

SEMENTES ESVERDEADAS EM SOJA: TESTES ALTERNATIVOS PARA DETERMINAR A SUA QUALIDADE¹

MARIA DE FÁTIMA ZORATO², SILMAR TEICHERT PESKE³, CLAUDIO TAKEDA⁴ E JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO⁵

RESUMO – A comercialização antecipada de soja é uma realidade em Mato Grosso. Isso implica na necessidade de testes rápidos, confiáveis e que permitam minimizar riscos futuros, principalmente, quando existe um agente complicador a armazenabilidade, como é o caso de sementes com retenção de clorofila. Mudanças associadas à deterioração com conseqüente perda de vigor e viabilidade são observadas nesse tipo de semente, fazendo-se necessário o conhecimento da localização e abrangência dos pontos deteriorativos. Objetivando avaliar testes que sejam factíveis e tenham potencial de determinar a qualidade de sementes esverdeadas, foi realizado este estudo. FMT-Tucunará, ciclo semi-precoce, e EMGOPA 313, FMT-Arara Azul e M-SOY 9350, ciclo tardio, que apresentavam 25,7%, 26,8%, 22,6% e 15,6%, respectivamente, de sementes esverdeadas, foram as cultivares estudadas. Para cada cultivar foi utilizada uma amostra testemunha, isenta de pigmento verde. Cada amostra constituiu um tratamento. A qualidade foi avaliada em duas épocas (inicial, maio/2001 e final, novembro/2001), através dos testes de germinação, tetrazólio, emergência em areia, envelhecimento acelerado (24 horas e 48 horas), utilizando tetrazólio em substituição à germinação, e massa seca de plântulas. No teste de tetrazólio, a subclasse DU 4-5 indica a deterioração por umidade, como principal problema fisiológico evolutivo e o tetrazólio, em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado, 24 horas, pode avaliar o risco do potencial fisiológico do lote com sementes esverdeadas, na época inicial de armazenagem.

Termos para indexação: *Glycine max*, deterioração, clorofila, vigor.

GREEN SOYBEAN SEED: ALTERNATIVE TESTS TO DETERMINE SEED QUALITY

ABSTRACT – The anticipation of the commercialization of soybean seed in the state of Mato Grosso is a reality. This implies the need for reliable quick testing methods for seed quality evaluation, which will minimize and present future risks in commercialization, mainly when there is a complicating factor during storage, such as the case with seed that has chlorophyll retention. Changes associated with deterioration, and the consequent loss of vigor and germination are noticeable in this type of seed, and as a consequence there is the need to know the location and extension of these deteriorative points. Focusing on the objective of evaluating with feasible tests, that have the potential to determine the green seed quality, this study was carried out using: FMT-Tucunare, an early maturing cycle, cultivar ‘EMGOPA 313’, ‘FMT-Arara Azul’, and ‘M-Soy 9350’, with late maturing cycles, which presented 25,7%, 26,8%, 22,6% and 15,6% green seed, respectively. As a control, within each cultivar, there was a lot without green pigmentation, and a new lot with each treatment. The quality of the seed was evaluated in two periods (initial, may/2001 and final, November/2001) using the tests of germination, tetrazolium, emergence in sand, accelerated aging (24 hours and 48 hours), using tetrazolium to replace germination, plus seedling dry matter. In the tetrazolium test, the subclass WD 4-5 indicated deterioration due to weathering, the main

¹ Submetido em 20/03/2006. Aceito para publicação em 09/01/2007. Parte da tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, FAEM, UFPel.

² Bióloga, bolsista do CNPq, Depto de Fitotecnia, FAEM, UFPel, Coordenadora Geral, Aprosmat, Cx. Postal, 81, 78745-280, Rondonópolis, MT; fzorato@terra.com.br

³ Engº Agrº, Ph.D., Prof. Titular, Depto Fitotecnia, FAEM, UFPel; peske@ufpel.tche.br

⁴ Engº Agrº, Dr., Coordenador Melhoramento, Fundação MT; takeda@fundacaomt.com.br

⁵ Engº Agrº, Ph.D., Pesquisador, Embrapa Soja; jbranca@cnpso.embrapa.br

physiological problem that evolves in green seeds during storage. In the tetrazolium test, that replaced the accelerated aging germination test, an exposure of 24 hours can be utilized in determining the quality of green seeds on the initial period of storage.

Index terms: *Glycine max*, deterioration, chlorophyll, vigor.

INTRODUÇÃO

O comércio de sementes de soja tem sido realizado de forma antecipada em Mato Grosso. Isso implica na necessidade de programas de verificação da qualidade que sejam hábeis na utilização de testes rápidos, confiáveis e que permitam minimizar riscos futuros.

Na região dos cerrados tem surgido um agente complicador a armazenabilidade de sementes de soja. Quando não ocorre o declínio de clorofila e seus derivados nos cotilédones, o qual nas observações de Noodén (1984) sofre a interferência das condições ambientais durante a fase de maturação, podem surgir sementes esverdeadas que apresentam menor longevidade.

Os cotilédones são considerados essencialmente folhas modificadas representando as primeiras folhas da planta (Raven et al., 2001). Portanto, as mudanças na pigmentação durante a maturação das sementes podem estar ligadas ao processo de amarelecimento na senescência foliar, que compreende um número de alterações fisiológicas e bioquímicas (Thomas e Smart, 1993). Entretanto, o processo bioquímico não é bem conhecido e, devido ao desenvolvimento de vagens e a senescência foliar estar proximamente entrelaçados, muitas vezes, torna-se difícil separá-los (Noodén, 1984). A degradação de clorofila está ligada a um uso forçado de todos os componentes do processo de senescência, tais como, degradação de proteína, mudanças na atividade de enzimas e nos padrões de izoenzimas (Thomas e Stoddart, 1975).

À medida que os cotilédones iniciam sua expansão, inicia-se também a deposição de reservas e, sendo parte do embrião, é um tecido vivo que dispõe de todo aparato enzimático necessário para promover a degradação e o transporte de suas próprias substâncias de reserva, visando nutrir o crescimento do eixo embrionário na germinação (Carvalho e Nakagawa, 2000). Ao mesmo tempo em que as reservas estão sendo depositadas no embrião em desenvolvimento, o conteúdo de DNA e RNA aumenta durante essa fase de expansão e também ocorre a deposição das moléculas de RNA mensageiro (mRNA), codificando as enzimas que degradarão as reservas armazenadas, durante o processo de germinação. Quando o embrião alcança seu tamanho máximo e a deposição de

reservas é completada tem-se, então, o início da maturação e da desidratação das sementes (Bryant, 1989; Bewley e Black, 1982).

Adams et al. (1983) colocaram alto grau de importância no processo de maturação de sementes de soja, sob a desidratação lenta com efeitos distintos na degradação de clorofila, situação essa que permite a produção de isocitrato liase e malato sintase, enzimas específicas de germinação, em razão de seu papel no ciclo do glioxalato. Nesse ciclo, os lipídios insolúveis das sementes são convertidos em açúcares solúveis (sacarose), forma em que são deslocados para os meristemas radiculares e apicais (Cioni et al., 1981).

Algumas mudanças associadas com deterioração, tais como diminuição de germinação, redução da taxa de crescimento de plântulas, diminuição da tolerância às condições adversas de ambiente e perda de germinabilidade, ocorrem quando as sementes ficam armazenadas (Anderson, 1973). Para avaliar essas mudanças é realizado o teste de envelhecimento acelerado, que prediz o potencial de armazenamento dos lotes, submetido à ambiente adverso de temperatura e umidade relativa, com base na velocidade de deterioração das sementes (Marcos-Filho, 1999). Apesar disso, Priestley e Leopold (1983) observaram o mecanismo de envelhecimento acelerado sendo diferente do envelhecimento fisiológico natural em sementes de soja.

Os sintomas do envelhecimento das sementes podem ser medidos baseados no progresso desse envelhecimento, resultados de mudanças em reações bioquímicas que ocorrem nas sementes com o passar do tempo (Harrington, 1973). Para observações de alterações bioquímicas nos tecidos, diversos testes foram desenvolvidos para medir um ou um grupo de reações que declinam em atividade com a idade das sementes. O teste de tetrazólio, que mede a atividade das enzimas desidrogenases, é o mais comumente usado (Harrington, 1973; França Neto et al., 1998). O grau de atividade das desidrogenases é a base de um teste *in situ* para a viabilidade das sementes em poucas horas de embebição (Chauhan, 1985).

Pontos de crescimento (meristema da radícula e plúmula) do eixo embrionário são altamente susceptíveis aos efeitos do envelhecimento em termos de reação do tetrazólio e, logo,

concebidas como regiões de “células chaves” que representam uma pequena fração do total da semente e essenciais para a preservação da viabilidade da mesma (Roberts, 1973; Banerjee, 1978; Purkar e Negi, 1982). Quando o processo deteriorativo nas “células chaves” excedem um certo limiar, resulta num estado de não-retorno e a semente inteira é incapaz de germinar, apesar da disponibilidade da reserva alimentícia (Chauhan, 1985). Harrington (1973) considerou somente o eixo embrionário, incluindo células meristemáticas da radícula e plúmula, sendo essencial para uma semente produzir uma plântula e, caso essas células estejam mortas ou não-funcionais, nenhuma quantidade de células de outras partes da semente possibilitará desenvolvimento de uma plântula normal.

Baseando-se nos princípios dos testes de envelhecimento acelerado e de tetrazólio é possível uma associação de protocolos que estabeleça a localização e a seqüência dos pontos de deterioração nas sementes, num intervalo de tempo menor que o rotineiro, no qual se utiliza o teste padrão de germinação.

Em soja envelhecida de forma artificial e imediatamente submetida ao tetrazólio, os órgãos mais sensíveis ao envelhecimento foram plúmula e radícula, enquanto os cotilédones foram altamente resistentes (Chauhan, 1985).

A visualização dos pontos deteriorativos iniciais, que conduzem à morte das células nas regiões vitais das sementes e à redução do período utilizada para obtenção de resultados no envelhecimento acelerado, seguido por tetrazólio, além de soja, tem sido estudada em várias espécies. Em cebola e cevada, Banerjee (1978) observou a deterioração se iniciando no eixo embrionário e avançando em direção à porção mediana, região em que a morte dos tecidos condiciona a perda total da capacidade germinativa das sementes. Em trigo e ervilha, Purkar e Negi (1982) verificaram a primeira indicação de deterioração começando no ápice da raiz e progredindo pela região do hipocótilo e mesocótilo. Quase simultaneamente, começou a deterioração no par de cotilédones que também progrediu através do mesocótilo. Em sorgo, os primeiros tecidos apresentando deterioração foram na extremidade do escutelo (Krishnasamy, 1985) e, em arroz (Krishnasamy e Seshu, 1989) a deterioração se iniciou no coleótilo e progrediu para o epiblasto, escama lateral, escama ventral, coleoriza, plúmula, radícula, mesocótilo e escutelo.

A redução do período pode se traduzir em decisões rápidas e mais confiáveis na produção de sementes de soja, caso seja evidenciado os efeitos dos pigmentos verdes em seu potencial fisiológico. A execução do teste de envelhecimento, em soja, de acordo com Costa et al. (1984)

é de sete dias. Entretanto, no envelhecimento acelerado empregando-se o teste de tetrazólio em substituição à germinação, os resultados podem ser alcançados em 48 horas. Em milho, Bittencourt (1999) observou ser possível a redução de oito para três dias, o tempo necessário para finalização do teste, além de possibilitar informações semelhantes às fornecidas pelo teste de germinação.

A qualidade fisiológica de sementes esverdeadas demanda informações sobre vigor e viabilidade que sejam compatíveis com a emergência em campo, na época de semeadura.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a sensibilidade de interação dos testes de envelhecimento acelerado e do tetrazólio usado em substituição à germinação, assim como, aplicar e dar amplitude às técnicas com protocolos descritos em literatura, que sejam factíveis e possam determinar a qualidade das sementes de soja, apresentando sinais de clorofila nos cotilédones.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com lotes comerciais em sementes de soja de cultivares pertencentes aos grupos de maturação semi-precoce (FMT-Tucunará) e tardio (EMGOPA 313, FMT-Arara Azul e M-SOY 9350), produzidas na safra agrícola 2001/02, oriundas de campos de produção da região Sul do Estado de Mato Grosso.

A escolha de lotes foi baseada na presença visual de pigmentação verde existente nos cotilédones das sementes: 25,7%; 26,8%; 22,6% e 15,6% respectivamente, nas cultivares descritas acima. Outras fontes de base foram os resultados de verificação da qualidade inicial, através dos testes de tetrazólio e de germinação. Para testemunha, utilizou-se, para cada cultivar, amostra de um lote de sementes oriundo de campo que não produziu sementes esverdeadas. Portanto, não prejudicado com estresse ambiental durante as fases de deposição de reservas (R_6) e de maturação fisiológica (R_7), períodos considerados importantes na degradação da clorofila.

As amostras testemunhas e as amostras com sementes esverdeadas constituíram os tratamentos e esses continham aproximadamente 1,2kg de sementes cada um.

O critério utilizado para a obtenção da média porcentual de sementes esverdeadas nos lotes foi a seguinte: sob lupa circular de seis aumentos, foram separadas 10 subamostras de 100 sementes cada, em quatro repetições, e contabilizada a presença de sementes com pigmento verde nos cotilédones (sem nenhum tratamento, a exemplo de pré-umedecimento). Foi considerada toda e qualquer nuance de pigmento nos

cotilédones e então retirada para contagem. Em caso de dúvida, foram retirados os tegumentos para melhor visualização e confirmação dos vestígios (sinais) verdes. Os resultados, expressos em números inteiros, foram computados para as 10 subamostras e realizada a média porcentual para cada repetição.

Os tratamentos foram submetidos às análises de qualidade no laboratório da Associação dos Produtores de Sementes de Mato Grosso – APROSMAT, Rondonópolis-MT, em duas épocas distintas: início de armazenamento, quando da formação de lotes, correspondente à fase de pós-beneficiamento, em maio/2001, e época final de armazenamento, correspondente ao período de semeadura, em novembro/2001. As sementes permaneceram armazenadas em condições controladas de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (50%).

As avaliações da qualidade das sementes foram realizadas pelos seguintes testes:

Teste de germinação – realizado na época final (novembro), sendo utilizadas quatro subamostras de 50 sementes em cada tratamento, por repetição. A semeadura foi realizada em rolo de papel-toalha, marca Germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e colocado em germinador sob temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram efetuadas no quinto dia após a instalação do teste, seguindo critérios de Brasil (1992) e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais.

Teste de tetrazólio – realizado nas duas épocas (inicial e final), nas quais foram empregadas duas subamostras de 50 sementes, em cada tratamento, por repetição. As sementes foram pré-umedecidas em papel-toalha, por 16 horas à temperatura média de 25°C . Após o período de embebição, as sementes foram colocadas em copos plásticos, submersas em solução 0,05% de sal de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio, por 150 minutos, à temperatura de $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa no escuro. Após o período de coloração, a solução foi drenada e as sementes foram lavadas em água corrente. As avaliações de vigor e viabilidade, assim como os principais danos fisiológicos nas sementes, foram realizados de acordo com os critérios de França Neto et al. (1998) e Zorato (2001).

Envelhecimento acelerado + tetrazólio – realizados na época inicial (maio), em dois períodos: 24 horas e 48 horas. No envelhecimento acelerado foi adotada a metodologia recomendada pela AOSA (1983) e complementada por Marcos Filho (1999), com modificação no tempo de permanência das sementes na câmara e no substrato. Foram utilizadas 200

sementes para cada tratamento, por repetição, distribuídas em camada uniforme sobre uma tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica tipo gerbox, funcionando como um compartimento individual (mini-câmara). Em cada mini-câmara foram adicionados 40mL de água e colocadas a seguir, em câmara tipo BOD (Eletrolab), regulada a $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após os períodos de exposição, duas subamostras de 50 sementes, para cada período (24 horas e 48 horas), para cada tratamento, por repetição, foram submetidas à emergência em areia. Outras duas subamostras de 50 sementes, para cada período (24 horas e 48 horas), para cada tratamento, por repetição, foram colocadas diretamente na solução de tetrazólio (protocolo descrito anteriormente, desconsiderando o pré-umedecimento).

Emergência em areia – realizado em duas situações: na época inicial e final, nas quais foram utilizadas duas subamostras de 100 sementes, para cada tratamento, por repetição. As sementes foram semeadas em bandejas de plástico (27cm x 32cm x 6cm), contendo areia umedecida a 60% da capacidade de saturação de água. E na época inicial (maio), após o envelhecimento acelerado, duas subamostras de 50 sementes, para cada período (24 horas e 48 horas), para cada tratamento, por repetição, foram semeadas. Em seguida à instalação do teste, as bandejas foram colocadas em local de condições ambientais não controladas, onde a temperatura média foi de 27°C , com sistema de luminosidade natural (dia/noite). As avaliações foram efetuadas no quinto dia após a instalação do teste e os resultados expressos em porcentual de plântulas normais (Brasil, 1992), sendo essas também classificadas em porcentual de plântulas fortes, de acordo com Nakagawa (1999).

Massa seca das plântulas – realizado na época final (novembro), determinado com quatro subamostras de 10 sementes em cada tratamento, por repetição. A disposição das sementes foi no terço superior do papel-toalha, marca Germitest, com o hilo voltado para a parte inferior, posição que facilita o desenvolvimento retilíneo da raiz e do hipocótilo. O substrato foi umedecido 2,5 vezes seu peso seco em água e os rolos colocados inclinados (45°) em germinador, em ausência de luz, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante cinco dias. No final desse período, as plântulas normais de cada tratamento e repetição foram retiradas e com auxílio de um bisturi, foram removidos os cotilédones, para a extração dos eixos embrionários. Esses foram colocados em recipientes de alumínio previamente pesados e, a seguir, colocados para secar em estufa termoeletrica regulada a 80°C , durante 24 horas. Após o período, as amostras foram colocadas para

resfriamento de 15 minutos em dessecador. As repetições, pós-resfriamento, foram pesadas em balança de precisão com quatro casas decimais e determinada a massa seca, expresso em mg.plântula⁻¹ (Nakagawa, 1999).

Procedimentos estatísticos - o delineamento experimental foi de blocos casualizados e os testes efetuados com quatro repetições. Os dados obtidos em cada teste foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade e teste de correlação linear simples. Para a realização das análises foi utilizado o programa estatístico SAS - Statistics Analysis System (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre sementes esverdeadas de soja com a qualidade foi destacada nos resultados obtidos nos diferentes testes e épocas realizadas.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 constam os coeficientes de correlação simples entre os testes, nas épocas inicial, entre inicial e final e na final, respectivamente. Houve correlação significativa entre os testes nas épocas estudadas. Na tentativa de compreender o mecanismo de atuação das sementes esverdeadas (SE) no decorrer do tempo, foram correlacionadas as épocas inicial e final e foi obtida significância entre todas as avaliações efetuadas.

A Tabela 4 demonstra, de modo geral, já na fase de pós-beneficiamento (maio), a qualidade inferior das sementes com cotilédones esverdeados, a qual diferiu significativamente em relação às testemunhas, correspondentes às sementes normais (SN) - sementes sem a presença do pigmento verde, nas quatro cultivares, em quase todas as variáveis analisadas. O potencial fisiológico da testemunha da cultivar M-Soy 9350 se apresentou menor e oscilante, desde a fase inicial, em função de outros tipos de problemas como, incidência de percevejos e deterioração por umidade ocasionada por instabilidade climática na época de colheita.

Na Tabela 5 estão relatados os resultados da fase final, momento de semeadura (novembro), quando os tratamentos de sementes com sinais de clorofila tenderam a uma redução mais acentuada das porcentagens de plântulas normais e plântulas fortes nos testes de emergência em areia e germinação, assim como, do vigor e da viabilidade do teste tetrazólio, comparativamente aos tratamentos testemunhas. Isto demonstrou o efeito deteriorante da clorofila em sementes de soja, espécie que possui, de acordo com Bordignon e Mandarino (1994), entre 15% a 25% de lipídios. A peroxidação

de lipídios foi considerada uma das causas de deterioração das sementes de soja (Wilson e McDonald, 1986) e a clorofila pode reagir com compostos intermediários de peroxidação dos lipídios (Endo et al., 1984). Priestley e Leopold (1983) observaram a peroxidação ocorrendo ao longo do tempo de armazenamento com mecanismos de envelhecimento acelerado diferentes fisiologicamente do envelhecimento natural.

Um fator observado que contribuiu para dificultar a homogeneidade e tendência de dados, nas fases estudadas, residiu na quantidade de sementes com cotilédones esverdeados presente nas subamostras, no momento de efetuar os diferentes testes. Exemplificando, para obtenção da média de 22,6% na cultivar FMT-Arara Azul, entre as 10 subamostras de 100 sementes, dentro da mesma repetição, a variação na quantidade de sementes que, visualmente apresentavam pigmentação verde, oscilou entre 7% a 39%. Ou seja, numa subamostra de 100 sementes apenas sete sementes apresentavam esverdeamento, já numa outra subamostra, dentro da mesma repetição, 39 das 100 sementes eram de cotilédones esverdeados. Portanto, com estas variações detectadas, algumas oscilações de resultados foram compreensíveis, porque a probabilidade, no momento da instalação das subamostras nos testes, foi a mesma tanto para semente normal quanto para semente esverdeada. E, sementes esverdeadas demonstraram ser potencialmente desfavoráveis à manutenção da qualidade de sementes.

O teste de tetrazólio, como um teste topográfico, delineou melhor a variabilidade referida entre subamostras, a qual foi estratificada em três principais níveis de qualidade. Grande proporção de sementes esverdeada foram enquadradas na classe 3 (vigor médio) e na subclasse DU 4-5 (viabilidade) - subclasse essa indicativa de razão principal da diferença existente entre o vigor e a viabilidade da amostra e, no caso específico, deterioração por umidade (Zorato, 2001). Por fim, grande parte de sementes já deterioradas e mortas foram atribuídas na classe 7.

A atribuição das sementes na subclasse DU 4-5 (viabilidade) ocorreu em função da abrangência das lesões provocadas pela deterioração de umidade nos cotilédones e pontos dessa deterioração, localizados na região do eixo embrionário (plúmula, hipocótilo e radícula). O índice obtido na subclasse, normalmente apresenta potencial para predizer que o tratamento (amostra), pode perder a viabilidade com o decorrer da armazenagem e/ou, caso as condições de temperatura do ar ou umidade do solo forem inadequadas no momento de semeadura, principalmente se a deterioração

TABELA 1. Correlação linear simples (r) entre os testes de avaliação da qualidade efetuados no início de armazenagem, em quatro cultivares de soja (FMT-Tucunará, FMT-Arara Azul, EMGOPA 313 e M-SOY 9350), com presença e ausência de sementes esverdeadas.

Época inicial	Época inicial																				
	Emergência em areia			Env. acelerado (24 horas)			Env. acelerado (48 horas)			Tetrazólio			Envelhecimento acelerado (24 horas) + tetrazólio			Envelhecimento acelerado (48 horas) + tetrazólio					
	%PN	%PF	%PN	%PN	%PF	%PN	%PN	%PF	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	
Emerg. areia % PF	0,99**																				
Env. acel. 24 h.	%PN	0,88**																			
	%PF	0,89**	1,00**																		
Env. acel. 48h.	%PN	0,87**	0,86**	0,90**	0,90**																
	%PF	0,84**	0,84**	0,88**	0,89**	0,99**															
TZ (%)	VG	0,90**	0,90**	0,81**	0,82**	0,82**	0,80**														
	VB	0,80**	0,81**	0,65**	0,65**	0,65**	0,61**	0,94**													
	DU 4-5	-0,60**	-0,58**	-0,71**	-0,71**	-0,77**	-0,80**	-0,67**	-0,40*												
EA + TZ (24 h.) (%)	VG	0,91**	0,93**	0,86**	0,87**	0,83**	0,80**	0,91**	0,86**	-0,53**											
	VB	0,89**	0,91**	0,80**	0,82**	0,80**	0,76**	0,91**	0,88**	-0,51**	0,98**										
	DU 4-5	-0,85**	-0,87**	-0,89**	-0,90**	-0,84**	-0,82**	-0,83**	-0,74**	0,59**	-0,91**	-0,83**									
EA + TZ (48 h.) (%)	VG	0,87**	0,89**	0,86**	0,87**	0,86**	0,83**	0,84**	0,71**	-0,66**	0,88**	0,84**	-0,85**								
	VB	0,88**	0,88**	0,81**	0,81**	0,84**	0,81**	0,88**	0,79**	-0,62**	0,87**	0,84**	-0,83**	0,92**							
	DU 4-5	-0,48**	-0,51**	-0,55**	-0,58**	-0,51**	-0,50**	-0,39*	-0,24 ^{ns}	0,43*	-0,47**	-0,46**	0,47**	-0,66**	-0,32 ^{ns}						

** - significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * - significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns - não significativo.

EA + TZ - tetrazólio (TZ) em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado (EA); PN - plântulas normais; PF - plântulas fortes; VG - vigor; VB - viabilidade; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

TABELA 2. Correlação linear simples (r), entre os testes de qualidade realizados no início de armazenagem e os testes efetuados na época final do armazenamento, em quatro cultivares de soja (FMT-Tucunará, FMT-Arara Azul, EMGOPA 313 e M-SOY 9350), com presença e ausência de sementes esverdeadas.

Época final	Época inicial																			
	Emergência em areia			Envelhecimento acelerado (24 horas)			Envelhecimento acelerado (48 h.)			Tetrazólio (%)			Envelhecimento acelerado (24 horas) + Tetrazólio (%)			Envelhecimento acelerado (48 horas) + Tetrazólio (%)				
	%PN	%PF	%PN	%PN	%PF	%PN	%PN	%PF	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5	VG	VB	DU 4-5
Emerg. areia	%PN	0,90**	0,91**	0,88**	0,89**	0,92**	0,90**	0,90**	0,80**	-0,66**	0,94**	0,91**	-0,89**	0,90**	0,90**	0,90**	-0,48**			
	%PF	0,89**	0,91**	0,86**	0,87**	0,92**	0,91**	0,92**	0,80**	-0,70**	0,94**	0,91**	-0,88**	0,91**	0,90**	0,90**	-0,51**			
Tz (%)	VG	0,86**	0,86**	0,86**	0,87**	0,91**	0,90**	0,90**	0,78**	-0,72**	0,89**	0,88**	-0,86**	0,87**	0,86**	0,86**	-0,48**			
	VB	0,81**	0,82**	0,76**	0,77**	0,78**	0,88**	0,88**	0,84**	-0,56**	0,90**	0,92**	-0,79**	0,80**	0,82**	0,82**	-0,37*			
	DU 4-5	-0,67**	-0,66**	-0,77**	-0,77**	-0,85**	-0,87**	-0,63**	-0,42*	0,78**	-0,61**	-0,57**	-0,73**	-0,66**	0,57**					
Germ.	%PN	0,84**	0,83**	0,81**	0,81**	0,90**	0,87**	0,84**	0,76**	-0,61**	0,86**	0,83**	-0,81**	0,86**	0,89**	-0,37*				

** - significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * - significativo no teste F, a 5% de probabilidade.

TZ - tetrazólio; PN - plântulas normais; PF - plântulas fortes; VG - vigor; VB - viabilidade; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

TABELA 3. Correlação linear simples (r) entre os testes de qualidade, efetuados na época final de armazenamento, em quatro cultivares de soja (FMT-Tucunaré, FMT-Arara Azul, EMGOPA 313 e M-SOY 9350) com presença e ausência de sementes esverdeadas

Emergência em areia	%PF	Época final		Tetrazólio (%)		
		Emergência em areia (%)		VG	VB	DU 4-5
		PN	PF			
		0,99**				
Tetrazólio (%)	VG	0,92**	0,93**			
	VB	0,88**	0,87**	0,93**		
	DU 4-5	-0,72**	-0,75**	-0,82**	-0,57**	
Germinação	%PN	0,92**	0,90**	0,89**	0,87**	-0,68**

** - significativo no teste F, a 1% de probabilidade.

PN – plântulas normais; PF – plântulas fortes; VG – vigor; VB – viabilidade; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

TABELA 4. Médias obtidas no início da armazenagem nos testes de emergência em areia, envelhecimento acelerado 24 horas, tetrazólio, tetrazólio em substituição ao teste de germinação em dois períodos de envelhecimento acelerado (24 horas e 48 horas), em quatro cultivares de soja, em lotes com presença de sementes esverdeadas (SE) e lotes testemunhas, sementes normais (SN).

Testes		Tratamentos (Cultivares)								CV (%)
		FMT-Tucunaré		FMT-Arara Azul		EMGOPA 313		M-Soy 9350		
		SN	SE	SN	SE	SN	SE	SN	SE	
Emergência em areia (%)	Pl. normais	96 A	86 A	86 A	77 B	96 A	81 B	69 A	49 B	5,48
	Pl. fortes	96 A	84 B	82 A	71 B	93 A	75 B	65 A	44 B	5,44
Envelhecimento acelerado / 24 horas (%)	Pl. normais	97 A	74 B	90 A	74 B	94 A	77 B	60 A	45 B	8,54
	Pl. fortes	95 A	71 B	88 A	70 B	92 A	72 B	55 A	40 B	8,50
Envelhecimento acelerado / 48 horas (%)	Pl. normais	89 A	56 B	87 A	63 B	95 A	70 B	55 A	30 B	5,54
	Pl. fortes	84 A	48 B	82 A	57 B	93 A	65 B	51 A	28 B	5,81
Tetrazólio (%)	Vigor	82 A	66 B	61 A	57 A	81 A	65 B	60 A	36 B	7,95
	Viabilidade	92 A	87 A	74 A	72 A	88 A	81 B	82 A	58 B	5,08
	DU 4-5	7 B	18 A	10 A	13 A	4 B	11 A	16 A	16 A	20,45
Envelhecimento acelerado + tetrazólio (24 horas) (%)	Vigor	83 A	70 B	64 A	49 B	77 A	52 B	50 A	18 B	7,75
	Viabilidade	90 A	85 B	77 A	68 B	89 A	75 B	69 A	50 B	4,54
	DU 4-5	6 B	15 A	12 B	17 A	8 B	19 A	19 B	29 A	23,12
Envelhecimento acelerado + tetrazólio (48 horas) (%)	Vigor	79 A	52 B	59 A	55 A	66 A	49 B	42 A	28 B	6,80
	Viabilidade	88 A	72 B	74 A	73 A	85 A	69 B	72 A	49 B	5,78
	DU 4-5	5 B	17 A	12 B	17 A	16 A	15 A	27 B	18 A	18,30

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, para cada tratamento (cultivar), não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pl. – Plântulas; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

estiver localizada na extremidade da radícula com quantidade de células que excedem determinado limite, comprometendo ou impedindo a divisão celular e o desenvolvimento do órgão.

Conforme já mencionado, o principal dano propiciando perda de qualidade nas sementes esverdeadas foi a deterioração por umidade. Quando a superfície dos cotilédones apresentava pigmentação mais abrangente e numa tonalidade mais forte de verde, foi notada a deterioração generalizada dos cotilédones e isso pode ter representado relevante perda do potencial fisiológico, de forma mais acentuada, o vigor da semente. Costa et al. (2001) e França Neto et al. (2005), consideraram razoável a hipótese de sementes verdes serem detentoras de elevados índices de deterioração por umidade e argumentaram

que, dependendo da intensidade da região afetada, ocorre redução de vigor e germinação de lotes.

Ainda, com referência aos resultados da subclasse DU 4-5, no tetrazólio, na fase inicial (maio), estes revelaram diferenças significativas nas cultivares FMT-Tucunaré e EMGOPA 313, quando comparadas as sementes esverdeadas com as sementes normais. O mesmo não ocorreu com as cultivares FMT-Arara Azul e M-Soy 9350, isso sugere a variação na quantidade de sementes esverdeadas entre subamostras e problemas com outros tipos de danos fisiológicos, respectivamente, como explicação plausível. Quando analisados os dados de DU 4-5, na época final de armazenamento (novembro), os valores se mostraram, de

TABELA 5. Médias obtidas no final da armazenagem nos testes de emergência em areia, germinação, tetrazólio e peso de massa seca, em quatro cultivares de soja, em lotes com presença de sementes esverdeadas (SE) e lotes testemunhas, sementes normais (SN).

Testes		Tratamentos (Cultivares)								CV (%)
		FMT-Tucunaré		FMT-Arara Azul		EMGOPA 313		M-Soy 9350		
		SN	SE	SN	SE	SN	SE	SN	SE	
Emergência em areia (%)	Pl. normais	96 A	73 B	83 A	65 B	95 A	67 B	67 A	38 B	5,33
	Pl. fortes	92 A	64 B	72 A	58 B	92 A	61 B	59 A	31 B	6,17
Germinação (%)	Pl. normais	96 A	72 B	89 A	77 B	95 A	75 B	76 A	34 B	4,63
Tetrazólio (%)	Vigor	87 A	61 B	69 A	58 A	88 A	69 B	59 A	36 B	6,21
	Viabilidade	93 A	84 B	81 A	76 A	93 A	83 B	79 A	58 B	5,06
	DU 4-5	3 B	18 A	6 B	13 A	3 B	10 A	16 A	17 A	25,26
Peso da massa seca (mg/plântula)		0,427 A	0,175 B	0,415 A	0,093 B	0,291 A	0,076 B	0,197 A	0,035 B	13,46

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, para tratamentos (cultivares), não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pl. – Plântulas; subclasse DU 4-5 (deterioração por umidade).

maneira geral, significativos em três das quatro cultivares estudadas, quando comparadas às sementes testemunhas e às sementes esverdeadas, sinalizando processo contínuo de deterioração em células com pigmentação verde. Indicativo esse que tende a ser relevado no setor de sementes, haja vista, a propensão de problemas no momento de emergência de plântulas e a conseqüente redução de estandes recomendados para as cultivares.

Com relação à associação de teste, a utilização do tetrazólio em substituição à germinação no envelhecimento acelerado, o período de 24 horas (época inicial) demonstrou correlação significativa, tanto no vigor ($r = 0,94$) quanto na viabilidade ($r = 0,91$), com a emergência de plântulas em areia na época final. Estes dados são considerados importantes porque o teste de emergência em areia acredita-se simular as condições mais próximas da realidade do campo, local que representa o destino final das sementes, além da redução de período para respostas da qualidade. Embora a correlação tenha sido significativa, foi observada expressiva quantidade de tecido lesionado pela deterioração por umidade em células da radícula-hipocótilo, principalmente nas sementes esverdeadas. Esta é uma região de “células chaves”, cuja morte de tecidos condiciona a perda total da qualidade das sementes, apontou Roberts (1973). Talvez, na análise, tenha sido super estimada a quantidade de tecidos lesionados no cilindro central, o que demanda ajustes para adequação dessa associação de testes que possibilita a fundamental redução do período para a avaliação dos pontos da deterioração em sementes esverdeadas. Apesar desta associação de testes ter se mostrado uma alternativa promissora e mais rápida, consideram-se necessários mais estudos, assim como treinamentos adequados para delimitar a deterioração nos pontos de

crescimento, principalmente na extremidade da radícula (células iniciais do cilindro central), visando resultados consistentes.

No tetrazólio, nos dois tempos de exposição, assim como na metodologia usual, em sementes esverdeadas, além da sensibilidade da plúmula e radícula foi observada nos cotilédones, saliente deterioração, o que contrapõe os resultados de Chauhan (1985), que verificou resistência dos cotilédones de soja envelhecida artificialmente, contudo, tenha estudado semente sem a presença de pigmento verde. Outro aspecto discordante se refere ao apontamento de Harrington (1973), no qual considerou somente células meristemáticas da radícula e plúmula essenciais para produzir uma plântula normal. Em sementes apresentando resíduos de clorofila (pigmento verde), algumas vezes, nas células dos órgãos vitais não foram encontrados pontos de deterioração, todavia, suas células cotiledonares estavam completamente deterioradas e, mesmo se estas sementes iniciassem o processo de germinação, porque tinham células viáveis no eixo embrionário, ocorria a descontinuidade do processo, em função das reservas dos cotilédones estarem completamente comprometidas. Como nos cotilédones se concentram os substratos e enzimas necessárias para o início da divisão celular e crescimento do embrião, no caso de sementes esverdeadas, as evidências sugeriram um metabolismo prejudicado com o nível muito elevado de deterioração. Bryant (1989) postulou que se houver bloqueio na síntese de mRNA, as enzimas específicas de degradação das reservas não serão sintetizadas e as reservas estocadas e depositadas durante o desenvolvimento, incluindo proteínas, carboidratos e lipídios, não serão hidrolisadas para fornecer nutrientes ao embrião em crescimento, até que ele se estabeleça como uma plântula independente.

Dentre os testes realizados na fase final de armazenagem, próxima da sementeira (Tabela 5), o teste de germinação e emergência de plântulas em substrato de areia revelaram-se eficientes e compatíveis nas informações, conferindo os desempenhos esperados para os tratamentos testemunhas e de sementes esverdeadas, de acordo com as duas situações. O fator negativo destes testes é o tempo necessário para obtenção dos resultados (120 horas). Por outro lado, o tetrazólio como teste bioquímico, apresentou principalmente para sementes esverdeadas, viabilidades superiores em relação à germinação e emergência de plântulas, no entanto, os valores encontrados na subclasse DU 4-5, quando subtraídos das referidas viabilidades indicavam os tratamentos sujeitos à provável declínio da qualidade, compatibilizando com os dois testes citados.

Um outro considerável efeito da pigmentação verde foi verificado na massa seca de plântulas. As sementes esverdeadas diferiram significativamente em relação às normais (testemunhas), nas quatro cultivares estudadas, demonstrando decréscimo em sua massa seca. De acordo com Dan et al. (1987), a habilidade da transformação de reservas armazenadas nos cotilédones, em componentes solúveis utilizados na formação de novos tecidos e a incorporação desses pelo eixo embrionário, se relacionam ao vigor das sementes. Explicação factível para o diminuído vigor encontrado em sementes com degradação parcial da clorofila.

CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio em substituição à germinação no teste de envelhecimento acelerado por período de 24 horas pode ser suficiente para detectar riscos em lotes de soja com presença de sementes esverdeadas, na época inicial de armazenagem.

A subclasse DU 4-5 (viabilidade), no teste de tetrazólio é adjuvante na avaliação da qualidade de sementes com retenção de clorofila.

Em sementes esverdeadas os testes de germinação e emergência de plântulas em areia, apesar do tempo de execução, têm potencial para determinar índices confiáveis, quando realizado próximo da sementeira.

REFERÊNCIAS

ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C.; RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v.23, n.2, p.265-267, 1983.

ANDERSON, J.D. Metabolic changes associated with

senescence. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.2, p.401-416, 1973.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Springfield: AOSA, 1983. 88p.

BANERJEE, S.K. Observations on initiation of seed deterioration and its localization in barley and onion. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.6, n.4, p.1025-1028, 1978.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v.2, 374p.

BITTENCOURT, S.R.M. **Uso do teste de tetrazólio na avaliação de resultados do teste de envelhecimento acelerado em sementes de milho**. Jaboticabal, 1999. 146p. Tese (doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 1999.

BORDIGNON, J.R.; MANDARINO, J.M.G. **Soja: composição química, valor nutricional e sabor**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. 32p. (Documentos, 70).

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRYANT, J.A. **Fisiologia da Semente**. (1.ed.). São Paulo: Editora EPU, 1989. 85p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. (4.ed.). Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CHAUHAN, K.P.S. The incidence of deterioration and its localization in aged seeds of soybean and barley. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.3, p.769-773, 1985.

CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.70, n.1, p.1-26, 1981.

COSTA, N.P.; PEREIRA, L.A.G.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A. A. KRZYZANOWSKI, F.C.; BARRETO, J.N.; PRADERI, J.E.V. Padronização do teste de envelhecimento precoce. EMBRAPA-CNPSo. **Resultados de Pesquisa de soja 1983/84**. P.119-120. 1984.

COSTA, N.P.; FRANÇA-NETO, J.B.; PEREIRA, J.E.; MESQUITA, C.M.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n.2, p.102-107, 2001.

DAN, E.L.; MELLO, V.D.C.; WETZEL, C.T.; POPINIGIS, F.; ZONTA, E.P. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, ano 9, n.3, p.45-55, 1987.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. The photooxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.4, p.985-989, 1984.

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

FRANÇA NETO, J.B.; PÁDUA, G.P.; CARVALHO, M.M.L.; COSTA, O.; BRUMATTI, P.S.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; SANCHES, D.P. **Sementes esverdeadas de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa

Soja, 2005. 8p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 38).

HARRINGTON, J.F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.2, p.453-461, 1973.

KRISHNASAMY, V. Sequence of senescence in sorghum seed during accelerated aging. **Current Science**, Bangalore, v.54, n.1, p.150-151, 1985.

KRISHNASAMY, V.; SESHU, D.V. Sequence of deterioration in rice embryos during accelerated ageing of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.1, p.19-23, 1989.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.1, p.1.1-1.20.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.2, p.2.1-2.24.

NOODÉN, L.D. Integration of soybean pod development and monocarpic senescence. **Physiology Plant**, Copenhagen, v.62, fasc.2, p.273-284, 1984.

PRIESTLEY, D.A.; LEOPOLD, A.C. Lipid changes during natural aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, n.1, p.467-470, 1983.

PURKAR, J.K.; NEGI, H.C.S. Initiation of seed deterioration and its localization in peas and wheat. **Seed Research**, New Delhi, v.10, n.2, p.196-200, 1982.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. (6.ed.) Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001. 906p.

ROBERTS, E.H. Loss of seed viability: chromosomal and genetics aspects. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.515-527, 1973.

SAS Intitute Inc. **SAS User's Guide: statistics.Version 5**. Cary, NC, 1985. 956p.

THOMAS, H.; SMART, C.M. Crops that stay green. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.123, n.1, p.193-219, 1993.

THOMAS, H.; STODDART, J.L. Separation of chlorophyll degradation from other senescence processes in leaves of a mutant genotype of meadow fescue (*Festuca pratensis* L.). **Plant Physiology**, Maryland, v.56, n.3, p.438-441, 1975.

WILSON, D.O.; McDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.14, p.296-300, 1986.

ZORATO, M.F. Teste de tetrazólio modificado. **SEED News**, Pelotas, ano V, n.4, p.21, 2001.

