

AMANDA RITHIELI PEREIRA DOS SANTOS

**ESTIMATIVA DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE SOJA E SUA RELAÇÃO
COM O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDATIVO**

Botucatu

2022

AMANDA RITHIELI PEREIRA DOS SANTOS

**ESTIMATIVA DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE SOJA E SUA RELAÇÃO
COM O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDATIVO**

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

Orientadora: Dra. Maria Márcia Pereira
Sartori.

Coorientador: Dr. Edvaldo Aparecido
Amaral da Silva.

Botucatu

2022

S237e Santos, Amanda Rithieli Pereira dos

Estimativa da longevidade de sementes de soja e sua relação com o sistema de defesa antioxidativo / Amanda Rithieli Pereira dos Santos. -- Botucatu, 2022
102 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientadora: Maria Márcia Pereira Sartori

Coorientadora: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

1. longevidade de sementes. 2. sistema de defesa antioxidativo. 3. deterioração. 4. sementes de soja. 5. armazenamento. 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 TESE: ESTIMATIVA DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE SOJA E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDATIVO

AUTORA: AMANDA RITHIELI PEREIRA DOS SANTOS

ORIENTADORA: MARIA MÁRCIA PEREIRA SARTORI

COORDENADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

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

Pesquisadora Dr.^a MARIA MÁRCIA PEREIRA SARTORI (Participação Virtual)
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu UNESP

Prof. Dr. ANDERSON RODRIGO DA SILVA (Participação Virtual)
Agronomia / Instituto Federal Goiano

Profa. Dra. RUTE QUELVIA DE FARIA (Participação Virtual)
Campus Urutaí / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Prof.^a Dr.^a KARINA RENOSTRO DUCATTI (Participação Virtual)
Campus Nova Andradina / Instituto Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. CLÁUDIO JOSÉ BARBEDO (Participação Virtual)
Centro de Pesquisas - Núcleo de Conservação da Biodiversidade / Instituto de Pesquisas Ambientais

Botucatu, 27 de abril de 2022

A minha amada mãe, Edeni,
carinhosamente chamada de onçona,
minhas irmãs oncinhas, meu noivo
amado e meus amados sobrinhos
João Gabriel, André Luiz,
Marianny e Pedro Bruno.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça de poder viver essa oportunidade, a ti, toda honra e glória.

À Santa Maria pela proteção diária.

Aos meus amados pais Edeni Pereira da Silva Nascimento e Marcus Vinicius Rodrigues do Nascimento (*in memoriam*), às minhas irmãs Stephanny Di Anny P. dos Santos e Renata Ohana P. dos Santos, à minha Tia Valdeni, por todo apoio e amor.

Ao meu noivo Álvaro Oliveira, por todo amor, cuidado, paciência e por dividir essa jornada linda da vida comigo.

Ao grupo do Laboratório de Análises de Sementes, nas pessoas de Ana Carolina Petronilio, Carolina P. Cardoso Carvalho, Dennis Souza, Gustavo Ferreira, Samara Moreira Perissato e Yago Triboni, à cada um que contribuiu compartilhando um pouco do seu conhecimento comigo, meu muito obrigada. Em especial ao Thiago Batista Barbosa e Larissa Chamma, por toda amizade, e ensinamentos compartilhados. A técnica do laboratório Valéria Cristina Giandoni, por todo o auxílio dedicado nas avaliações.

Ao grupo de Pesquisa Modelagem e Estatística Aplicada às Ciências Agrárias (ModelStat), pela consolidação da área e parceria em todos os trabalhos, aos estimados integrantes Brunna Rithielly Rezende, Gabriela Nunes da Piedade, Keyse Cristina Mendes Lopes, Michelane Silva Santos Lima, Mônica e Córdoba Figueroa e Pedro Moreno. Em especial à Brunna, Michelane e Gabi, vocês foram mais que colegas de doutorado, vocês foram amigas verdadeiras, que contribuíram em minha jornada acadêmica e pessoal, obrigada por tudo, por toda a dedicação e paciência nas atividades que realizamos nesses anos todos, eu amo muito vocês!

Ao Laboratório de Análises Bioquímicas – UNESP/IB, na pessoa do Prof. Dr. Fernando Broetto, por permitir a utilização da estrutura e por compartilhar conhecimento para a realização das análises dessa tese fossem realizadas. As integrantes do laboratório, Mara Lúcia Cruz de Souza e Tatiane Cristovam por auxiliarem e ensinarem com maestria como executar as análises, bioquímicas, e entender as suas cadeias de reações.

Às minhas amigas Amanda Maria de Almeida Silva, Alessandra Vieira da Silva, Mara Lúcia Cruz de Souza, Rute Quêlvia de Faria, por todo o amor, pelo carinho, pelo apoio e pelas melhores companhias, obrigada por serem minha família em Botucatu. Aos

meus diversos amigos feitos em Botucatu, presentes que a pós-graduação me deram, o meu muito obrigada!

À Professora Doutora Maria Márcia Pereira Sartori, pela orientação ao longo do mestrado e doutorado, por todos os ensinamentos compartilhados sobre pesquisas de forma inovadora, estatística e matemática aplicada, pelo exemplo profissional, pessoal, pela paciência e amizade.

Ao Professor Doutor Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela coorientação e suas diversas contribuições, pela paciência, atenção e visão inovadora sobre a fisiologia de sementes.

Ao Professor Doutor Anderson Rodrigo da Silva pelos ensinamentos compartilhados, paciência em solucionar diversos questionamentos, e por aceitar participar da banca de defesa. Obrigada, por tudo, você sabe quanto eu admiro você e seu trabalho.

Aos professores e pesquisadores que aceitaram participar dessa banca de defesa, por todas as contribuições realizadas para a melhoria desse texto.

Ao Pesquisador Roberto Sinício pelos esclarecimentos sobre suas metodologias para realização de parte do estudo das metodologias estudadas nesse trabalho.

A Professora Fiona H. Ray por todo o auxílio, tempo e paciência dedicados para compartilhar a importância das previsões para o monitoramento dos bancos de conservação em torno do mundo.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Adriana, Acir, Débora, Regina e Tainan, por auxiliarem em todas as demandas com relação à pós-graduação, por todos os esclarecimentos e por toda paciência.

A funcionária do Departamento de Produção Vegetal, Eliane, obrigada por tudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Agricultura) pela oportunidade em realizar o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio de bolsa de pesquisa (Processo nº 2018/25698-4).

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo.

“Life is not just about to survive.It’s about making difference!”

Emerson, K. **Lost in Space**: Infinity's Edge.
New York: Little, Brown and Company, 2020.

RESUMO

As sementes podem envelhecer de forma natural ou artificial durante o armazenamento, sendo sua viabilidade ao longo do tempo avaliada e denotada por longevidade. Durante esse processo os ciclos de reações oxidativas sugerem como as células estão se comportando diante do estresse para que ocorra a manutenção de sua vida. Assim, tão importante quanto entender como as sementes estão envelhecendo é a correta predição desse evento. De tal modo, neste trabalho o objetivo no Capítulo 1 foi de equacionar o desvio padrão da frequência (σ) de distribuição de sementes de soja durante o armazenamento em diferentes ambientes utilizando a função usual Probit, comparando-as com as funções Cauchy-Santos-Sartori-Faria (Cauchy-SSF) e Logit, na determinação do P50 e dos coeficientes da equação da viabilidade (K_E , C_W , C_H , C_Q) e determinando o modelo que permite maior precisão. No Capítulo 2, foi de compreender a deterioração e como os sistemas de defesa antioxidativo estão atuando durante o armazenamento de sementes de soja em diferentes ambientes. Para isso, 5 cultivares comerciais: BRS 6979 IPRO, 7677 RSF IPRO, 8473 RSF RR, 8579 RSF IPRO, e M7119 IPRO, foram previamente estudadas quanto à viabilidade, germinação, e teor de água durante o armazenamento nos ambientes de 15°C e 50% Umidade Relativa (UR), e 35°C e 75% UR, para a variação nas temperaturas de 30°C e 60% UR, 30°C e 70% UR, 35°C e 75% UR, 35°C e 80% UR, 42°C e 65% UR e 42°C e 70%, foram selecionadas as cultivares BRS 6979, 8473 e M7119, de acordo com o comportamento fisiológico. Para as análises bioquímicas durante o armazenamento foram coletados pontos de interesse fisiológico para avaliação de Proteína Solúvel Total (PST), Teor de Açúcar Solúvel Total (AST), enzimas relacionadas com o SRA – Sistema de Resposta Antioxidativo: Atividade da Enzima Peroxidase (POD), Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) e peroxidação lipídica pelo Teor de Malonaldeído (MDA). As funções de Cauchy-SSF e Logit são melhores que Probit para predição do P_{50} dos lotes para a faixa de temperatura de 15°C a 35°C em ambientes de 50% a 80% de umidade relativa do ar de armazenamento das sementes. As funções Cauchy-SSF e Logit não são recomendadas para estimação dos coeficientes de viabilidade segundo Ellis e Roberts (1980), entretanto a função de Cauchy-SSF foi a que obteve os ajustes mais precisos para esses coeficientes. Durante o armazenamento a atividade de SOD e POD não são contínuas e variam em função da resposta ao nível

de estresse do envelhecimento. Lotes de sementes de soja com alto teor de Proteína Solúvel Total podem indicar sementes com nível de envelhecimento e deterioração mais avançados. Lotes que apresentem o segundo pico do Teor de Malonaldeído acima de 105,0 nmol.g⁻¹ são passíveis de lotes de sementes inviáveis.

Palavras-chave: *Glycyne max*; armazenamento de sementes; P₅₀; sistema antioxidativo.

ABSTRACT

Seeds can age naturally or artificially during storage, and their viability over time is evaluated and denoted by longevity. During the storage process, the cycles of oxidative reactions suggest how cells are behaving in the face of stress so that the maintenance of their life occurs. Thus, as important as understanding how seeds are aging is the correct prediction of this event. Thus, in this work the objective in Chapter 1 was to equate the standard deviation of the frequency (σ) of soybean seed distribution during storage in different environments using the usual Probit function, comparing them with the functions Cauchy-Santos-Sartori-Faria (Cauchy-SSF) and Logit, in the determination of the P50 and the coefficients of the viability equation (K_E , C_W , C_H , C_Q) and determining the model that allows greater accuracy. Chapter 2, was to understand the deterioration and how antioxidative defense systems are acting during the storage of soybean seeds in different environments. For this, five commercial cultivars: BRS 6979 IPRO, 7677 RSF IPRO, 8473 RSF RR, 8579 RSF IPRO, and M7119 IPRO, were previously studied when to viability, germination, and water content during storage in 15°C environments and 50% Relative Humidity (RH), and 35°C and 75% RH, for the variation in temperatures of 30°C and 60% RH, 30°C and 70% RH, 35°C and 75% RH, 35°C and 80% RH, 42°C and 65% RH and 42°C and 70%, cultivars BRS 6979, 8473 and M7119 were selected, according to physiological behavior. For biochemical analyses during storage, physiological points of interest were collected for evaluation of Total Soluble Protein (PST), Total Soluble Sugar Content (AST), enzymes related to SRA - Antioxidative Response System: Activity of the Enzyme Peroxidase (POD), Activity of the Enzyme Superoxide Dismutase (SOD) and lipid peroxidation by malonaldehyde content (MDA). The Cauchy-SSF and Logit functions are better than Probit for p50 prediction of lots for temperature range from 15°C to 35°C in environments of 50% to 80% relative humidity of seed storage air. The Cauchy-SSF and Logit functions are not recommended for estimating the viability coefficients according to Ellis and Roberts (1980), however, the Cauchy-SSF function was the one that obtained the most accurate adjustments for these coefficients. In the storage, the activity of SOD and POD are not continuous and vary depending on the response to the stress level of aging. The soybean seeds lots with high total soluble protein content may indicate seeds with more advanced aging and deterioration level.

Lots with the second peak of malonaldehyde content above 105.0 nmol.g⁻¹ are susceptible to unviable seed lots.

Keywords: *Glicyne max.*; seed's storage; P₅₀; antioxidant system.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - CAUCHY-SSF, LOGIT PARA OTIMIZAÇÃO DAS EQUAÇÕES DE VIABILIDADE DE SEMENTES DE SOJA

- Tabela 1 - Soluções salinas utilizadas em função da temperatura e umidade relativa para obtenção dos ambiente de armazenamento 36
- Tabela 2 -Definição dos tratamentos em função das Cultivares, Temperaturas (°C) e Umidade Relativa do ar (UR) estudadas 37
- Tabela 3 - Funções de ligação e seus respectivos modelos. 37
- Tabela 4 - Teor de água (b.u), Intervalo de Interesse Experimental para P50 (IIE50), Percentual de Contagem do IIE50 e Total de (dias) para completa perda de Primeira contagem de plântulas da germinação, Germinação e Viabilidade para os tratamentos estudados 42
- Tabela 5 - Funções de Probit, Cauchy-SSF e Logit e seus respectivos valores de Ki, desvio (σ), P_{50} , Coeficiente de determinação (R^2), Coeficiente de determinação Ajustado (R^2 Aj.), Critério de Informação de Akaike (AIC), Critério de Informação Bayseano (BIC), Durbin-Watson (D-W), Teste de Shapiro Wilk (W), para dados de Viabilidade para os tratamentos de 1 a 12 em função das Cultivares, Temperaturas (°C) e Umidade Relativa do ar estudadas.....51
- Tabela 6 - Funções de Probit, Cauchy-SSF e Logit e seus respectivos valores de Ki, desvio (σ), P_{50} , Coeficiente de determinação (R^2), Coeficiente de determinação Ajustado (R^2 Aj.), Critério de Informação de Akaike (AIC), Critério de Informação Bayseano (BIC), Durbin-Watson (D-W), Teste de Shapiro Wilk (W), para dados de Viabilidade para os tratamentos de 13 a 23 em função das Cultivares, Temperaturas (°C) e Umidade Relativa do ar (UR) estudadas. 52

CAPÍTULO 2 - METABOLISMO ANTIOXIDATIVO PARA AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE SOJA

- Tabela 1 - Soluções salinas utilizadas em função da temperatura e umidade relativa para obtenção dos ambientes de armazenamento.....66
- Tabela 2 - Tratamento, Código da cultivar utilizada, Temperatura (°C), Umidade Relativa do ar (%) e tempo (Dias). 66
- Tabela 3 - Valores de Germinação média (%) e Viabilidade média (%) para as cultivares BRS 6979 (1), 7677 (2), 8473 (3), 8579 (4), M7119 (5), em função dos tratamentos avaliados.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de Componentes Principais
AST	Teor de Açúcar Solúvel Total
AIC	Critério de Informação de Akaike
BIC	Critério de Informação de Bayseano
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
b.u	Base úmida
CAT	Atividade da Enzima Catalase
Cauchy-SSF	Cauchy-Santos-Sartori-Faria
CP	Componente Principal
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
MDA	Teor de Malonaldeído
PST	Proteína Solúvel Total
POD	Atividade da Enzima Peroxidase
SRA	Sistema de resposta antioxidativo
SOD	Atividade da Enzima Superóxido Dismutase
UR	Umidade Relativa do ar

LISTA DE SÍMBOLOS

σ	Desvio padrão da distribuição normal das mortes de sementes no tempo
$\approx$	Aproximadamente
R^2	Coeficiente de Determinação
R^2 Aj.	Coeficiente de Determinação Ajustado
LiCl	Cloreto de Lítio
KCl	Cloreto de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
μ M	Micro Molar
mM	Mili Molar
M	Molar
IIE ₅₀	Intervalo de Interesse Experimental de P ₅₀
P ₅₀	Período para o decréscimo de 50% da viabilidade de um lote

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
CAPÍTULO 1 - CAUCHY-SSF, LOGIT PARA OTIMIZAÇÃO DAS EQUAÇÕES DE VIABILIDADE DE SEMENTES DE SOJA	31
1.1 INTRODUÇÃO	33
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1.2.1 MATERIAL VEGETAL – SEMENTES.....	34
1.2.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS	35
1.2.2.1 TEOR DE ÁGUA.....	35
1.2.2.2 GERMINAÇÃO.....	35
1.2.2.3 ESTUDO DA LONGEVIDADE	35
1.2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
1.2.4 MODELOS UTILIZADOS PARA TRANSFORMAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA.....	37
1.2.5 EQUACIONAMENTO DO DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DE SEMENTES MORTAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO	37
1.2.6 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DA EQUAÇÃO DE VIABILIDADE	38
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1.4 CONCLUSÕES.....	56
1.5 REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 2 - METABOLISMO ANTIOXIDATIVO PARA AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE SOJA	61
2.1 INTRODUÇÃO.....	63
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	64
2.2.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS	65
2.2.2.1 TESTE DE GERMINAÇÃO	65
2.2.2.2 ESTUDO DA LONGEVIDADE	65
2.2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	67
2.2.3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	67

2.2.3.2	EXTRATO BRUTO	68
2.2.3.3	TEOR DE PROTEÍNA SOLÚVEL TOTAL	68
2.2.3.4	ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD, E.C 1.15.1.1)	68
2.2.3.5	ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE (POD, EC 1.11.1.7).....	69
2.2.3.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES SOLÚVEL TOTAL.....	69
2.2.3.7	ESTIMATIVA DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS - TEOR DE MALONALDEÍDO (MDA).....	69
2.2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	70
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2.4	CONCLUSÕES	91
2.5	REFERÊNCIAS	92
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE	102

INTRODUÇÃO GERAL

Longevidade, armazenamento e envelhecimento de sementes

A preservação das espécies é uma garantia de manter informações sobre nossa biodiversidade genética. Bancos de germoplasma, também denominados bancos de sementes (SOLBERG et al, 2020) são responsáveis por administrar essas coleções. Existem mais de 1750 bancos de germoplasma em torno do mundo com mais de 7,4 milhões de acessos (FAO, 2010). Sabe-se que um dos maiores desafios para a gestão dos bancos genéticos é a manutenção da boa saúde das sementes nas coleções (REDDEN; PARTINGTON, 2019). Para uma manutenção dos bancos com menor perda de biodiversidade, antes que os acessos atinjam o 85% (P_{85}) de viabilidade, (ou quando a quantidade de sementes remanescentes for inferior ao necessário para três sementeiras de uma população representativa dos acessos) (FAO, 2014), essas coleções são regeneradas.

O comportamento dos processos de deterioração e envelhecimento das sementes são importantes para se definir metodologias que permitam que a modelagem dos eventos biológicos seja matematicamente descrita, de modo que sejam definidos os melhores momentos para a regeneração de coleções com segurança e sem perdas de biodiversidade.

A longevidade de sementes é por definição o período máximo de tempo que as sementes se mantêm viáveis sob condições ideais de armazenamento para cada espécie. É a habilidade que a semente tem de estabilizar seu sistema biológico por longos períodos de tempo, no qual sua atividade metabólica é suspensa, estado vítreo, retardando-se severamente, reações de deterioração (DONA et al., 2013), sendo considerada como o maior desafio para a manutenção da biodiversidade de plantas (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008).

A deterioração de sementes é discriminada por um conjunto em série de alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, a partir da maturidade, em ritmo progressivo, determinado e irreversível (McDonald, 1999), de queda do potencial de desempenho (germinação, vigor e longevidade) culminando com a inviabilização e até a morte da semente (MARCOS FILHO, 2015), onde diferentes espécies de

sementes têm diferentes taxas de deterioração, as diferenças em nível de deterioração que ocorrem entre e dentro delas pode variar amplamente em razão de fatores genéticos e das condições ambientais em que as sementes foram produzidas, secadas, beneficiadas e armazenadas (BEWLEY; BLACK; HOLMES, 2006).

Em sementes de soja, a longevidade é adquirida ao final do desenvolvimento das sementes, maturação tardia (LIMA, 2017), momento ao qual também são adquiridos a massa final, germinação, tolerância a dessecação e vigor (RIGHETTI et al., 2015). Durante a fase de maturação ocorre a redução natural e de forma progressiva de água pelas sementes, o que induz a formação do estado vítreo citoplasmático, matriz amorfa semelhante a um estado sólido, no qual a mobilidade e o nível de fluidez das moléculas são reduzidos, impondo um estado de quiescência e proporcionando longevidade (BUIKINK; LEPRINCE, 2008). Sementes em estado de quiescência resistem às condições ambientais adversas e, no momento que forem expostas às condições adequadas e na ausência de dormência, têm a capacidade de retomada do metabolismo no processo de germinação (BEWLEY; BLACK, 1994).

A propriedade de estado vítreo ocorre em função da natureza do comportamento da água dentro das células (MARCOS FILHO, 2015), e suas reações de afinidade e repulsão com tecidos de reservas (LORINI, 2018), assim, as propriedades inerentes das sementes, como a capacidade que as sementes têm de perder e ganhar água, adquirida pelas relações de dessecação ao final da fase de maturação das sementes são fatores importantes no estudo da longevidade. Outro aspecto muito importante que deve ser observado é a longevidade natural das sementes. Esta característica, intrínseca da semente, varia entre as espécies: enquanto sementes de algumas espécies permanecem viáveis durante anos após sua maturação, outras espécies perdem rapidamente essa viabilidade (HOPPE et al., 2004). Sementes de soja são consideradas naturalmente como uma espécie de longevidade curta.

Ao final da fase de maturação das sementes, a configuração da perda de água as categoriza em sementes em ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes (MARCOS-FILHO, 2015). Sementes ortodoxas (ou tolerantes) mantem sua viabilidade após o processo de secagem em teores de água de até 5%. Podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por longos períodos (ROBERTS, 1973). Sementes ortodoxas aumentam sua longevidade gradativamente durante a maturação após a aquisição da tolerância à dessecação (VERDIER et al., 2013). Sementes recalcitrantes ou não

tolerantes à dessecação são sensíveis à redução excessiva do teor de água, reduzindo a viabilidade e dificultando o armazenamento por longo prazo (ROBERTS, 1973). Sementes intermediárias não seguem as classificações dos padrões de tolerantes e não tolerantes, consistem em sementes que toleram a perda de água até teores de 7 a 10% e não toleram baixas temperaturas por longos períodos, cujo comportamento durante a secagem e armazenamento apresenta características variáveis (ELLIS et al. 1990).

O teor de água das sementes é dado em função do equilíbrio das pressões de vapor do ar do ambiente e da semente, denominado de equilíbrio higroscópico. Sendo essa, a representação da igualdade de transferência de água, em forma de vapor, da semente para o ambiente ou mutuamente (CARVALHO, 2005). A pressão de vapor é influenciada pelo comportamento do ambiente, ao seu redor, relações de umidade relativa do ar e temperatura (CARNEIRO; AGUIAR, 1993). De tal modo que, o equilíbrio higroscópico é atingido com maior rapidez sob altas temperaturas (HARRINGTON, 1972; TOLEDO; MARCOS FILHO, (1977).

Em razão disto, foram criadas regras para o armazenamento, como a Regra de James, que adota que o somatório entre umidade relativa do ar (%) e temperatura (em Fahrenheit, °F) não devem totalizar mais que 100, para armazenamento comercial satisfatório (prazo médio). Enquanto, a regra de Harrington (HARRINGTON, 1972; COLVILLE, 2017) afirma que a viabilidade no armazenamento irá aproximadamente dobrar para cada diminuição de 10 °F (equivalente a 5,6 °C) na temperatura, e cada 1% de redução no teor de umidade das sementes para temperaturas entre 0 e 40 °C e teor de umidade entre 5 e 14% b.u. Ambas as regras enfatizam a importância de utilizar-se baixos teores de umidade e temperatura para o prolongamento da longevidade de sementes.

Condições eficazes para o ambiente de armazenamento de sementes compreendem na combinação de Umidade Relativa (UR) e temperatura (°C) em faixas de 10 a 50% UR e de 0 a 10°C (HARTMANN; KESTER, 1974; KANO et al., 1978). Ressalta-se que, a temperatura apropriada para o armazenamento dependerá do período de armazenamento e da espécie. Para períodos curtos são recomendadas temperaturas entre 0 e 5°C, enquanto que para longos períodos as mais recomendadas são entre -4°C e -18°C (WANG, 1977) sendo que Toledo e Marcos Filho (1977) sugerem teores de umidade para conservação de diferentes espécies

pelo período de 1 ano, entre 11 e 14%, observando-se a redução da percentagem de germinação à medida em que aumenta o teor de umidade das sementes.

Para uma longevidade maior é necessário a combinação de um armazenamento adequado, visto que ambos são complementares. Em bancos de germoplasma, o armazenamento de sementes é a preservação de sementes sob condições ambientais controladas que prolongarão a viabilidade das sementes por longos períodos (SOLBERG et al, 2020). Em níveis comerciais, o armazenamento compreende na diminuição ao máximo das taxas de deterioração até a próxima comercialização. Além de fatores que afetam a longevidade o armazenamento é influenciado pela qualidade inicial das sementes; teor de umidade da semente; tempo decorrido entre colheita e armazenamento; tratamentos fitossanitários e térmicos aplicados; tipo de embalagem; temperatura e umidade relativa de armazenamento (FLORIANO, 2004).

O armazenamento das sementes deve ser iniciado o mais próximo possível da maturidade fisiológica das sementes (CROCHEMORE, 1993). As características fisiológicas das espécies determinam a temperatura e os teores de umidade ideais para o armazenamento (HARRINGTON, 1972; CARVALHO et al., 1976; CARVALHO; NAKAGAWA, 1983; PINTO et al., 1988). Conserva-se germinação e o vigor das sementes dentro dos limites fisiológicos das espécies, por meio do armazenamento em ambiente frio e seco (HARRINGTON, 1959). Além de se considerar as condições climáticas é necessário a utilização de embalagens adequadas observando as características mecânicas das mesmas (CARVALHO E NAKAGAWA, 2000; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; MARCOS-FILHO, 2005). Embora tudo isso, mesmo quando armazenadas em condições ideais, todas as sementes acabarão perdendo sua viabilidade (ZHANG et al., 2021).

As reações químicas são sempre dependentes do teor de água e da temperatura (SOLBERG et al, 2020). Conforme as sementes envelhecem, em algum ponto perdem sua capacidade de germinar e formar "plântulas normais", ou seja, plântulas que têm a capacidade de formar plantas viáveis. Ainda em decorrência desse envelhecimento, as membranas perdem a permeabilidade seletiva, as enzimas tornam-se menos eficientes e os cromossomos podem acumular aberrações (PRIESTLEY, 1986; SMITH, BARJARK, 1995; McDONALD, 1999).

Durante todas as fases do desenvolvimento de sementes desde a embriogênese até o armazenamento, podem ser associadas com diferentes níveis de

espécies reativas de oxigênio - EROS (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). As espécies reativas de oxigênio são um dos subprodutos da respiração aeróbica (BAILLY, 2004; COLVILLE, 2017). EROS em baixas concentrações nas sementes servem como importantes sinalizadoras de germinação e proteção contra patógenos (APEL e HIRT, 2004; WASZCZAK et al., 2018). A diminuição da germinabilidade é correlacionada com o aumento do acúmulo de peróxido total e conteúdo de malonaldeído, bem como a diminuição da atividade das enzimas antioxidativas peroxidase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase (GOEL; GOEL; SHEORAN, 2003). A produção de espécies reativas de oxigênio aumenta em resposta ao estresse ambiental (SOUZA, 2018; COLVILLE, 2017).

Equacionamento da viabilidade de sementes

Com intuito de modelar a perda de viabilidade das sementes ao longo do armazenamento, modelos foram desenvolvidos para prever a viabilidade final com base na viabilidade inicial, temperatura e teor de água umidade.

Roberts (1972) foi um dos primeiros a analisar quantitativamente os padrões de perda de viabilidade da semente durante o armazenamento, onde observou que a perda de viabilidade geralmente seguia um padrão sigmoidal e reconheceu que esse comportamento poderia estar relacionado a uma distribuição normal de vidas entre as sementes na população, no qual transformando essa curva em uma linear com modelo de probit desenvolveu as 3 primeiras relações da viabilidade e armazenamento.

A primeira relação linear predizia o período que um lote perderia 50% de sua viabilidade (P50), bem como a determinação dos coeficientes de armazenamento para cada espécie, melhorados e ampliados por Ellis e Roberts (1980) para uma ampla gama de espécies conforme equação 1.

$$v = K_i - p\left(\frac{1}{\sigma^{10} \frac{KE - CW \log m - CH_t - CQ_{t^2}}{t^2}}\right)$$

Em que;

v = percentual da viabilidade das sementes em Probit, após o armazenamento no tempo p ;

p = período de armazenagem em dias;

K_i = valor de Probit da viabilidade inicial, ou seja, o ponto de interceptação do eixo das ordenadas (y) da curva de sobrevivência transformada; o que implica também dizer que, quando $p = 0$; $K_i = v$;

$1/\sigma$ = inclinação da curva de sobrevivência transformada, onde σ é o desvio padrão da frequência de distribuição das sementes mortas durante o período de armazenamento (dias);

m = grau de umidade (% , base úmida);

t = temperatura ($^{\circ}\text{C}$); e

K_E , C_W , C_H e C_Q = constantes específicas para cada espécie, independentes do genótipo e das condições de pré-armazenamento.

A partir do desvio da frequência de sementes mortas (σ) foi possível determinar os parâmetros específicos para as condições de armazenamento avaliadas e prever estendendo para maiores combinações de condições de armazenamento. Definiu-se através dessa equação o comportamento considerado como padrão, redução da viabilidade durante o armazenamento, ou que a curva de sobrevivência de todas as sementes apresentaria uma mesma inclinação. Ainda, conclui-se que a longevidade poderia ser calculada com base em três fatores únicos: o teor de água das sementes, a temperatura de armazenamento e um valor de interceptação específico do lote de sementes (ELLIS; ROBERTS, 1980).

Essa equação permitiu a predição da longevidade para uma ampla gama de mais de 53 espécies (ELLIS; HONG, 2007). Embora os coeficientes da viabilidade tenham sido introduzidos sem muitos esclarecimentos (SINÍCIO, 2004; SINÍCIO et al., 2019; SINÍCIO, 2013; SINÍCIO, 2015) e terem intervalos de confiança grandes, esta metodologia ainda é utilizada em bancos de germoplasma devido a sua simplicidade de utilização (SOLBERG et al, 2020).

Os comportamentos de diversas espécies podem não atender ao comportamento desejado para aplicação da metodologia usual, e com intuito de se estabelecer novas metodologias para assegurar a sobrevivência e a redução da vulnerabilidade à extinção de espécies, são necessárias aplicações e desenvolvimento de novas metodologias, ou utilização de novas funções aplicadas a esses comportamentos.

São relatados por diversos autores como Schneider et al. (2017), Hay, Mead e Bloomberg (2014), Hill et al., (2007), Chaves e Usberti, 2003, Tang et.al (1999), Mead e Gray (1999), restrições na utilização da função probit, tanto para a predição dos coeficientes de viabilidade para espécies diversas, como problemas na utilização do modelo em si.

Solberg et al (2020) comparando a germinação prevista com os resultados dos experimentos de longo prazo, pelo método de Ellis e Roberts (1980) observou que os valores previstos foram superiores ou muito superiores aos valores observados, o que demonstra que algo no manejo de sementes nos bancos de germoplasma pode ser melhorado.

Predição da longevidade por novas metodologias

A estimação do período de decréscimo de 50% da viabilidade (P_{50}) foi estudado pela utilização da transformação das curvas de distribuição de sementes no armazenamento por funções de ligação simétricas de Logit (FARIA et al, 2020; SARTORI et al., 2017) e Cauchy-SSF em metodologia de predição utilizando mínimos quadrados - regressão linear simples e máximo verossimilhança - modelos lineares generalizados (SANTOS et al, 2019) e funções de ligação assimétricas de Aranda-Ordaz, Complementar Log-Log, Logarítmica, Stukel, Weibull e Potência (Santos, 2018), utilizando o método de estimação de mínimos quadrados pela análise regressão linear simples. Tais funções obtiveram vantagens em relação a usual Probit para a estimação do P_{50} .

Essas funções são alternativas viáveis para a determinação do P_{50} da longevidade de sementes de soja, de forma mais assertiva, e que podem ser aplicadas a uma ampla gama de espécies, além de serem funções que sugerem estimativas mais robustas que Probit e para dados que não seguem normalidade.

A aplicação das funções Logit e Cauchy-SSF foi validada por Lima (2021) estudando a influência de sementes de soja esverdeadas para predição do P_{50} e por Lopes (2021) predizendo o P_{50} por meio de análise de parâmetros bioquímicos de sementes de soja, bem como para predição da germinação de sementes de mamona de diversos acessos (T_{50}) (SIQUEIRA, 2020).

Análises fisiológicas de sementes tem sido estudada como alternativas, relativamente mais rápidas comparadas aos experimentos de longevidade, como

testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e têm sido associada para determinar o P_{50} (BATISTA et al., 2021).

A utilização de Regressão Linear Múltipla (MLR) e de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para a predição da longevidade também foi investigada, e se mostrou eficiente predição da longevidade de sementes de soja (REZENDE, 2021), sendo utilizadas diferentes análises biométricas e fisiológicas rotineiras em laboratórios de sementes para sua predição.

Outras adaptações para o modelo de Probit (ELLIS; ROBERTS, 1980) já foram difundidas, para prever a longevidade das sementes ortodoxas que foi modificado por Sinício (2004) tornando-se um modelo de longevidade generalizado baseado na composição das sementes, no qual leva-se em consideração uma análise de erro para determinar as incertezas envolvidas no modelo de Probit em sementes de grão-de-bico, vaqueiro e soja.

Espera-se que utilização de novos modelos para determinação da longevidade implicará em equacionamentos mais robustos para além da longevidade, o desvio de morte das sementes (σ) e seus coeficientes (K_E , C_W , C_H , C_Q).

De tal modo nesse trabalho objetivo no Capítulo 1 consistiu em equacionar o desvio padrão da frequência (σ) de distribuição de sementes de soja e P_{50} durante o armazenamento em diferentes ambientes utilizando a função usual Probit, comparando-as com as funções de Cauchy-SSF e Logit, na determinação dos coeficientes K_E , C_W , C_H , C_Q e determinar o modelo que permite maior precisão. O objetivo no Capítulo 2 foi compreender a deterioração das sementes durante a longevidade antes da perda da capacidade germinativa, inviabilidade, e como os sistemas de defesa antioxidativo estão atuando durante a longevidade de sementes de soja em diferentes ambientes de armazenamento.

CAPÍTULO 1

CAUCHY-SSF, LOGIT PARA OTIMIZAÇÃO DAS EQUAÇÕES DE VIABILIDADE DE SEMENTES DE SOJA

Resumo

A utilização de diferentes funções para predizer a longevidade pode permitir um intervalo de predição e regeneração mais adequado para lotes de sementes. De tal modo, neste trabalho o objetivo foi de equacionar o desvio padrão da frequência (σ) de distribuição de sementes de soja durante o armazenamento em diferentes ambientes utilizando a função usual Probit, comparando-as com as funções Cauchy-Santos-Sartori-Faria (Cauchy-SSF) e Logit, na estimação do P_{50} e dos coeficientes K_E , C_W , C_H , C_Q e selecionar o modelo que permite maior precisão. Para isso, 5 cultivares comerciais: BRS 6979 IPRO, 7677 RSF IPRO, 8473 RSF RR, 8579 RSF IPRO, e M7119 IPRO, foram previamente estudadas quanto à viabilidade, germinação, e teor de água durante o armazenamento nos ambientes de 15°C e 50% Umidade Relativa (UR), e 35°C e 75% UR, para a variação nas temperaturas de 30°C e 60% UR, 30°C e 70% UR, 35°C e 75% UR, 35°C e 80% UR, 42°C e 65% UR e 42°C e 70%, foram selecionadas as cultivares BRS 6979, 8473 e M7119, de acordo com o comportamento fisiológico. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições. A estimação do P_{50} para todos os ambientes foi realizada a partir das curvas de viabilidade e a estimação dos coeficientes K_E , C_W , C_H , C_Q , foi realizada por regressão linear múltipla, a partir das equações lineares obtidas para estimação do P_{50} , utilizando as funções de ligação utilizadas foram a usual Probit, Cauchy-SSF e Logit, para ambas estimatórias. As funções de Cauchy-SSF e Logit são melhores que Probit para predição do P_{50} dos lotes para a faixa de temperatura de 15°C a 35°C e 50% a 80% UR. As funções Cauchy-SSF, Logit e Probit, não obtiveram coeficiente de determinação adequado para serem utilizadas para a predição dos coeficientes da equação da viabilidade segundo a metodologia de Ellis e Roberts (1980), embora a Cauchy-SSF tenha obtido o maior r^2 Ajustado. Sugere-se maiores estudos para o desenvolvimento de modelos generalizados para predição de viabilidade ao longo do armazenamento de sementes.

Palavras-chave: *Glycine max*; longevidade; armazenamento; P_{50} .

Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Seed Science Research**

CAUCHY-SSF, LOGIT TO OPTIMIZATION OF SOYBEAN SEEDS VIABILITY EQUATIONS

Abstract

The different functions to predict longevity may allow a better estimate of prediction and regeneration interval for seed lots. Thus, the objective of this study was to equate the standard deviation of the frequency (σ) of distribution of soybean seeds during storage in different environments using the usual Probit function, comparing them with the Cauchy-Santos-Sartori-Faria (Cauchy-SSF) and Logit functions, in determining the coefficients K_E , C_W , C_H , C_Q and determining the model that allows greater robustness. For this, five commercial cultivars: BRS 6979 IPRO, 7677 RSF IPRO, 8473 RSF RR, 8579 RSF IPRO, and M7119 IPRO, were studied when germination, and water content during longevity in environments from 15°C to 42°C Celsius degrees, 50 to 80% Relative Humidity (RH), respectively. The design was completely randomized, the estimation of the coefficients K_E , C_W , C_H , C_Q , was performed by multiple linear regression, from the linear equations (P_{50}) obtained for each temperature and relative humidity, for Cauchy-SSF, Logit and Probit. The Cauchy-SSF and Logit functions are better than Probit for P_{50} 's prediction for the temperature range of 15°C to 35°C in environments of seeds storage 50% to 80% RH. Cauchy, Logit, and Probit functions are not suitable for estimating the feasibility coefficients according to the methodology of Ellis and Roberts (1980). Further studies have suggested the studies of generalized models for predicting viability during seed storage.

Key-words: *Glycine max*; longevity; storage; P_{50} .

1.1 INTRODUÇÃO

O estudo da longevidade de sementes, tem como foco a compreensão de como as sementes estão morrendo e predizer quando esse evento ocorrerá. A longevidade é por definição o tempo que as sementes são capazes de se manterem viáveis em condições ideais para a espécie (DONA et al, 2013), é uma característica altamente plástica (LUSTY *et al.*, 2021), afetada por fatores como o ambiente durante a produção das sementes, o momento da colheita das sementes e como as sementes são processadas após a colheita (HAY; PROBERT, 2013; LEPRINCE et al, 2016; RAO et al, 2017).

O seu equacionamento foi proposto inicialmente por Roberts (1972) e melhorado em Ellis e Roberts (1980), que ao aplicarem a transformação Probit aos dados de sobrevivência das sementes (Equação 1), obtém-se uma reta cujo o coeficiente de regressão é negativo, tal coeficiente é definido como sendo $1/\sigma$ (Equação 2).

$$v = K_i - p/\sigma \quad \text{Eq. 1}$$

$$\sigma = 10^{KE - CW \log m - CH_t - CQ_t^2} \quad \text{Eq. 2}$$

Em que;

v = percentual da viabilidade das sementes em Probit, após o armazenamento no tempo p ; p = período de armazenagem em dias; K_i = valor de Probit da viabilidade inicial, quando $p = 0$; $K_i = v$; $1/\sigma$ = inclinação da curva de sobrevivência transformada, onde σ é o desvio padrão da frequência de distribuição das sementes mortas durante o período de armazenamento (d); m = grau de umidade (% base úmida); t = temperatura (°C); e K_E , C_W , C_H e C_Q = constantes específicas para cada espécie, independentes do genótipo e das condições de pré-armazenamento.

Dentre as limitações de uso desse modelo, é que as equações se baseiam em constantes de temperatura e umidade específicas para cada espécie, necessitando serem geradas experimentalmente pelo envelhecimento das sementes sob várias combinações de condições de temperatura e umidade (COLVILLE, 2017). O equacionamento conforme já foi aplicado com sucesso para aproximadamente 53 espécies (ELLIS; HONG, 2007; HONG, LININGTON; ELLIS, 1996).

A relação logarítmica negativa com a longevidade de sementes, e seu teor de água em ambiente hermético, implicam em grandes consequências de erros e

influências, em qualquer componente ambiental de armazenamento pode afetar consideravelmente a estimativa de longevidade (ELLIS, 2022).

A estimação do período que a viabilidade do lote decai em 50% (P50) por diferentes funções como Logit (FARIA et al, 2019) Logit e Cauchy-SSF (SANTOS et al., 2019), implicaram em predições mais robustas do P50, possibilitando a aplicação mais assertiva na determinação deste parâmetro e introduzindo também uma nova metodologia de estimação além do método de mínimos quadrados que foram ajustes por modelos lineares generalizados. Sartori et al. (2017) avaliando sementes de soja e milho, verificou a possibilidade do uso da função Logit para determinação mais robusta do P₅₀. A necessidade da preservação dos recursos, por meio da correta predição da viabilidade, novas metodologias para assegurar a sobrevivência e a redução da vulnerabilidade à extinção de espécies se faz necessária (CHAVES; USBERTI, 2003). Schneider et al. (2017), Hay, Mead e Bloomberg (2014), Hill et al., (2007), Tang et.al (1999a), Mead e Gray (1999), relataram problemas no uso do modelo de Probit devido às limitações do modelo.

A utilização de diferentes funções pode permitir um intervalo de regeneração mais adequado, o que viabilizaria rotinas mais adequadas de gestão de bancos de germoplasma. De tal modo, neste trabalho o objetivo foi de equacionar o desvio padrão da frequência (σ) de distribuição de sementes de soja durante o armazenamento em diferentes ambientes utilizando a função usual Probit, comparando-as com as funções de Cauchy-Santos-Sartori-Faria e Logit, na determinação dos coeficientes K_E , C_W , C_H , C_Q e determinar o modelo que permite maior robustez.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Material Vegetal – Sementes

As sementes de soja produzidas em condições de campo foram colhidas na safra 2018/2019, no município de Campo Alegre de Goiás, Brasil. No total foram utilizadas sementes de 5 cultivares comerciais: BRS 6979 IPRO, 7677 RSF IPRO, 8473 RSF RR, 8579 RSF IPRO, e M7119 IPRO.

As sementes foram colhidas mecanicamente, beneficiadas e armazenadas em sacos de papel, levadas à câmara fria com temperatura e umidade relativa de 15°C e 50%±2, respectivamente.

Posteriormente, as sementes foram submetidas às análises fisiológicas.

1.2.2 Análises Fisiológicas

Para a avaliação dos parâmetros fisiológicos foram realizadas as seguintes análises de Teor de Água das sementes, Teste de Germinação e estudo da Longevidade, conforme metodologia a seguir:

1.2.2.1 Teor de Água

Determinado pelo método gravimétrico, utilizando estufa a 105°C ± 0,1°C por 24 horas, e 10 g de amostra em 3 repetições (BRASIL, 2009). Os resultados expressos em porcentagem (base úmida);

1.2.2.2 Germinação

A germinação foi conduzida com 50 sementes em 6 repetições, semeadas em papel tipo filtro umedecido com água na proporção da massa de 2,5:1, as quais foram mantidas em germinador, à temperatura de 25°C, as avaliações ocorreram no quinto e oitavo dia, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, anormais e protrusão>2mm.

1.2.2.3 Estudo da Longevidade

Inicialmente todos os lotes foram submetidos ao teste de longevidade em ambiente de temperatura de 35°C e 75% de umidade relativa do ar (UR) (LIMA, 2017). Dentre as 5 cultivares avaliadas foram selecionados 3 (BRS 6979, 8473, M7119), com base no desempenho inicial nas análises fisiológicas para avaliação da longevidade com variação em temperaturas de 30°C com 60 e 70% UR, 35°C com 75 e 80% UR, 42°C com 65 e 70% UR. O experimento com diversos ambientes ocorreu após 7

meses de armazenamento em condição de 15°C e 50% UR, do estudo inicial da longevidade.

Para a criação dos ambientes da longevidade, as sementes foram colocadas em caixas plásticas (10 x 15 x 5 cm) com selagem hermética sobre telas de tecido tule (Apêndice A), em cada unidade experimental/caixa colocou-se 600 sementes. No fundo das caixas continham soluções salinas, supersaturadas para Cloreto de Sódio e Potássio, e 30% de concentração para Cloreto de Lítio, conforme a Tabela 1. As caixas foram armazenadas em câmaras tipo BOD (do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*) em ambiente controlado em combinações com 60, 65, 70, 75, 80% de umidade relativa do ar à 30, 35, 40°C, com variação de $\pm 0,2$ para ambos. As avaliações ocorreram em intervalos regulares de dias enquanto houvesse viabilidade (adaptado SANTOS et al., 2019).

Tabela 1 - Soluções salinas utilizadas em função da temperatura e umidade relativa para obtenção dos ambientes de armazenamento

Ambiente		Solução Salina	Símbolo
Temperatura (°C)	Umidade Relativa do ar (%)		
30	60	Cloreto de Sódio	NaCl
30	70	Cloreto de Potássio	KCl
35	75	Cloreto de Sódio	NaCl
35	80	Cloreto de Potássio	KCl
42	65	Cloreto de Lítio	LiCl
42	70	Cloreto de Potássio	NaCl

Considerou-se o ambiente de 15°C e 50% UR como um ambiente de envelhecimento natural, como controle de longevidade para todas as amostras estudadas, realizando-se a germinação no tempo de armazenamento de 30 meses (938 dias).

1.2.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento. Os tratamentos consistiram na combinação de 3 cultivares, 4 temperaturas e 6 umidades relativa do ar, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Definição dos tratamentos em função das Cultivares, Temperaturas (°C) e Umidade Relativa do ar (UR) estudadas

Tratamento	Cultivar	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do ar (%)
1	BRS 6979 IPRO	30	60
2	8473 RSF RR	30	60
3	M7119 IPRO	30	60
4	BRS 6979 IPRO	30	70
5	8473 RSF RR	30	70
6	M7119 IPRO	30	70
7	BRS 6979 IPRO	35	75
8	7677 RSF IPRO	35	75
9	8473 RSF RR	35	75
10	8579 RSF IPRO	35	75
11	M7119 IPRO	35	75
12	BRS 6979 IPRO	35	75
13	8473 RSF RR	35	75
14	M7119 IPRO	35	75
15	BRS 6979 IPRO	35	80
16	8473 RSF RR	35	80
17	M7119 IPRO	35	80
18	BRS 6979 IPRO	42	65
19	8473 RSF RR	42	65
20	M7119 IPRO	42	65
21	BRS 6979 IPRO	42	70
22	8473 RSF RR	42	70
23	M7119 IPRO	42	70
24	BRS 6979 IPRO	15	50
25	7677 RSF IPRO	15	50
26	8473 RSF RR	15	50
27	8579 RSF IPRO	15	50
28	M7119 IPRO	15	50

1.2.4 Modelos utilizados para transformação das curvas de sobrevivência

Para o estudo das equações em diferentes ambientes de armazenamento

Tabela 3 - Funções de ligação e seus respectivos modelos.

Função de Ligação	Expressão	Equação
Probit	$f(p) = \Phi^{-1}(p)$	(3)
Cauchy-SSF	$f(p) = \tanh\left(\pi\left(p - \frac{1}{2}\right)\right)$	(4)
Logit	$f(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right)$	(5)

1.2.5 Equacionamento do desvio padrão da frequência de distribuição de sementes mortas durante o período de armazenamento

Foram determinados inicialmente pela equação 1, conforme Ellis e Roberts (1980), pela transformação dos dados por Probit, em sequência Foram realizados o mesmo método para as funções descritas na tabela 1, conforme Santos et al., (2019).

Para todos os dados transformados (para cada função) e ajustados pelo método de regressão linear que seja verificado qual propicia o equacionamento mais assertivo de P_{50} dentro da influência dos fatores temperatura e umidade relativa.

1.2.6 Determinação dos Coeficientes da Equação de Viabilidade

As equações obtidas nas combinações de temperatura e umidade relativa serão ajustadas por regressão linear múltipla, conforme Equação 2.

Os valores de σ e k_i selecionas pelos métodos descritos anteriormente serão substituídos na equação 1 para a obtenção dos coeficientes da equação de viabilidade K_E , C_W , C_H , C_Q em função da umidade relativa, temperatura e do teor de água.

1.2.7 Avaliadores da qualidade dos ajustes

Para avaliar a aplicabilidade dos modelos levou-se em consideração os processos biológicos, e a precisão dos ajustes foram de acordo com:

1.2.7.1 Teste de Durbin Watson

A presença de autocorrelação residual foi verificada com 5% de probabilidade.

1.2.7.2 Coeficiente de determinação ajustado (r^2_{Aj}) (CECON et al., 2012)

Dado por: $r^2_{Aj} = 1 - \left[\frac{(n-1)(1-r^2)}{n-q} \right]$, em que r^2 é o coeficiente de determinação não ajustado, n é o número de observações e q é o número de parâmetros do modelo.

1.2.7.3 Critério de Informação de Akaike (AKAIKE, 1974);

Dado por: $AIC = n \ln(SQL/n) + 2p$, em que SQR soma de quadrado do resíduo do modelo, p é o número de parâmetros do modelo, n é o tamanho da amostra.

1.2.7.4 Critério de Informação de Bayesiano

Dado por: $BIC = n \ln(SQL/n) + n \ln(p)$, em que SQR soma de quadrado do resíduo do modelo, p é o número de parâmetros do modelo, n é o tamanho da amostra.

Para seleção dos melhores modelos, considerou-se os avaliadores da qualidade dos ajustes combinados com a relação aos seus Intervalos de Interesse (II).

1.2.7.5 Intervalo de Interesse Experimental (IIE₅₀)

Com base na predição, Intervalo de interesse avalia o período em dias em que se obteve experimentalmente os valores percentuais estimados desejados. Para 50% de germinação do lote quando se estiver avaliando o P_{50} .

1.2.8 Análises computacionais

Todas as análises, para o presente trabalho, foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2021).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para compreender como o ambiente influencia na longevidade das sementes foram estudadas uma ampla faixa de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (UR), 15°C à 42°C, 50 a 80% UR, respectivamente, cujos são representados nas Figuras de 1 a 5. Os teores de água obtidos em base úmida (b.u.), o Intervalo de Interesse Experimental para P_{50} (IIE₅₀), o Percentual de Contagem do IIE₅₀ e Total em dias para: completa perda de Primeira Contagem de Plântulas da Germinação; Germinação; e Viabilidade; para os tratamentos de 1 a 28 em função das Cultivares BRS 6979, 8473 e M7119, Temperatura (°C) e Umidade Relativa do ar (UR) estudadas são apresentados na Tabela 4.

Os ambientes de avaliação propiciaram teores de umidade nas sementes na faixa de 7 a 14% b.u. (Tabela 4).

O primeiro ambiente de avaliação (câmara seca) consistiu na temperatura de 15°C e 50% UR para cinco cultivares BRS 6979, 7677, 8473, 8579 e M7119, essas cultivares apresentaram curvas de distribuição diferentes para as variáveis de germinação, primeira contagem e viabilidade durante 938 dias ($\approx$ 30 meses) de avaliação conforme podemos ver na Figura 1. Para esse ambiente o teor da água das cultivares foi de 7% base úmida (b.u.), com variação de $\pm$ 1% b.u.

A menor redução foi verificada para viabilidade dos lotes avaliados ao longo do armazenamento, seguida da germinação e primeira contagem de plântulas da germinação. Assim, como já relatado por autores como Carvalho e Nakagawa (2000), Bewley et. al (2013) e Marcos-Filho (2015).

A primeira contagem foi utilizada como base do vigor relativo dos lotes (NAKAGAWA, 1999). A cultivar BRS 6979 (Figura 1-A) teve o menor vigor relativo, seguido das cultivares 8579 (Figura 1-D), M7119 (Figura 1-E), 8473 (Figura 1-C) e 7677 (Figura 1-B). A maior redução em germinação foi observada para cultivar 8579, de 41%, chegando ao intervalo de interesse de 50% de germinação, ao final dos 30 meses de avaliação. A cultivar 7677 (Figura 1-B), foi a cultivar que obteve menor redução em todos os percentuais avaliados.

Após o período de 30 meses, a viabilidade (protrusão maior que 2 mm) dos lotes permaneceu acima de 90%, as cultivares BRS 6979, 7677 e 8473 mantiveram-se com 96%, 8579 manteve-se com 92% e a cultivar M7119 manteve-se com 90%. As cultivares BRS 6979 e 8579 apresentaram o IIE₅₀ em primeira contagem de plântulas da germinação, sendo que a cultivar 8579 também apresentou IIE₅₀ para germinação, indicando ser a cultivar com maior redução em vigor relativo.

O armazenamento é um agente de grande influência na qualidade fisiológica da semente (KAEFER et al., 2019). Ao longo do armazenamento, nesta condição, foram observados incrementos em primeira contagem de plântulas da germinação, germinação e longevidade, em diferentes momentos, por pelo menos duas vezes (Figura 1) em cada lote, evidenciando que sementes como seres vivos possuem oscilações em desempenho, acredita-se que esse evento tenha como estratégia de sobrevivência, que podem ser influenciadas por diversos fatores, além de cultivar, temperatura e umidade relativa do ar.

Com intuito de conhecer o comportamento durante a longevidade (germinação ao longo do tempo, em condições artificiais de temperatura e umidade relativa) para as mesmas cultivares, o segundo ambiente de avaliação consistiu na temperatura de 35°C e 75% UR para as cinco cultivares BRS 6979, 7677, 8473, 8579 e M7119, e o comportamento na longevidade é apresentado na Figura 2.

O teor de água entre os lotes variou entre 11 e 13% durante o período de avaliação, o tempo para que ocorrer a inviabilidade total dos lotes variou entre 70 e 83 dias, no qual BRS 6979 e 7677 foram as cultivares que obtiveram 83 dias, 8473 e 8579 obtiveram 76 dias e M7119 obteve 70 dias. O período que os lotes obtiveram plântulas normais avaliadas pela germinação e primeira contagem foram menores que para viabilidade, variando entre 49 dias para a cultivar BRS 6979 e 70 dias para as demais cultivares.

Assim, observa-se que o maior período de viabilidade não garantiu o melhor resultado em vigor relativo para os lotes avaliados na temperatura de 35°C e 75%UR. Ressalta-se que o ponto de inflexão para o decréscimo da viabilidade dos lotes não foi semelhante, variando de 21 à 49 dias. A cultivar BRS 6979 teve o ponto de inflexão mais rápido e a cultivar M7119 o mais lento.

O período para total inviabilidade dos lotes durante o envelhecimento artificial das sementes, variou de 28 a 154 dias (Tabela 4). Sendo a condição de 35°C e 80 % UR e 42°C e 70% UR os ambientes mais deletérios para o armazenamento de sementes. Tais resultados já eram esperados visto que, amostras de sementes em condições de umidade e temperatura relativamente altas, mostram que a longevidade relativa das sementes pode variar enormemente em taxas diversas (PROBERT et al., 2009)

Tabela 4 - Teor de água (b.u), Intervalo de Interesse Experimental para P₅₀ (IIE₅₀), Percentual de Contagem do IIE₅₀ e Total de (dias) para completa perda de Primeira contagem de plântulas da germinação, Germinação e Viabilidade para os tratamentos estudados

Tratamento	Cultivar	Temperatura (°C)	UR (%)	Teor de água b.u (%)	Primeira Contagem de Plântulas			Germinação			Viabilidade		
					IIE ₅₀	(%)	Total (Dias)	IIE ₅₀	(%)	Total (Dias)	IIE ₅₀	(%)	Total (Dias)
1	BRS 6979 IPRO	30	60	12,23 ± 1,27	49-56	64-34	84	49-56	84-46	84	77-84	56-18	91
2	8473 RSF RR	30	60	12,24 ± 0,38	63-70	58-30	98	63-70	84-44	98	-	-	154
3	M7119 IPRO	30	60	12,71 ± 0,73	28-49	84-44	98	49-56	54-30	98	56-63	66-30	98
4	BRS 6979 IPRO	30	70	14,23 ± 1,79	56-63	80-36	77	63-70	60-32	77	70-77	56-02	77
5	8473 RSF RR	30	70	14,41 ± 1,64	56-63	56-44	70	63-70	62-02	77	63-70	82-20	83
6	M7119 IPRO	30	70	12,69 ± 2,05	35-49	80-20	56	35-49	84-36	56	49-56	70-18	83
7	BRS 6979 IPRO	35	75	11,06 ± 3,02	18-21	64-50	49	21-34	68-12	49	34-49	64-12	83
8	7677 RSF IPRO	35	75	12,06 ± 1,33	21-34	78-46	70	34-49	58-18	70	49-58	66-44	83
9	8473 RSF RR	35	75	13,17 ± 1,96	49-58	72-04	70	49-58	84-08	70	49-58	98-42	70
10	8579 RSF IPRO	35	75	12,10 ± 2,89	21-34	62-36	70	21-34	76-48	70	49-58	86-16	76
11	M7119 IPRO	35	75	12,50 ± 1,72	58-70	60-00	70	58-70	70-00	70	58-70	92-08	76
12	BRS 6979 IPRO	35	75	12,13 ± 0,51	14-21	68-38	28	21-28	60-00	28	21-28	90-16	42
13	8473 RSF RR	35	75	12,19 ± 0,45	14-21	70-50	35	21-28	70-40	35	28-35	70-10	42
14	M7119 IPRO	35	75	12,07 ± 0,78	21-28	64-20	42	21-28	74-30	42	28-35	56-30	42
15	BRS 6979 IPRO	35	80	14,08 ± 0,83	07-14	88-24	21	07-14	90-36	21	14-21	80-02	28
16	8473 RSF RR	35	80	13,85 ± 1,82	07-14	90-40	21	14-21	66-00	21	14-21	94-04	28
17	M7119 IPRO	35	80	13,81 ± 1,08	14-21	66-00	21	14-21	72-00	21	14-21	92-04	35
18	BRS 6979 IPRO	42	65	04,06 ± 0,40	50-85	56-48	85	-	-	85	-	-	85
19	8473 RSF RR	42	65	11,64 ± 0,05	30-35	65-00	35	30-35	72-0	35	30-35	96-02	60
20	M7119 IPRO	42	65	12,09 ± 0,66	10-15	72-26	45	10-15	80-30	50	30-35	74-18	60
21	BRS 6979 IPRO	42	70	11,66 ± 0,16	05-10	88-48	20	10-15	72-02	20	10-15	96-28	30
22	8473 RSF RR	42	70	11,98 ± 0,21	10-15	66-42	30	15-20	52-48	30	25-30	72-30	35
23	M7119 IPRO	42	70	12,08 ± 0,33	10-15	60-28	30	10-15	68-30	30	15-20	62-10	30
24	BRS 6979 IPRO	15	50	7,50 ± 1,57	708-938	86-48	-	-	72,00	-	-	96,00	938
25	7677 RSF IPRO	15	50	7,37 ± 1,17	-	70,00	-	-	86,00	-	-	96,00	938
26	8473 RSF RR	15	50	7,62 ± 2,14	-	64,00	-	-	80,00	-	-	96,00	938
27	8579 RSF IPRO	15	50	7,10 ± 1,02	217-288	56-50	-	405-468	76-40	-	-	92,00	938
28	M7119 IPRO	15	50	7,51 ± 1,49	-	52,00	-	-	62,00	-	-	90,00	938

Figura 1 - Curvas de Distribuição do percentual da Primeira Contagem, Germinação e Protrusão (Viabilidade) de sementes de soja das cultivares BRS 6979 (A), 7677 (B), 8473 (C), 7589 (D) e M7119 (E), ao longo do armazenamento de 938 dias para o ambiente de 15 °C e 50% de Umidade relativa do ar.

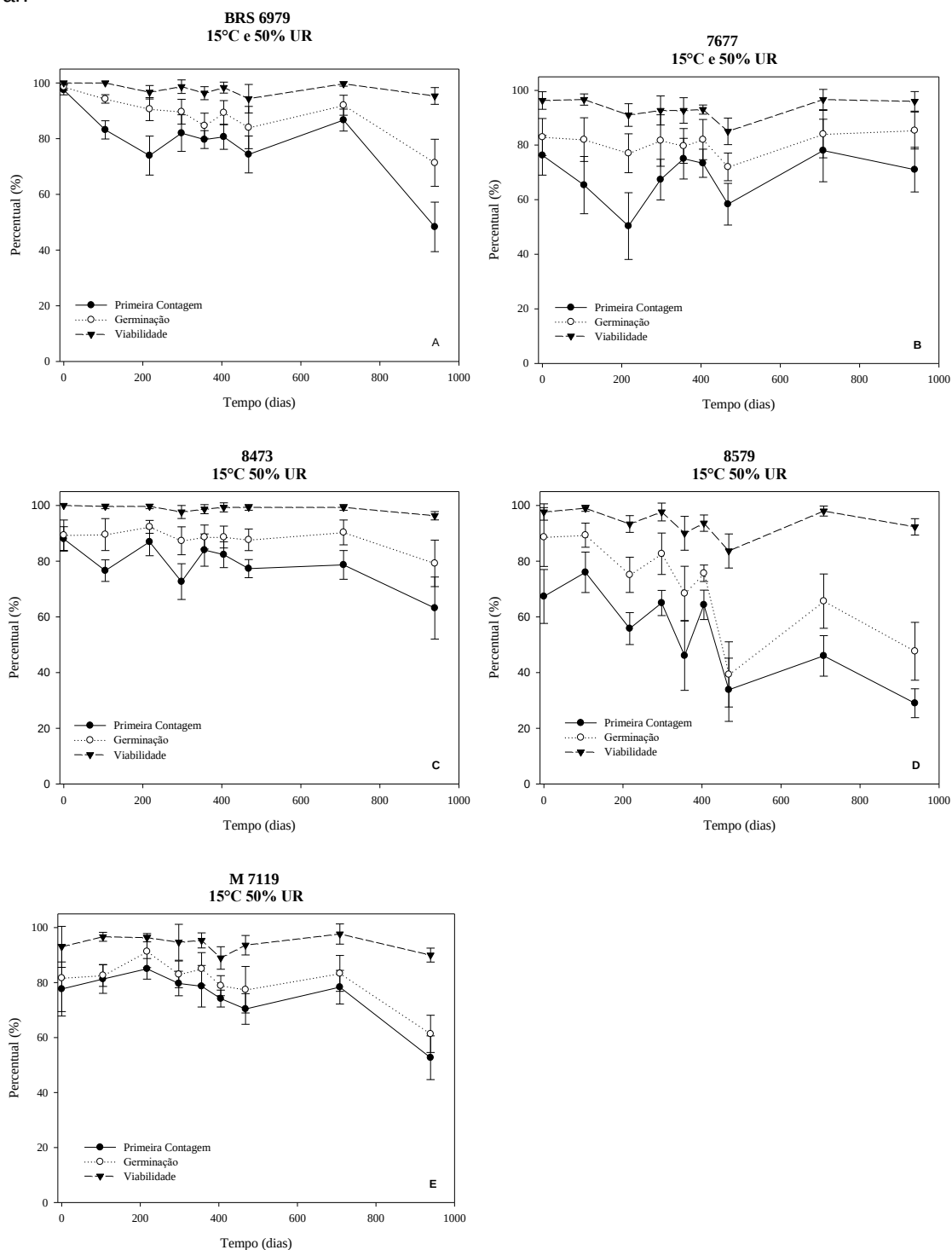
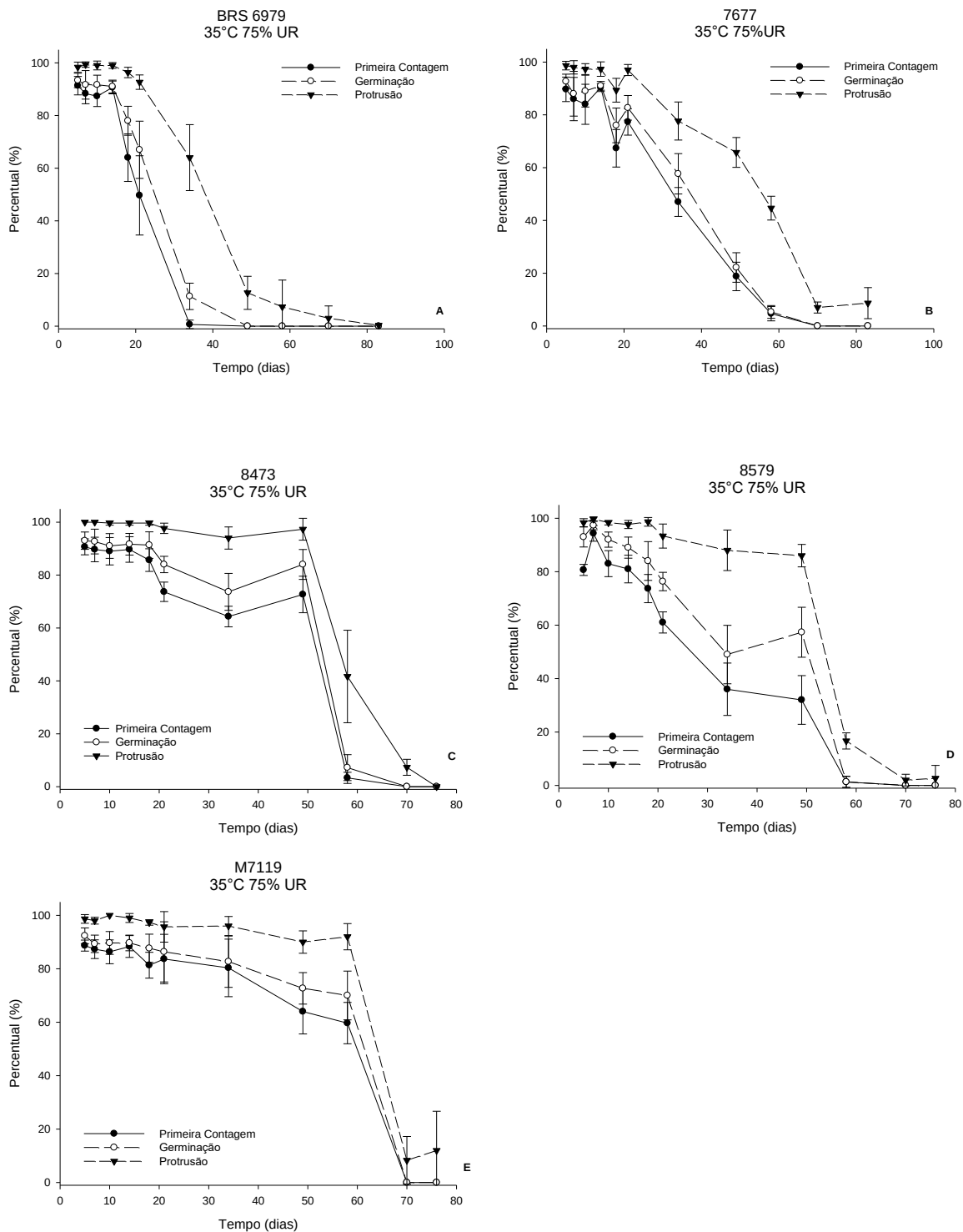


Figura 2 - Curvas de Distribuição do percentual da Primeira Contagem, Germinação e Protrusão (Viabilidade) de sementes de soja das cultivares BRS 6979 (A), 7677 (B), 8473 (C), 7589 (D) e M7119 (E), para longevidade no ambiente de 35 °C e 75 % de Umidade relativa do ar.



Dentre os cinco cultivares estudados, três (BRS 6979, 8473 e M7119) foram selecionados para avaliação em diferentes combinações de temperatura e longevidade. As curvas de distribuição do percentual da primeira contagem de plântulas, germinação e protrusão são apresentadas nas Figuras 3 para a temperatura de 30°C, 60 e 70% UR, Figura 4 para a temperatura de 35°C, 75 e 80% UR, Figura 5 para a temperatura de 42°C e 65 e 70% UR.

O ambiente de 30°C e 60% UR propiciou teor de água de 12% b.u., e maior período para ocorrer a inviabilidade total dos lotes, quando comparado às temperaturas de 35°C e 42°C. A cultivar com maior longevidade foi a 8473 com duração de 154 dias (Figura 3-C), seguida da BRS 6979 com 119 dias (Figura 3-A), M7119 com 98 dias (Figura 3-E). O aumento em 10% da umidade relativa do ar sob a mesma temperatura propiciou a redução de 42 dias para BRS 6979 (Figura 3-B), 77 dias para 8473 (Figura 3-D) e 21 dias para M7119 (Figura 3-F).

O decréscimo da viabilidade, germinação e primeira contagem da germinação para a temperatura de 30°C e 70% UR ocorreu em 56 dias para BRS 6979 e 8473 e M7119 em 35 dias.

A perda da qualidade das sementes ocorre mais rapidamente à medida que o teor de umidade e a temperatura das sementes aumentam consideravelmente (CHHABRA; ANSARI; SINGH, 2019). Esse fato decorre da maior atividade metabólica, diretamente relacionada com a atividade de água e consequente deterioração.

A qualidade inicial em que a semente é inserida no envelhecimento influenciou na capacidade que a semente tem de responder ao estímulo da embebição e reparação para germinação e protrusão (Figuras 2-A, 2-C, 2-E). Podemos observar que, para as cultivares BRS 6979, 8473 e M7119 (Figura 4-A, 4-C, 4-E), após aproximadamente 7 meses de armazenamento na condição de 15°C e 50% UR, obtiveram outro comportamento em resposta à condição de 35°C e 75% UR. O tempo de avaliação reduziu de 76 e 83 dias para 42 dias, esse comportamento já era esperado visto, que ao longo das condições mesmo que menos danosas, acontece a deterioração de forma natural.

Para algumas espécies 14% b.u. pode ser considerado como um teor de água limitante para o armazenamento de sementes (SHABAN, 2013), nesse estudo ao teor de água de aproximadamente 14% b.u. foi observado no ambiente de 35°C e 80%UR (Figuras 4-B-E-F, Tabela), esse ambiente propiciou a maior taxa de deterioração e

menor tempo para total inviabilidade dos lotes das cultivares estudadas, o período para que isso ocorresse variou de 21 a 35 dias.

Figura 3 - Curvas de Distribuição do percentual da Primeira Contagem, Germinação e Protrusão (Viabilidade) de sementes de soja da cultivar BRS 6979 condições de 30°C e 60% UR (A) 30°C e 70% UR (B), cultivar 8473 condições de 30°C e 60% UR (C) 30°C e 70% UR (D), cultivar M7119 condições de 30°C e 60% UR (E) 30°C e 70% UR (F).

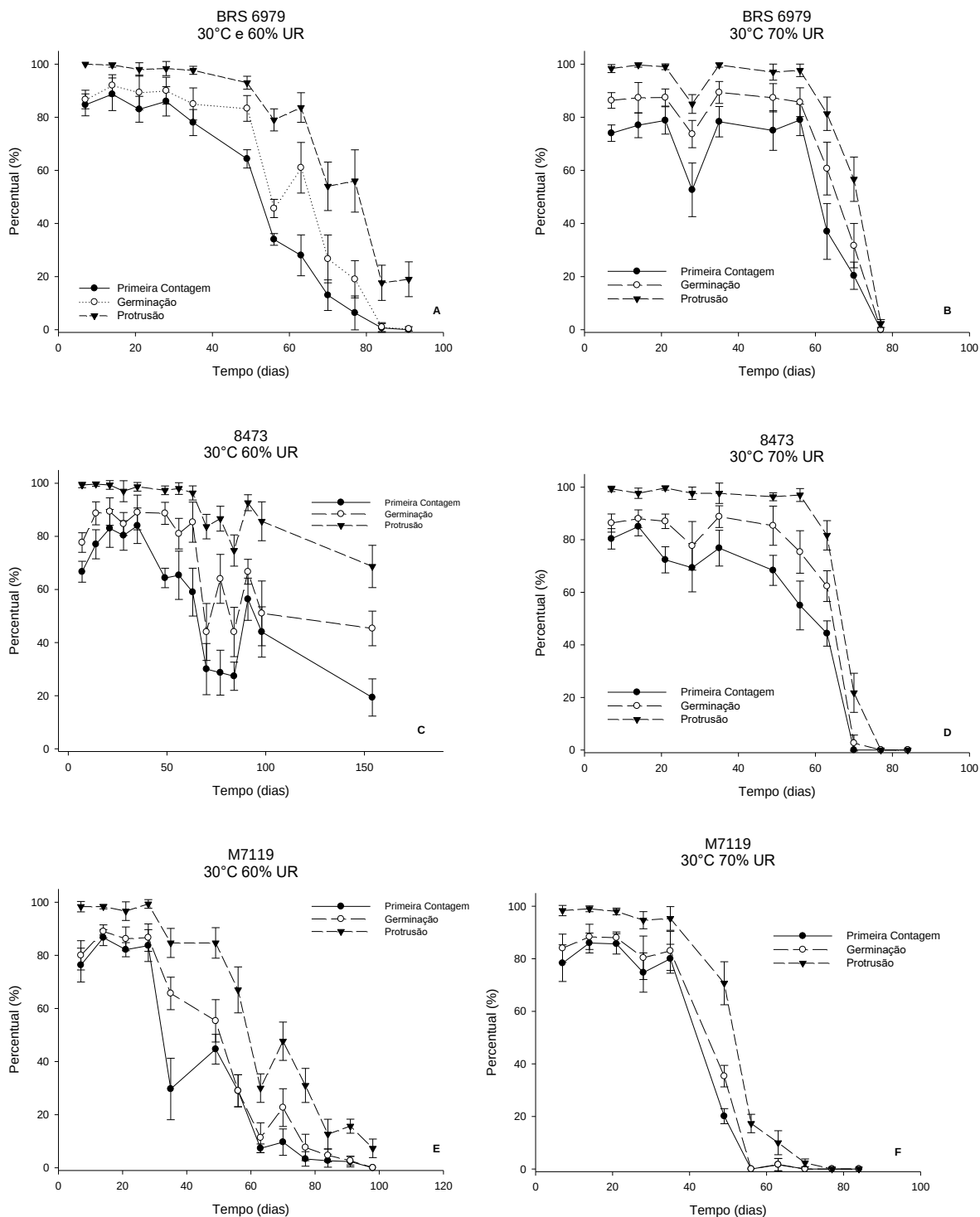
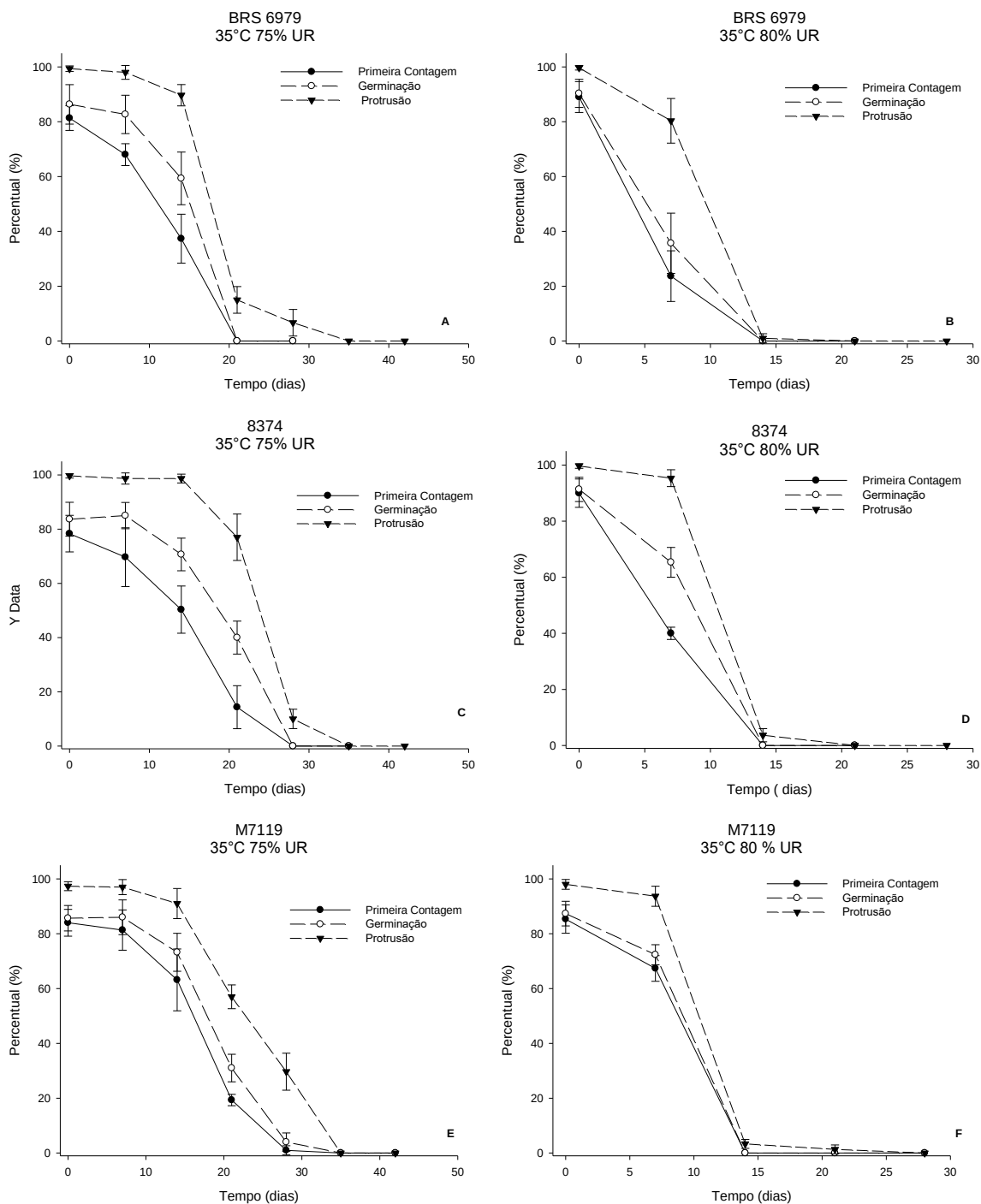


Figura 4 - Curvas de Distribuição do percentual da Primeira Contagem, Germinação e Protrusão (Viabilidade) de sementes de soja da cultivar BRS 6979 condições de 35°C e 75% UR (A) 35°C e 80% UR (B), cultivar 8473 condições de 35°C e 75% UR (C) 35°C e 80% UR (D), cultivar M7119 condições de 35°C e 75% UR (E) 35°C e 80% UR (F).



O ambiente de temperatura de 42°C e umidade relativa de 65 e 70% são apresentados na Figura 5. A condição de ambiente 42°C e 65%UR para a cultivar

BRS 6979 (Figura 5-A), foi atípica e propiciou um teor de água ($4\% \text{ b.u.} \pm 0,5$ – Tabela 4) muito restrito e possivelmente como consequência a longevidade prolongada para esse ambiente, mesmo em condição de temperatura deletéria para sementes de soja.

O teor de umidade que as sementes são mantidas bem como as condições de armazenamento são os principais fatores para controlar a capacidade de armazenamento (BIABANI et al., 2011). As cultivares 8473 e M7119, nessa mesma condição apresentaram período para total inviabilidade de 60 e 83 dias, respectivamente, maiores que para a temperatura de 35°C , de 35 a 42 dias, contrariando as expectativas de predições, e indicando relações mais complexas que necessitam serem estudadas para compreender até que ponto é deletéria ou não a temperatura do armazenamento, ou se esse foi um caso isolado.

Os lotes de sementes na condição de 42°C e 70 % UR, apresentaram menor tempo para inviabilidade total dos lotes (Figuras 5-B-D-F), quando comparado à mesma temperatura de 42°C e 65% UR.

Usualmente a longevidade medida pelo P_{50} é predita em função da protrusão da semente pela equação da viabilidade (ELLIS, 1980), por isso, os lotes são apresentados em todos os ambientes para comparação da viabilidade e predição de seus parâmetros (Tabelas 5 e 6) em função das cultivares estudadas (Figura 6).

Não foram observadas taxas constantes de mortes de sementes para os ambientes estudados. Essas taxas são observadas no desvio padrão da distribuição de mortes das sementes (σ) (Tabelas 5 e 6).

Figura 5 - Curvas de Distribuição do percentual da Primeira Contagem, Germinação e Protrusão (Viabilidade) de sementes de soja da cultivar BRS 6979 condições de 42°C e 65% UR (A) 42°C e 70% UR (B), cultivar 8473 condições de 42°C e 65% UR (C) 42°C e 70% UR (D), cultivar M7119 condições de 42°C e 65% UR (E) 42°C e 70% UR (F).

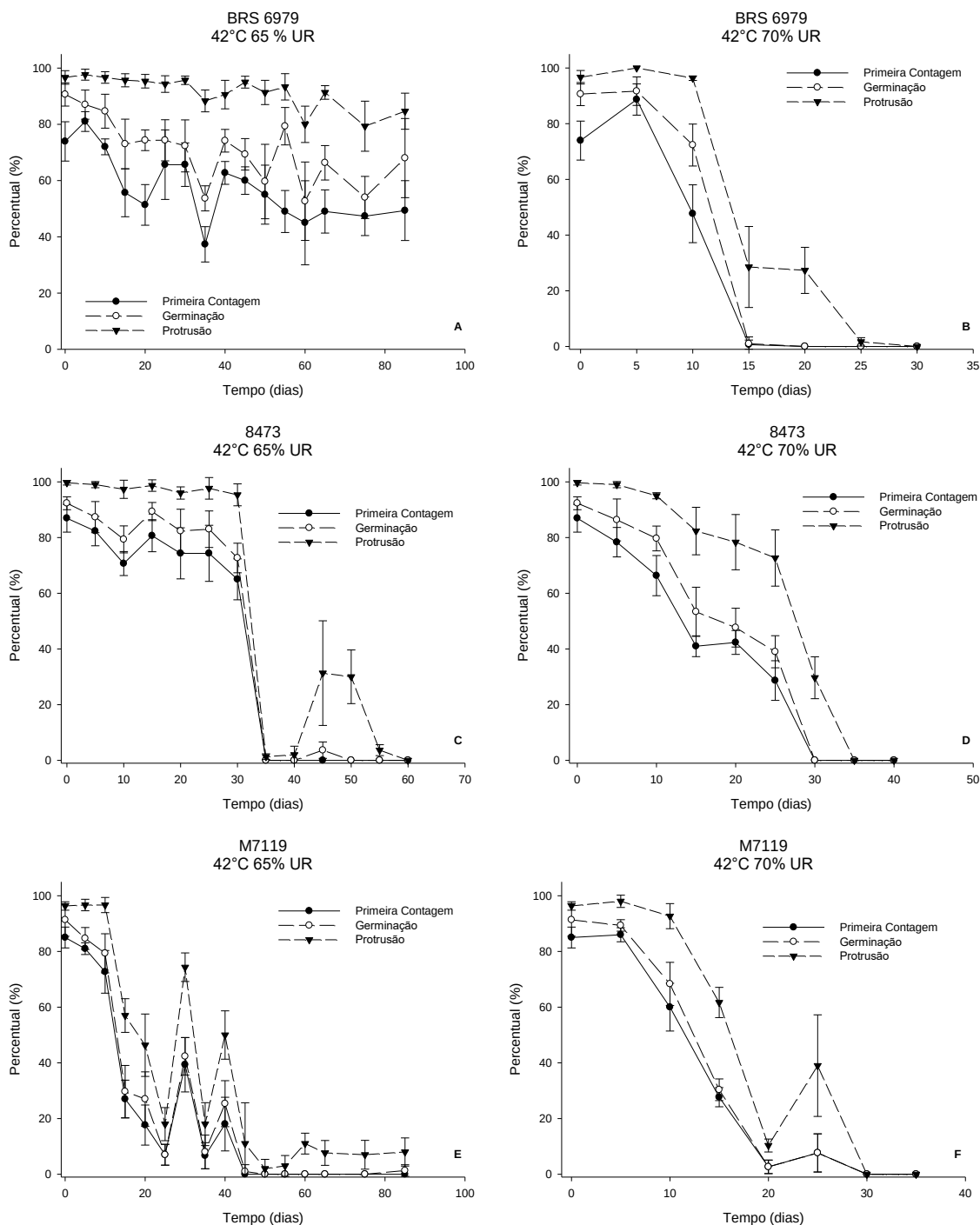


Figura 6 - Curvas de Distribuição da Viabilidade (protrusão) de sementes de soja das cultivares BRS 6979, 8473, M7119, para os ambientes de armazenamento (A) 30°C e 60% UR, (B) 30°C e 70% UR, (C) 35°C e 75% UR, (D) 35°C e 80% UR, (E) 42°C e 65% UR, (F) 42°C e 70% UR.

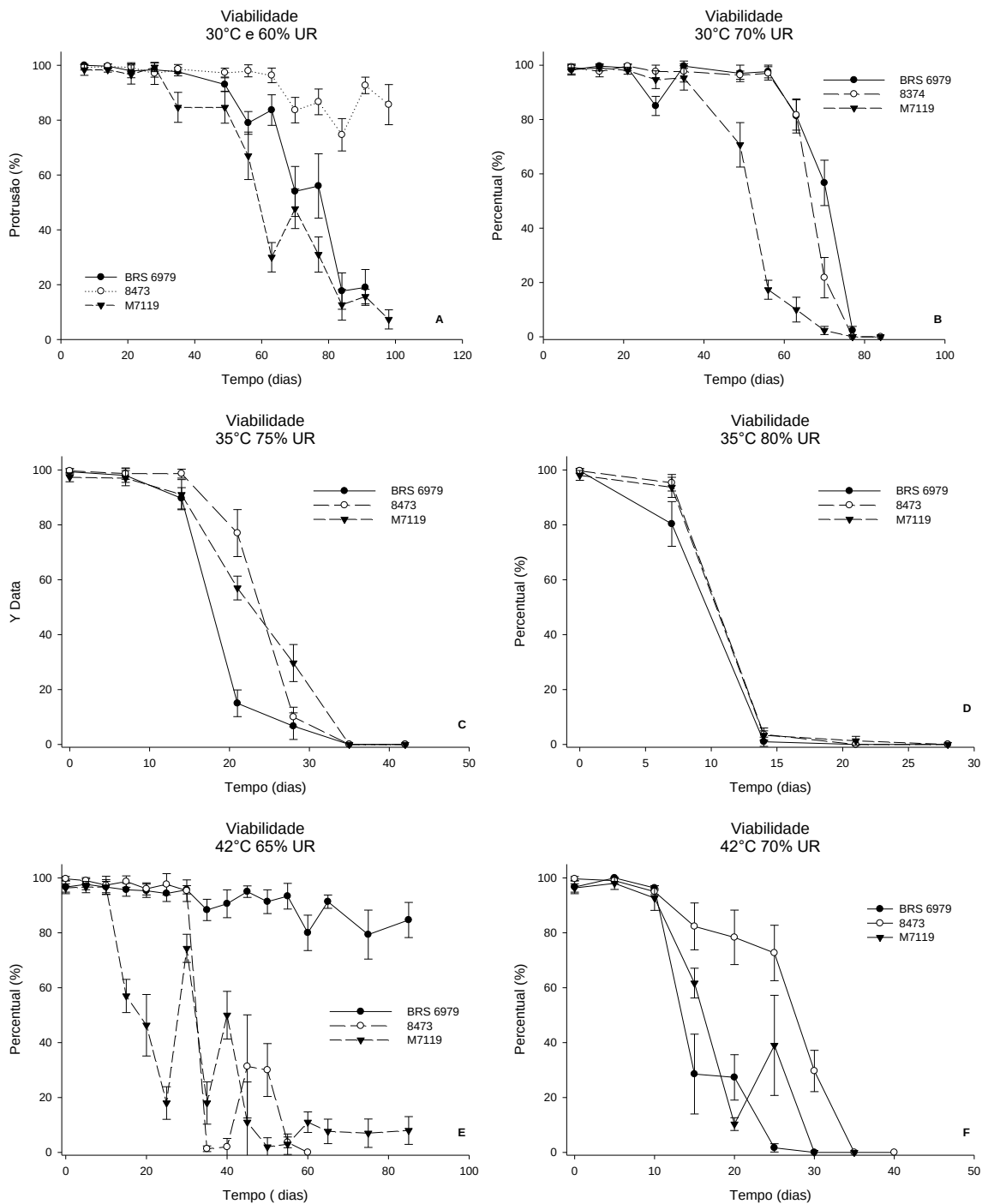


Tabela 5 - Funções de Probit, Cauchy-SSF e Logit e seus respectivos valores de Ki, desvio (σ), P_{50} , Coeficiente de determinação (R^2), Coeficiente de determinação Ajustado (R^2 Aj.), Critério de Informação de Akaike (AIC), Critério de Informação Bayesiano (BIC), Durbin-Watson (D-W), Teste de Shapiro Wilk (W), para dados de Viabilidade para os tratamentos de 1 a 12 em função das Cultivares, Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) e Umidade Relativa do ar estudadas.

Tratamento	Cultivar	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Umidade Relativa do ar (%)	Função	Viabilidade										
					ki	σ	P_{50}	R^2	R^2 Aj.	AIC	BIC	D-W	p-Value	W	p-Value
1	BRS 6979 IPRO	30	60	Probit	5,6611	-0,0767	73,81	0,81	0,81	210,51	217,34	2,08	0,75	0,96	4,11E-02
1	BRS 6979 IPRO	30	60	Cauchy-SSF	1,4005	-0,0186	75,10	0,66	0,66	63,50	70,33	0,46	0,00	0,96	2,59E-02
1	BRS 6979 IPRO	30	60	Logit	6,9678	-0,0935	74,53	0,90	0,90	188,36	195,19	2,01	0,99	0,98	2,79E-01
2	8473 RSF RR	30	60	Probit	5,1263	-0,0464	110,55	0,51	0,50	271,13	278,20	1,98	0,80	0,98	2,72E-01
2	8474 RSF RR	30	60	Cauchy-SSF	0,9531	-0,0018	533,49	0,35	0,34	-185,40	-178,33	1,00	0,00	0,86	3,54E-07
2	8475 RSF RR	30	60	Logit	6,0939	-0,0473	128,72	0,59	0,59	248,52	255,59	1,75	0,20	0,99	6,80E-01
3	M7119 IPRO	30	60	Probit	4,0256	-0,0593	67,94	0,69	0,69	248,99	256,06	1,22	0,00	0,86	4,33E-07
3	M7119 IPRO	30	60	Cauchy-SSF	1,4101	-0,0235	60,03	0,85	0,85	34,32	41,39	0,34	0,00	0,97	9,46E-02
3	M7119 IPRO	30	60	Logit	5,6855	-0,0862	65,93	0,85	0,58	234,03	241,10	1,12	0,00	0,93	3,06E-04
4	BRS 6979 IPRO	30	70	Probit	5,1344	-0,0693	74,06	0,40	0,39	257,26	263,54	1,31	0,01	0,97	1,55E-01
4	BRS 6979 IPRO	30	70	Cauchy-SSF	1,2965	-0,0159	81,56	0,44	0,43	71,64	77,92	0,13	0,00	0,88	3,58E-05
4	BRS 6979 IPRO	30	70	Logit	6,6608	-0,0911	73,08	0,49	0,48	267,81	274,09	0,70	0,00	0,97	2,09E-01
5	8473 RSF RR	30	70	Probit	6,0734	-0,1010	60,11	0,55	0,55	265,83	272,11	0,95	0,00	0,93	2,60E-03
5	8474 RSF RR	30	70	Cauchy-SSF	1,4232	-0,0285	49,96	0,50	0,50	88,07	94,35	0,19	0,00	0,93	1,37E-03
5	8475 RSF RR	30	70	Logit	7,574	-0,1199	63,15	0,61	0,60	273,23	279,52	0,54	0,00	0,95	1,71E-02
6	M7119 IPRO	30	70	Probit	5,4712	-0,1176	46,52	0,76	0,76	226,43	232,71	1,77	0,27	0,95	1,80E-02
6	M7119 IPRO	30	70	Cauchy-SSF	1,5407	-0,0328	46,91	0,82	0,82	52,56	58,84	0,30	0,00	0,94	6,06E-03
6	M7119 IPRO	30	70	Logit	7,3273	-0,1563	46,89	0,87	0,87	215,46	221,74	1,36	0,01	0,94	8,28E-03
7	BRS 6979 IPRO	35	75	Probit	4,8096	-0,1208	39,81	0,85	0,84	232,06	238,63	2,23	0,43	0,96	2,83E-02
7	BRS 6979 IPRO	35	75	Cauchy-SSF	1,2227	-0,0302	40,47	0,89	0,89	22,75	29,32	0,59	0,00	0,96	3,39E-02
7	BRS 6979 IPRO	35	75	Logit	6,1377	-0,1529	40,14	0,93	0,93	208,30	214,87	2,06	0,88	0,97	1,52E-01
8	7677 RSF IPRO	35	75	Probit	3,6067	-0,0694	51,98	0,67	0,66	225,47	232,04	2,00	0,86	0,92	3,84E-04
8	7677 RSF IPRO	35	75	Cauchy-SSF	1,2455	-0,0247	50,51	0,89	0,89	-2,48	4,09	0,34	0,00	0,97	1,83E-01
8	7677 RSF IPRO	35	75	Logit	5,1153	-0,0996	51,34	0,84	0,84	207,92	214,49	1,74	0,24	0,99	6,77E-01
9	8473 RSF RR	35	75	Probit	5,988	-0,0958	62,51	0,66	0,65	226,17	232,45	0,85	0,00	0,91	3,00E-04
9	8474 RSF RR	35	75	Cauchy-SSF	1,2616	-0,0225	56,15	0,65	0,64	54,52	60,81	0,30	0,00	0,95	1,65E-02
9	8475 RSF RR	35	75	Logit	7,0963	-0,1163	61,04	0,73	0,73	227,72	234,00	0,57	0,00	0,85	2,45E-06
10	8579 RSF IPRO	35	75	Probit	4,5247	-0,1041	43,45	0,73	0,73	251,91	258,48	1,49	0,03	0,95	5,97E-03
10	8579 RSF IPRO	35	75	Cauchy-SSF	1,3175	-0,0277	47,55	0,79	0,78	58,16	64,73	0,28	0,00	0,89	2,63E-05
10	8579 RSF IPRO	35	75	Logit	6,1766	-0,1364	45,29	0,85	0,85	239,00	245,57	1,09	0,00	0,97	1,37E-01
11	M7119 IPRO	35	75	Probit	4,6753	-0,0804	58,15	0,59	0,58	260,72	267,29	1,46	0,03	0,96	4,52E-02
11	M7119 IPRO	35	75	Cauchy-SSF	1,2583	-0,0205	61,27	0,60	0,59	79,03	85,60	0,25	0,00	0,94	5,24E-03
11	M7119 IPRO	35	75	Logit	6,1873	-0,1054	58,71	0,69	0,69	266,62	273,19	1,04	0,00	0,97	2,01E-01
12	BRS 6979 IPRO	35	75	Probit	6,9136	-0,2781	24,86	0,87	0,87	126,60	131,35	1,96	0,78	0,95	1,18E-01
12	BRS 6979 IPRO	35	75	Cauchy-SSF	1,6259	-0,0658	24,70	0,81	0,80	39,46	44,21	0,40	0,00	0,92	1,13E-02
12	BRS 6979 IPRO	35	75	Logit	8,5206	-0,3401	25,05	0,92	0,92	119,48	124,23	1,52	0,07	0,95	1,11E-01

Dados de P_{50} em negrito, estão contidos dentro o IIE_{50} .

Tabela 6 - Funções de Probit, Cauchy-SSF e Logit e seus respectivos valores de Ki, desvio (σ), P_{50} , Coeficiente de determinação (R^2), Coeficiente de determinação Ajustado (R^2 Aj.), Critério de Informação de Akaike (AIC), Critério de Informação Bayesiano (BIC), Durbin-Watson (D-W), Teste de Shapiro Wilk (W), para dados de Viabilidade para os tratamentos de 13 a 23 em função das Cultivares, Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) e Umidade Relativa do ar (UR) estudadas.

Tratamento	Cultivar	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	UR (%)	Função	Viabilidade										
					ki	σ	P_{50}	R^2	R^2 Aj.	AIC	BIC	D-W	p-Value	W	p-Value
13	8473 RSF RR	35	75	Probit	8,2209	-0,2894	28,41	0,83	0,82	140,85	145,60	1,16	0,00	0,95	1,48E-01
13	8473 RSF RR	35	75	Cauchy-SSF	1,7407	-0,0599	29,06	0,76	0,75	43,61	48,36	0,36	0,00	0,90	3,35E-03
13	8473 RSF RR	35	75	Logit	9,7464	-0,3405	28,63	0,87	0,86	141,75	146,50	0,73	0,00	0,93	2,32E-02
14	M7119 IPRO	35	75	Probit	5,2032	-0,205	25,38	0,70	0,69	142,42	147,17	1,07	0,00	0,91	5,84E-03
14	M7119 IPRO	35	75	Cauchy-SSF	1,6423	-0,0575	28,56	0,87	0,87	12,14	16,89	0,38	0,00	0,92	1,19E-02
14	M7119 IPRO	35	75	Logit	7,1924	-0,2677	26,87	0,81	0,81	138,97	143,72	0,87	0,00	0,90	4,02E-03
15	BRS 6979 IPRO	35	80	Probit	8,0182	-0,5144	15,59	0,89	0,89	89,80	93,33	1,23	0,05	0,69	8,65E-06
15	BRS 6979 IPRO	35	80	Cauchy-SSF	1,7351	-0,1019	17,03	0,84	0,83	23,99	27,53	0,61	0,00	0,89	1,20E-02
15	BRS 6979 IPRO	35	80	Logit	9,3403	-0,5921	15,77	0,91	0,91	92,12	95,66	0,88	0,00	0,76	7,30E-05
16	8473 RSF RR	35	80	Probit	8,7071	-0,5069	17,18	0,91	0,91	84,74	88,28	1,77	0,37	0,62	1,18E-06
16	8473 RSF RR	35	80	Cauchy-SSF	1,8185	-0,1040	17,48	0,81	0,80	29,40	32,94	0,56	0,00	0,88	7,31E-03
16	8473 RSF RR	35	80	Logit	10,306	-0,5977	17,24	0,92	0,91	90,52	94,06	1,13	0,00	0,89	1,45E-02
17	M7119 IPRO	35	80	Probit	5,6819	-0,3258	17,44	0,84	0,84	111,30	115,50	1,70	0,30	0,93	3,97E-02
17	M7119 IPRO	35	80	Cauchy-SSF	1,4416	-0,0776	18,57	0,76	0,75	40,91	45,12	0,41	0,00	0,88	2,59E-03
17	M7119 IPRO	35	80	Logit	7,158	-0,4066	17,60	0,86	0,85	120,63	124,83	0,82	0,00	0,90	9,03E-03
18	BRS 6979 IPRO	42	65	Probit	2,3857	-0,0179	132,99	0,18	0,17	242,50	250,00	1,78	0,22	0,58	1,35E-14
18	BRS 6979 IPRO	42	65	Cauchy-SSF	0,9278	-0,0019	482,60	0,32	0,31	-229,43	-221,93	1,87	0,42	0,76	8,51E-11
18	BRS 6979 IPRO	42	65	Logit	3,7912	-0,0270	140,41	0,33	0,32	241,61	249,11	1,76	0,22	0,85	3,98E-08
19	8473 RSF RR	42	65	Probit	5,3825	-0,1570	34,29	0,60	0,59	324,92	331,75	1,21	0,00	0,96	3,17E-02
19	8473 RSF RR	42	65	Cauchy-SSF	1,4367	-0,0421	34,12	0,73	0,72	93,48	100,31	0,36	0,00	0,95	5,63E-03
19	8473 RSF RR	42	65	Logit	6,9972	-0,2035	34,39	0,67	0,66	340,85	347,68	0,84	0,00	0,96	2,17E-02
20	M7119 IPRO	42	65	Probit	1,4014	-0,0526	26,65	0,39	0,38	337,29	344,79	1,20	0,00	0,86	1,43E-07
20	M7119 IPRO	42	65	Cauchy-SSF	0,5873	-0,0224	26,17	0,58	0,58	113,74	121,24	0,59	0,00	0,97	2,91E-02
20	M7119 IPRO	42	65	Logit	2,2303	-0,0822	27,15	0,53	0,52	367,84	375,34	0,89	0,00	0,97	5,63E-02
21	BRS 6979 IPRO	42	70	Probit	6,4807	-0,3946	16,42	0,92	0,91	110,07	114,83	0,78	0,00	0,94	3,68E-02
21	BRS 6979 IPRO	42	70	Cauchy-SSF	1,2764	-0,0837	15,25	0,80	0,79	34,64	39,39	0,55	0,00	0,92	1,04E-02
21	BRS 6979 IPRO	42	70	Logit	7,7542	-0,4743	16,35	0,94	0,94	107,43	112,18	0,70	0,00	0,79	9,10E-06
22	8473 RSF RR	42	70	Probit	4,866	-0,2302	21,13	0,73	0,72	154,31	159,53	0,91	0,00	0,89	9,43E-04
22	8473 RSF RR	42	70	Cauchy-SSF	1,5531	-0,0609	25,51	0,75	0,75	36,85	42,06	0,58	0,00	0,89	6,74E-04
22	8473 RSF RR	42	70	Logit	6,526	-0,2915	22,39	0,81	0,81	153,09	158,30	0,63	0,00	0,93	1,56E-02
23	M7119 IPRO	42	70	Probit	5,3306	-0,3187	16,73	0,84	0,83	154,33	159,54	1,09	0,00	0,90	1,42E-03
23	M7119 IPRO	42	70	Cauchy-SSF	1,2603	-0,0689	18,29	0,78	0,78	40,42	45,63	0,63	0,00	0,89	8,14E-04
23	M7119 IPRO	42	70	Logit	6,2657	-0,3611	17,35	0,87	0,87	153,20	158,42	1,01	0,00	0,88	3,39E-04

Dados de P_{50} em negrito, estão contidos dentro o IIE_{50} .

Comumente, a taxa de deterioração varia muito entre as sementes de diferentes espécies (ROBERTS, 1989), neste estudo ocorreu a variação entre uma mesma espécie em diferentes condições. Os lotes estudados apresentaram diferentes curvas de sobrevivência, implicando em diferentes taxas de decréscimo em função do cultivar, e do ambiente de avaliação da longevidade. Isso pode ocorrer em função de as estimativas realizadas a partir de Santos et al. (2019) levam em consideração todos os dados obtidos experimentalmente para a predição do P_{50} , enquanto Ellis e Roberts (1980) consideram a partir do decréscimo da viabilidade.

Os resíduos obtidos para as estimações realizadas, em maior parte dos dados não seguiram a distribuição normal, o mesmo é relatado em Amorim et al (2021), Faria et al. (2020) e Santos et al. (2019). Se os resíduos não seguem uma distribuição normal, os intervalos de confiança e valores de p podem ser imprecisos.

As funções estudadas conseguiram predizer corretamente o P_{50} em IIE_{50} de 60% para Cauchy-SSF, 47% para Logit e 43% para Probit, dentre os lotes e ambientes estudados.

Os modelos de Logit e Cauchy-SSF apresentaram melhor desempenho quando comparado com o modelo Probit (FARIA et al, 2020; SANTOS et al, 2019) para estimação do P_{50} de sementes de soja quando o ajuste dos dados é realizado pelas respectivas funções.

O maior percentual de acertos nas predições de P_{50} dentro do IIE_{50} foram para os lotes na temperatura de 35°C e 80% UR, para todas as funções estudadas, visto que essa condição propiciou um teor de água de 14% b.u., gerando uma taxa de deterioração mais rápida e sem períodos de viabilidade constantes para interferência na estimação. Assim, sugere-se a utilização dessa temperatura para futuros estudos de longevidade. O segundo maior percentual de acertos nas predições fora para os lotes na temperatura de 35°C e 75% UR, sendo a função de Cauchy-SSF a que mais prediz o P_{50} dentro do IIE_{50} .

A distribuição da viabilidade na temperatura de 42°C e 65%UR, teve comportamento atípico para cultivar BRS 6979, conforme já discutimos na Figura 5-A, ainda assim, os outros lotes não permitiram estimativas que se predizem P_{50} dentro de IIE_{50} , acredita-se que a condição ambiental pode ter influenciado diretamente na estimativa do μ e σ . Por isso, não se sugere essa faixa de temperatura para estudos de longevidade com intuito de estudo das funções, quando utilizado o método de regressão linear.

As previsões de P_{50} obtidas para os diferentes ambientes, demonstram que as funções Probit, Cauchy-SSF e Logit nessa ampla gama de temperaturas e umidades relativas não foram as mais adequadas para a correta previsão do P_{50} em todos os ambientes estudados. Ressaltando-se que a função que propiciou mais vezes previsões em $II E_{50}$ foi a função de Cauchy-SSF.

O monitoramento contínuo da viabilidade tem um impacto grande e direto no número de anos em que as sementes permanecem viáveis no armazenamento (LUSTY et al, 2021). De tal modo que se faz necessário cada vez mais estudos para adequada previsão.

Os menores valores de AIC e BIC são obtidos para as estimativas obtidas pela função de Cauchy-SSF, seguidas de Logit e Probit. Quando comparados o coeficiente de determinação ajustado os maiores valores percentuais são obtidos para a função de Logit, no entanto a maior quantidade de estimações do coeficiente acima de 70% é obtida para a função de Cauchy-SSF.

Os coeficientes K_E , C_w , C_H , e C_Q estimados para as respectivas funções de Cauchy-SSF Logit e Probit são apresentados na Tabela 7, bem como o desvio amostral (S) obtido pelas funções, Coeficiente de Determinação (R^2) e Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2 Aj.)

Ressalta-se que os coeficientes foram introduzidos convencionalmente por Ellis e Roberts (1980), mas não esclareceram sobre o significado de seus subscritos (SINÍCIO, 2004; SINÍCIO, 2013).

Tabela 7 -Funções de Probit, Cauchy-SSF e Logit e seus respectivos valores dos coeficientes da Equação de Viabilidade K_E , C_w , C_H , e C_Q , desvio amostral (S), Coeficiente de determinação (R^2), Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2 Aj.)

Funções	K_E	C_w	C_H	C_Q	S	R^2	R^2 Aj.
Cauchy-SSF	16,98	3,890	0,577	0,00721	0,29	63,70	57,96
Logit	14,30	1,320	0,663	0,00895	0,27	48,20	40,02
Probit	13,59	2,882	0,497	0,00629	0,27	56,06	49,12

Os coeficientes estimados para cada função, não obtiveram coeficientes de determinação e de determinação ajustado, adequados para representação desses parâmetros por meio desses parâmetros.

Os coeficientes estimados foram diferentes dos relatados na literatura para sementes de soja, conforme podemos observar na Tabela 8.

Tabela 8 - Constantes da viabilidade do modelo Ellis e Roberts para as espécies de sementes utilizadas nas análises estatísticas (SINÍCIO, 2004)

Funções	K_E	C_w	C_H	C_Q	Referência
Probit	7,748	3,979	0,0530	0,000228	Ellis et al (1982a)
Probit	7,525	4,086	0,0329	0,000478	Ellis et al., 1982a) e Dickie et al. (1990)
Probit	7,292	3,996	0,0295	0,000491	Ellis (1988)

O coeficiente K_E foi o que mais distinguiu-se, esse coeficiente representa a relação de qualidade inicial dos lotes. Esse coeficiente não leva em consideração as variações iniciais dos lotes, o tempo que elas se mantêm constantes. Sendo considerado o parâmetro mais provável de apresentar variações (HAY et al., 2003). C_H e C_Q já foram considerados constantes entre as espécies, com condições de teor e temperaturas constantes (DICKIE et al., 1990) mas nesse estudo também apresentaram grande distanciamento, dos parâmetros relatados na literatura.

Os valores de todos os quatro parâmetros podem diferir entre lotes de sementes da mesma espécie (HAY et al., 2003), dependendo, por exemplo, da época da colheita (WECHSBERG, 1994; HAY et al., 1997) ou do genótipo (ZANAKIS et al., 1994; TANG et al., 1999b). Sinício (2004) relata que as diferenças entre as composições nutricionais das sementes, também podem influenciar nos parâmetros estimados. Embora as estimativas tenham-se propiciados.

Acredita-se que as diferenças na metodologia utilizada por Ellis e Roberts (1980) e proposta aqui, possam ser a razão dessas diferenças. As funções estudadas dentro do método de estimação por regressão linear generalizada, podem não ter favorecido. Hay et al. (2003) sugere estudos que os coeficientes possam ter relação quadrática.

Esses resultados sugerem que algumas das suposições subjacentes ao modelo de deterioração das sementes de Ellis-Roberts podem ser inválidas e requerem uma avaliação mais aprofundada. Assim como já foi sugerido por Solberg (2020), Sinício (2004) Hay et al (2003), Tang et al. (2000), Mead and Gray (1999).

1.4 CONCLUSÕES

As funções de Cauchy-SSF e Logit são mais adequadas que Probit para predição do período que decresce em 50% a viabilidade (P_{50}) dos lotes para a faixa de temperatura de 15°C a 35°C em ambientes de 50% a 80% de umidade relativa do ar.

As funções Cauchy- Logit e Probit, não são adequadas para estimação dos coeficientes de viabilidade segundo a metodologia de Ellis e Roberts (1980).

São sugeridos maiores estudos para o desenvolvimento de modelos generalizados para predição de viabilidade ao longo do armazenamento de sementes.

1.5 REFERÊNCIAS

- ANDREA MONDONI, ROBIN J. PROBERT, GRAZIANO ROSSI, EMANUELE VEGINI, FIONA R. HAY, Seeds of alpine plants are short lived: implications for long-term conservation, *Annals of Botany*, Volume 107, Issue 1, January 2011, Pages 171–179, <https://doi.org/10.1093/aob/mcq222>
- BIABANI, ABBAS & CARPENTER-BOGGS, LYNNE & KATOZI, MAHNAZ & SABOURI, HOSSEIN. Effects of seed deterioration and inoculation with *Mesorhizobium ciceri* on yield and plant performance of chickpea. **Australian Journal of Crop Science**. v. 5, 2011.
- BEWLEY, J. Derek; BRADFORD, Kent J.; HILHORST, Henk W.M.; NONOGAKI, Hiro. Seeds. **Springer**, [S.L.], 3 ed. New York. Springer, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>. p.341-392.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria Nacional de Defesa **Agropecuária Brasília**, 2009. 399p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Vigor de sementes. In: _____. (Eds.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p.224-242.
- CHAVES, Maria Madalena F.; USBERTI, Roberto. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). *Revista Brasileira de Botânica*, [s.l.], v. 26, n. 4, p.557-564, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-84042003000400015>.
- CHHABRA, Rohit; ANSARI, Shabnam; SINGH, Tavisha. Seed Aging, Storage and Deterioration: an irresistible physiological phenomenon. **Agricultural Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 03, p. 234-238, 7 ago. 2019. Agricultural Research Communication Center. <http://dx.doi.org/10.18805/ag.r-1914>.
- COLVILLE, L. Seed Storage. **Encyclopedia Of Applied Plant Sciences**, [S.L.], p. 335-339, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-394807-6.00080-0>
- DICKIE, J. B; ELLIS, R. H.; KRAAK, H. L.; RYDER, K.; TOMPSETT, P. B. Temperature and seed storage longevity. **Annals of Botany**, 65, 197–204. 1990.
- DONA, M. et al. DNA profiling, telomere analysis and antioxidant properties as tools for monitoring ex situ seed longevity. **Annals of Botany**, London, v. 111, p. 987-998, 2013.
- ELLIS, R. The J. Derek Bewley Career Lecture. Seeds-plants-crops-biodiversity-environment: illustrating understanding and ideas. *Seed Science Research*, 1-8. 2022. doi:10.1017/S0960258521000295.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D. Quantitative response of the longevity of seed of twelve crops to temperature and moisture in hermetic storage. **Seed Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 432-444, 2007.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; JACKSON, M. T. 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.; OSEI-BONSU, K; ROBERTS, E. H. Desiccation and germination of seed of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Seed Science Technology**, 10, 509–515. 1982a.

ELLIS, R. H; OSEI-BONSU, K; ROBERTS, E. H. The influence of genotype, temperature and moisture on seed longevity in chickpea, cowpea and soya bean. **Annals of Botany**, 50, 69–82. 1982b.

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

FARIA, Rute Q. de; SANTOS, Amanda R. P. dos; AMORIM, Deoclecio J.; CANTÃO, Renato F.; SILVA, Edvaldo A. A. da; SARTORI, Maria M. P.. Probit or Logit? Which is the better model to predict the longevity of seeds? **Seed Science Research**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 49-58, mar. 2020. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0960258520000136>.

HAY, F.R; PROBERT, R.J; SMITH, R.D. The effect of maturity on the moisture relations of seed longevity in foxglove (*Digitalis purpurea* L.). **Seed Science Research**, v.7, p. 341–349. 1997.

HAY, Fiona R. et al. One-step analysis of seed storage data and the longevity of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 384, p. 993-1011, 2003.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-11, 22 nov. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/conphys/cot030>.

HAY, F.R.; MEAD, A.; BLOOMBERG, M. Modelling seed germination in response to continuous variables: use and limitations of probit analysis and alternative approaches. **Seed Science Research**, [s.l.], v. 24, n. 03, p.165-186, 7 jul. 2014. **Cambridge University Press** (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s096025851400021x>.

HILL, H. J.; CUNNINGHAM, J. D.; BRADFORD, K.J.; TAYLOR, A.G. Primed Lettuce Seeds Exhibit Increased Sensitivity to Moisture Content During Controlled Deterioration. **HortScience** October 2007 42:1436-1439.

LEPRINCE, Olivier; PELLIZZARO, Anthoni; BERRIRI, Souha; BUITINK, Julia. Late seed maturation: drying without dying. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], p. 363-368, 6 out. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erw363>.

LUSTY, CHARLOTTE & VAN BEEM, JANNY & HAY, FIONA. (2021). plants A Performance Management System for Long-Term Germplasm Conservation in

CGIAR GenBank: Aiming for Quality, Efficiency and Improvement. **Plants**. 10. 2627. 10.3390/plants10122627.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24

LIMA J.J. P, BUITINK, J., LALANNE, D., ROSSI, R.F, PELLETIER S, DA SILVA EAA, et al. (2017). Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **PLoS ONE** 12(7): e0180282. <http://doi.org.10.1371/journal.pone.0180282>.

MEAD, A.; GRAY, D. Prediction of seed longevity: a modification of the shape of the Ellis and Roberts seed survival curves. **Seed Science Research**, v.9, p.63-73, 1999.

PROBERT ROBIN, ADAMS JOHN, CONEYBEER JULIA, CRAWFORD ANDREW, HAY FIONA. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. **Australian Journal of Botany**, v. 55, 326-335. 2007. <https://doi.org/10.1071/BT06046>

PROBERT, Robin J.; DAWS, Matthew I.; HAY, Fiona R. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 57-69, 9 abr. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcp082>.

RAO, N. Kameswara *et al.* A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. **Genetic Resources And Crop Evolution**, [S.L.], v. 64, n. 5, p. 1061-1074, 11 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-016-0425-9>.

ROBERTS, E. H. Seed storage for genetic conservation. *Plant Today* 2: 1989, p.12–18.

ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. (Ed.). Viability of seeds. New York: Syracuse University Press, 1972. p.14-58.

ROBIN J. PROBERT, MATTHEW I. DAWS, FIONA R. HAY, Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species, **Annals of Botany**, Volume 104, Issue 1, July 2009, Pages 57–69, <https://doi.org/10.1093/aob/mcp082>

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SANTOS, Amanda Rithieli Pereira dos et al. Cauchy, Cauchy–Santos–Sartori–Faria, Logit, and Probit Functions for Estimating Seed Longevity in Soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v. 111, n. 6, p.1-11, 1 nov. 2019.

SARTORI, M. M. P.; CANTÃO, R. F.; FARIA, R.Q.; SILVA, E.A.A. Desenvolvimento de um software para avaliação da germinação e longevidade de sementes. Informativo Abrates. Volume 27 - nº 2, agosto de 2017.

SCHNEIDER, Cristina Fernanda et al. Equações de longevidade para sementes de pau-marfim. **Revista de Ciências Agrárias** - Amazon Journal Of Agricultural And Environmental Sciences, [s.l.], v. 60, n. 1, p.53-59, 2017. Editora Cubo Multimidia. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2259>.

SINÍCIO, R. Generalised Longevity Model for Orthodox Seeds. **Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 89, n. 1, p. 85-92, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2004.05.008>.

SINÍCIO, Roberto et al. Equacionamento da qualidade inicial de sementes de milho e soja para aplicação no modelo de Probit. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 31,n. 1,p. 122-130, 2009.

SINÍCIO, R. Equação de longevidade para sementes de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg). **Engenharia na Agricultura**, v.21, n.4, p.323-333, 2013.

SINÍCIO, Roberto. Modelamento matemático da longevidade de sementes de camu-camu. *Engenharia na Agricultura*, Viçosa, v. 23, n. 3, p.203-211, jun. 2015.

SMANIOTTO, T. A. de S. S.; REZENDE, O.; MARÇAL, K. A. F.; OLIVEIRA, D. E. C.; OLIVEIRA, G. A. S. Qualidade Fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* Campina Grande, PB, UAEEA/UFCG, v. 18, n. 4, p. 446–453, 2014. Disponível em: Acesso em: 06 out. 2018. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA17183>.

TANG, S., DM TEKRONY, DB EGLI, PL CORNELIUS E M. RUCKER. Survival Characteristics of Corn Seed during Storage: I. Normal Distribution of Seed Survival Contribution of Kentucky Agric. Exp. Stn. No. 98-06-119. *Crop Sci.* v.39, p.1394-1400. 1999a. doi: 10.2135 / cropsci1999.395139

TANG, S.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B, CORNELIUS, P.L. Survival characteristics of corn seed during storage. II. Rate of seed deterioration. *Crop Science*, v.39, p. 1400–1406. 1999b.

Wechsberg, G.E. Seed longevity and response to priming in *Ranunculus sceleratus* L. PhD thesis, University of Manchester, UK. 1994.

ZANAKIS, G.N.; ELLIS, R.H.; SUMMERFIELD, R.J. Seed quality in relation to seed development in three genotypes of soyabean (*Glycine max*). *Experimental Agriculture* v. 30, p. 139-156. 1994.

CAPÍTULO 2

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO PARA AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE SOJA

Resumo

As sementes podem envelhecer de forma natural ou artificial durante o armazenamento. Os ciclos oxidativos sugerem como as células estão se comportando diante do estresse para que ocorra a manutenção da sua vida. Neste trabalho objetivou-se compreender a deterioração e como os sistemas de defesa antioxidativo estão atuando durante a longevidade de sementes de soja em diferentes ambientes de armazenamento. Para isso avaliou-se cinco cultivares comerciais de soja, BRS 6979 IPRO, 7677 RSF RR, 8473 RSF IPRO, 8579 RSF IPRO, M7119 IPRO, em combinações de ambientes de armazenamento (longevidade) de temperaturas de 15, 30, 35, 42°C e umidade relativa do ar de 50, 60, 65, 70, 75, 80%. As análises fisiológicas realizadas foram germinação (plântulas normais e protrusão radicular), e bioquímicas: Proteína Solúvel Total (PST), Teor de Açúcar Solúvel Total (AST), enzimas relacionadas com o SRA – Sistema de resposta antioxidativo: Atividade da Enzima Peroxidase (POD), Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) e peroxidação lipídica pelo Teor de Malonaldeído (MDA), para diferentes pontos de dias dentro do armazenamento. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizados. Cada tratamento foi composto de três repetições e comparados por meio de Análise de Componentes Principais (ACP) com dados normalizados. SOD e POD não são contínuas em função do armazenamento e variam em função da resposta ao nível de estresse do envelhecimento. Lotes de sementes de soja com alto teor de Proteína Solúvel Total podem indicar sementes com nível de envelhecimento e deterioração mais avançados. Lotes que apresentem o segundo pico do Teor de Malonaldeído acima de 105,0 nmol.g⁻¹ são passíveis de lotes de sementes inviáveis

Palavras-chave: *Glycine max*; sistema de resposta antioxidativo; alterações bioquímicas; armazenamento; P₅₀; deterioração.

ANTIOXIDATIVE METABOLISM FOR EVALUATION OF THE LONGEVITY OF SOYBEAN SEEDS

Abstract

Seeds can age naturally or artificially during storage. Oxidative cycles suggest how cells have behaved in the face of stress to maintain their life. The objective of this work was to understand the deterioration and how the antioxidant defense systems are acting during the longevity of soybean seeds in different storage environments. For this, five commercial soybean cultivars, BRS 6979 IPRO, 7677 RSF RR, 8473 RSF IPRO, 8579 RSF IPRO, M7119 IPRO, were evaluated in combinations of storage environments (longevity) of temperatures of 15, 30, 35, 42° C and relative humidity of 50, 60, 65, 70, 75, 80%. The physiological analyzes performed were germination (normal seedlings and root protrusion), and biochemical: Total Soluble Protein (PST), Total Soluble Sugar Content (AST), enzymes related to the SRA – Antioxidative Response System: Peroxidase Enzyme Activity (POD), Activity of the Enzyme Superoxide Dismutase (SOD) and lipid peroxidation by Malonaldehyde Content (MDA), for different points of days within the storage. The experiment was in a completely randomized design. Each treatment consisted of three replicates that were compared using Principal Component Analysis (PCA) with normalized data. SOD and POD are not continuous as a function of storage and vary as a function of the stress level response of aging. Lots of seeds with a high content of Total Soluble Protein may indicate soybean seeds with a more advanced level of aging and deterioration. Lots that show the second peak of Malondialdehyde Content above 105.0 nmol.g⁻¹ are subject to unviable seed lots.

Key-words: *Glycine max*; antioxidant response system; biochemistry changes; storage; P₅₀; deterioration.

2.1 INTRODUÇÃO

Semente é o material vegetal que tem como objetivo a perpetuação da espécie, em sua formação, desde a embriogênese até a maturação tardia, passa por diversos processos físicos, fisiológicos e bioquímicos para atingir o máximo de qualidade. A qualidade corresponde a junção das qualidades, física, sanitária, genética e fisiológica. A qualidade fisiológica corresponde à Germinação, vigor e longevidade das sementes.

O tempo em que sementes podem ser armazenadas é determinado pela sua longevidade. Longevidade é por definição o tempo em que a semente, suspendendo sua atividade metabólica (estado vítreo) (DONA et al., 2013) é capaz de sobreviver em condições ideais para a espécie (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008), sendo comparada em função do decréscimo de 50% da viabilidade ou germinação (P50) de um lote de sementes.

Após o momento de maturidade fisiológica (maturidade de massa) atingida ainda em campo, as sementes já são consideradas armazenadas. A partir desse ponto as características adquiridas até o momento podem ser apenas mantidas ou inicia-se seu decréscimo com a deterioração.

O armazenamento é influenciado pelas condições de temperatura e umidade relativa do ambiente, o que define o teor de água das sementes e seu respectivo teor de equilíbrio higroscópico. Igualmente, o comportamento do envelhecimento de sementes é geralmente descrito em termos de conteúdo de água durante o armazenamento (WALTERS, 1998; BERBERT et al., 2008), este exerce influência acentuada e direta na longevidade destas, pois estimula a atividade metabólica do embrião (MACEDO et al., 1999).

Aliada com a temperatura, a umidade do ambiente no armazenamento causa maior atividade fisiológica da semente e mais rápida será sua deterioração (ARAGÃO, 2007). Harrington (1972), afirmou que a manutenção da baixa temperatura reduz a atividade de enzimas envolvidas no processo respiratório e, conseqüentemente, a velocidade de declínio na viabilidade das sementes ortodoxas durante o armazenamento.

Deterioração é um processo determinado por uma série de alterações, fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas. Inicia-se na maturidade e em ritmo contínuo e irreversível, culminando em completa disfunção celular e inviabilidade da

semente, morte (MARCOS-FILHO, 2015), sendo uma propriedade inversa ao vigor (WANG et al., 2012).

A deterioração também pode ser considerada como o envelhecimento das sementes e pode acontecer de forma natural ou artificial. Em decorrência desse envelhecimento, as membranas perdem a permeabilidade seletiva, as enzimas tornam-se menos eficientes e os cromossomos podem acumular aberrações (PRIESTLEY, 1986; SMITH, BARJARK, 1995; McDONALD, 1999).

Os ciclos oxidativos sugerem como as células estão se comportando diante do estresse para que ocorra a manutenção da sua vida. A instabilidade do estado vítreo, adicionado a quebra de cadeias de açúcares e ao desencadeamento dos processos oxidativos, resultam em danos a lipídeos, proteínas e DNA (ARAGÃO, 2007).

Em todas as fases do desenvolvimento de sementes até o armazenamento, pode-se associar com diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio - EROS (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). As plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos (MITTLER, 2002; KIM & KWAK, 2010) capazes de neutralizar a citotoxicidade das EROS (BARBOSA et al, 2014). As plantas possuem sistemas de defesa complexos para espécies reativas de oxigênio, visto que as EROS são produzidas tanto em células não estressadas e estressadas (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). O equilíbrio entre as enzimas antioxidativas, as moléculas protetoras (como açúcares solúveis e tocoferóis) e os níveis de EROS determinam o limiar entre o efeito benéfico ou deletério desses compostos nas células (DUCATTI, 2018).

Neste trabalho objetivou-se compreender a deterioração das sementes durante a longevidade antes da perda da capacidade germinativa, inviabilidade, e como os sistemas de defesa antioxidativos estão atuando durante a longevidade de sementes de soja em diferentes ambientes de armazenamento.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal

As sementes de soja produzidas em condições de campo foram colhidas na safra 2017/2018, no município de Campo Alegre de Goiás, Brasil. No total foram utilizadas sementes de 5 cultivares comerciais: BRS 6979 IPRO, 7677 RSF RR, 8473 RSF

I PRO, 8579 RSF I PRO, M7119 I PRO. As sementes foram colhidas mecanicamente e armazenadas em câmara fria com temperatura e umidade relativa do ar de 15°C e 50%±2, respectivamente.

2.2.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

As sementes foram submetidas a determinação do teor de água, avaliação da germinação, e longevidade (germinação no tempo), conforme metodologias descritas abaixo:

2.2.2.1 Teste de Germinação

A germinação foi conduzida com 50 sementes em 6 repetições, semeadas em papel tipo germitest, umedecidas com água na proporção da massa de 2,5:1, as quais foram mantidas em germinador, à temperatura de 25°C. As avaliações ocorreram no oitavo dia, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (germinação) e protrusão>2mm (viabilidade).

2.2.2.2 Estudo da Longevidade

Inicialmente todos os lotes foram submetidos ao teste de longevidade em ambiente de temperatura de 35°C e 75% de umidade relativa do ar (UR) (LIMA, 2017). Dentre as 5 cultivares avaliadas foram selecionados 3 (BRS 6979, 8473, M7119), com base no desempenho inicial nas análises fisiológicas para avaliação da longevidade com variação em temperaturas de 30°C com 60 e 70% UR, 35°C com 75 e 80% UR, 42°C com 65 e 70% UR. O experimento com diversos ambientes ocorreu após 7 meses de armazenamento em condição de 15°C e 50% UR, do estudo inicial da longevidade.

Para a criação dos ambientes da longevidade, as sementes foram colocadas em caixas plásticas (10 x 15 x 5 cm) com selagem hermética sobre telas de tecido tule (Apêndice A), em cada unidade experimental/caixa colocou-se 600 sementes. No fundo das caixas continham soluções salinas, supersaturadas para Cloreto de Sódio e Potássio, e 30% de concentração para Cloreto de Lítio, conforme a Tabela 1. As caixas foram armazenadas em câmaras tipo BOD (do inglês, Biochemical Oxygen Demand) em ambiente controlado em combinações com 60, 65, 70, 75, 80% de

umidade relativa do ar à 30, 35, 40°C, com variação de $\pm 0,2$ para ambos. As avaliações ocorreram em intervalos regulares de dias enquanto houvesse viabilidade (adaptado SANTOS et al., 2019).

Tabela 1 - Soluções salinas utilizadas em função da temperatura e umidade relativa para obtenção dos ambientes de armazenamento

Ambiente		Solução Salina	Símbolo
Temperatura (°C)	Umidade Relativa do ar (%)		
30	60	Cloreto de Sódio	NaCl
30	70	Cloreto de Potássio	KCl
35	75	Cloreto de Sódio	NaCl
35	80	Cloreto de Potássio	KCl
42	65	Cloreto de Lítio	LiCl
42	70	Cloreto de Potássio	NaCl

Considerou-se o ambiente de 15°C e 50% UR como um ambiente de envelhecimento natural, como controle de longevidade para todas as amostras estudadas, realizando-se a germinação no tempo de armazenamento de 30 meses (938 dias).

Para as análises bioquímicas foram selecionados os tratamentos com base no comportamento biológico avaliado durante a longevidade (Germinação e Protrusão ao longo do armazenamento). A combinação dos efeitos avaliados durante a longevidade é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Tratamento, Código da cultivar utilizada, Temperatura (°C), Umidade Relativa do ar (%) e tempo (Dias).

Tratamento	Cultivar	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do ar (%)	Tempo (Dias)
1	BRS 6979	15	50	105
2	BRS 6979	15	50	288
3	BRS 6979	15	50	468
4	BRS 6979	15	50	938
5	BRS 6979	30	60	7
6	BRS 6979	30	60	14
7	BRS 6979	30	60	28
8	BRS 6979	30	60	63
9	BRS 6979	30	70	7
10	BRS 6979	30	70	28
11	BRS 6979	30	70	77
12	BRS 6979	35	75	5
13	BRS 6979	35	75	14
14	BRS 6979	35	75	21
15	BRS 6979	35	75	34
16	BRS 6979	35	75	49
17	BRS 6979	35	80	14
18	BRS 6979	35	80	21
19	BRS 6979	42	65	40
20	BRS 6979	42	65	85
21	BRS 6979	42	70	5

22	BRS 6979	42	70	10
23	7677	15	50	217
24	7677	15	50	468
25	7677	15	50	938
26	8473	15	50	298
27	8473	15	50	468
28	8473	15	50	938
29	8473	30	60	28
30	8473	30	60	35
31	8473	30	60	84
32	8473	30	60	91
33	8473	30	70	7
34	8473	30	70	28
35	8473	30	70	77
36	8473	35	75	5
37	8473	35	75	14
38	8473	35	75	21
39	8473	35	75	49
40	8473	35	80	14
41	8473	35	80	21
42	8473	42	70	5
43	8473	42	70	30
44	8579	15	50	105
45	8579	15	50	468
46	8579	15	50	938
47	8579	35	75	5
48	M7119	15	50	288
49	M7119	15	50	468
50	M7119	15	50	938
51	M7119	30	60	28
52	M7119	30	60	35
53	M7119	30	60	49
54	M7119	30	70	7
55	M7119	30	70	28
56	M7119	30	70	77
57	M7119	35	75	5
58	M7119	35	75	14
59	M7119	35	75	21
60	M7119	35	75	49
61	M7119	35	75	70
62	M7119	35	80	14
63	M7119	35	80	21
64	M7119	42	65	30
65	M7119	42	65	40
66	M7119	42	65	85
67	M7119	42	70	5
68	M7119	42	70	20
69	M7119	42	70	25
70	M7119	42	70	30

2.2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.2.3.1 Coleta e Armazenamento do Material Vegetal

As amostras de sementes foram coletadas durante o experimento da longevidade, em cada ponto de germinação, totalizando 3 repetições com 25

sementes. Estas foram submetidas à embebição em água na proporção de 2,5:1 da massa de seu peso, por 6 horas. Ao completar esse período de embebição, as sementes foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e imersos em nitrogênio líquido para congelamento rápido. Em seguida, o material foi transferido para freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da realização das análises.

2.2.3.2 Extrato Bruto

Realizado a partir de amostras de 400 mg de sementes moídas em moinho analítico Ika® (modelo A11), em 3 repetições por tratamento. As amostras de 400 mg foram ressuspensas em 5,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,8. Após centrifugação por 30 minutos a $5.000 \times g$, coletou-se e armazenou-se o sobrenadante em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3.3 Teor de Proteína Solúvel Total

Conforme metodologia de Bradford (1976), utilizou-se 20 μL do extrato bruto adicionados de 80 μL de água deionizada e mais 5 mL do reativo de Bradford. A solução foi mantida por 15 minutos para formação do complexo de cor. Em seguida as leituras foram realizadas em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 595nm. O teor de proteína solúvel total foi calculado pela curva padrão, através da equação da reta.

2.2.3.4 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD, E.C 1.15.1.1)

Conforme metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977). conduziu-se a reação em placas ELISA contendo 50 μL de extrato bruto + 2.950 μL de solução contendo 13 mM de metionina, 75 μM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 μM de riboflavina em 120 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.8. O início da reação ocorreu após as placas serem iluminadas sob suporte contendo tubos fluorescentes (15 W) a uma altura de 30 cm e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 5 minutos de incubação, a reação foi determinada pela interrupção da luz. Realizou-se a detecção da enzima em função da prevenção da fotoredução do NBT na presença de SOD. A análise quantitativa foi realizada a partir da leitura da D.O. do complexo azul formado (Formazana) a 560 nm. Os tubos considerados “em branco”, necessários para zerar o espectrofotômetro, receberam 3 mL da solução para a análise, sendo compostos pelos mesmos reagentes, no entanto, foram mantidos cobertos com papel alumínio. Uma unidade de SOD é conceituada

como a quantidade de enzima suficiente para a inibição de 50 % da fotorredução do NBT. O cálculo da atividade da enzima utilizou a percentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$).

2.2.3.5 Atividade da enzima Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)

Conforme metodologia descrita por Peixoto et al. (1999) a atividade da enzima peroxidase foi determinada utilizando 100 μL de extrato bruto das amostras e adicionados a 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de Pyrogallol e 20 mM H_2O_2 . Após incubação por 1 minuto, a reação foi paralisada com 0,5 mL de H_2SO_4 e a leitura realizada a 420 nm em espectrofotômetro. A atividade específica ($\mu\text{Kat} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{Prot}^{-1}$) da enzima foi calculada usando-se coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.2.3.6 Determinação do Teor de Açúcares Solúvel Total

Conforme metodologia descrita por Dubois et al. (1956). Para as análises, 20 μL de extrato bruto foram adicionados a 980 μL de água destilada, 500 μL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico (Anidrol, 95 a 98% de pureza) em tubos de ensaio. Após 20 min de incubação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm, e comparadas com a curva padrão de glicose (concentrações: 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.2.3.7 Estimativa da peroxidação de lipídeos - Teor de Malonaldeído (MDA)

Conforme metodologia descrita por Heath e Packer (1968). Moeu-se e pesou-se 400 mg de sementes de cada tratamento com três repetições. As sementes foram moídas em moinho analítico Ika® (modelo A11) com uso de nitrogênio líquido e homogeneizadas com 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (P/V). As amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 90 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado. O material foi colocado em microtubo para fazer-se a determinação de MDA. Foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante e adicionado 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% preparado com 20% de TCA. Foi preparado o branco com 2,0 mL de TBA a 0,5%. As amostras foram incubadas a 90° C por 20 minutos em tubo de ensaio. A reação foi parada em banho de gelo e em seguida centrifugada a 1.000 g por 5 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm e 660 nm.

A concentração de MDA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A532 - A660) \cdot 3 / (\epsilon \cdot b \cdot m)$, sendo ϵ o coeficiente de extinção molar: $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$; b o comprimento óptico e m a massa em gramas. O teor de MDA foi expresso em nmol g⁻¹ de matéria fresca de sementes (MF). Os resultados correspondem a média de duas medições por amostra.

2.2.4 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Todas as análises foram realizadas com o programa R versão 4.1.2 (R Core Team, 2021) e SigmaPlot versão 14.

As análises bioquímicas foram sujeitas à Análise de Componente Principal (ACP) utilizando os pacotes *devtools*, *fatorextra* e *ggbiplot*, em função dos cultivares, temperaturas e umidades relativas.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios de germinação e viabilidade obtidos durante os pontos de coleta durante o armazenamento e envelhecimento artificial (longevidade) para as análises bioquímicas são descritos a seguir na Tabela 3.

TABELA 3 - Valores de Germinação média (%) e Viabilidade média (%) para as cultivares BRS 6979 (1), 7677 (2), 8473 (3), 8579 (4), M7119 (5), em função dos tratamentos avaliados.

Tratamento	Código	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Tempo (Dias)	Germinação (%)	Viabilidade (%)
1	1	15	50	105	94,0	100,0
2	1	15	50	288	70,0	98,0
3	1	15	50	468	84,0	94,0
4	1	15	50	938	72,0	96,0
5	1	30	60	07	86,0	100,0
6	1	30	60	14	92,0	100,0
7	1	30	60	28	90,0	98,0
8	1	30	60	63	62,0	84,0
9	1	30	70	07	86,0	98,0
10	1	30	70	28	74,0	86,0
11	1	30	70	77	0,0	2,0
12	1	35	75	05	94,0	98,0
13	1	35	75	14	92,0	100,0
14	1	35	75	21	68,0	92,0
15	1	35	75	34	12,0	64,0
16	1	35	75	49	0,0	12,0
17	1	35	80	14	36,0	80,0
18	1	35	80	21	0,0	0,0
19	1	42	65	40	74,0	90,0
20	1	42	65	85	68,0	84,0

21	1	42	70	05	92,0	100,0
22	1	42	70	10	72,0	96,0
23	2	15	50	217	77,0	92,0
24	2	15	50	468	72,0	86,0
25	2	15	50	938	86,0	96,0
26	3	15	50	298	88,0	98,0
27	3	15	50	468	88,0	100,0
28	3	15	50	938	80,0	96,0
29	3	30	60	28	84,0	98,0
30	3	30	60	35	90,0	100,0
31	3	30	60	84	44,0	74,0
32	3	30	60	91	66,0	92,0
33	3	30	70	07	86,0	100,0
34	3	30	70	28	78,0	98,0
35	3	30	70	77	0,0	0,0
36	3	35	75	05	94,0	100,0
37	3	35	75	14	92,0	100,0
38	3	35	75	21	84,0	98,0
39	3	35	75	49	26,0	50,0
40	3	35	80	14	66,0	96,0
41	3	35	80	21	0,0	4,0
42	3	42	70	05	86,0	100,0
43	3	42	70	30	0,0	30,0
44	4	15	50	105	90,0	98,0
45	4	15	50	468	40,0	84,0
46	4	15	50	938	48,0	92,0
47	4	35	75	5	94,0	98,0
48	5	15	50	288	70,0	92,0
49	5	15	50	468	78,0	94,0
50	5	15	50	938	62,0	90,0
51	5	30	60	28	86,0	100,0
52	5	30	60	35	66,0	84,0
53	5	30	60	49	56,0	84,0
54	5	30	70	7	84,0	98,0
55	5	30	70	28	80,0	94,0
56	5	30	70	77	0,0	0,0
57	5	35	75	5	94,0	98,0
58	5	35	75	14	92,0	100,0
59	5	35	75	21	86,0	96,0
60	5	35	75	49	72,0	90,0
61	5	35	75	70	0,0	8,0
62	5	35	80	14	72,0	94,0
63	5	35	80	21	0,0	4,0
64	5	42	65	30	08,0	18,0
65	5	42	65	40	26,0	50,0
66	5	42	65	85	2,0	8,0
67	5	42	70	5	90,0	98,0
68	5	42	70	20	4,0	10,0
69	5	42	70	25	8,0	40,0
70	5	42	70	30	0,0	0,0

Os dados de germinação e viabilidade ao longo do armazenamento, compreendem no comportamento da longevidade das sementes vistas sob diferentes níveis de classificação. A viabilidade das sementes não leva em consideração a capacidade de se gerar uma nova planta como na classificação de germinação, porém

a viabilidade evidencia que existe atividade biológica na semente com a emissão da radícula, protrusão >2mm (BRASIL, 2009).

Os tratamentos avaliados de forma isoladas evidenciam lotes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, e com isso diferentes comportamentos durante a longevidade. O incremento da longevidade em relação ao ponto anterior já foi observado em outros trabalhos como Santos et al., (2019), e muito intrigou quanto a sua origem. Sabe-se que a dinâmica da redução do potencial fisiológico ao longo do tempo é diretamente afetada pela qualidade inicial e diferença entre lotes de alto e baixo vigor (FINCHSAVAGE; BASSEL, 2016).

As formas de incremento são tanto em germinação, quanto em viabilidade, de forma simultâneas e isoladas. Em condições de armazenamento de baixa umidade relativa e temperatura, ou seja, de indução à uma baixa atividade metabólica, esses comportamentos também foram observados, aos quais, buscamos compreender de modo isolado em função do ambiente e de modo geral, nas discussões a seguir.

Os ambientes de armazenamento e envelhecimento compreenderam em temperaturas de 15 à 42°C, e umidade relativa de 50 à 80%. Os parâmetros bioquímicos (Figuras 1 a 5) avaliados foram expressos em média, desvio amostral de Proteína Solúvel Total (PST), Teor de Açúcar Solúvel Total (AST), enzimas relacionadas com o SRA – Sistema de resposta antioxidativo: Atividade da Enzima Peroxidase (POD), Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) e Teor de Malonaldeído (MDA), e indicam a capacidade de resposta das sementes diante a condição de envelhecimento e armazenamentos sofridas.

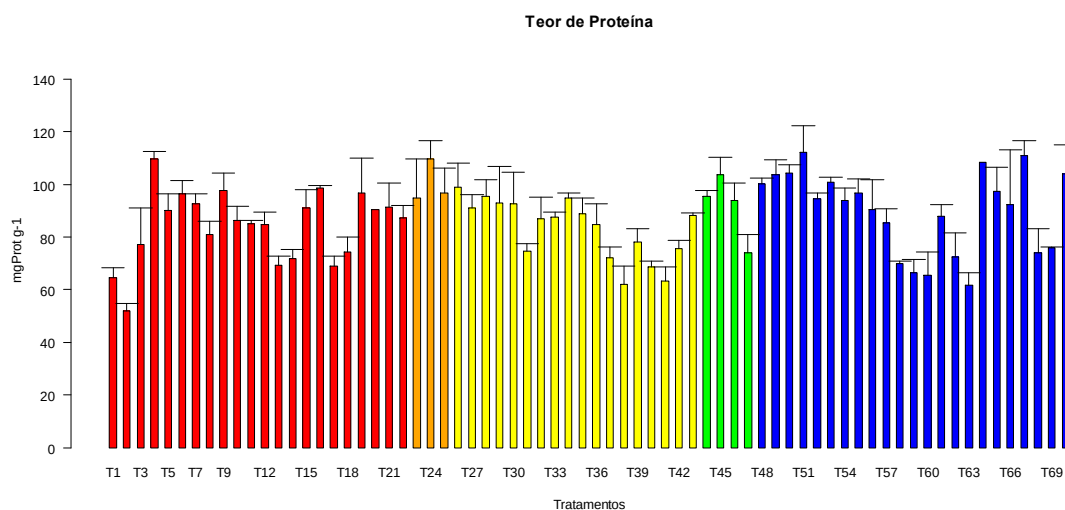


Figura 1 - Médias e desvio padrão de Proteínas Solúveis Totais (PST) para os tratamentos T1-T70. Cores correspondem as cultivares BRS 6979 (vermelho), 7677 (laranja), 8473 (amarelo), 8579 (verde), M7119 (azul).

O teor de proteína solúvel entre os 70 tratamentos foi de 87,01 mg Prot.g⁻¹, em média, sendo os tratamentos 04, 24, 27, 45, 48, 49, 50, 51, 53, 64, 67, 70 com os maiores valores de teor de proteína. As cultivares estudadas obtiveram diferentes teores de proteína total solúvel mesmo sendo cultivares advindas de região semelhante.

Diminuições na atividade enzimática durante a germinação de sementes envelhecidas pode ser resultante da diminuição da síntese proteica significando que o início da deterioração das sementes geralmente está associado à redução na síntese de proteínas (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972), de tal modo que a capacidade de ativação desses mecanismos de defesa antioxidativos possam prevenir o acúmulo de EROS e o estresse oxidativo extremo (BHATTACHARJEE, 2010), o que culminaria em inviabilidade das sementes.

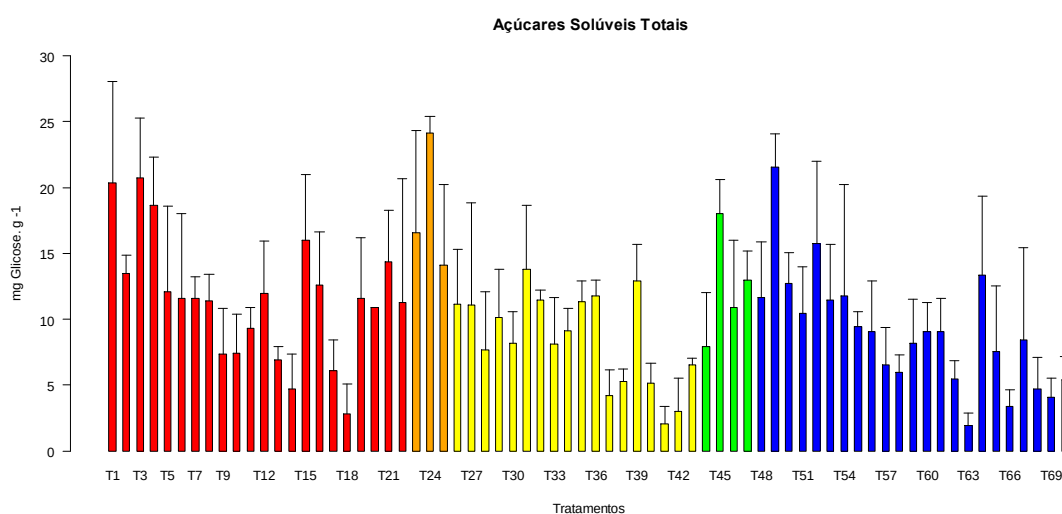


Figura 2 - Médias e desvio de Açúcares Solúveis Totais (AST) para os tratamentos T1-T70 separadas em cores por cultivar. Cores correspondem as cultivares BRS 6979 (vermelho), 7677 (laranja), 8473 (amarelo), 8579 (verde), M7119 (azul).

O teor de Açúcar Solúvel médio entre os 70 tratamentos foi de 10,28 mg Glicose.g⁻¹, sendo os tratamentos 01, 03, 04, 15, 23, 24, 45, 49, 52 com os maiores valores médios de teor de açúcar solúvel.

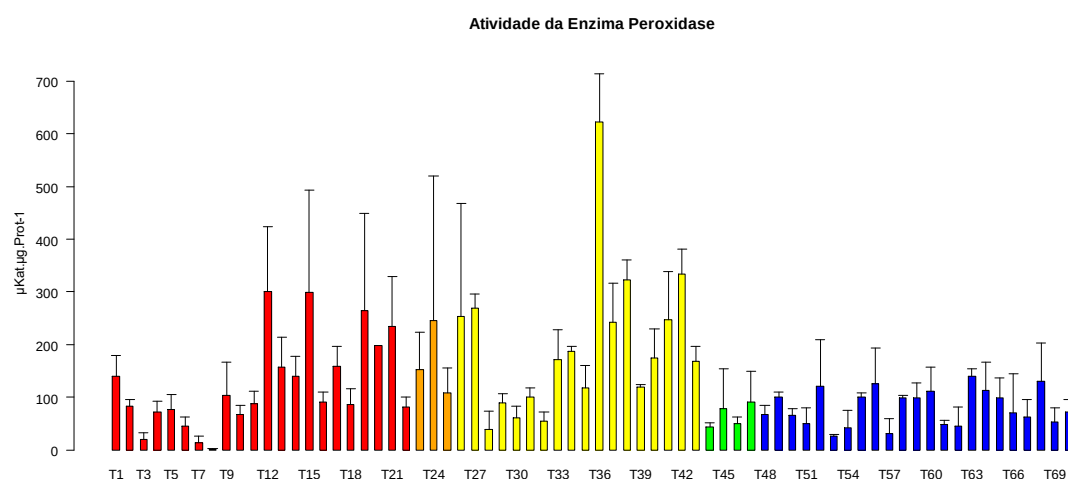


Figura 3 - Médias e desvio da Atividade da Enzima Peroxidase (POD) para os tratamentos T1-T70. Cores correspondem as cultivares BRS 6979 (vermelho), 7677 (laranja), 8473 (amarelo), 8579 (verde), M7119 (azul).

A média de atividade de Peroxidase entre os 70 tratamentos foi 127,26 $\mu\text{kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$. O tratamento 36 (Cultivar 3, temperatura 35°C e 75% UR, no tempo de 5 dias) foi o que mais distanciou-se em relação aos tratamentos avaliados, obtendo o maior valor médio de teor de açúcar solúvel. Os tratamentos 12, 15, 19, 24 e 26, foram os que apresentaram maior variabilidade entre os dados.

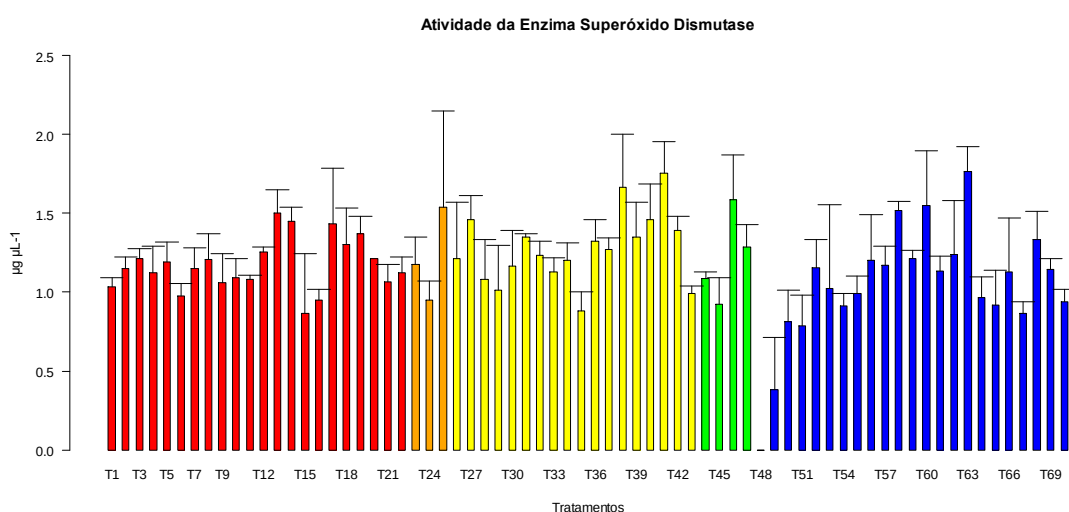


Figura 4 - Médias e desvio de Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) para os tratamentos T1-T70. Cores correspondem as cultivares BRS 6979 (vermelho), 7677 (laranja), 8473 (amarelo), 8579 (verde), M7119 (azul).

A média de atividade de Superóxido Dismutase entre os 70 tratamentos foi 1,16 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Sendo os tratamentos de 13, 14, 17, 25, 41, 38, 46, 58, 60, e 63 com os

maiores valores médios de atividade de Superóxido Dismutase. O tratamento 48 não teve atividade para SOD. Embora a atividade da SOD, possa ser considerada baixa, esta enzima esteve atuante em maior parte dos tratamentos.

A enzima superóxido dismutase (SOD) constituem a primeira linha de defesa contra EROS (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Se a atividade da SOD for baixa, este fato pode indicar que as sementes estão mais suscetíveis ao ataque de radicais livres (Timóteo, 2011). O estresse oxidativo causado por altos níveis de EROS leva a peroxidação de lipídeos e a formação de MDA (CRUZ DE CARVALHO, 2008), o que pode auxiliar a compreender os níveis de MDA obtidos nesse estudo (Figura 5).

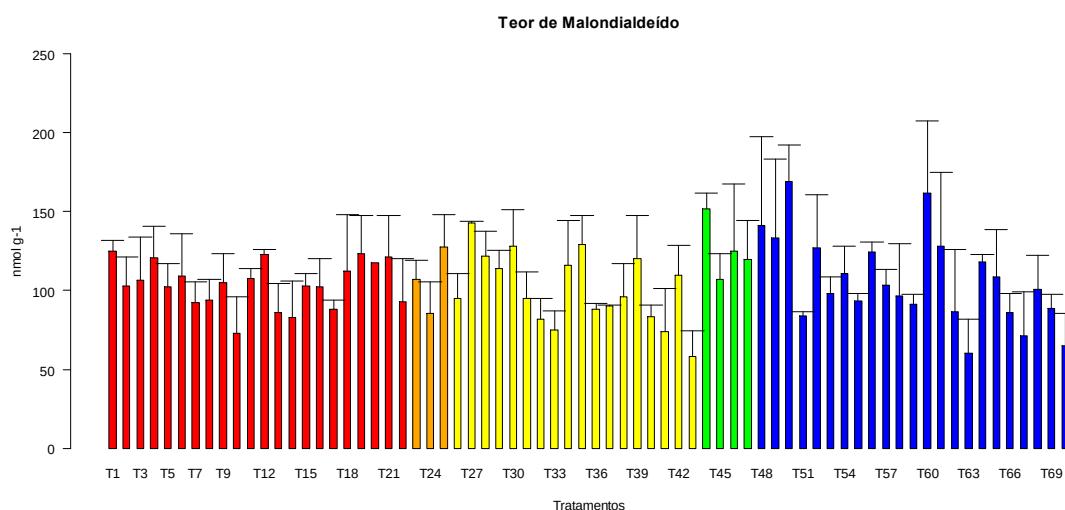


Figura 5 - Médias e desvios de Teor de Malonaldeído (MDA) para os tratamentos T1-T70. Cores correspondem as cultivares BRS 6979 (vermelho), 7677 (laranja), 8473 (amarelo), 8579 (verde), M7119 (azul).

O teor de Malonaldeído médio entre os 70 tratamentos foi de 105,47 mmol.g⁻¹, sendo os tratamentos 28, 29, 30, 34, 35, 39, 44, 48, 49, 50, 52, 56, 60 e 61 com os maiores valores médios de MDA.

Os processos não-enzimáticos em sementes secas responsáveis pela produção de EROS são as reações de Amadori e Maillard e a peroxidação lipídica (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008). Sementes submetidas ao envelhecimento acelerado evidenciam o aumento nos níveis de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e MDA, que são origem da deterioração das membranas e perda da capacidade de germinação e vigor ao longo do armazenamento (GOEL; SHEORAN, 2003; SONG et al., 2013).

Ducatti (2018) estudando sementes submetidas ao estresse hídrico em sua produção relacionou que o vigor e a longevidade de sementes tiveram relação positiva aos maiores níveis de H_2O_2 e atividade da enzima Catalase (CAT), no entanto, menores níveis de MDA. O que pode sugerir que sementes advindas de plantas cultivadas sob condição de estresse apresentem um menor teor de MDA, indicando menor peroxidação lipídica e possível envolvimento de H_2O_2 em vias de sinalização prévias.

Em desequilíbrio, a produção de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio supera a capacidade de ação do SRA, favorecendo a oxidação e gerando marcadores do estresse oxidativo, como o MDA.

Os fatores ambientais e genéticos influenciaram no comportamento bioquímico durante o estudo da longevidade de sementes, tanto para a mesma cultivar avaliada em diferentes condições de armazenamento, quanto para diferentes cultivares no mesmo ambiente de avaliação quando estudados os AST, PST, POD, SOD e MDA conforme podemos ver nas Figuras de 6 a 9.

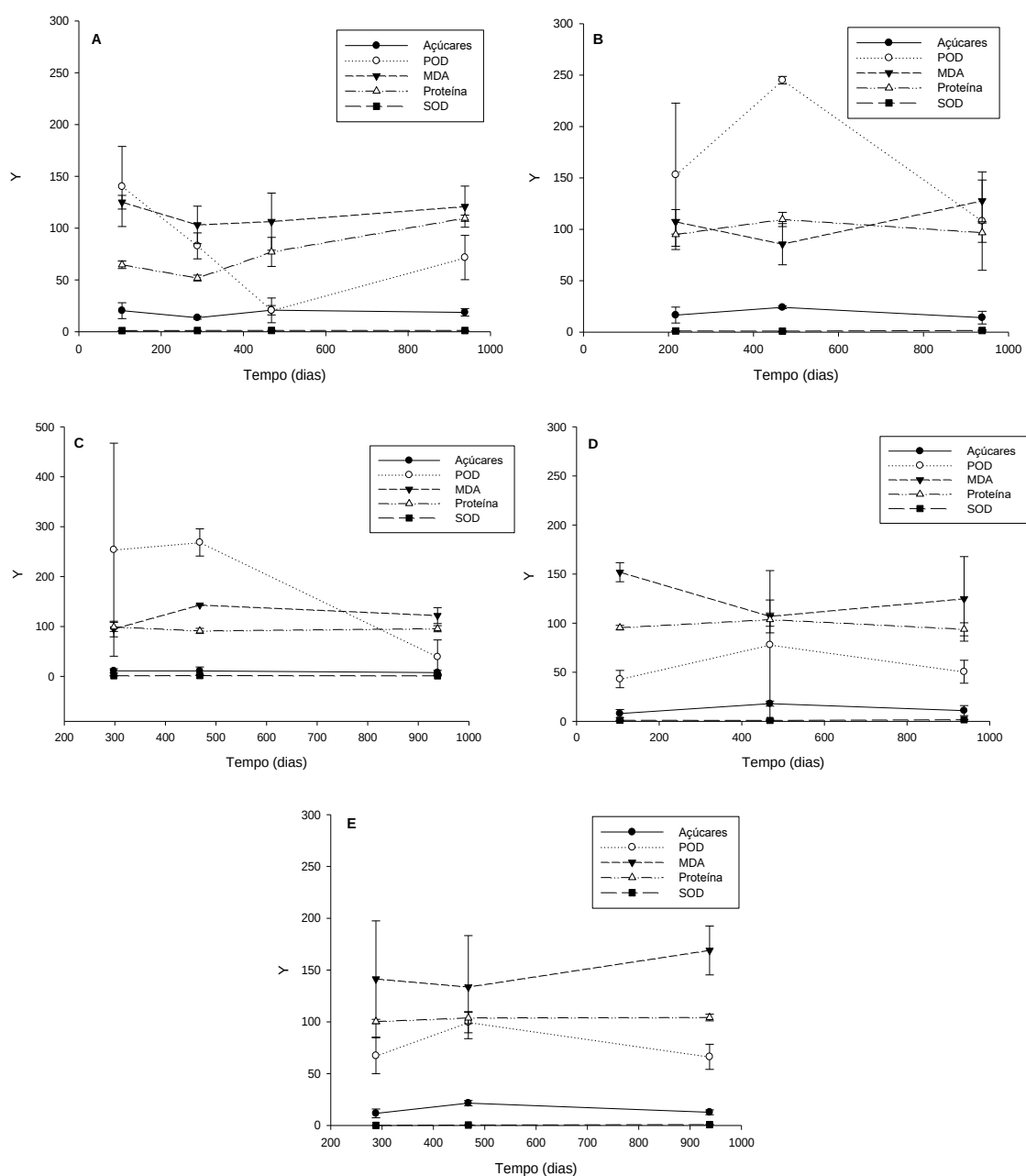


Figura 6 - Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST) e Superóxido Dismutase (SOD), para as cultivares BRS 6979 – T1 a T4 (A), 7677 – T23 a 25 (B), 8473 – T26 a 28 (C), 8579 – T44 a 46 (D), M7119 – T48 a 50 (E), durante armazenamento à 15°C e 50% de Umidade Relativa do ar.

O ambiente de armazenamento de 15°C e 50% UR (Figura 6) obteve alguns dos maiores valores de AST e PST para todas as cultivares avaliadas. Possivelmente, em decorrência do equilíbrio antioxidativo das células, visto que, esse ambiente, tem como objetivo reduzir a atividade metabólica para manutenção da viabilidade.

Ainda nesse ambiente, picos de AST podem ser relatados em 468 dias para todas as cultivares avaliadas. A Cultivar BRS 6979 (Figura 6-A), cujo ambiente fora

avaliados 4 momentos de observação, obteve ainda um pico inicial de AST em 105 dias. A qualidade fisiológica da semente é positivamente influenciada pelo maior teor inicial de açúcares solúveis (NERLING; COELHO; BRÜMMER, 2018), conforme podemos observar nesse ambiente.

A atividade de POD, apresentou dois comportamentos inversos para esse ambiente. Para a cultivar BRS 6979 iniciou-se em 140,20 $\mu\text{kat} \cdot \mu\text{Prot}^{-1}$ reduzindo sua atividade até 468 dias (20,62 $\mu\text{kat} \cdot \mu\text{Prot}^{-1}$) e posterior recuperação de 50% do valor inicial. Para as demais cultivares 8579 e M7119, iniciou-se em baixa, 43,06 e 67,34 $\mu\text{kat} \cdot \mu\text{Prot}^{-1}$, respectivamente, ocorrendo um pico em 468 dias (77,91 e 99,64 $\mu\text{kat} \cdot \mu\text{Prot}^{-1}$, respectivamente) e posterior decréscimo próximo ao valor inicial.

A peroxidação indicada pelo teor de MDA, assim como a atividade da POD, apresentou dois comportamentos inversos. Início em valores medianos, redução da atividade e novamente o acúmulo para as cultivares exceto para cultivar 8473, que teve um pico de MDA em 468 dias.

O PTS apresentou pequenas diferenças em acúmulo ao longo dos dias avaliados. Para essa condição de armazenamento a cultivar BRS 6979 teve picos durante o armazenamento e acumulou mais ao final do ciclo. O comportamento contrário é relatado, onde o período de armazenamento reduziu os níveis de proteína para todos os tratamentos de sementes de soja submetidas a condicionamento osmótico (BRACCINI et al., 2000).

Salienta-se que nesse ambiente a germinação (Tabela 3) da cultivar BRS 6979 teve incremento de 14% em 468 dias e em 938 dias na viabilidade em 2%. A cultivar 7677, aumentou germinação e viabilidade de 14% e 10%, respectivamente, em 938 dias. A cultivar 8473 aumentou 2% em viabilidade em 468 dias. A cultivar 8579 aumentou em 8% a sua germinação e viabilidade, em 938 dias. A cultivar M7119 incrementou 8% em sua germinação e 2% em viabilidade, em 468 dias. Incrementos em germinação durante o armazenamento sugerem que as células conseguiram eliminar as EROS geradas por meio das enzimas antioxidativas.

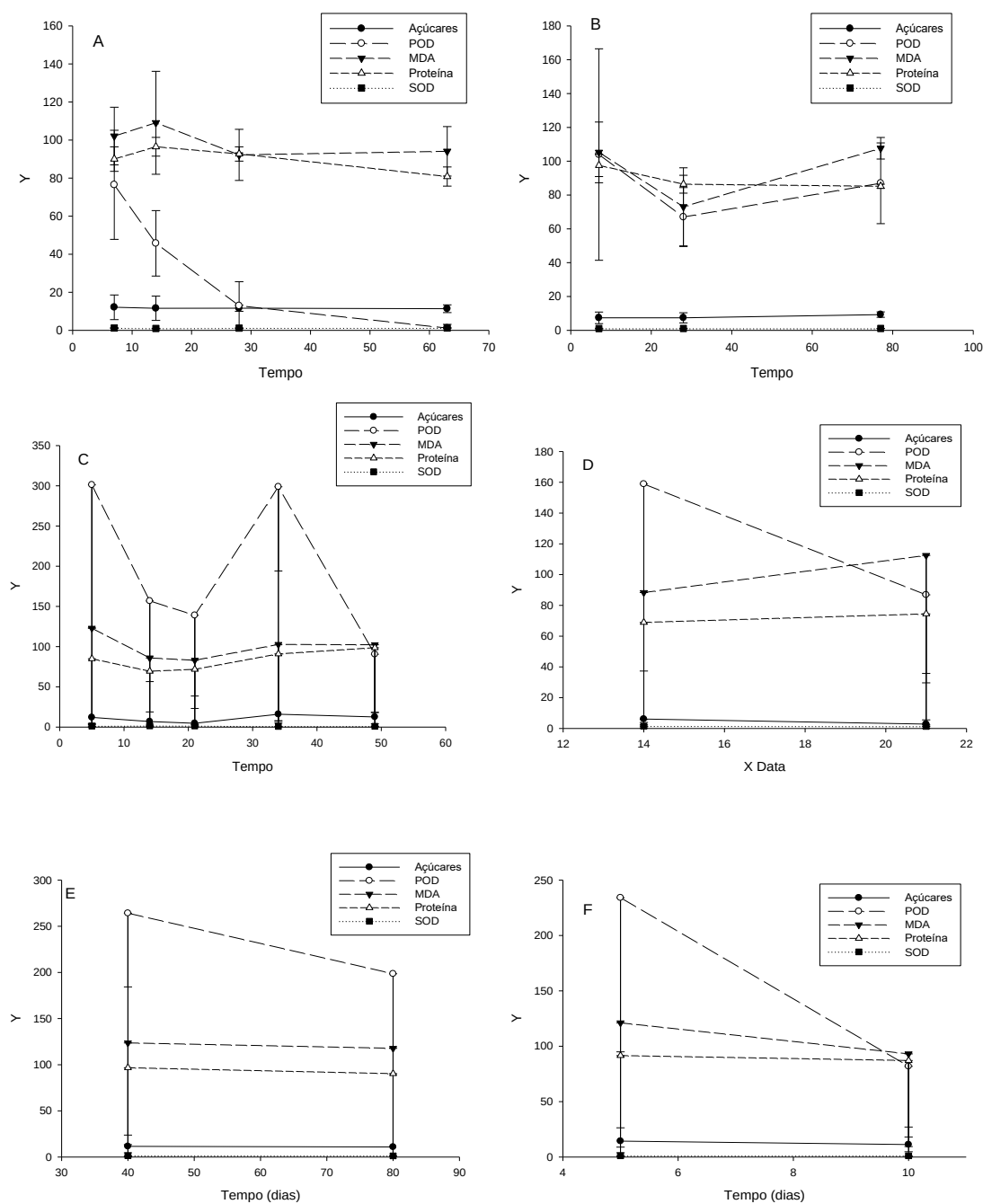


Figura 7 - Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST) e Superóxido Dismutase (SOD), para a cultivar BRS 6979 durante armazenamento à 30°C e 60% UR – T5 a T8 (A), 30°C e 70% UR – T9 a T11 (B), 35°C e 75% UR – T12 a T16 (C), 35°C e 80% UR – T17 a T18 (D), 42°C e 65% UR – T19 a T20 (E) e 42°C e 70% UR – T21 a T22 (F).

O ambiente de armazenamento influenciou no comportamento da PTS, ATS, MDA, SOD e POD para a cultivar BRS 6979 (Figura 7).

Para a temperatura de 30°C 60% UR (Figura 7-A), AST obtiveram poucas diferenças entre os momentos estudados. O MDA e PST também obtiveram comportamentos semelhantes e ponto de inflexão conjunto em 28 dias. Ambos os

valores finalizaram abaixo das médias iniciais. A POD teve comportamento de redução ao longo dos 63 dias avaliados, finalizando com $1,14 \mu\text{kat } \mu\text{Prot}^{-1}$, o que difere do comportamento de todas as demais temperaturas para essa cultivar, sem a evidência de picos dessa atividade. A atividade da SOD teve redução em 14 dias, momento em que é observado o aumento de 6% em germinação, e aumentou no final dos 63 dias.

Em 30°C 70% UR (Figura 7-B) é observado o aumento contínuo da atividade de AST até final da longevidade em 77 dias, ponto no qual já não se observa mais germinação e viabilidade neste lote. A PST inicia-se em valores entre 87,68 e 99,57 mg Proteína.g⁻¹ em 7 dias e decresce aproximadamente entre 5-10% até o momento da inviabilidade. A POD e MDA, assim como PST inicia em alta, reduz em 28 dias e cresce ao final novamente. Observa-se que a resposta de 105,21 nmol.g⁻¹ MDA em 07 dias de envelhecimento dentro do estudo da longevidade, é próxima à resposta do momento que as sementes já não possuem viabilidade 107,63 nmol.g⁻¹ em 77 dias, o que diferencia-se é a atividade das outras enzimas, como exemplo da SOD que em 28 dias aumenta. Observa-se então que o aumento do MDA o que afetou negativamente a PST e que a POD não foi eficiente, provavelmente pela duração do armazenamento ou estresse, pois em 77 dias as sementes já se classificavam como inviáveis.

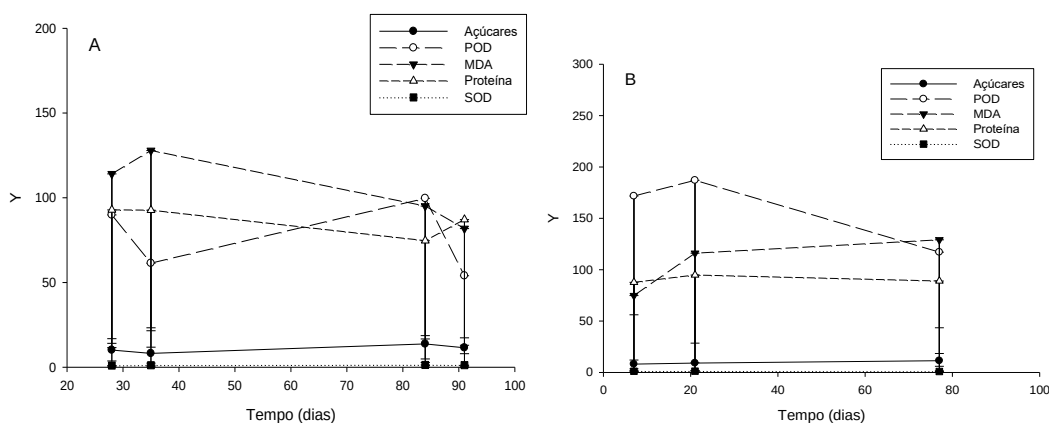
A longevidade costuma ser avaliada em condições de 35°C e 75% de umidade relativa do ar, por isso, essa combinação possui maior quantidade de pontos observados (Figura 1-C). A maior variação é detectada na atividade da enzima Peroxidase (POD). Durante essa condição houve o decréscimo da atividade da enzima POD até o tempo de avaliação de 14 dias e posterior incremento em 35 dias, chegando neste tempo ao valor da atividade observada no primeiro dia avaliado, e novamente o decréscimo em 49 dias de avaliação. O mesmo pode ser visto para o teor de açúcares totais e proteína, entretanto, o incremento em 35 dias não foi em grandes proporções para o teor de PST, AST e MDA. Evidencia-se que a POD inicialmente conseguiu reduzir o estresse causado pelo peróxido, apresentando um alto teor de germinação e viabilidade, porém um pequeno aumento do MDA promoveu a redução da germinação e viabilidade das sementes.

O mesmo comportamento de redução para POD, SOD, PST e AST foi observado para a 35° 80% UR (Figura 7-D), quando comparados ao mesmo momento de avaliação para 35°C e 75% UR. No entanto o teor de MDA, aumentou em 35% em possível resposta ao ambiente de 80% UR inviabilizando a semente.

A condição de 42°C e 65% UR para a BRS 6979 (Figura 7-E), apresentou alta viabilidade após 85 dias de armazenamento em condição de envelhecimento consideradas deletérias. A recomendação para envelhecimento acelerado de sementes de soja é 42°C por 48 horas (DUTRA; VIEIRA, 2004), nessa condição apresentou valores médios e comportamento semelhante à 35°C e 75% UR. A condição de 42°C e 70% UR (Figura 7-F) já obteve os mesmos comportamentos, no entanto com médias altas quando comparadas às demais em 5 dias de envelhecimento. Em decorrência da capacidade antioxidativa da POD, nota-se que não houve aumento do MDA, para esses tratamentos.

Assim como em outros momentos da longevidade, a cultivar 8473 RSF RR (Figura 8-A), teve aumentos em germinação durante a longevidade (Tabela 3), esse evento foi observado em 2 momentos, 35 e 91 dias, no qual observamos a redução da atividade de POD e AST e aumento da SOD, quando comparados aos pontos anteriores. O Teor de MDA teve incremento em 35 dias e redução continua a até 91 dias. O PST, se manteve em valores próximos (25 e 28 dias) e decrescendo em 84 dias e recuperando em 91 dias, porém não retornando ao valor inicial.

Em 30°C e 70% UR (Figura 8-B), podemos observar assim como na cultivar BRS 6979, a cultivar 8473 RSF RR, teve o aumento em MDA no ponto 77 dias, ocasião de sementes inviáveis. A PST teve valor máximo em 28 dias, assim como a POD e SOD. Açúcares Solúveis Totais teve aumento contínuo nessa condição de envelhecimento.



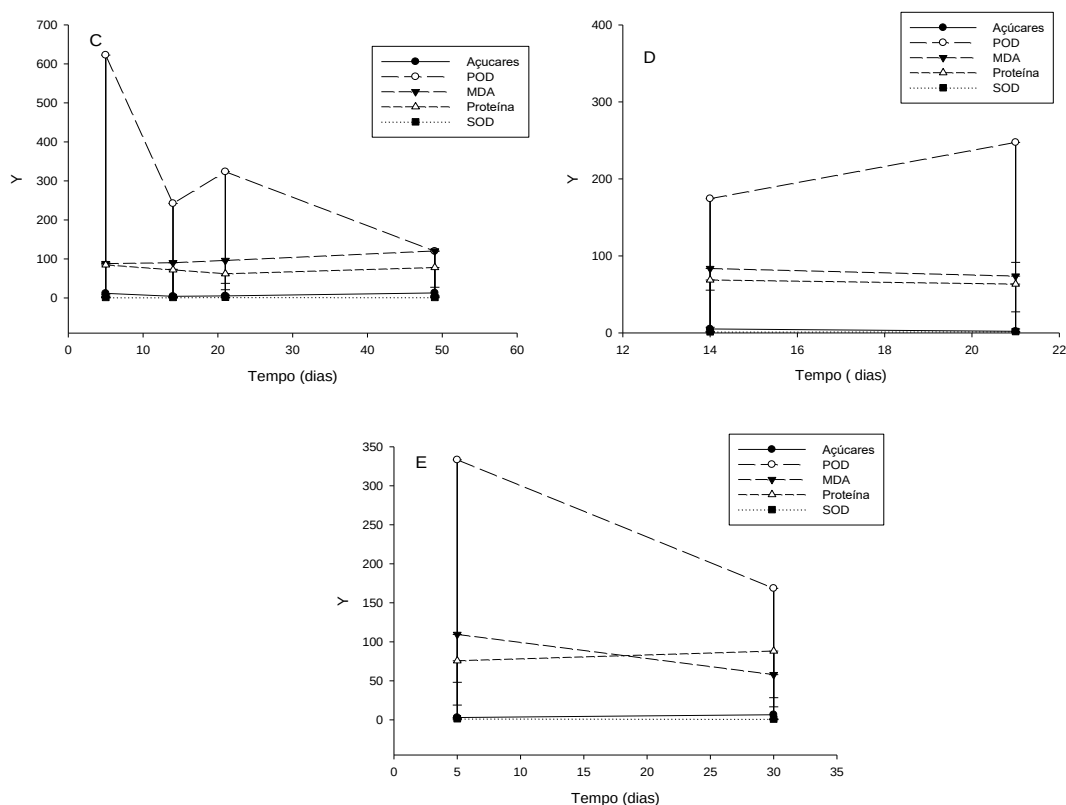


Figura 8 - Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST) e Superóxido Dismutase (SOD), para a cultivar 8473 RSF RR durante armazenamento à 30°C e 60% UR (A), 30°C e 70% UR (B), 35°C e 75% UR (C), 35°C e 80% UR (D) e 42°C e 70% UR (E).

A condição de 35°C e 75% de UR 8473 RSF RR (Figura 8-C) propiciou a maior média de POD de todos os tratamentos avaliados, sendo o dobro da atividade ocorrida para a cultivar BRS 6979 (Figura 7 – C) no mesmo momento de avaliação (5 dias). A POD em 14 dias reduz atividade em 60%, e retorna em para 50% da $POD_{inicial}$, e novamente decaí em 49 dias que representa o P50 (Tabela 3) em viabilidade do lote. O MDA apresentou aumento contínuo nesse ambiente, o ponto de maior atividade de SOD foi em 21 dias e AST obteve maiores valores em 5 dias e 49 dias.

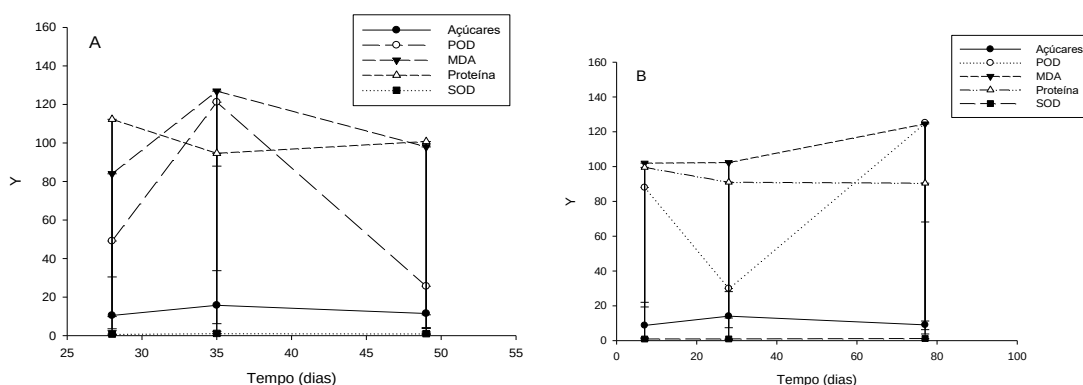
Em 35°C e 80% de UR (Figura 8-D) o AST e MDA teve comportamento inverso à 35C e 75% UR, reduzindo sua atividade. E semelhante para PST, SOD e POD, aumentando de 14 para 21 dias, mesmo com esse incremento em 21 dias, as sementes encontravam-se inviáveis.

Em 42°C e 70% de UR (Figura 8-E) o AST e PST aumentou em 30 dias, assim como reduziu-se os níveis de SOD, POD e MDA para o mesmo momento, sementes ainda com 30 % de viabilidade no lote, embora não se apresentar mais plântulas normais.

A atividade enzimática aumenta em resposta à intensidade e gravidade do estresse (SOUZA et al., 2020). Estudos indicam que a atividade de uma ou mais enzimas antioxidativas, como SOD e POD é observada em plantas expostas a condições estressantes e o aumento de suas atividades podem estar relacionados ao aumento da tolerância ao estresse. Assim como, açúcares solúveis em conjunto com proteínas protetoras contribuem para a formação do estado vítreo, e favorece a manutenção da integridade das membranas (CHATELAIN et al., 2012; BEWLEY et al., 2013; SANO et al., 2016; LEPRINCE et al., 2017).

AST, POD, SOD e MDA, apresentaram o mesmo comportamento em 30°C e 60% UR (Figura 9-A), com valores máximos em 35 dias de envelhecimento, e Proteína com comportamento inverso, teve o menor valor em 35 dias, aumentando em 49 dias.

O ambiente de 30°C e 70% UR (Figura 9-B) propicia o aumento de AST, POD e SOD. O teor de MDA inicia em 110,753 nmol.g⁻¹, decresce em 93,548 e finaliza em 124,516 nmol.g⁻¹, indicando que o nível de peroxidação de lipídios acima de 100 nmol.g⁻¹ são níveis alarmantes para a inviabilização das sementes, assim como observados na Figura 7-B e 8-B. A POD teve maior atividade observada em 77 dias, momento de inviabilidade do lote.



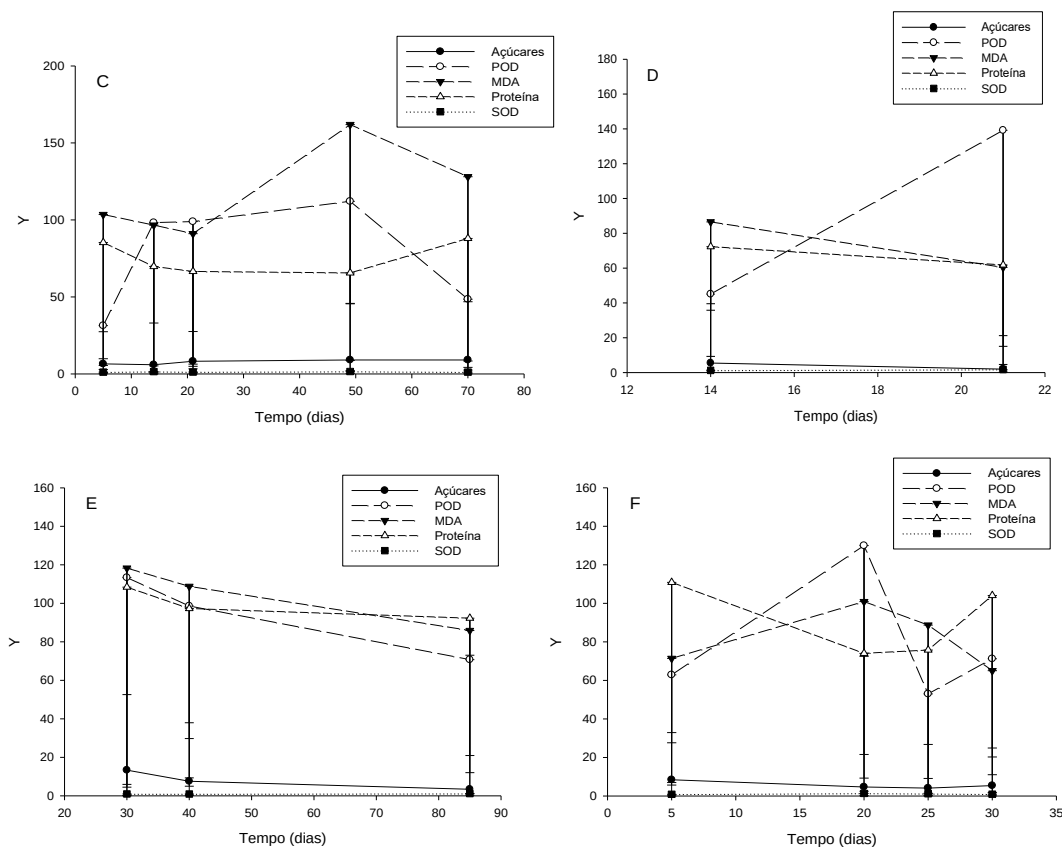


Figura 9 - Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST) e Superóxido Dismutase (SOD), para a cultivar M7119 IPRO durante armazenamento à 30°C e 60% UR (A), 30°C e 70% UR (B), 35°C e 75% UR (C), 35°C e 80% UR (D), 42°C e 65% UR (E) e 42°C e 70% UR (F).

O ambiente de 35°C e 75% UR (Figura 9-C) apresentou comportamento distinto para a cultivar M7119 IPRO, das demais cultivares estudadas, AST iniciou em alta, 11,99 mg Glicose.g⁻¹, decresceu e a partir de 14 dias teve aumento contínuo. POD teve crescimento contínuo até 49 dias e depois redução da atividade. PST teve redução contínua até 49 dias e depois desse ponto aumento. SOD apresentou aumento de atividade em 14 e 49 dias. MDA teve redução contínua até 20 dias, pico aos 49 dias e depois desse ponto reduziu. O momento de avaliação de 70 dias propiciou apenas protrusão de 8%.

Comparativamente, em condições de deficiência hídrica, a redução no acúmulo de açúcares solúveis pode estar associada à diminuição na germinação de sementes, bem como no vigor das sementes submetidas a condições estressantes (SAMARAH; MULLEN; ANDERSON, 2009).

O ambiente de 35°C e 80% UR (Figura 9-D) propiciou a redução em AST, comportamento semelhante ao ambiente de 35°C e 75% UR para a mesma cultivar no mesmo momento de avaliação, a atividade de POD e SOD, MDA e PST apresentaram comportamento semelhantes de aumento e redução, respectivamente.

O ambiente de 42°C e 65% UR (Figura 9-E) teve o incremento em germinação de 30 para 40 dias em 18% em germinação e 32 % em viabilidade, esse ambiente propiciou redução contínua para AST, POD, MDA e PST, a atividade da SOD, iniciou em alta com atividade de 0,967 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$, reduziu para 0,917 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ em 40 dias e recuperando em 1,131 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. O mesmo incremento em germinação e viabilidade foi observado no ambiente de 42°C e 70% UR (Figura 9-F), entre 20 e 25 dias, o incremento em 4% de germinação e 30% em viabilidade. A atividade da POD apresentou dois picos em 20 dias e 30 dias, sendo o pico em 30 dias equivalente apenas em 50% do primeiro pico. AST teve redução contínua até 25 dias, posterior aumento em 30 dias. O teor de MDA iniciou em 71,39 nmol.g^{-1} , teve seu teor máximo em 21 dias com 101,09 nmol.g^{-1} e posterior redução contínua. O Teor de PST iniciou em 110,88 mgProt. g^{-1} reduziu até 25 dias e posteriormente, aumentou 104,05 mgProt. g^{-1} .

Lotes com alta germinação e viabilidade apresentaram diferentes respostas ao envelhecimento, assim como observado por Santos, Menezes e Villela (2004) que em lotes de sementes de feijão com alta germinação obtiveram diferenças em resposta ao processo de envelhecimento, evidenciados pela redução na capacidade seletiva das membranas das sementes e pelo crescimento e desenvolvimento das plântulas.

A longevidade foi afetada pelos níveis de temperatura e UR durante o envelhecimento. Comparativamente, lotes de sementes advindas de plantas que sofreram condições de estresse em campo também são afetados em nível de longevidade, sendo estresse hídrico mais danoso (DUCATTI, 2018).

A análise de Componente Principal para os tratamentos é apresentada nas Figuras 10-13.

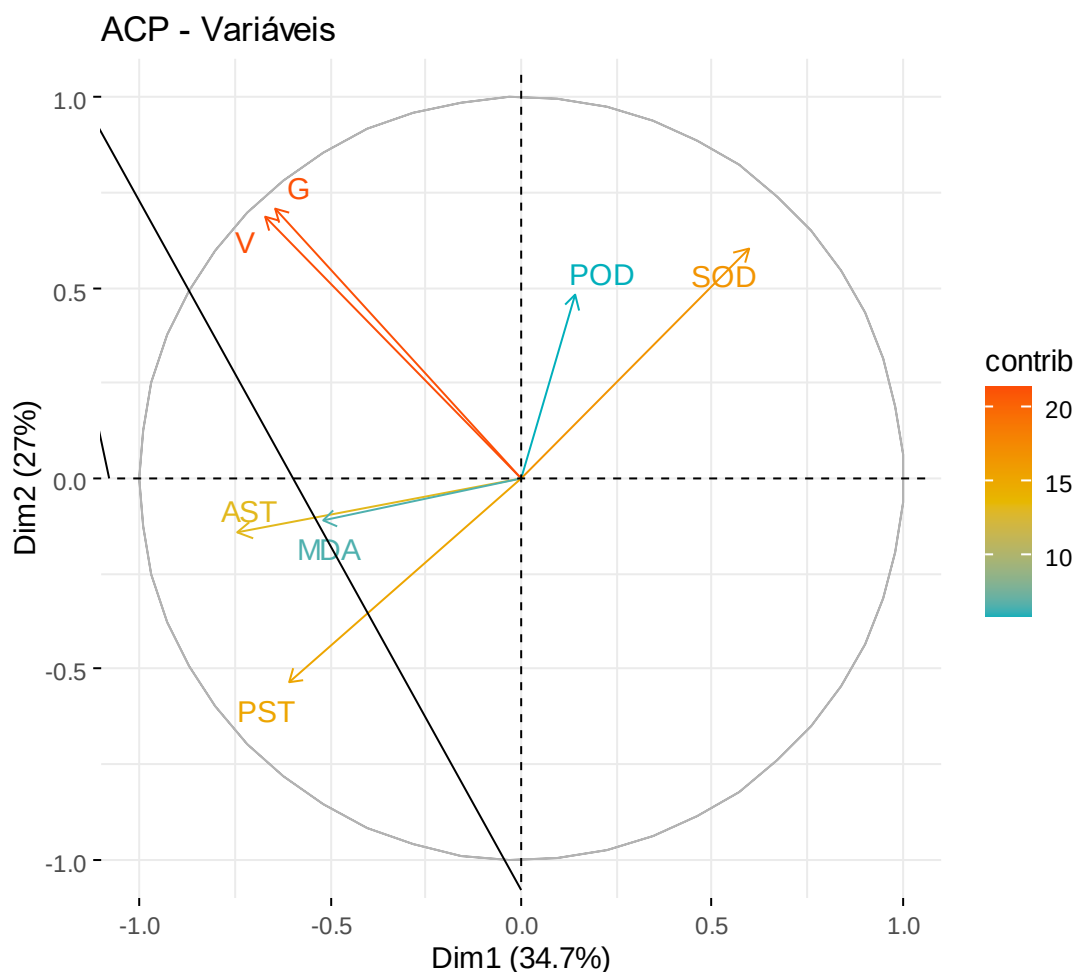


Figura 10 – Biplot Autovetores nos componentes principais 1 e 2: Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST), Superóxido Dismutase (SOD), Germinação(G), Viabilidade(V), conforme tratamentos da Tabela 2.

As três primeiras componentes explicaram a totalidade de aproximadamente 74,70% de toda a variabilidade no conjunto de dados (34,71% explicado pelo Componente Principal 1 (CP1), 26,96% por CP2 e 13,04% por CP3), conforme Rencher, (2002); Varmuza; Filzmoser, (2009) essa proporção da variância explicada pelas (CP) deve corresponder a pelo menos 70%.

Podemos observar que na Figura 10, o CP1 apresentou grandes associações positivas com as variáveis SOD e POD. Já no CP2, observa-se que as variáveis G, V, POD e SOD apresentaram associações positivas, PST, AST, e MDA apresentaram associações negativas, respectivamente.

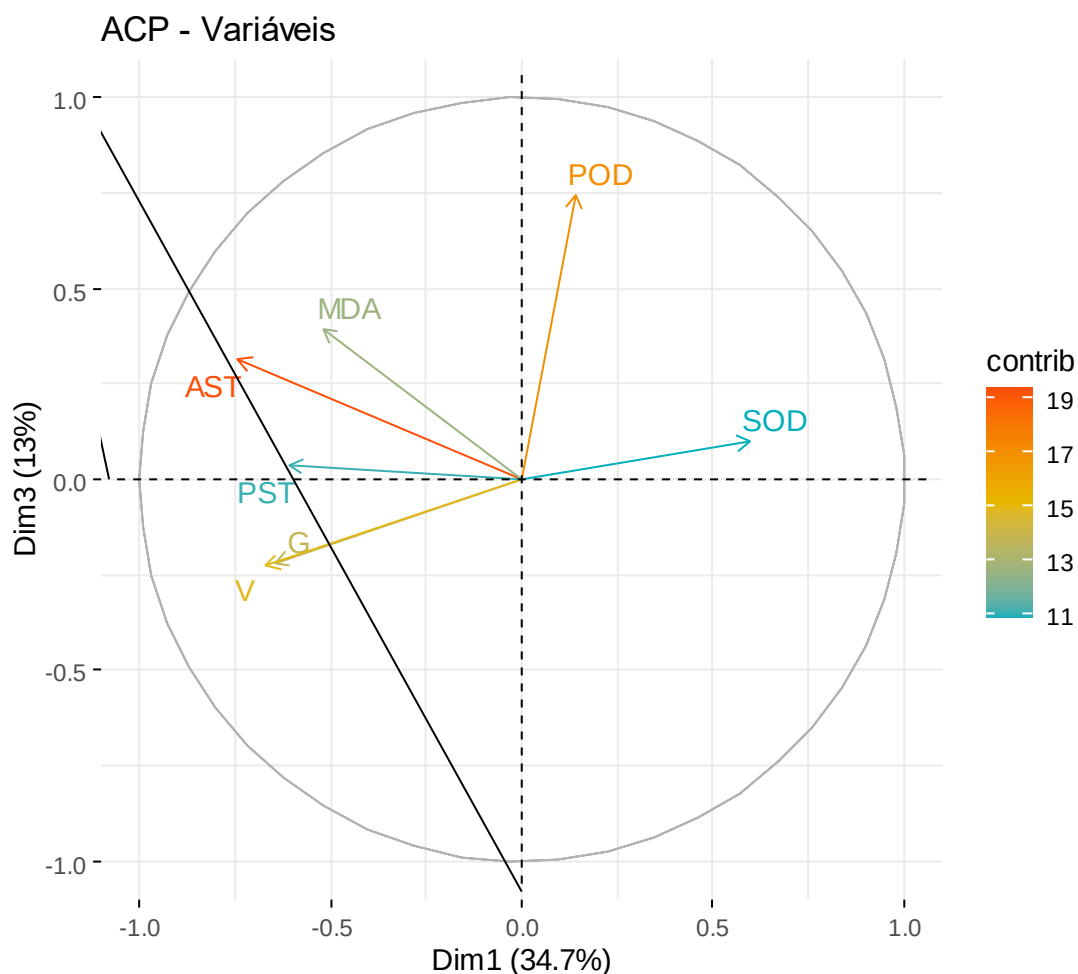


Figura 11 – *Biplot* Autovetores nos componentes principais 1 e 3: Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST), Superóxido Dismutase (SOD), Germinação(G), Viabilidade(V), conforme tratamentos da Tabela 2.

Podemos observar que na Figura 11, o CP3, observa-se que as variáveis PST, AST, MDA, POD e SOD apresentaram associações positivas, e G e V apresentaram associações negativas, respectivamente.

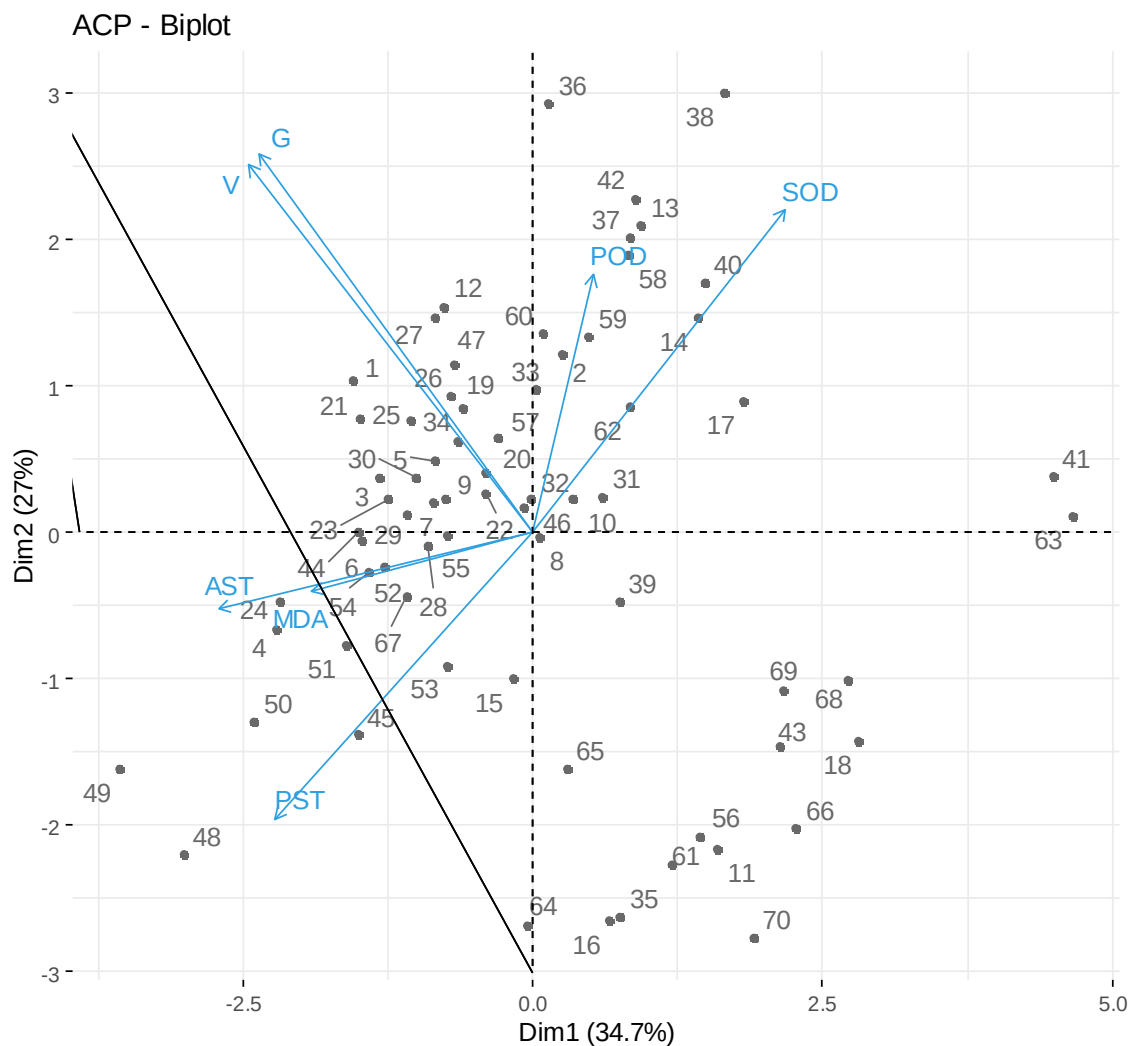


Figura 12 – Biplot Escores nos componentes principais 1 e 2 para os valores médios de: Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST), Superóxido Dismutase (SOD), Germinação (G), Viabilidade (V), conforme tratamentos da Tabela 2.

Podemos observar que o aumento da atividade PST representa a diminuição da atividade da SOD. Como mecanismo de proteção, a proteína nesse acaso atua ativamente nos tratamentos, 48, 49 e 50.

A AST associa-se ao nível de MDA, como mecanismo de proteção assim como PST.

A separação completa de lotes com baixo valor de germinação e inviabilidade são observados opostamente aos autovetores de G e V, assim como níveis próximos de P50 são observados em mesmo sentido, porém próximos ao PST.

Como sistemas em mesmo nível antioxidativo a atividade de POD é próxima em nível de SOD, sendo a SOD, com maior nível de scores, nessa componente.

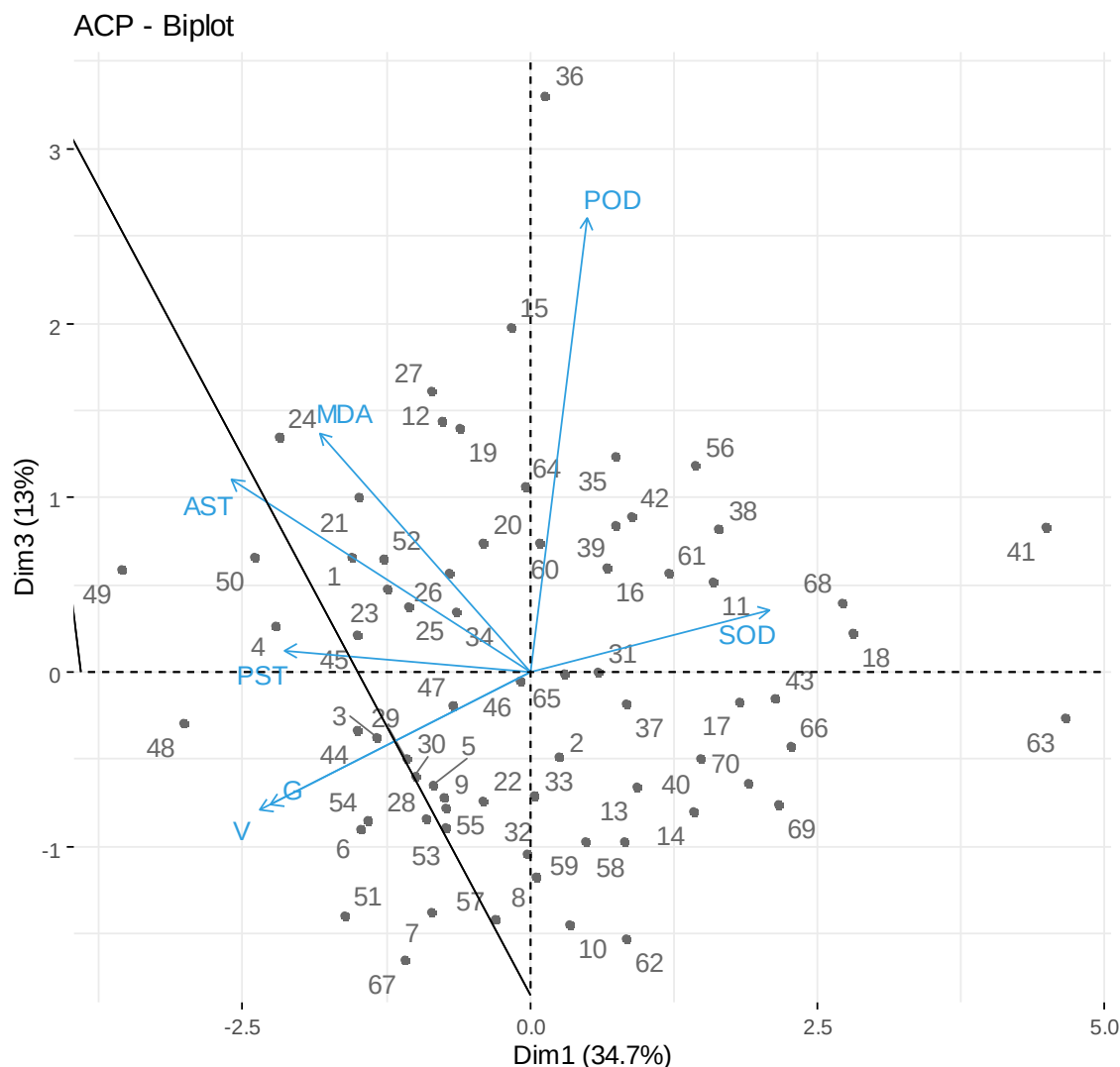


Figura 13 – Biplot Escores nos componentes principais 1 e 3 para os valores médios de: Açúcares Solúveis Totais (AST), Peroxidase (POD), Teor de Malonaldeído (MDA), Proteína Solúvel Total (PST), Superóxido Dismutase (SOD), Germinação (G), Viabilidade (V), conforme tratamentos da Tabela 2.

Podemos observar que o aumento da atividade SOD representa a diminuição da germinação e da viabilidade. Os tratamentos 18, 41, 63 e 68, que se apresentaram mais distantes de todos e próximos ao autovetor de SOD, são lotes que apresentaram inviabilidade. Assim como os tratamentos 11, 16, 35, 56, e 61 apresentam baixa ou inviabilidade total dos lotes. Embora sejam tratamentos que apresentem alta atividade de SOD, 38, 39 e 42 são lotes que ainda apresentaram alta viabilidade > 90%, e também com alta atividade de POD.

A atividade de POD alta e relação com alta viabilidade para os tratamentos 12, 15, 19, 20, 27, 36, 60, 64 indicando que essa foi a via utilizada para remoção de íons deletérios. Sabe-se que as PODs utilizam o H_2O_2 como oxidante e compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons, de tal modo, o H_2O_2 formado pela ação

da SOD também pode ser removido pelas PODs, além da CAT e APX (LOCATO et al., 2010). Alguns desses tratamentos apresentaram altos valores de MDA, indicando que embora o sistema esteja atuando, a atividade de peroxidação dos compostos não foi totalmente suprimida.

O aumento da SOD, POD e MDA foram proporcionais. A SOD, atuou em menor proporção que a POD, indicando que o metabolismo da semente estava tentando desintoxicar as células (verificado pelo aumento da SOD e POD), entretanto não estava sendo tão eficiente, pois o teor de MDA ainda foi alto, como efeito teve-se a deterioração das membranas e consequente redução da germinação e viabilidade

A atividade de AST e PST foram próximas e evidenciaram os tratamentos 01, 04, 23, 25, 49, 50, 51, com alta viabilidade, ainda que em longos períodos de armazenamento. Os tratamentos que se apresentaram abaixo dos autovetores de G, V e SOD, com baixos escores para componente 1, são lotes que apresentam características de germinação e viabilidade acima do P_{50} e baixa atividade do SRA.

Com base nesse estudo, sugere-se que o envelhecimento das sementes em diferentes ambientes de armazenamento, foi percebido pelas sementes como uma condição de estresse, o que ocasionou diferenciações em acúmulo de açúcares solúveis e proteínas protetoras, para longos períodos de armazenamento, bem como aumento da atividade de Peroxidase e Superóxido Dismutase, sendo a peroxidase alta, indicativo de viabilidade quando associada com a SOD, o que refletiu no aumento em peroxidação lipídica (MDA) das sementes. Com a duração do estresse, houve aumento da atividade das enzimas também, mas não foram mais eficientes, consequente aumento em níveis de teor de MDA, culminando até a morte e inviabilidade total dos lotes.

2.4 CONCLUSÕES

As atividades das enzimas do sistema antioxidativo não são contínuas em função do armazenamento e variam em função da resposta ao nível de estresse do envelhecimento.

Lotes de sementes com alto teor de Proteína Solúvel Total podem indicar sementes com nível de envelhecimento e deterioração mais avançados.

Lotes que apresentem o segundo pico do Teor de Malonaldeído acima de 105,0 nmol.g⁻¹ são passíveis de lotes de sementes inviáveis.

2.5 REFERÊNCIAS

ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T.T. Seed Biology. New York: Academic Press, 1972. v.2, p. 283-315.

ARAGÃO, Theresa Christine Filgueiras Russo. **Danos oxidativos e o envelhecimento de sementes de feijão caupi**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. Cap. 1. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/18805>. Acesso em: 18 dez. 2021.

ALSCHER, R.G; ERTURK, N; HEATH, L.S; Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J Exp Bot**, v. 53, n° 372, p. 1331-41, 2002.

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

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BARBOSA, Marta Ribeiro; SILVA, Marina Medeiros de Araújo; WILLADINO, Lilia; ULISSES, Claudia; CAMARA, Terezinha Rangel. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 15 jan. 2022.

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

BERBERT, P.A.; SILVA, J.S.; RUFATO, S.; AFONSO, A.D.L. Indicadores da qualidade dos grãos. In: SILVA, J.S. (Ed) Secagem e armazenagem de produtos agrícolas, Viçosa: Aprenda Fácil, 2008. p.63-107.

BRACCINI, Alessandro de Lucca e *et al.* Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 433-447, fev. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2000000200022>

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 398 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 and Environment**, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.

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

COLVILLE, Thomas. O Sistema Reprodutivo. In: COLVILLE, Thomas; BASSERT, Joanna M.. *Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária*. [s. L.]: Elsevier, 2010. p. 1-1296.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.

DUCATTI, Karina Renostro. **Vigor de sementes de soja: estudos fisiológicos e moleculares relacionados ao déficit hídrico**. 2018. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agricultura, Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Botucatu, 2018. Cap. 1. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/180667>. Acesso em: 15 jan. 2022.

Dutra, Alek Sandro e Vieira, Roberval Daiton Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. *Ciência Rural* [online]. 2004, v. 34, n. 3 [Acessado 5 Março 2022] , pp. 715-721. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000300010>>. Epub 02 Jul 2004. ISSN 1678-4596. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000300010>.

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.

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

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59, p. 309-314, 1977. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. *Seed biology*. New York: Academic Press, v.3, p.145-245, 1972. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000036&pid=S0006-8705198500010003100005&lng=em

HEATH, Robert L.; PACKER, Lester. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.129-150.

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

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbateglutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.45-64.

MACEDO, E.C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. *Revista brasileira de sementes*, v. 21, n.1, p.67-65, 1999.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.9, p.405-410, 2002. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9

NERLING, Daniele; COELHO, Cileide Maria Medeiros; BRÜMMER, Adriele. Biochemical profiling and its role in physiological quality of maize seeds. **Journal Of Seed Science**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 7-15, mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v40n1172734>.

NUNES JUNIOR, F. H.; GONDIM, F.A.; FREITAS, V. S.; BRAGA, B. B.; BRITO, P. O. B.; MARTINS, K. Crescimento foliar e atividades das enzimas antioxidativas em plântulas de girassol suplementadas com percolado de aterro sanitário e submetidas a estresse hídrico. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 71, 1 jan. 2017. Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrograficas (IPABHi). <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1964>.

McDonald, M. B. "Seed Deterioration: Physiology Repair and Assessment," **Seed Science and Technology**, Vol. 27, No. 1, 1999, pp. 177-237.

PRIESTLEY, David A. **Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil**. Comstock Associates, 1986.

PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SANT´ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, A. M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bras. Fis. Vegetal**, 11 (3):137-43, 1999.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

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

Rencher, A. C., & Christensen, W. F. (2002). *Methods of Multivariate Analysis*. John Wiley & Sons, Inc.: Toronto, ON, Canada. <https://doi.org/10.1002/0471271357>

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

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

SANTOS, Candice Mello Romero; MENEZES, Nilson Lemos de; VILLELA, Francisco Amaral. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-31222004000100017>.

SANTOS, Amanda Rithieli Pereira *et al.* Cauchy, Cauchy–Santos–Sartori–Faria, Logit, and Probit Functions for Estimating Seed Longevity in Soybean. **Agronomy Journal**, [S.L.], v. 111, n. 6, p. 2929-2939, nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj2018.11.0700>.

SOUZA, M.L.C., DA SILVA ALVES ZAPPAVIGNA STARLING, C., MACHUCA, L.M.R. *et al.* Biochemical parameters and physiological changes in maize plants submitted to water deficiency. *SN Appl. Sci.* **2**, 447 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2246-x>

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

TIMÓTEO, Tathiana Silva. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho**. 2011. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Cap. 2.

TIMÓTEO, Tathiana Silva; MARCOS-FILHO, Julio. Seed performance of different corn genotypes during storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, pp. 207-215, 2013.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics. Boca Raton: CRC Press, 2009. 336p.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**; v.8, p. 223-44, 1998.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As funções de Cauchy-SSF e Logit são mais adequadas que Probit para predição do período que decresce em 50% a viabilidade (P_{50}) dos lotes para a faixa de temperatura de 15°C a 35°C em ambientes de 50% a 80% de umidade relativa do ar.

As funções Cauchy-SSF e Logit, não se mostraram adequadas para estimação dos coeficientes de viabilidade segundo a metodologia de Ellis e Roberts (1980). Sugere-se maiores estudos para o desenvolvimento de modelos generalizados para predição de viabilidade ao longo do armazenamento de sementes.

As atividades das enzimas do sistema antioxidativo não são contínuas em função do armazenamento e variam em função da resposta ao nível de estresse do envelhecimento.

As análises bioquímicas do SRA de SOD e POD, bem como os terrores de AST, MDA e PST podem auxiliar na identificação de lotes de sementes passíveis de regeneração. Lotes de sementes com alto teor de Proteína Solúvel Total podem indicar sementes com nível de envelhecimento e deterioração mais avançados, enquanto os lotes que apresentarem o segundo pico do Teor de Malonaldeído acima de 105,0 nmol.g⁻¹ são passíveis de lotes de sementes inviáveis.

REFERÊNCIAS

- APEL, K. et al. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annals Rev. Plant Biology**, 2004.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, 2004.
- BATISTA, Thiago Barbosa et al. Is it possible to estimate longevity through the analyses used to measure the initial physiological potential in soybean seeds?. **Journal of Seed Science**, v. 43, 2021.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M.; HOLMES, P. The encyclopedia of seeds: science, technology and uses: technology and uses. Wallingford: CABI, 2006. p. 138-142.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Longevity, Storage, and Deterioration. In: Seeds. Springer, New York, NY. Cap. 8, p.341-370, 2013.
- BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies*, Paris, v. 331, n. 10, p. 788–95, 2008.
- CARNEIRO, J.G.A.; AGUIAR, I.B. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (coords.). Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 1993. p.333-350.
- CARVALHO, Nelson Moreira de. **Secagem de sementes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2005. 184 p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Campinas: FUNEP, 2000. 588p.
- CHAVES M.M., USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Botânica** 26: 557-564, 2003.
- COLVILLE, L.. Seed Storage. **Encyclopedia Of Applied Plant Sciences**, [S.L.], p. 335-339, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-394807-6.00080-0>.
- CROCHEMORE, M.L. Conservação de sementes de tremoço azul em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v.15, n.2, p.227-232, 1993.
- DONA, M. et al. DNA profiling, telomere analysis and antioxidant properties as tools for monitoring ex situ seed longevity. **Annals of Botany**, London, v. 111, p. 987-998, 2013.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

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

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (Rome: FAO), 2010.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (Rome: FAO), 2014.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FLORIANO, E.P. Armazenamento de sementes florestais - Caderno Didático. 1ª ed. Santa Rosa. 2004.

GOEL, Anuradha; GOEL, Ajay Kumar; SHEORAN, Inder Singh. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal Of Plant Physiology**, [S.L.], v. 160, n. 9, p. 1093-1100, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-00881>.

HARRINGTON, J. F. - Drying storage and packaging seeds to maintain, germination and vigor. Proc. Short Course for Seedsman. Seed technology Laboratory, Mississippi State, Part. II 1959.

HARRINGTON, J. F. - Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKI, T. T. - Seed biology. New York, Academic Press, 1972. v. 3, p. 145-245.

HARTMANN, H. T. & KESTER, D. E. - **Propagacion de plantas**. México, Continental, 1974. 810 p.

HILL, H. J.; CUNNINGHAM, J. D.; BRADFORD, K.J.; TAYLOR, A.G. Primed Lettuce Seeds Exhibit Increased Sensitivity to Moisture Content During Controlled Deterioration. **HortScience** October 2007 42:1436-1439.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **Tropical Tree Seed Manual**. Forest Service's, Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources. Washington, USDA. 2003.

HOPPE, J.M. Produção de sementes e mudas florestais - Caderno Didático. 2 ed. Santa Maria. 2004.

KANO, N.K.; MARQUES, F.C.M.; KAGEYAMA, P.Y. Armazenamento de sementes de ipê-dourado (*Tabebuia* sp.). Revista: IPEF, v.1, n.17, p.12-33, 1978.

LIMA, Michelane Silva Santos. Influência do percentual de sementes esverdeadas de soja no comportamento da longevidade com diferentes ambientes de armazenamento. 2021.

LOPES, Keyse Cristina Mendes. Predição da longevidade de sementes de soja por parâmetros bioquímicos. 2021.

LORINI, Irineu. Propriedades Físicas dos grãos. In: LORINI, Irineu; MILKE, Lincoln Hiroshi; SCUSSEL, Vildes Maria; FARONI, Lêda Rita D'Antonino (ed.). **Armazenagem de Grãos**. 2. ed. Ff: Bio Geneziz, 2018. Cap. 4. 1011p..

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

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

McDonald, M. B. "Seed Deterioration: Physiology Repair and Assessment," **Seed Science and Technology**, Vol. 27, No. 1, 1999, pp. 177-237.

PRIESTLEY, David A. **Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil**. Comstock Associates, 1986.

RAJJOU, Loïc; DEBEAUJON, Isabelle. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, [S.L.], v. 331, n. 10, p. 796-805, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.021>.

REDDEN, Robert; PARTINGTON, Debra. Gene bank scheduling of seed regeneration: interim report on a long term storage study. **Journal Of Integrative Agriculture**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 1529-1540, jul. 2019. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119\(19\)62730-9](http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119(19)62730-9)

REZENDE, Brunna Rithielly. Métodos preditivos da porcentagem de sementes verdes e da longevidade de sementes de soja. 2021.

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

ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. (Ed.). *Viability of seeds*. New York: Syracuse University Press, 1972. p.14-58.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.1, n. 3, p. 499-514, 1973.

SANTOS, A. R. P.; FARIA, R. Q.; AMORIM, D. J.; SILVA, E. A. A.; SARTORI, M. M. P. Função de ligação de Cauchy para avaliação de P50 de longevidade de sementes de soja. *Caderno de Trabalhos do III Encontro Luso-Galaico de Biometria*, Aveiro – Portugal, 2018.

SANTOS, Amanda Rithieli Pereira dos et al. Cauchy, Cauchy-SSF, Logit, and Probit functions for estimating seed longevity in soybean. *Agronomy Journal*. First Look.

2019. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/aj/first-look/pdf/agronj2018.11.0700.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2019

SARTORI, M. M. P.; CANTÃO, R. F.; FARIA, R.Q.; SILVA, E.A.A. Desenvolvimento de um software para avaliação da germinação e longevidade de sementes. Informativo Abrates. Volume 27 - nº 2, agosto de 2017.

SCHNEIDER, Cristina Fernanda et al. Equações de longevidade para sementes de pau-marfim. Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal Of Agricultural And Environmental Sciences, [s.l.], v. 60, n. 1, p.53-59, 2017. Editora Cubo Multimidia. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2259>.

SINÍCIO, R. Generalised Longevity Model for Orthodox Seeds. **Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 89, n. 1, p. 85-92, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2004.05.008>.

SINÍCIO, Roberto et al. Equacionamento da qualidade inicial de sementes de milho e soja para aplicação no modelo de Probit. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 122-130, 2009.

SINÍCIO, R. Equação de longevidade para sementes de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg). **Engenharia na Agricultura**, v.21, n.4, p.323-333, 2013.

SINÍCIO, Roberto. Modelamento matemático da longevidade de sementes de camu-camu. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 23, n. 3, p.203-211, jun. 2015.

SIQUEIRA, Otavio Augusto Pessotto Alves. Qualidade fisiológica e sanitária de acessos de mamoneira espontânea provenientes do Acre por modelos lineares generalizados. 2020.

SOLBERG, Svein Øivind; YNDGAARD, Flemming; ANDREASEN, Christian; VON BOTHMER, Roland; LOSKUTOV, Igor G.; ASDAL, Åsmund. Long-Term Storage and Longevity of Orthodox Seeds: a systematic review. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 11, p. 1007-1007, 3 jul. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.01007>.

SOUZA, M.L.C., DA SILVA ALVES ZAPPAVIGNA STARLING, C., MACHUCA, L.M.R. et al. Biochemical parameters and physiological changes in maize plants submitted to water deficiency. *SN Appl. Sci.* **2**, 447 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2246-x>

TOLEDO, F. F. & MARCOS FILHO, J. - Manual de sementes: tecnologia da produção. São Paulo, Agronômica Ceres, 1977. 224 p

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.

WANG, B. S. P. - Procurement, handling and storage of tree seed for genetic research. *WORLD CONSULTATION ON TREE BREEDING*, 3 Canberra, 1977

WASZCZAK, Cezary; CARMODY, Melanie; KANGASJÄRVI, Jaakko. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. **Annual Review Of Plant Biology**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 209-236, 29 abr. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>.

ZHANG, Keliang; ZHANG, Yin; SUN, Jing; MENG, Jiasong; TAO, Jun. Deterioration of orthodox seeds during ageing: influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 158, p. 475-485, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.031>.

APÊNDICE

Modelo de Caixas herméticas utilizadas para envelhecimento das sementes durante os experimentos de longevidade. Dimensões de altura: 5 cm, largura: 12 cm, comprimento: 18 cm.

