

SUAREZ F.L. et al. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 1, p. 135-139, 1999.

SUGLIANI, M. et al. Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants abscisic acid insensitive3-5 (abi3-5) and leafy cotyledon1-3 (lec1-3). **New Phytol**, v. 184, p. 898–908, 2009.

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

USDA. United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acessado em 17, jul. 2019.

VALÁRIO, B.P. **Estudo da tolerância à dessecação e longevidade em sementes de soja (Glycine max (L.) MERR.)**. 2016, 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

VALENTINE, M. F. et al. Silencing of Soybean Raffinose Synthase Gene Reduced Raffinose Family Oligosaccharides and Increased True Metabolizable Energy of Poultry Feed. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. 16, p. 692, 2017.

VAN DIE, M. D. et al. Soy and soy isoflavones in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BJU international**, v. 113, n. 5b, 2014.

VANDECASTEELE, C. et al. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, n. 9, p. 1473–1487, 2011.

VERDIER, J. et al. A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 757-774, 2013.

WALTERS, C.; HILL, L. M.; WHEELER, L. J. Dying while Dry: Kinetics and Mechanisms of Deterioration in Desiccated Organisms. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 751–758, 2005.

WEBER, H; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–279, 2005.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1099–1108, 2000.

WILCOX, J. R.; SHIBLES, R. M. Interrelationships among seed quality attributes in soybean. **Crop Science**, v. 41, n. 1, p. 11–14, 2001.

XIE, L. et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for seed vigor in germination and seedling establishment in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 8, p. 749–759, 2014.

ZANAKIS, G.N.; ELLIST, R.H.; SUMMERFIELD, R.J. A comparison of changes in vigour among three genotypes of soyabean (*Glycine max*) during seed development and maturation in three temperature regimes. **Experimental agriculture**, Melbourne, v. 30, n. 2, p. 157-170, 1994.

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