

CAROLINA MARIA LUZIA DELGADO BITTENCOURT

**POTENCIAL FISIOLÓGICO E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS
EM SEMENTES DE SOJA APÓS A APLICAÇÃO DE
GLUFOSINATO DE AMÔNIO**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Produção Vegetal, da
Universidade do Estado de Santa
Catarina, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Produção Vegetal.

Orientadora: Cileide Maria Medeiros
Coelho.

**LAGES, SC
2016**

Bittencourt, Carolina Maria Luzia Delgado.

Potencial fisiológico e alterações bioquímicas em sementes de soja após a aplicação de glufosinato de amônio. / Carolina Maria Luzia Delgado Bittencourt. Lages, 2016.

112 p.: il.; 21 cm

Orientador: Cileide Maria Medeiros Coelho.

Bibliografia: p. 98-112

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2016

1. Estresse oxidativo. 2. Mecanismos antioxidantes. 3. Germinação e vigor. I Bittencourt, Carolina Maria Luzia Delgado. II. Coelho, Cileide Maria Medeiros. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela aluna

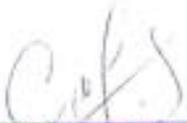
CAROLINA MARIA LUZIA DELGADO BITTENCOURT

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

POTENCIAL FISIOLÓGICO E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS
EM SEMENTES DE SOJA APÓS A APLICAÇÃO DE
GLUFOSINATO DE AMÔNIO

Banca Examinadora

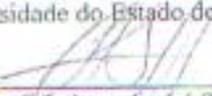
Orientador:


Prof. Dr. Cileide Maria Medeiros Coelho
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:


Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:


Prof. Dr. Cristiano André Steffens
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:


Prof. Dr. Naiara Guerra
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Membro:


Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Lages, 15/02/2016.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Aparecida Delgado, pelo incentivo e amor incondicional.

Ao meu marido Francisco José Bittencourt Junior, pelo incentivo, amor, dedicação e ajuda em todas as etapas desse trabalho e da minha vida.

Aos meus irmãos Maria Eduarda Delgado e Marcelos Delgado Tuelher Dias.

À minha tia Maria Helena Delgado e meus primos André e Arthur Delgado da Silva por me receberem durante esses 4 anos em sua casa em Lages

À minha orientadora Dra. Cileide Maria Medeiros de Coelho, pela orientação, dedicação e paciência.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Sementes, pela descontração, ajuda e colaboração neste trabalho.

A todos os professores que vem contribuindo para minha formação durante toda a minha jornada acadêmica, em especial Dra. Maria Terezinha Silveira Paulilo, Dra. Marisa Santos, Dr. Leonardo Carvalho e Dra. Luciana Oliveira Magda.

Ao Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas da ESALq, em especial a Dra. Salete Aparecida Gaziola pela colaboração e ajuda para a realização desse trabalho.

Ao FUMDES pela bolsa concedida para realização do doutorado.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós graduação em Produção Vegetal da UDESC pela agradável convivência e conhecimento transmitidos durante esses quatro anos.

Obrigada!

RESUMO

A antecipação da colheita de sementes de soja com a utilização de herbicidas é uma alternativa de manejo, antecipando a colheita, com objetivo principal de manter o vigor das sementes. Porém estudos vêm demonstrando que o herbicida glufosinato de amônio interfere negativamente no vigor e no percentual de germinação das sementes. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi: 1-avaliar o acúmulo de reservas (açúcar e proteína solúvel) antes, 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio e a resposta ao estresse oxidativo, através de mecanismos antioxidantes; e 2- avaliar a mobilização de reservas, estresse oxidativo e mecanismos antioxidantes durante o processo de germinação e relacionar com o percentual final de germinação e vigor das sementes. Para isso foi avaliado os teores de proteína e açúcar solúvel, teor de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e mecanismos antioxidantes durante a germinação de sementes das cultivares NA5909RG e Benso 1RR dessecadas no estágio reprodutivo R7.1. Conclui-se que a cultivar NA5909RG, proveniente de plantas dessecadas, apresentaram menor percentual de germinação em relação a sua testemunha, coincidindo com a baixa mobilização de proteína solúvel e baixa intensidade das bandas no perfil protéico durante a germinação em relação à testemunha. A baixa mobilização de proteína nesse caso pode estar associada com os teores elevada de peróxido de hidrogênio observado durante a germinação que associado a uma atividade antioxidante ineficiente podem ter contribuído para a elevada peroxidação lipídica. Para a cultivar Benso1RR não foi observado diferença no percentual de germinação entre sementes proveniente de plantas dessecadas e sua testemunha, nesse caso a mobilização de proteína foi semelhante, sendo que a intensidade das bandas do perfil protéico para sementes proveniente de plantas dessecadas foi

superior em relação a sua testemunha, acompanhada de uma atividade enzimática eficiente, indicando que o peróxido de hidrogênio pode ter funcionado com um sinalizador para a germinação dessas sementes.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Mecanismos antioxidantes. Germinação e vigor

ABSTRACT

The anticipation of the soybean crop with the use of herbicides is a management alternative, anticipating the harvest, with the main objective to keep the seed vigor. But studies have shown that the glufosinate ammonium herbicide adversely affects the force and the percentage of seed germination. In this sense, the objective of this study was: 1-evaluate the accumulation of reserves (sugar and soluble protein) before, 24h and 48h after application of glufosinate ammonium and response to oxidative stress through antioxidant mechanisms; 2- and evaluate the mobilization of reserves, oxidative stress and antioxidant mechanisms during the germination process and relate to the final percentage of germination and seed vigor. To this it was avalido the protein and soluble sugar, hydrogen peroxide content, lipid peroxidation and antioxidant mechanisms during seed germination NA5909RG and Benso 1RR cultivars desiccated in the reproductive stage R7.1. It is concluded that cultivating NA5909RG, from desiccated plants, had lower germination percentage in relation to their witness, coinciding with the low mobilization of soluble protein and low intensity of bands in protein profile during germination compared to the control. Low protein mobilization in this case can be associated with high levels of hydrogen peroxide observed during germination that associated with an inefficient antioxidant activity may have contributed to the high lipid peroxidation. To cultivate Benso1RR no difference was observed in the percentage germination of seeds from desiccated plants and their control, in this case the protein mobilization was similar, with the intensity of the bands of the protein profile for seeds from desiccated plants was higher than in its control, followed by efficient enzyme activity, indicating that hydrogen peroxide can be operated with a flag for the germination of the seed.

Key-words: Oxidative stress. Antioxidant mechanisms.
Germination and vigor

LISTA DE ABREVIACOES

CAT -	Catalase
DTT -	Detetiorol
EDTA -	Ácido Etilenodiaminotetraacético
EROs -	Espécie reativa de oxigênio
GLA -	Glufosinato de amônio
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
<i>Lea</i> -	Late-Embryigenesis adundant
MDA -	Malondialdeido
PVPP -	Polivinilpirrolidona
SDS -	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE -	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio
SOD -	Superoxido dismutase
TBA -	Ácido tiobarbiturico
TCA -	Ácido tricloroacético
TST -	Testemunha

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1A-1B - Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação (0), 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST) 51
- Figura 2A-2B - Teor de prolina em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação, 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST)..... 52
- Figura 3A-3B - Atividade antioxidante da enzima catalase em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação do glufosinato de amônio (TST) na maturidade fisiológica (R7.1), 24h e 48h após aplicação do produto (GLA)..... 53
- Figura 4A-4B - Peroxidação lipídica (MDA) em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação (0), 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST) 55
- Figura 5 - Perfil protéico de sementes das cultivares de soja NA5909RG e Benso 1RR colhidas na maturidade fisiológica (R7.1). Antes da aplicação (0), 24h e 48h após a aplicação do produto (GLA) e suas testemunhas (TST). P-peso padrão (KDa) 57
- Figura 6 - Padrão trifásico de embebição sementes de soja para as cultivares NA5909 RG e Benso1RR proveniente de plantas que foram dessecadas com glufosinato de amônia (GLA) e não dessecadas (TST)..... 67

Figura 7 -	Protrusão radicular após 24h de embebição em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso1RR provenientes de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) ou não (TST).....	68
Figura 8 -	Mobilização de proteínas solúveis de sementes de soja durante a germinação da cultivar NA5909RG e Benso1RR proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecada (TST).....	72
Figura 9 -	Mobilização de açúcar solúvel de sementes de soja durante a germinação de sementes da cultivar NA5909RG e Benso 1RR provenientes de plantas dessecadas (GLA) e não dessecadas (TST)	73
Figura 10 -	Produção de H ₂ O ₂ durante a germinação em sementes de soja da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST)	85
Figura 11 -	Produção de H ₂ O ₂ durante a embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST)	86
Figura 12 -	Teores de prolina livre totais durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar Benso1RR proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST)	87
Figura 13 -	Teores de prolina livre totais durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST)	88

Figura 14 -	Atividade da enzima Catalase (CAT) durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST).....	89
Figura 15 -	Atividade da enzima Catalase (CAT) durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST).....	90
Figura 16 -	Peroxidação lipídica (MDA) durante a germinação em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST).....	91
Figura 17 -	Peroxidação lipídica (MDA) durante a germinação em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST).....	92
Figura 18A-18B -	Perfil de proteína de sementes de soja da cultivar NA5909RG durante 0, 24h, 48h e 72h de embebição. A-Semente proveniente de plantas testemunha; B-Semente proveniente de plantas dessecadas, P-peso padrão	93
Figura 19A-19B -	Perfil de proteína de sementes de soja da cultivar Benso1RR durante 0,24h,48h e 72h de embebição. A- Semente proveniente de plantas testemunha, B-Semente proveniente de plantas dessecadas, P-peso padrão	95

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Teor de proteína solúvel em massa seca ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) antes da aplicação, 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio. TST - testemunha; GLA - glufosinato de amônio..... 56
- Tabela 2 - Teor inicial dos componentes bioquímicos em sementes secas de soja proveniente de plantas dessecadas com glufosinato (GLA) de amônio ou não (TST) 66
- Tabela 3 - Teor inicial dos componentes bioquímicos em sementes secas de soja proveniente de plantas dessecadas com glufosinato (GLA) de amônio ou não (TST) 69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	EFEITO DA APLICAÇÃO DE DESSECANTES NA MATURIDADE FISIOLÓGICA EM PLANTAS DE SOJA NA QUALIDADE DE SUAS SEMENTES	31
2.2	PADRÃO TRIFÁSICO DE EMBEBIÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO	34
2.3	INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO VIGOR DE SEMENTES	36
3	ESTRESSE OXIDATIVO E Acúmulo de Reservas EM SEMENTES DE SOJA COLHIDAS NA MATURIDADE FISIOLÓGICA ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO	41
3.1	RESUMO	41
3.2	OXIDATIVE STRESS AND RESERVES ACCUMULATION IN SOYBEAN HARVESTED SEEDS IN MATURITY PHYSIOLOGICAL BEFORE AND AFTER APPLICATION OF HERBICIDE GLUFOSINATE AMMONIUM	42
3.3	INTRODUÇÃO	43
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.5	RESULTADOS	50
3.6	CONCLUSÃO	58
4	MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E VIGOR DE SEMENTES DE SOJA SOB DESSECAÇÃO COM GLUFOSINATO DE AMÔNIO	59
4.1	MOBILIZATION OF RESERVES AND VIGOR OF SOYBEAN SEEDS UNDER DESICCATION WITH GLUFOSINATE AMMONIUM	60
4.2	INTRODUÇÃO	60

4.3	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.5	CONCLUSÕES	74
5	ESTRESSE OXIDATIVO ENVOLVIDOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA PROVENIENTE DE PLANTAS DESSECADAS COM GLUFOSINATO DE AMÔNIO	76
5.1	RESUMO.....	76
5.2	OXIDATIVE STRESS INVOLVED IN GERMINATION OF SOYBEAN PLANT DESICCATED FROM SEEDS WITH GLUFOSINATE AMMONIUM	77
5.3	INTRODUÇÃO	78
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	80
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
6	CONCLUSÕES.....	96
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO GERAL

A aplicação de herbicidas na maturidade fisiológica em plantas de soja com a função de dessecar a planta para antecipar a colheita, é uma alternativa utilizada por produtores de sementes de soja, na tentativa de garantir sementes com alto vigor. Pesquisas vem demonstrando que a aplicação de dessecantes pode afetar negativamente a qualidade fisiológica das sementes, diminuindo seu vigor e germinação (GUIMARÃES et al., 2012; PINTO et al., 2014).

A antecipação da colheita depende do tipo de herbicida, o estágio fenológico e condições meteorológicas em que a dessecação é realizada (LACERDA et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2012; PEREIRA et al., 2015). De acordo com Guimarães et al. (2012) o herbicida glufosinato de amônio reduz a germinação de sementes de soja quando aplicado no estágio R6 em relação a sua testemunha, antecipando a colheita em 4 dias e o herbicida paraquat promove os melhores índices de germinação e vigor das sementes quando utilizado nos estádios R6 e R7.2, antecipando a colheita em 6 dias. Pinto et al. (2014) observaram que a dessecação com glufosinato de amônio em sementes de feijão apresentaram menor percentagem de plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado.

Entretanto, praticamente não existem estudos mostrando como os mecanismos antioxidantes, estresse oxidativo e mobilização de reservas se comportam durante a germinação de sementes em função da aplicação do glufosinato de amônio na maturidade fisiológica (estádio reprodutivo R7.1) podendo afetar negativamente o vigor e percentual de germinação das sementes. Dessa forma, o herbicida poderá ser considerado um causador de estresse abiótico, uma vez que na maturidade fisiológica as sementes já acumularam o máximo de matéria seca e necessitam apenas diminuir seu teor de água para serem colhidas. Normalmente, são realizadas pesquisas que busquem avaliar as qualidades físicas, fisiológicas e

sanitárias de sementes isoladamente, sendo escassos estudos mostrando as relações entre alterações bioquímicas e enzimáticas durante a maturação e germinação das sementes, com o seu vigor e a formação de plântulas normais.

A identificação e a compreensão dos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos envolvidos durante a pré-colheita e germinação, assim como a mobilização de reservas e o perfil protéico de sementes de soja proveniente de plantas dessecadas serão fundamentais para elucidar melhor quais e como os componentes enzimáticos e bioquímicos podem explicar o efeito da dessecação sobre o baixo vigor e menor percentual de germinação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DE DESSECANTES NA MATURIDADE FISIOLÓGICA EM PLANTAS DE SOJA NA QUALIDADE DE SUAS SEMENTES

O Brasil está entre os três maiores produtores mundiais de soja, com uma produção de aproximadamente 96 milhões de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB, 2015). Para estar entre os maiores produtores de soja no mundo é necessário que se tenha alguns cuidados durante a produção de sementes, para que essas apresentem qualidade superior. Dentre os fatores que afetam a qualidade das sementes de soja, está o seu potencial genético, sua sanidade, o período que as sementes permanecem no campo após a maturidade fisiológica (estádio reprodutivo R.7), o momento da colheita e o seu vigor (LACERDA et al., 2005). Entende-se por vigor de sementes as propriedades ou características da semente que determinam o seu potencial para uma rápida emergência e desenvolvimento com estande de plântulas normais e uniformes, sob ampla diversidade de condições ambientais (AOSA, 1983; RAJJOU et al., 2012).

A maturidade fisiológica em sementes de soja ocorre com o máximo acúmulo de matéria seca, na fase final de desenvolvimento da semente, coincidindo com o seu maior potencial fisiológico e vigor. Entretanto, nesse período as sementes apresentam teores de água elevados (40 a 65%), dificultando sua colheita (MARCOS FILHO, 2005) sendo que o teor ideal de água para a colheita de soja fica próximo ou abaixo de 15% (FRANÇA NETO et al., 2007).

Durante seu desenvolvimento, as sementes acumulam reservas como carboidratos, óleos e proteínas. Segundo Rajjou et al. (2012), o potencial de germinação das sementes é largamente programado durante a maturação da semente, onde as proteínas armazenadas são utilizadas no início da germinação para reiniciar a atividade celular e mobilização de reservas. O acúmulo de reservas tem que ser feito

adequadamente, uma vez que o desenvolvimento inicial das plântulas depende dessas substâncias. Dessa forma, a qualidade fisiológica das sementes depende da organização celular durante o desenvolvimento e da sua capacidade em mobilizar reservas durante a germinação para a formação de plântulas normais. Henning et al. (2010) observaram que sementes de soja mais vigorosas apresentaram maiores conteúdos de proteínas solúveis, amido e açúcares solúveis, bem como maior capacidade de mobilização de reservas na germinação, resultando em plântulas de soja com melhor desempenho inicial.

O período em que a semente permanece no campo, após a maturidade fisiológica com o objetivo de perder água, é um fator determinante na queda do vigor, uma vez que as sementes ficam expostas a condições ambientais até atingirem a umidade variando entre 13% e 15%. A dessecação ou desfolha na maturidade fisiológica em plantas de soja, com a utilização de herbicidas, é uma alternativa de manejo que pode favorecer a perda de água de forma mais rápida na planta e, conseqüentemente na semente, favorecendo a antecipação da colheita e manutenção do do vigor das sementes. Porém, também é possível que o dessecante afete negativamente a qualidade da semente. Lacerda et al. (2003) relataram que a aplicação de dessecantes em plantas de soja, com o objetivo de antecipar a colheita, pode influenciar nas características bioquímicas das sementes. Os autores observaram que a aplicação do glufosinato de amônio promoveu diferença significativa no extrato etéreo entre as sementes de soja provenientes de plantas dessecadas, quando comparada com as sementes proveniente de plantas não dessecadas.

O glufosinato de amônio é um herbicida de contato com a capacidade de translocar-se na planta a curta distância. Esse herbicida inibe a glutamina sintetase, provocando um conjunto de efeitos na planta, como o acúmulo de amônia, a inibição na síntese de aminoácidos que são precursores de proteínas, entre

esses aminoácidos está a prolina; além da produção de radicais livres (com conseqüente destruição de membranas) e o bloqueio na fotossíntese, levando a planta à morte (CARVALHO, 2013). A morte da planta está associada à rápida perda de água da mesma, fazendo com que a semente perca água em função da diferença do potencial hídrico entre a planta e a semente, favorecendo a colheita antecipada.

Conforme a semente vai perdendo água durante sua dessecação, a concentração de solutos no interior das células aumenta, diminuindo a fluidez do meio aquoso, fazendo com que o conteúdo celular torne-se cada vez mais viscoso, aumentando a chance de interações moleculares podendo provocar a desnaturação de proteínas (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; MARCOS FILHO, 2005). A desidratação da semente de forma gradual permite a atuação de mecanismos protetores que conferem maior tolerância aos desequilíbrios celulares provocado pela desidratação. Por outro lado, a secagem muito rápida da semente pode ocasionar em considerável desorganização das membranas celulares e da estrutura interna, fazendo com que a semente necessite de um tempo adicional para reparo do metabolismo durante a germinação. Dessa forma, a secagem muito rápida predispõe as sementes a possíveis injúrias durante a embebição no período de germinação.

Entre os mecanismos de proteção e reparação celular estão a presença de proteínas *LEA* (Late-Embryogenesis abundant), açúcares solúveis e a presença de mecanismos antioxidantes (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; BAILLY, 2004; MARCOS FILHO, 2005; LEPRINCE; BUTINIK, 2010). Segundo Veiga et al. (2007), a germinabilidade e a tolerância à dessecação de sementes de soja aumentam com a perda natural de água no campo e que sementes colhidas no estágio R7 apresentam maior qualidade fisiológica com padrão diferenciado de proteínas *lea* e maior tolerância à dessecação do que nos estádios R6 e R6/R7

O momento de aplicação do herbicida para dessecar/desfolhar a planta é muito importante para a qualidade fisiológica da semente, pois o modo de ação do dessecante, condições meteorológicas e o estágio fenológico em que a planta se encontra podem afetar negativamente a qualidade das sementes, e nesse caso, o dessecante pode funcionar como um agente causador de estresse abiótico, não antecipando a colheita, podendo interferir em algum mecanismo de proteção e reparação celular durante a dessecação e, conseqüentemente, influenciando negativamente no vigor das sementes. Pereira et al. (2015) não observaram a antecipação de colheita com a utilização do glufosinato de amônio, associando esse efeito com a elevada precipitação após a aplicação do produto durante a maturidade fisiológica.

Plantas de soja na maturidade fisiológica (R7) que passaram por estresse de alta temperatura e umidade durante 24h e tiveram suas sementes colhidas após esse período, apresentaram alterações anatômicas em suas células e mudanças no perfil de proteínas, diminuindo o vigor das sementes (WANG et al., 2012). Atualmente existem vários trabalhos relacionando a utilização do dessecante na maturidade fisiológica com a qualidade final da semente, porém são raros os estudos que realmente demonstrem qual a relação existente entre o vigor e qualidade dessas sementes com o acúmulo de reservas e sua mobilização, assim como a formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes, na maturidade fisiológica e durante a germinação.

2.2 PADRÃO TRIFÁSICO DE EMBEBIÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO

No início da germinação a reidratação dos tecidos da semente está normalmente relacionado ao reparo das estruturas das membranas e ácidos nucléicos (BUKERIDGE et al., 2004). A retomada da atividade metabólica vai acontecer durante o

processo de germinação, quando começar a ocorrer o processo de embebição das sementes. De acordo com Marcos Filho (2005), o processo de embebição é fundamental para a germinação, pois contribui para os processos de mobilização e assimilação de reservas e conseqüentemente crescimento. Ainda segundo o mesmo autor, as proteínas são hidrolisadas com auxílio de proteases e peptidases e translocadas aos pontos de crescimento do eixo embrionário, à formação de tecidos vivos, ou participam de reações da cadeia respiratória.

O processo de germinação corresponde a três fases (BEWLEY; BLACK, 1994; NONOGAKI et al., 2010). Durante a fase I, também denominada embebição, ocorre uma rápida absorção de água, em função da grande diferença de potencial hídrico entre as sementes e o substrato, independentemente do estado fisiológico das sementes. Além da rápida embebição de água, ocorre o rápido aumento na captação de oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar dano estrutural e funcional às células (TOMMASI et al., 2001; PRODANOVIC et al., 2007). Entretanto, as espécies reativas de oxigênio também podem funcionar como sinalizadores para a germinação ao invés de agente causador de estresse oxidativo (MOLLER et al., 2007; BAILLY et al., 2008; QUAN et al., 2008; YE et al., 2011; SHARMA et al., 2012). De acordo com Ishibashi et al. (2013), espécies reativas de oxigênio produzidas no eixo embrionário de sementes de soja após a embebição foram responsáveis pela indução e produção de etileno, promovendo o alongamento das células na ponta da radícula.

A fase II é caracterizada pela estabilização na absorção de água, ocorrendo diversas reações metabólicas preparatórias à emergência da raiz primária, como reorganização celular, síntese de novas proteínas, mobilização de reservas e desintoxificação de EROs, que foram produzidas em excesso (BEWLAY et al., 2013; WANG et al., 2015).

Na fase III, com o metabolismo ativado e em função da produção de substâncias osmoticamente ativas, ocorre uma redução no potencial hídrico das sementes, resultando em rápida absorção de água do meio. A mobilização mais intensa das principais substâncias de reserva (amido, proteínas e lipídios) ocorre após o início do crescimento do embrião. Han et al. (2013) observaram, durante o processo de germinação de sementes de soja a presença de enzimas envolvidas na degradação de lipídios, proteínas e amido, sugerindo que o lipídio é o principal componente consumido nas fases iniciais de germinação em função da sua grande quantidade encontrada na semente.

A partir do momento exato que inicia e finaliza cada uma das três fases no processo da germinação em sementes de soja, fica mais fácil inferir quais os possíveis efeitos que a aplicação do dessecante em plantas de soja no estágio reprodutivo R7 provoca durante o processo de germinação nas sementes provenientes dessas plantas, comprometendo ou não o vigor dessas sementes.

2.3 INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO VIGOR DE SEMENTES

Espécies reativas de oxigênio têm um duplo papel na fisiologia de sementes, apresentando efeitos benéficos ou prejudiciais fornecendo informações importantes para a melhoria na manutenção do vigor e qualidade de sementes de plantas cultivadas, assim como um papel importante durante a germinação (KUMAR et al., 2015). Segundo Leymarie et al. (2012), a germinação de sementes não dormentes de *Arabidopsis thaliana* está associada com o acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio na radícula. Espécies reativas de oxigênio produzidas no eixo embrionário de sementes de soja, após a embebição foram responsáveis pela indução e produção de etileno promovendo o alongamento das

células na ponta da radícula (ISHIBASHI et al., 2013). A ausência de peróxido de hidrogênio em *Vigna* afetou negativamente a mobilização de reservas durante a germinação, apresentando baixo percentual de germinação e menores comprimentos de plântulas (VERMA et al., 2015).

Um dos fatores que pode ocasionar a queda de vigor em sementes é o desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e mecanismos antioxidantes, ocasionado por algum tipo de estresse. A acumulação de EROs pode ser prejudicial para a viabilidade das sementes em função do estresse oxidativo imposto durante a dessecação, durante seu envelhecimento e sua germinação, podendo induzir a oxidação de proteínas, afetando deletериamente o vigor e germinação das mesmas (BAILLY, 2004; JOB et al., 2005).

Entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) encontram-se o ânion superóxido (O_2^-), hidroxila (OH), o hidrogênio peróxido (H_2O_2) e o oxigênio singletto (1O_2). Em baixa concentração, as EROs são necessárias para as plantas, funcionando como mensageiros hormonais para diversas funções nas plantas como fechamento estomático, biossíntese de lignina, morte celular programada, quebra de dormência e germinação (MOLLER et al., 2007; QUAN et al., 2008; BAILLY et al., 2008; SHARMA et al., 2012; LEYMARIE et al., 2012).

Condições de estresse abiótico podem favorecer o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, dentre os tipos de estresse, pode-se destacar temperaturas extremas, o déficit hídrico, radiações UV, ataque de patógenos, metais pesados e herbicidas (GILL; TUTEJA, 2010; GOMES; GARCIA, 2013).

O aumento das EROs podem reagir com ácidos graxos insaturados das membranas celulares, promovendo a peroxidação lipídica (YAMAUCHI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011). A peroxidação lipídica em membrana causa a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica

e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ et al., 1998). A diminuição da fluidez das membranas interfere nas funções das proteínas, reduz o suprimento de energia, favorece a perda de compartimentalização e liberação acentuada de íons e outros eventos que rompem o metabolismo normal, levando ao desbalanço e perda das funções essenciais (AZIZ; LARHER, 1998). Dessa forma, a peroxidação lipídica pode ser utilizada como um marcador de estresse oxidativo.

Entretanto, as plantas têm a capacidade desintoxicar as espécies reativas de oxigênio com auxílio de diferentes antioxidantes, os quais podem ser classificados em dois tipos, os enzimáticos e os não enzimáticos. Entre os mecanismos enzimáticos, podemos citar as enzimas como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), e glutathiona peroxidase (GPX) que são importantes mecanismos eficientes para desintoxicar ou remover O_2^- e H_2O_2 .

A superóxido dismutase é a primeira enzima na linha de defesa das plantas na eliminação das Eros, convertendo O_2^- em H_2O_2 e O_2 . Entretanto o H_2O_2 também pode ser prejudicial às células vegetais, dessa forma a catalase e a ascorbato peroxidase podem converter o H_2O_2 em O_2 e H_2O .

Estudos relacionando a qualidade de semente com alterações enzimáticas já vem sendo discutido na literatura, inclusive com sementes provenientes de plantas submetidas a estresse na maturidade fisiológica. De acordo com Wang et al. (2012) semente de soja proveniente de plantas que passaram por estresse de alta temperatura e umidade no estágio reprodutivo R7 durante 24h apresentaram aumento na concentração de EROs acompanhada do aumento na peroxidação lipídica. Sementes de trigo submetidas ao envelhecimento acelerado (45⁰C e 100% de umidade) apresentaram perda de viabilidade das sementes associada com aumento de H_2O_2 , e baixa atividade da SOD e da CAT (LEHNER et al., 2007).

Além das enzimas antioxidantes que atuam na detoxificação das EROs das plantas, existem os compostos não enzimáticos que podem exercer a mesma função (SMIRNOFF; CUMBES, 1989) denominada osmólitos ou solutos compatíveis. Esses compostos podem aumentar sua concentração no interior das células sem prejudicar o seu metabolismo com o objetivo de manter a integridade celular. Entre esses compostos pode-se citar o ácido ascórbico, α -tocopherols, carotenóides, glutamato, sacarose, glicina-betaina e a prolina (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2013)

A prolina é um aminoácido sintetizado a partir do ácido L-glutâmico, funcionando como um osmoprotetor com capacidade de aumentar a estabilidade das células em reter água sem afetar o metabolismo normal das plantas, também pode agir como estabilizador protéico e inibidor da peroxidação lipídica (HAMILTON; HECKATHORN, 2001; GILL; TUTEJA, 2010). O glufosinato de amônio é um herbicida de contato com a capacidade de translocar-se a curta distância, inibindo a glutamina sintetase, que é a precursora de uma série de aminoácidos incluindo a prolina (CARVALHO, 2013) podendo dessa forma afetar a produção da mesma.

A grande problemática da presente pesquisa é: Se a semente já atingiu sua maturidade fisiológica, ou seja, acumulou toda matéria seca necessária para a formação da futura plântula, quais são os mecanismos bioquímicos e enzimáticos das sementes que podem estar contribuindo para o baixo vigor dessas sementes e o seu percentual de germinação; e se essas respostas são intrínsecas de cada cultivar. Nesse sentido, acredita-se que o uso do glufosinato de amônio como dessecante aplicado na maturidade fisiológica em plantas de soja influencia negativamente: **1)** na qualidade fisiológica das sementes produzidas; **2)** no perfil protéico e na mobilização de reservas durante a germinação das sementes proveniente dessas plantas; **3)** na produção de espécies reativas de oxigênio e

atividade antioxidante durante a germinação das sementes proveniente dessas plantas.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação existente entre os componentes de reserva, alterações enzimáticas e mecanismos antioxidantes com o vigor e germinação em sementes de soja proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio na maturidade fisiológica (R7.1)

3 ESTRESSE OXIDATIVO E ACÚMULO DE RESERVAS EM SEMENTES DE SOJA COLHIDAS NA MATURIDADE FISIOLÓGICA ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO

3.1 RESUMO

A aplicação de herbicidas na maturidade fisiológica em plantas de soja é uma alternativa de antecipação para a colheita de suas sementes, garantindo o maior vigor das sementes. Entretanto, é possível que o herbicida afete negativamente o seu vigor. Conforme a semente vai diminuindo seu teor de água, durante a maturidade fisiológica, um amplo mecanismo de proteção, desintoxicação e reparação de membranas é ativado, permitindo que as sementes sobrevivam no estado seco preservando sua capacidade de germinação. O objetivo do presente estudo foi: avaliar em sementes coletadas na maturidade fisiológica, o acúmulo de reservas, expressão do perfil protéico, espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade antioxidante e peroxidação lipídica, antes (0) da aplicação do glufosinato de amônio; 24h e 48h após a aplicação do herbicida. As cultivares utilizadas no presente estudo foram NA5909RG e Benso 1RR. As sementes foram coletadas no terço-médio das plantas e armazenadas em ultra-freezer até o momento das análises bioquímicas. Para o acúmulo de reservas, foram avaliados os teores de proteína e açúcar solúvel; o perfil protéico foi avaliado através da técnica SDS-PAGE. As espécies reativas de oxigênio (EROs) foram avaliadas através dos teores de peróxido de hidrogênio. Para o sistema antioxidante quantificou-se a atividade da catalase e teores de prolina. A peroxidação lipídica foi quantificada através dos teores de malondialdeído. Conclui-se que sementes da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas apresentaram menor teor de proteína solúvel. Sementes da cultivar NA5909RG apresentaram maior acúmulo de peróxido

de hidrogênio em relação a sua testemunha associada a uma atividade ineficiente da enzima catalase e baixos teores de prolina, ocasionando a maior peroxidação lipídica. Esses mecanismos enzimáticos podem indicar que sementes da cultivar NA5909RG provenientes de plantas dessecadas, poderão apresentar baixo vigor quando atingirem seu ponto de colheita (umidade variando entre 13 e 15%).

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Peroxidação lipídica. Mecanismos antioxidantes.

3.2 OXIDATIVE STRESS AND RESERVES ACCUMULATION IN SOYBEAN HARVESTED SEEDS IN MATURITY PHYSIOLOGICAL BEFORE AND AFTER APPLICATION OF HERBICIDE GLUFOSINATE AMMONIUM

ABSTRACT - The application of herbicides at physiological maturity in soybean plants, is an alternative anticipation for the harvest of the seeds, ensuring the highest seed vigor. However, it is possible that the herbicide adversely affects its strength. As the seed is decreased water content, during physiological maturation ample protection mechanism, detoxification and repair membranes is activated, allowing the seeds to survive in the dry state preserving their ability to germinate. The aim of this study was to: assess seeds collected at physiological maturity, the accumulation of reserves, the protein expression profile, reactive oxygen species (ROS), antioxidant activity and lipid peroxidation before (0) application of glufosinate ammonium; 24h and 48h after the herbicide application. The cultivars used in this study were NA5909RG and Benso 1RR. The seeds were collected in the third-medium plants and stored in ultra-freezer until the moment of biochemical analysis. For the accumulation of reserves, they were evaluated protein and soluble sugar; the protein profile was assessed by SDS-PAGE technique. Reactive oxygen species (ROS) were evaluated by

the hydrogen peroxide content. For the antioxidant system quantitated catalase activity and proline contents. Lipid peroxidation was quantified by the malondialdehyde levels. It was concluded that seeds of the cultivar Benso 1RR from pantas desiccated had lower soluble protein content. The seeds NA5909RG showed greater accumulation of hydrogen peroxide in relation to their witness associated with an inefficient activity of catalase enzyme and low proline levels, leading to increased lipid peroxidation. These enzymatic mechanisms, may indicate that seeds grow NA5909RG from desiccated plants may have low force when they reach their point of harvest (humidity ranging between 13 and 15%).

Key-words: Reactive oxygen species. Lipid peroxidation. Antioxidant mechanisms.

3.3 INTRODUÇÃO

Durante o seu desenvolvimento as sementes acumulam componentes bioquímicos fundamentais para o seu próprio desenvolvimento e para a formação de plantas vigorosas durante o processo de germinação. Jones et al. (2013), estudando a expressão de genes durante a formação de sementes de soja, identificaram quatro dias após a fertilização, genes relacionados com muitos componentes e processos básicos, tais como histonas e proteínas ricas em prolina. A elevada expressão de genes de proteínas ricas em prolina (PRP1), no desenvolvimento inicial das sementes está associada com o aumento no crescimento e desenvolvimento celular, sendo observado em maior quantidade no tegumento das sementes (LINDSTROM; VODKIN,1991).

Segundo Rajjou et al. (2012) o potencial de germinação das sementes é largamente programado durante sua maturação, onde as proteínas armazenadas são utilizadas no início da germinação para reiniciar a atividade celular e mobilização de reservas. Nas fases mais avançadas do desenvolvimento de

sementes de soja, quando a esta adquire maior peso fresco, ou seja, atingiram a maturidade fisiológica. Jones et al. (2013), verificaram maior expressão de genes que codificam proteínas de armazenamento, tais como glicinina e β -conglucina, confirmando que esses produtos são acumulados rapidamente antes que a semente comece o processo de dessecação. De acordo com Marcos Filho (2005), a secagem gradual no final da maturação de sementes favorece o acúmulo de açúcares solúveis exercendo proteção contra os efeitos negativos da desidratação, contribuindo para a estabilidade de membranas ao favorecer a preservação das relações hidrofílicas associadas à atividade de proteínas durante a desidratação.

O período de permanência das sementes de soja a campo, após a maturidade fisiológica, é um fator importante que afeta a qualidade da semente, determinando a queda do seu vigor. Isto, porque nessa fase, as sementes apresentam teores de água elevados (40 a 65%) dificultando a colheita, tendo que permanecer no campo até atingirem teores próximo ou inferior a 15% (MARCOS FILHO, 2005; FRANÇA NETO et al., 2007). Por isso, a aplicação de dessecantes pode ser uma forma de manejo, visando a antecipação da colheita em função da rápida perda de água da planta e conseqüentemente na semente.

Conforme a semente vai perdendo água durante a dessecação, o seu volume celular começa a diminuir provocando aglomerações de compostos citoplasmáticos, fazendo com que o conteúdo celular torne-se cada vez mais viscoso, aumentando a chance de interações moleculares que pode provocar a desnaturação de proteínas (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). Uma ampla série de adaptações durante a dessecação das sementes relacionadas com a proteção, desintoxicação e reparação de membranas, foi identificada para evitar essas interações moleculares, permitindo que a semente preserve a sua capacidade germinativa.

Entre essas adaptações, estão a presença de proteínas LEA (Late-Embryogenesis abundant), acúmulo de açúcares solúveis e mecanismos antioxidantes (enzimáticos ou não) com habilidade em reparar, tolerar ou prevenir o ataque de espécies reativas de oxigênio (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; BAILLY, 2004; MARCOS FILHO, 2005; VEIGA et al., 2007).

O estresse oxidativo ocorre em função do desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e mecanismos antioxidantes, promovendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, afetando o vigor das sementes (BAILLY, 2004). As espécies reativas de oxigênio em excesso reagem com ácidos graxos insaturados das membranas celulares, promovendo a peroxidação lipídica (YAMAUCHI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011). Entre as espécies reativas de oxigênio, destaca-se o peróxido de hidrogênio, o qual pode ser convertido em água e oxigênio com auxílio da enzima catalase. Segundo Silva (2006) durante a secagem de sementes de soja, a superóxido dismutase (SOD) é ativada durante o desenvolvimento, enquanto a catalase (CAT) é efetiva após a maturidade fisiológica. Segundo Leprince; Butinik (2010) muitos genes relacionados aos mecanismos antioxidantes são regulados positivamente em tecidos tolerantes a dessecação.

Por outro lado, alguns trabalhos vêm demonstrando que a aplicação de dessecantes, entre eles o glufosinato de amônio, pode afetar negativamente a qualidade fisiológica das sementes, diminuindo seu vigor e aumentando o percentual de plântulas anormais, podendo não haver a antecipação da colheita (GUIMARÃES et al., 2012; PINTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar em sementes coletadas na maturidade fisiológica o comportamento das espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade antioxidante, peroxidação lipídica e acúmulo de reservas, antes (0) da aplicação do glufosinato de amônio; 24h e 48h após a aplicação do herbicida.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: As sementes das cultivares NA5909RG (hábito indeterminado) e Benso1RR (hábito determinado) foram produzidas no município de Campos Novos-SC, na safra 2012/2013 conforme descrito por Pereira et al., (2015).

As sementes foram coletadas no terço médio das plantas que atingiram a maturidade fisiológica, em R7.1 conforme descrito (RITCHIE et al., 1982). As coletas foram realizadas antes da aplicação do glufosinato de amônio (0) e após aplicação do produto (24h e 48h). Também foram realizadas coletas nos mesmos tempos em plantas que não sofreram dessecação sendo consideradas sementes provenientes de plantas testemunhas. Após as coletas, as sementes foram armazenadas em ultra-freezer até o momento de realização das análises bioquímicas.

A aplicação do glufosinato de amônio foi realizada no período matutino em 28/02/2013, com um pulverizador mecanizado, com vazão de 300 L ha⁻¹ e ponta tipo leque vazão 1,63 L min⁻¹ e ângulo de 110°. No processo de aplicação do dessecante foram utilizadas 2 secções da barra de pulverização, totalizando 8,6 m de comprimento (PEREIRA et al. 2015).

Teor de água nas sementes: Para determinação do teor de água nas sementes, utilizou-se o método da estufa a 105°C por 24 horas. Pesou-se em uma cápsula de alumínio aproximadamente 5 g de semente, em 3 repetições conforme descrito na Regra de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

Peróxido de hidrogênio: Os teores de peróxido de hidrogênio foi quantificado de acordo com Alexieva et al. (2001). Foram feitas 3 repetições com 0,2 g de semente de soja proveniente antes da aplicação do produto (0), 24h e 48h após aplicação do herbicida e sua testemunha. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha, depois se adicionou 2 mL tampão de extração (ácido

tricloroacético 1%). O homogenizado foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação, para quantificação do H_2O_2 utilizou-se 200 μ L do sobrenadante acrescido de 800 μ L de iodeto de potássio e 200 μ L de tampão fosfato (0,1M pH 7,5) que foram incubados no gelo por 1h. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 15 min e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 390 nm. Os resultados foram expressos em μ g/g massa fresca).

Prolina livre: O teor de prolina livre foi determinado conforme Bates et al. (1973). Foram feitas 3 repetições com 0,25 g de sementes de soja proveniente dos tempos de coleta antes da aplicação do produto (0), 24h e 48h após aplicação do herbicida e sua testemunha. As amostras foram extraídas em ácido sulfossalicílico (3% m/v). O extrato foi centrifugado (3600 rpm 15 min) recuperando-se o sobrenadante (2 ml) ao qual foram adicionados 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. O meio de reação foi incubado em banho-maria (100°C/1h), sendo a reação paralisada por imersão em banho de gelo. Após este procedimento, foram acrescentados 4 mL de tolueno, seguido de agitação vigorosa (20 s) e recuperação do sobrenadante aspirado da fase aquosa para leitura. Os resultados foram expressos em μ mol prolina g^{-1} peso fresco.

Quantificação da catalase: Foram feitas 3 repetições com utilizando os 25 μ L de extrato vegetal (proteína solúvel) extraídas de acordo com Azevedo et al. (1988) das semente de soja proveniente dos tempos de coleta antes da aplicação do produto (0), 24h e 48h após aplicação do herbicida e sua testemunha. O ensaio foi realizado a 25°C em uma solução contendo 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescida de 25 μ L de H_2O_2 (solução 25%). A reação inicia-se pela adição de 25 μ L de extrato vegetal e a atividade é determinada monitorando-se a degradação de H_2O_2 a 240 nm (pico de absorção do H_2O_2) durante o período de 1 minuto e

dosagem contínua em intervalos de 1 segundo em temperatura ambiente. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.

Peroxidação lipídica: A quantificação do malondialdeído (MDA) foi realizada conforme descrito por Heath e Packer (1968). Foram feitas 3 repetições com 0,2 g de semente de soja proveniente dos tempos de coleta antes da aplicação do produto (0), 24h e 48h após aplicação do herbicida e suas testemunhas. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha, adicionando 2 mL do tampão de extração (ácido tricloroacético 1%). O homogenizado foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação, para quantificação do MDA utilizou-se 250 μL do sobrenadante acrescido de 1 mL de ácido tricloroacético 20% + ácido tiobarbitúrico 0,5%, os quais foram incubados por 30 minutos a 95°C . A reação foi paralisada em gelo durante 10 min, as amostras ficaram em repouso e protegidas de luz por 15 min para sua estabilização. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 600 e 535 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{g}$ de peso fresco.

Proteína solúvel total: Para análise de proteína solúvel, foram feitas 3 repetições com 1 g de semente de soja proveniente de cada momento da coleta antes da aplicação do produto (0), 24h e 48h após aplicação do herbicida e suas testemunhas. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha. O material foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH7,5) contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e aproximadamente 4% de PVPP, conforme Azevedo et al. (1988) e Garcia et al. (2006). O homogenizado foi centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos. As proteínas solúveis totais foram determinadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S, conforme método descrito por Bradford (1976) e os resultados expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca de semente.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE): A eletroforese da fração protéica foi realizada em cuba vertical com sistema de eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE) em uma concentração de 12% (gel de resolução) e 3% (gel de empacotamento), utilizando sistema de mini-gel no tamanho de 8,3 cm x 10,2 cm (Mini Protein II) da Bio-Rad.

Após a quantificação dos teores de proteína de acordo com Bradford et al. (1976), uma parte correspondente a 20 µg de proteína foi adicionada a solução tampão de amostra contendo: água destilada; Tris-HCl pH 6,7; glicerol; SDS 10%; solução 0,5% de azul de bromofenol e 2-mercaptoetanol, na proporção 1:1; seguido por aquecimento em banho-maria a 100°C durante 5 min e resfriamento em gelo por 1 min e submetidas a eletroforese. O sistema de eletroforese contendo as amostras foi colocado em solução tampão com pH 8,3 (25 mM de Tris, 192mM de Glicina, 1% de SDS 10%) e tensão de 30V durante 3 horas em temperatura ambiente até a passagem das proteínas de acordo com Laemmli (1970).

Após a eletroforese, os géis foram lavados com água e na sequência incubados por 3 horas em solução corante de Coomassie Brilliant Blue R-250, contendo metanol, ácido acético glacial e água destilada. O excesso do corante foi retirado com solução descolorante até que as bandas protéicas se tornassem nítidas (ALFENAS, 1998).

O procedimento de avaliação foi realizado por comparação do perfil protéico das amostras em relação ao marcador molecular Sigma (Wide Range – 6,5 a 200 kDa) para determinar a massa molecular de cada banda de proteína presente no gel.

Posteriormente, foi realizada a foto documentação digital em transluminador WL (DNR Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro, Jerusalém - Israel), com o software de captura de imagem Gel Capture, permitindo a visualização e o processamento de imagens das bandas protéicas reveladas nos

géis. A análise do padrão eletroforético de cada tratamento foi realizada qualitativamente por meio da comparação visual na detecção diferencial de bandas.

Açúcar solúvel total: Para análise de açúcar solúvel total foram feitas 3 repetições com de 0,250 g de sementes secas e moídas dos tempos de cada coleta antes da aplicação do produto (0), 24h e 48h após aplicação do herbicida e sua testemunha. Os açúcares solúveis totais foram determinados pelo método da Antrona conforme Clegg (1956) e a leitura das amostras feitas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S no comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em mg.g^{-1} de semente de massa seca de semente

Análise estatística: Para verificar a distribuição normal dos dados utilizou-se o teste de Shapiro Wilk (5%). Na sequência os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Para análise da qualidade dos componentes bioquímicos foi utilizado o teste de Duncan a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas via programa computacional Assistat ® versão 7.7 beta (SILVA, 2011).

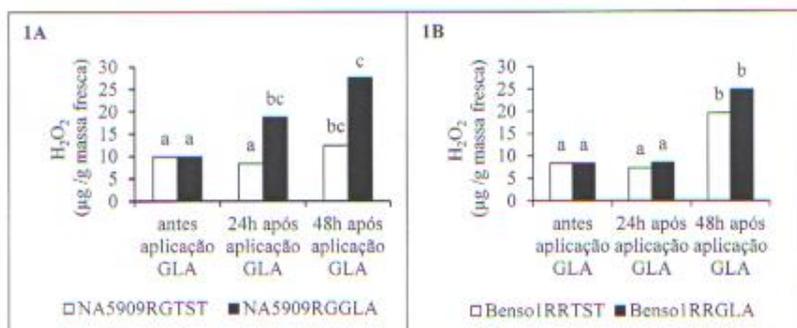
3.5 RESULTADOS

A dessecação após 48h da aplicação do glufosinato de amônio na maturidade fisiológica, não interferiu nos teores de água das sementes das cultivares NA5909RG e Benso 1RR. Antes da aplicação do glufosinato de amônio, sementes da cultivar Benso1RR e NA5909RG apresentaram 66,27% e 63,14% de umidade respectivamente. Após 48h da aplicação do glufosinato de amônio, não se observou redução nos teores umidade para as duas cultivares. Esses resultados indicam que 48h pode ser um tempo muito curto para observar redução nos teores de água.

Com relação as espécies reativas de oxigênio, especificamente o peróxido de hidrogênio, sementes da NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio apresentaram maiores teores de peróxido de

hidrogênio, 24h e 48h após a aplicação do herbicida em relação as suas testemunhas colhidas no mesmo tempo, aumentando em 55,53% e 54,87% respectivamente (Figura 1A). Para a cultivar Benso 1RR, não houve diferença nos teores de peróxido de hidrogênio em relação as suas testemunhas (Figura 1B). Segundo Bailly (2004), o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, pode ser prejudicial para a viabilidade das sementes em função do estresse oxidativo imposto durante a dessecação das mesmas, podendo dessa forma, sugerir que sementes da cultivar NA5909RG proveniente de planta dessecada poderá futuramente apresentar baixa viabilidade quando estas atingirem umidade próxima a 12% (ponto de colheita).

Figura 1A-1B - Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação (0), 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST)



CV= 9.23%, teste Ducan ($p < 0,01$).

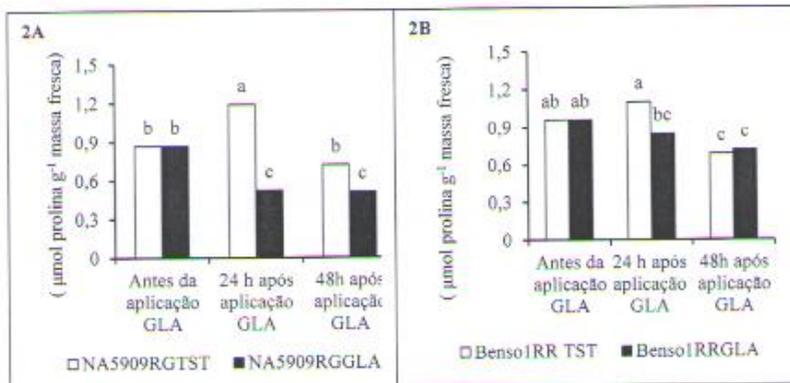
CV= 12.05%, teste Ducan ($p < 0,01$).

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Após a aplicação do herbicida, sementes da cultivar NA5909RG apresentaram redução nos teores de prolina (Figura 2A) nos tempos avaliados (24h e 48h), reduzindo 56% e 41% respectivamente em relação as suas testemunhas colhidas no mesmo tempo. Para sementes da cultivar Benso

1RR, observou-se redução nos teores de prolina apenas 24h após a aplicação do produto (Figura 2B), reduzindo em 27,35% em relação a testemunha colhida no mesmo tempo, não havendo diferença na redução dos teores de prolina 48h após a aplicação do herbicida. Gill; Tuteja (2010) afirmam que a prolina pode funcionar como estabilizadora de membranas evitando a peroxidação lipídica.

Figura 2A-2B - Teor de prolina em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação, 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST)



CV = 12.42 %, teste Ducan (p<0,01). CV = 11.57 % , teste Ducan (p<0,01).
 Fonte: produção do próprio autor (2016).

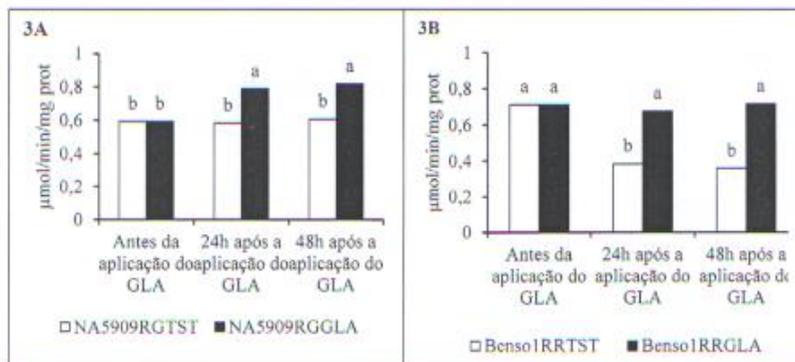
Com relação a atividade da catalase, após 24h e 48h da aplicação do glufosinato observou-se que as duas cultivares apresentaram maior atividade da enzima em relação as suas testemunhas no mesmo tempo (Figura 3A-3B). Para a cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas esse aumento foi menos expressivo, tanto em 24h como em 48h em relação a suas testemunhas colhidas no mesmo tempo, aumentando em 25,64% e 25,92% em relação as suas testemunhas.

Para a cultivar Benso 1RR após 24h e 48h da aplicação do produto, sementes da cultivar Benso1RR apresentaram um

aumento da atividade da enzima catalase de 43,87% e 50,70% em relação as suas testemunhas colhidas no mesmo tempo.

A atividade da catalase em sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas não foi eficiente para neutralizar o aumento nos teores de peróxido de hidrogênio, mesmo tendo sido superior a sua testemunha. Ao contrário, para sementes da cultivar Benso1RR proveniente de plantas dessecadas, o aumento mais acentuado da atividade da catalase em relação a sua testemunha, juntamente com os teores de prolina, pode ter contribuído para os menores teores de peróxido de hidrogênio. Além, disso outras enzimas, que não foram estudadas nesse trabalho, também podem ter influenciado no controle do peróxido de hidrogênio. Lehner et al. (2007) associaram a perda de viabilidade em sementes de trigo com aumento de H_2O_2 , e baixa atividade da SOD e da CAT quando essas foram submetidas a alta temperatura e umidade.

Figura 3A-3B - Atividade antioxidante da enzima catalase em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação do glufosinato de amônio (TST) na maturidade fisiológica (R7.1), 24h e 48h após aplicação do produto (GLA)



CV= 9.43% teste Duncan (p<0,01).

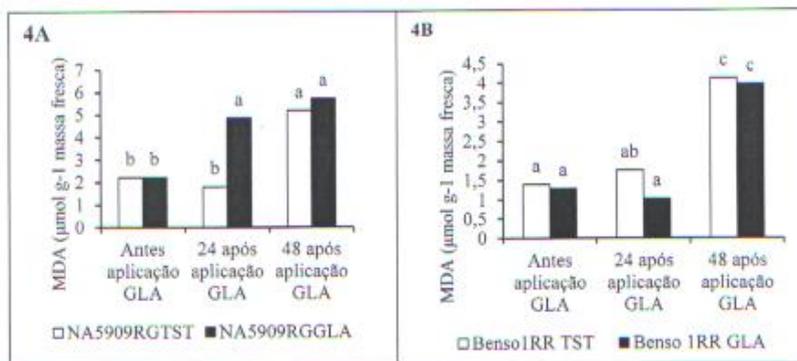
CV= 18.21%, teste Duncan (p<0,01).

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Sementes da cultivar NA5909RG colhidas 24h após a dessecação apresentaram maior peroxidação lipídica em relação a semente proveniente de plantas não dessecadas (Figura 4A), aumentando em 62,68% os teores de MDA em relação a sua testemunha colhida no mesmo tempo. Essa maior peroxidação lipídica pode estar relacionada ao elevado teor de peróxido de hidrogênio observado anteriormente (Figura 1A) e os baixos teores de prolina (Figura 2A). Segundo Bailly, (2004) e Job et al., (2005), a partir da maturidade fisiológica, na fase de dessecação, pode ocorrer acúmulo de espécies reativas de oxigênio em sementes, causando estresse oxidativo, o que futuramente poderá afetar deletериamente o vigor das mesmas. Gill e Tuteja (2010) afirmam que a prolina pode funcionar como estabilizadora de membranas evitando a peroxidação lipídica.

Para a cultivar Benso1RR, ao comparar os teores de MDA de sementes proveniente de plantas dessecadas com as sementes proveniente de plantas testemunhas não se observou alteração nos teores de MDA (Figura 4B). A menor redução nos teores de prolina de sementes da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas, também pode ter contribuído para a maior estabilização de suas membranas evitando a peroxidação lipídica em relação a sua testemunha colhida no mesmo tempo. Segundo Hoekstra, Golovina e Buitink (2001), Hamilton e Heckathorn (2001) e Gill e Tuteja (2010), a prolina pode funcionar como estabilizadora de membranas evitando a peroxidação lipídica.

Figura 4A-4B - Peroxidação lipídica (MDA) em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso 1RR antes da aplicação (0), 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST)



CV (%)=16.18, teste Ducan ($p<0,01$). CV (%)=21.03, teste Ducan ($p<0,01$).
 Fonte: produção do próprio autor (2016)

Os teores de proteína solúvel para sementes colhidas antes da aplicação do produto (Tabela 1) apresentaram diferença significativa entre as cultivares, sendo que a cultivar NA5909RG apresentou maior teor de proteína solúvel ($39,43 \text{ mg.g}^{-1}$) em relação a cultivar Benso1RR ($34,85 \text{ mg.g}^{-1}$). Após 48h da aplicação do produto não se observou alteração nos teores de proteína solúvel para a cultivares NA5909RG, entretanto a cultivar Benso1RR apresentou menores teores em relação a sua testemunha (Tabela 1).

Tabela 1 - Teor de proteína solúvel em massa seca (mg.g⁻¹) antes da aplicação, 24h e 48h após a aplicação do glufosinato de amônio. TST - testemunha; GLA - glufosinato de amônio

Cultivares	Tempo(h)		
	0	24	48
Benso1RR+TST	34,85 bAB	32,38 bB	38,06 bA
Benso1RR+GLA	34,84 bA	32,89 bAB	30,56 cB
NA5909RG+TST	39,43 aA	41,51 aA	42,83 aA
NA5909RG+GLA	39,43 aA	34,54 bB	38,66 abA

Letras minúsculas comparam dentro da mesma coluna, e letras maiúsculas comparam nas mesmas linhas (entre tempos). Teste Ducan (p<0,05).

Fonte: Produção do próprio autor (2016)

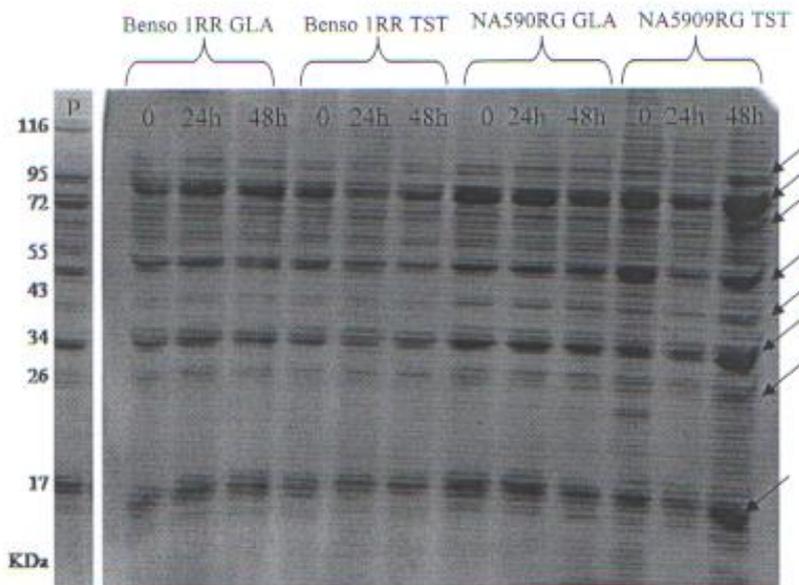
Com relação ao perfil protéico para as duas cultivares observou-se a presença de proteínas de armazenamento β -conglucina (95 KDa a 55 KDa) e glicina (34 KDa a 17 KDa) (Figura 5). Jones et al. (2013) observaram maior expressão de genes que codificam proteínas de armazenamento (glicina e β -conglucina) nas fases de maior peso fresco (maturidade fisiológica), confirmando que proteínas de armazenamento são acumuladas antes que as sementes passem pelo processo de dessecação.

A aplicação do herbicida na maturidade fisiológica das plantas pode ter favorecido o aumento na intensidade das proteínas das sementes da cultivar Benso 1RR 24h e 48h em relação a sua testemunha. Para a cultivar NA5909RG observou-se menor intensidade nas bandas 48h após a aplicação do herbicida em relação a sua testemunha colhida no mesmo tempo, coincidindo com os maiores teores de peróxido de hidrogênio e menores teores de prolina nesse mesmo tempo.

No presente estudo, é possível observar que houve o acúmulo de proteínas de armazenamento, entretanto o herbicida pode ter influenciado na qualidade do perfil protéico, com base na baixa intensidade das bandas da cultivar

NA5909RG após 48h da aplicação do herbicida e aumento na intensidade das bandas da Benso 1RR.

Figura 5 - Perfil protéico de sementes das cultivares de soja NA5909RG e Benso 1RR colhidas na maturidade fisiológica (R7.1). Antes da aplicação (0), 24h e 48h após a aplicação do produto (GLA) e suas testemunhas (TST). P-peso padrão (KDa)



Setas indicam maior intensidade das bandas.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Com relação ao açúcar solúvel, não houve diferença significativa entre cultivares antes da aplicação do herbicida as quais apresentaram teores próximos a 50 mg.g^{-1} . Após 48h da aplicação do produto não houve alterações nos teores de açúcar solúvel em relação as suas testemunhas para as duas cultivares, nem ao longo do tempo, ficando próximos ao 50 mg.g^{-1} . Obendorf et al. (2009) observaram valores semelhantes durante a maturidade fisiológica de soja, com teores variando entre 40 mg.g^{-1} a 45 mg.g^{-1} .

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam o comportamento diferente entre as cultivares NA5909RG e Benso1RR, diante a aplicação do herbicida. Apesar de 48h ser um período curto para observar redução nos teores de umidade da semente e teores de açúcares solúveis, foi possível detectar alterações na produção de peróxido de hidrogênio, prolina, peroxidação lipídica e perfil protéico.

A baixa sensibilidade de sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas, pode ser explicada por algumas suposições que devem ser melhor investigadas em futuras pesquisas, como a possibilidade da molécula do glufosinato de amônio ter entrando em contato com a semente, uma vez que esse herbicida inibe a glutamina sintetase que é precursora de vários aminoácidos, entre eles a prolina. Dessa forma, seria interessante estudar aspectos morfológicos e composição química das vagens das duas cultivares, os quais podem ou não favorecer a translocação do herbicida. Além disso, realizar as mesmas análises por um período maior, em sementes coletadas semanalmente até que as mesmas atingissem teores de água próximo a 12% quando foi realizado a colheita.

3.6 CONCLUSÃO

Conclui-se que sementes da cultivar NA5909RG foram mais afetadas que sementes da cultivar Benso 1RR após a aplicação do glufosinato de amônio na maturidade fisiológica das plantas, apresentando maior acúmulo de peróxido de hidrogênio, sendo um indicativo de que sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas poderão apresentar baixo vigor quando atingirem seu ponto de colheita (umidade variando entre 12 e 15%).

4 MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E VIGOR DE SEMENTES DE SOJA SOB DESSECAÇÃO COM GLUFOSINATO DE AMÔNIO¹

RESUMO - A qualidade fisiológica em sementes depende da organização celular e da sua capacidade de mobilização de reservas. O objetivo do trabalho foi avaliar a germinação e vigor das sementes de sojas das cultivares Benso1RR e NA5909RG proveniente de plantas dessecadas ou não, através da mobilização de reservas. As plantas foram dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) no estágio reprodutivo R7.1 ou não (TST). A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada através dos testes de germinação, envelhecimento acelerado e comprimento de plântula. Para a mobilização de reservas foram avaliados em até 48 h de embebição, teores de fitato, proteína e açúcar solúvel. Em 48h de embebição sementes provenientes de plantas dessecadas da cultivar NA5909RG apresentou menor mobilização de proteína solúvel e açúcar solúvel refletindo em plântulas de baixo vigor em relação a sua testemunha. Para a cultivar Benso1RR em 48h de embebição, a aplicação do GLA não afetou a mobilização de proteína solúvel quando comparada a testemunha, não diferindo quanto ao vigor. Conclui-se que a utilização do dessecante influenciou negativamente na mobilização de proteína solúvel e açúcar solúvel para a cultivar NA5909RG refletindo em baixo percentual de germinação e baixo vigor.

Palavras-chave: Vigor. Herbicida. Proteína. Açúcar solúvel.

¹Artigo publicado na **Revista Journal of Seed Science**, v.37, n.2, p.154-161, 2015.

4.1 MOBILIZATION OF RESERVES AND VIGOR OF SOYBEAN SEEDS UNDER DESICCATION WITH GLUFOSINATE AMMONIUM

ABSTRACT - The physiological quality of seeds depends on the cellular organization and its capacity to mobilize reserves. The objective was to evaluate the germination and vigor of soybeans seeds of Benso1RR and NA5909RG cultivars from desiccated plants or not, by mobilizing reserves cultivars from desiccated plants or not, by mobilizing reserves. The plants were desiccated with glufosinate (GLA) in the reproductive stage R7.1 or not (TST). The physiological seed quality was evaluated by the germination, accelerated aging and seedling length. For the mobilization of reserves were evaluated within 48 h of soaking, phytate, protein and soluble sugar. In 48 h of soaking in desiccated seeds from cultivar NA5909RG showed lower mobilization of soluble protein and soluble sugar reflecting low vigor seedlings compared to seed their witnesses. To cultivate Benso1RR in 48 h of soaking, the application of GLA did not affect the mobilization of soluble protein when compared to control did not differ as to the force. It is concluded that the use of desiccant negative influence on mobilization of soluble protein and soluble sugar to cultivate NA5909RG reflecting low percentage of germination and low vigor.

Key-words: Vigor. Herbicide. Protein. Soluble sugar.

4.2 INTRODUÇÃO

O período de permanência das sementes de soja no campo, após a maturidade fisiológica, é determinante na deterioração, influenciando na queda do vigor. Uma alternativa para evitar que as sementes permaneçam a campo após atingirem a maturidade fisiológica é a aplicação de herbicidas

com a função de dessecar a planta rapidamente, antecipando a colheita de suas sementes. Dessa forma, aplicação do dessecante torna-se um fator importante para manter a qualidade fisiológica da semente.

A qualidade fisiológica em sementes depende da organização celular e da capacidade de mobilização de reservas para a formação de plântulas mais vigorosas. Segundo Henning et al. (2010), sementes de soja mais vigorosas apresentam maiores conteúdos de proteínas solúveis, amido e açúcares solúveis, bem como maior capacidade de mobilização de reservas durante a germinação, resultando em plântulas de soja com melhor desempenho inicial.

Atualmente vários trabalhos vêm relacionando a utilização do dessecante com a qualidade final da semente, onde o modo de ação do herbicida, condições meteorológicas e o estágio fenológico em que a planta se encontra podem manter ou afetar negativamente a qualidade das sementes, e até mesmo não antecipar a colheita. De acordo com Guimarães et al. (2012) o herbicida glufosinato de amônio reduz a germinação de sementes de soja quando aplicado no estágio R6 e o herbicida paraquat promove os melhores índices de germinação e vigor das sementes quando utilizado nos estádios R6 e R7.2. Pinto et al. (2014) observaram que a dessecação com glufosinato de amônio em sementes de feijão apresentaram menor percentagem de plântulas normais no teste de germinação, envelhecimento acelerado e primeira contagem.

O Glufosinato de amônio é um herbicida de contato, com a capacidade de deslocar-se a curta distância, sendo que seu modo de ação inibe a enzima glutamina sintetase, bloqueando a síntese de glutamina via glutamato e, portanto, a assimilação de NH_4^+ o qual é acumulado nas folhas das plantas (CARVALHO, 2013). Segundo o mesmo autor, o glufosinato de amônio ainda pode afetar a síntese de alguns aminoácidos, a produção de radicais livres e o bloqueio na fotossíntese, levando à planta a morte. Entretanto, são raros os estudos que

relatam quais alterações ocorrem nos componentes de reserva durante a germinação, em sementes provenientes de plantas dessecadas com o herbicida.

O processo de germinação de sementes corresponde a três fases. Inicialmente, na primeira fase a absorção de água ocorre de forma rápida e passiva, seguida pela segunda fase que se caracteriza pelo de atraso de absorção de água; e a terceira fase, onde novamente as sementes começam absorver a água rapidamente (TEULAT-MERAH et al. 2011; WEITBRECHT et al., 2011)

A partir do exato momento que inicia e finaliza cada uma das três fases no processo da germinação em sementes de soja, fica mais fácil inferir quais os possíveis efeitos da aplicação do dessecante em plantas de soja no estádio reprodutivo R7.1 sobre a qualidade fisiológica das sementes e seu subsequente efeito no processo germinativo e vigor.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a germinação e o vigor das cultivares de soja Benso1RR e NA5909RG, através da mobilização de reservas durante o processo de germinação de sementes provenientes de plantas dessecadas ou não com glufosinato de amônio (GLA) no estádio reprodutivo R7.1 (pré-colheita).

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes utilizadas durante o experimento são provenientes da safra 2012/2013 oriundas de plantas dessecadas ou não com glufosinato de amônio no estádio R7.1 (RITCHIE et al. 1982). As sementes foram coletadas quando atingiram teores poróximo 13% de umidade.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada através do percentual de germinação, comprimento de plântula e teste do envelhecimento acelerado. A mobilização de reservas durante a germinação (fitato, açúcar e proteína solúvel) foi determinada nos tempos de embebição 0h, 3h, 6h, 16h, 24h e 48h caracterizando o padrão trifásico de embebição.

O teste de germinação constituiu-se de quatro subamostras de 50 sementes, colocadas para germinar entre três folhas de papel *germitest*, umedecidas com a água destilada 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos com as sementes permaneceram em germinador à temperatura de 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco dias, considerando apenas as plântulas normais, segundo Brasil (2009).

Para a avaliação do comprimento de plântulas foi utilizada a metodologia proposta por Nakagawa (1999). As avaliações foram realizadas cinco dias após a semeadura, medindo-se o comprimento total das plântulas normais com auxílio de um paquímetro. Os resultados foram expressos em centímetros.

Para avaliação do vigor das sementes foi realizado o teste de envelhecimento acelerado, onde se utilizou quatro subamostras de 50 sementes para cada tratamento. As sementes foram distribuídas sobre telas de alumínio, fixadas no interior de caixas plásticas e adicionados 40 mL de água. As caixas foram fechadas e mantidas em câmara de envelhecimento por 48h a temperatura de 42°C conforme Marcos Filho (1999). Após este período as sementes foram colocadas para germinar a 25°C e no quinto dia após a instalação do teste realizou-se a contagem de plântulas normais, como no teste de germinação.

A curva de embebição foi obtida de acordo com Ma et al. (2004) e Han et al. (2013) com algumas adaptações. Para cada tempo de embebição foram utilizadas 2 repetições com 50 sementes em rolo de papel, o qual foi formado utilizando-se três folhas de papel *germitest* por repetição. O papel foi umedecido com a água destilada (2,5 vezes o peso do papel) e os rolos levados para o germinador na posição vertical, a 25°C, na presença de luz natural, permanecendo por 3h, 6h, 16h, 24h e 48h. Em cada tempo, foi retirada uma amostra de 5 g de sementes e levadas a estufa a 105°C durante 24h para a determinação da umidade. Através da diferença de umidade entre os tempos, obteve-se a curva de embebição. Foi

considerada final da fase II e início da fase III, o momento em que a protrusão radicular atingiu 50%+1.

O teor de fitato foi determinado pelo método de Latta e Eskin (1980), o qual se baseia na formação de um composto ferro-ácido-sulfossalicílico de coloração azul escuro (Reagente de Wade), na presença de fitato, o ferro é sequestrado e fica indisponível para reagir com o ácido sulfossalicílico, o que resulta na diminuição da intensidade da cor. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em cada tempo da curva de embebição, sendo realizado 3 repetições em cada tempo.

Para análise de proteína solúvel, foram feitas 3 repetições com 1 g de semente de soja proveniente de todos os pontos selecionados da curva de embebição. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha. O material foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH7,5) contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e aproximadamente 4% de PVPP, conforme Azevedo et al. (1988) e Garcia et al. (2006). O homogenizado foi centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos. As proteínas solúveis totais foram determinadas em espectrofotômetro, conforme método descrito por Bradford (1976) e os resultados expressos em mg.g^{-1} de massa seca de semente.

Para análise de açúcar solúvel total foram pesadas amostras de 0,250 g de sementes secas e moídas de cada ponto da curva de embebição. Os açúcares solúveis totais foram determinados pelo método da Antrona conforme Clegg (1956) e a leitura das amostras feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em mg.g^{-1} de semente de massa seca de semente.

Para verificar a distribuição normal dos dados utilizou-se o teste de Shapiro Wilk (5%), sendo o percentual de germinação transformado em arco seno de $(x / 100)^{0,5}$. Na seqüência os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Para análise da qualidade fisiológica das sementes e teor inicial dos componentes bioquímicos foi utilizado o teste

de Tukey a 5% de probabilidade de erro e para análise da mobilização de reservas ao longo do tempo foi utilizado análise de regressão. As análises foram realizadas via programa computacional SAS[®](SAS, 2009).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao comparar o vigor de sementes das duas cultivares proveniente de plantas não dessecadas (Tabela 2), observou-se através do teste de envelhecimento acelerado, que sementes da cultivar NA5909RG apresentaram vigor superior, com 89% de plântulas normais e 19 cm de comprimento, quando comparado com sementes da cultivar Benso1RR que apresentaram 79% de plântulas normais e 16 cm de comprimento (Tabela 2). A dessecação não afetou o vigor das sementes da cultivar Benso1RR em relação a sua testemunha (Tabela 2).

As sementes provenientes de plantas dessecadas da cultivar NA5909RG foi influenciada negativamente com a aplicação do glufosinato de amônio, com baixo vigor observado através do envelhecimento acelerado, menor percentual de germinação (78%) e menor comprimento de plântula (16 cm) em relação a testemunha. Dados semelhantes já foram observados anteriormente na literatura, indicando a baixa eficiência do herbicida na obtenção de sementes com alta qualidade fisiológica, promovendo baixo percentual de germinação e baixo vigor (LACERDA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2012; PINTO et al., 2014).

Tabela 2 - Teor inicial dos componentes bioquímicos em sementes secas de soja proveniente de plantas dessecadas com glufosinato (GLA) de amônio ou não (TST)

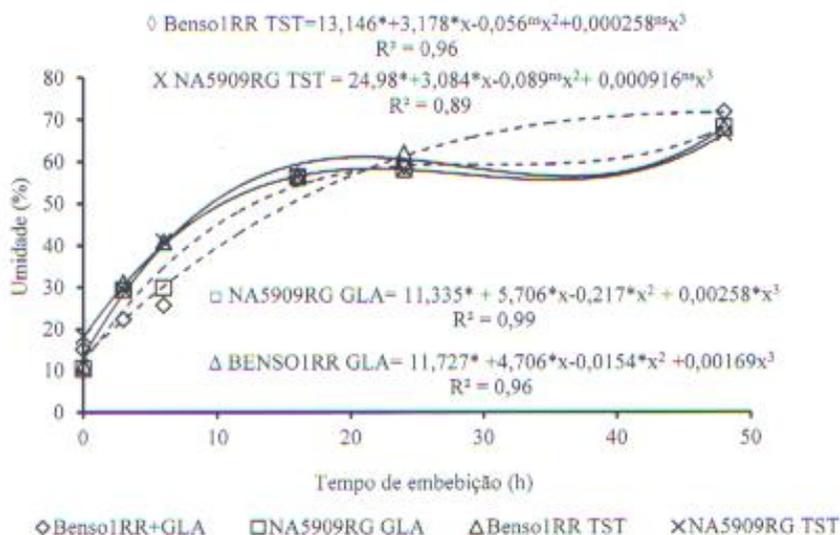
	NA5909R G TST Alto Vigor	NA3909RG GLA Baixo Vigor	BENSO1RR TST Alto Vigor	BENSO1RR GLA Alto Vigor	CV (%)
G (%)	92a	78,5b	94a	89a	3,58
EA (%)	89a	81b	79b	82b	3,35
CP (cm)	19,18a	16,77b	17,06b	18,44ab	2,10

Na linha, as médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey. CP- Comprimento de plântula; EA - Envelhecimento acelerado. G- Germinação.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Durante o processo de embebição, observou-se que a aplicação do glufosinato de amônio alterou o padrão de absorção de água da cultivar Benso1RR em até 48 h, prolongando a fase II (Figura 6), permitindo um tempo maior de reparo das estruturas celulares das sementes e alocação de suas reservas, o qual pode ter contribuído para a manutenção do vigor da cultivar diante a aplicação do dessecante. Essa mesma alteração no padrão de embebição não foi observado para sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas, a qual apresentou baixo vigor.

Figura 6 - Padrão trifásico de embebição sementes de soja para as cultivares NA5909 RG e Benso1RR proveniente de plantas que foram dessecadas com glufosinato de amônia (GLA) e não dessecadas (TST)



Fonte: produção do próprio autor (2016)

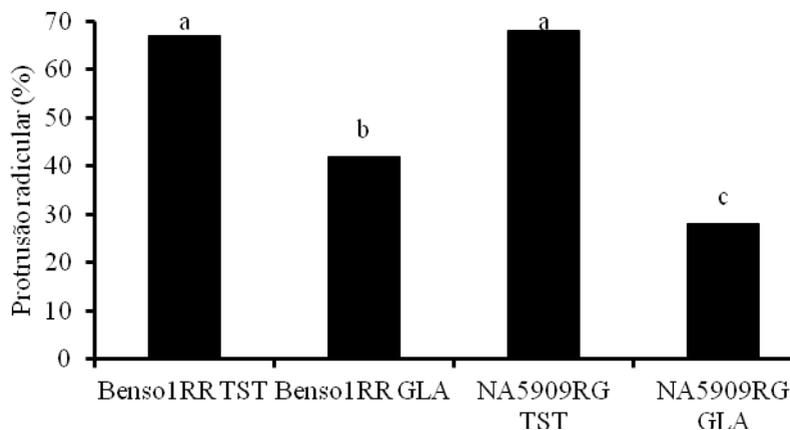
Em 24 horas de embebição todos os tratamentos apresentaram protrusão radicular, com teor de água nas sementes próximo a 60%, coincidindo Mengarda et al. (2015) e Castro et al. (2004) que relatam que no final da fase II durante a germinação, o conteúdo de água das sementes fica próximo a 60%, iniciando a fase III, momento o qual inicia-se a protrusão radicular. Han et al. (2013) definiram que a fase II ocorre entre 12h e 24h de embebição em sementes de soja.

Ainda em 24h de embebição, sementes provenientes de plantas dessecadas da cultivar NA5909RG apresentaram 28% de protrusão radicular e sua testemunha 68%, para a cultivar Benso1RR provenientes de plantas dessecadas houve 42% de protrusão radicular e sua testemunha 67% (Figura 7). Este atraso no processo de protrusão radicular poderia ser uma vantagem do ponto de vista da tolerância a algum tipo de

estresse que possa vir a ocorrer a campo, pois apenas algumas sementes seriam afetadas, uma vez que nem todas as sementes emitiriam radículas no momento do estresse.

Em 48h de embebição sementes provenientes de plantas dessecadas atingiram praticamente o mesmo percentual (100%) de protrusão radicular quando comparada com suas testemunhas, indicando o início da fase III. Dados semelhantes para sementes de soja e feijão já foram observados, sendo que a fase III ocorre a partir de 40h de embebição para sementes de soja e a partir de 30h para sementes de feijão (CHENG et al., 2009; TEULAT-MERAH et al., 2011).

Figura 7 - Protrusão radicular após 24h de embebição em sementes de soja das cultivares NA5909RG e Benso1RR provenientes de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) ou não (TST)



Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey. Fonte: produção do próprio autor (2016)

Com relação aos componentes de reserva das sementes secas, observou-se que o teor inicial de fitato e proteína solúvel não foram alterados com a aplicação do glufosinato de amônio quando comparadas com suas testemunhas, porém houve

redução dos teores iniciais de açúcar solúvel para as cultivares NA5909RG e Benso1RR (Tabela 3) em relação a suas testemunhas. Resultado semelhante foi observado por Lacerda et al. (2003) que não observaram diferença nos teores de proteína total ao comparar sementes provenientes de plantas dessecadas com glufosinato de amônio em relação a testemunha em diferentes estádios reprodutivos da soja, entretanto observaram diferença significativa no extrato etéreo (lipídio) entre as sementes provenientes de plantas dessecadas em relação a suas testemunhas, sendo que, quanto mais tarde foi aplicado o produto, mais o teor de extrato etéreo se aproximava da testemunha.

Tabela 3 - Teor inicial dos componentes bioquímicos em sementes secas de soja proveniente de plantas dessecadas com glufosinato (GLA) de amônio ou não (TST)

Tratamentos	Proteína solúvel	Açúcar Solúvel	Fitato
NA5909 RG TST	101,54 a	142,30 a	1,58 a
NA5909RG + GLA	104,26 a	100,9 ab	1,57 a
Benso1RR TST	110,11 a	94,7 b	1,27 a
Benso1RR + GLA	109,67 a	81,7 b	1,98 a
CV(%)	3,96	16,73	13,76

Na coluna, as médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

O fitato representa a principal forma de armazenamento de fósforo nas sementes, podendo ser utilizado como reserva energética, além de ser um importante precursor de polissacarídeos que constituem as paredes celulares (SCOTT, 1991). O teor inicial de fitato entre sementes provenientes de plantas dessecadas das cultivares NA5909RG e Benso1RR foram similares quando comparada com sementes provenientes de plantas não dessecadas, variando entre 1,27 a 1,97 mg.g⁻¹ de semente. Os teores observado por Moreira et al. (2012) variaram entre 1,131 a 2,43g 100 g⁻¹.

O teor inicial de proteína solúvel para a cultivar NA5909RG foi $104,26 \text{ mg.g}^{-1}$, sendo similar para a cultivar Benso1RR, com teor de $110,11 \text{ mg.g}^{-1}$, estando próximo ao valor encontrado por Stajner et al. (2007) que observaram 95 mg.g^{-1} de proteína solúvel em sementes de soja, sendo que o autor não observou alterações quando diferentes dosagem de irradiação γ foram aplicadas nas sementes, assim como não foi observado diferença nos teores de proteína solúvel do presente estudo entre as sementes proveniente de plantas dessecadas em relação a sua testemunha (Tabela 3).

A aplicação do dessecante promoveu a redução do teor inicial de açúcar solúvel nas sementes para as duas cultivares em relação a suas testemunhas, entretanto não apresentaram diferença estatística (Tabela 3). Para a cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas observou-se $100,89 \text{ mg.g}^{-1}$ e sua testemunha $142,30 \text{ mg.g}^{-1}$. Para a cultivar Benso1RR proveniente de plantas dessecadas observou-se $81,65 \text{ mg.g}^{-1}$ e sua testemunha $94,69 \text{ mg.g}^{-1}$. Os valores encontrados no presente estudo são semelhantes aos valores encontrados por Obendorf et al. (2009) que observaram entre 100 a 150 mg.g^{-1} de carboidrato solúvel total em sementes de soja na maturidade fisiológica.

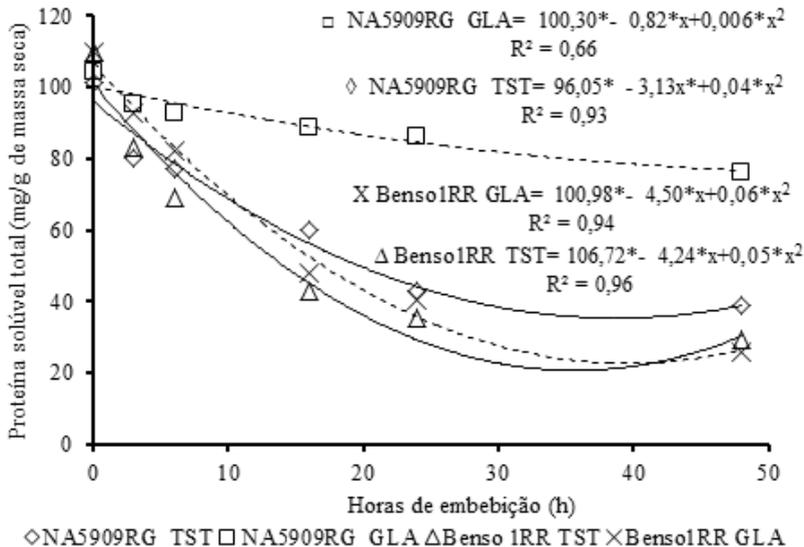
O elevado vigor para sementes da cultivar NA5909RG em relação a cultivar Benso1RR proveniente de plantas não dessecadas pode estar associado com maior teor inicial de açúcar solúvel observado para NA5909RG em relação a cultivar Benso1RR, o mesmo foi observado por Henning et al. (2010) que afirmam que sementes de soja com elevado teor inicial de açúcar e proteína solúvel apresentam alto vigor. Entretanto, sementes provenientes de plantas dessecadas da cultivar Benso1RR, apresentaram menor teor inicial de açúcar solúvel para sementes secas, mostrando que o teor inicial dos componentes de reserva não foi o fator determinante para a manutenção do vigor, uma vez que não houve diferença no

vigor entre sementes de plantas dessecadas em relação a sua testemunha para essa cultivar.

A germinação de sementes é um processo fisiológico, importante no desenvolvimento das plântulas, a qual envolve processos complexos (ISHIBASHI et al., 2013) como a utilização de suas reservas para a formação e estabelecimento de novas plântulas. Durante o período de embebição no presente estudo, observou-se mobilização de açúcares solúveis e decréscimos nos teores de proteínas, indicando a utilização desses componentes para a formação de novas plântulas. Entretanto não houve alterações significativas para os teores de fitato ao longo do tempo. Segundo Martinez et al. (2011) 48h de embebição é um período muito curto para observar a hidrólise do fitato durante a germinação em sementes de soja.

O teor de proteína solúvel decresceu ao longo do tempo de embebição (Figura 8) de forma mais acentuada para a cultivar Benso1RR com e sem dessecação e para a cultivar NA5909RG sem dessecação, não interferindo no vigor. No entanto, para sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas, observou-se mobilização de proteína solúvel menos acentuada, refletindo ao final de 5 dias, em menor percentual de germinação com plântulas menores e de baixo vigor, quando comparada com semente das plantas testemunha.

Figura 8 - Mobilização de proteínas solúveis de sementes de soja durante a germinação da cultivar NA5909RG e Benso1RR proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecada (TST)



*Valor significativo ($P < 0,05$) teste Tukey.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

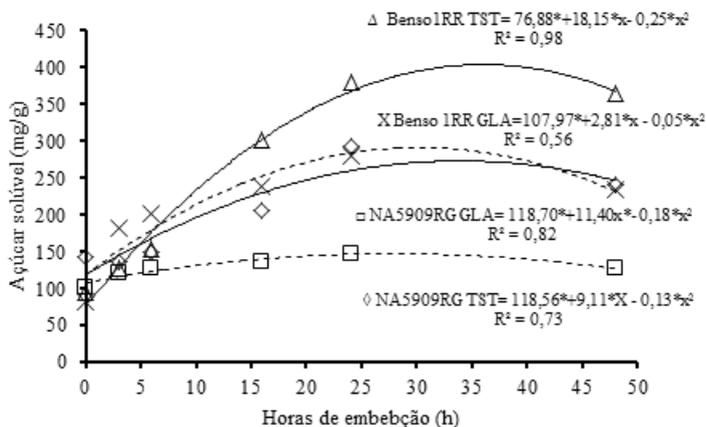
A menor mobilização de proteína solúvel ao longo do tempo pode ter refletido em menor síntese de aminoácidos. De acordo com Han et al. (2013), o aumento no teor de aminoácidos durante a germinação de sementes de soja está relacionado com a degradação de proteínas, que podem ser translocadas para pontos de crescimento do eixo embrionário contribuindo na formação de tecidos vivos e participar de reações da cadeia respiratória.

Com 24h de embebição, as cultivares proveniente de plantas testemunhada da cultivar NA5909RG apresentaram teor de açúcar solúvel menor ($291,99 \text{ mg.g}^{-1}$) em relação a cultivar Benso1RR ($379,23 \text{ mg.g}^{-1}$) para emitir praticamente o mesmo percentual de radículas, 67% e 68% respectivamente.

Para sementes proveniente de plantas dessecadas, as diferenças entre cultivares foi alta, o teor de açúcar solúvel para a cultivar Benso1RR foi de 279,27 mg.g⁻¹ com 42% de protrusão radicular em comparação com a cultivar NA5409RG com teor de açúcar solúvel 146,87mg.g⁻¹ e 28% de protrusão radicular.

Em 48h de embebição, quando todos os tratamentos apresentaram 100% de protrusão radicular, observou-se maior mobilização de açúcar solúvel da cultivar Benso1RR em relação a cultivar NA5909RG tanto para sementes provenientes de plantas testemunhas como para sementes provenientes de plantas dessecadas (Figura 9). Entretanto, ao comparar sementes das duas cultivares proveniente de plantas testemunhas, a cultivar NA5909RG (241,44 mg.g⁻¹) mostrou-se mais eficiente na utilização dos açúcares solúveis, pois com menor mobilização (Figura 9) a cultivar apresentou alto vigor em relação a cultivar Benso1RR (365 mg.g⁻¹).

Figura 9 - Mobilização de açúcar solúvel de sementes de soja durante a germinação de sementes da cultivar NA5909RG e Benso 1RR provenientes de plantas dessecadas (GLA) e não dessecadas (TST)



\diamond NA5909RG TST \square NA5909RG GLA Δ Benso1RR TST \times Benso1RR GLA

*Valor significativo ($p < 0,05$) teste Tukey.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Para sementes provenientes de plantas dessecadas, observou-se um comportamento contrário, nesse caso, a maior mobilização de açúcar solúvel (Figura 9) da cultivar Benso1RR (233,62 mg.g⁻¹) durante a embebição pode ter sido o fator determinante para a manutenção do vigor e percentual de germinação diante a aplicação do glufosinato de amônio na maturidade fisiológica em relação a cultivar NA5909RG (126,98 mg.g⁻¹), e não os teores superiores de açúcar solúvel na semente seca da cultivar NA5909RG em relação a sementes da cultivar Benso1RR.

Uma possível explicação para o glufosinato de amônio ter influenciado a qualidade das sementes seria a presença da molécula do herbicida nas sementes. Como esse herbicida tem a capacidade de translocar-se a curta distância, uma hipótese é que o herbicida poderia ter atravessado a vagem e entrado em contato com a semente, ou ainda, o produto ter capacidade de alterar a permeabilidade das membranas das vagens favorecendo a translocação de água e da própria molécula do herbicida para o interior da vagem, entrando em contato com a semente. Segundo Oliveira et al. (2014) a maior absorção de água pelas vagens de soja ocorre no estágio reprodutivo R7 e R8 quando comparada com os estádios R4, R5 e R6 em função da diferença de potencial que existe entre a vagem e a semente, uma vez que em R7 as vagens estão mais secas em relação aos estádios R4, R5 e R6, influenciando na perda de vigor das sementes.

4.5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a utilização do glufosinato de amônio interferiu negativamente na mobilização das reservas para NA5909RG refletindo em baixo vigor e baixo percentual de germinação. Para a cultivar Benso1RR a aplicação do dessecante alterou o padrão de absorção de água prolongando a fase II de embebição, possibilitando um tempo maior para a

organização celular das sementes e mobilização de suas reservas contribuindo para a manutenção do seu vigor.

Dessa forma, não se recomenda a utilização do glufosinato de amônio como dessecante, uma vez que para cultivar NA5909RG houve redução de vigor das sementes e para a cultivar Benso1RR não houve diferença de vigor entre sementes proveniente de plantas dessecadas em relação a sua testemunha.

5 ESTRESSE OXIDATIVO ENVOLVIDOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA PROVENIENTE DE PLANTAS DESSECADAS COM GLUFOSINATO DE AMÔNIO

5.1 RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) têm um duplo papel na fisiologia de sementes, podendo funcionar como sinalizadores hormonais durante a germinação ou afetar negativamente a qualidade das sementes, em função do desequilíbrio entre EROs e sistemas antioxidantes. O equilíbrio entre a produção EROs e mecanismos antioxidantes pode ser afetada por vários tipos de estresse abióticos e bióticos, como por exemplo herbicidas. A aplicação de herbicidas para antecipar a colheita de sementes de soja é uma prática que vem sendo utilizada por alguns produtores, mas estudos vêm demonstrando que a dessecação pode favorecer a queda no vigor e qualidade das sementes. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar durante a germinação o acúmulo de peróxido de hidrogênio, mecanismos antioxidante e o perfil protéico em sementes de soja proveniente de plantas dessecadas com o herbicida glufosinato de amônio no estágio reprodutivo R7.1. Para a realização dessas análises, as sementes foram colocadas para germinar e durante os tempos 0, 24h, 48h e 72h de embebição foram retiradas amostras das sementes para as análises. Sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas, ao serem submetidas a germinação, apresentaram maior acúmulo de peróxido de hidrogênio e menores teores de prolina ao longo do tempo, acarretando em uma maior peroxidação lipídica e menor intensidade do perfil protéico durante a germinação em relação a sua testemunha. Para a cultivar Benso 1RR os teores de peróxido de hidrogênio parece ter funcionado como um sinalizador, não sendo observado diferença durante a germinação nos teores de prolina e peroxidação lipídica, além da maior intensidade do perfil

protéico em relação a sua testemunha. Conclui-se que sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas mostraram-se mais sensíveis a aplicação do herbicida em R7.1, apresentando maior estresse oxidativo durante a germinação, o que pode explicar em partes o baixo vigor.

Palavras-chave: Perfil protéico. Peroxidação lipídica. Espécies reativas de oxigênio.

5.2 OXIDATIVE STRESS INVOLVED IN GERMINATION OF SOYBEAN PLANT DESICCATED FROM SEEDS WITH GLUFOSINATE AMMONIUM

SUMMARY - Reactive oxygen species (ROS) have a dual role in the physiology of seeds and can act as hormone signaling during germination or negatively affect the quality of seeds, due to the imbalance between ROS and antioxidant systems. The balance between ROS production and antioxidant mechanisms can be affected by various biotic and abiotic stress, such as herbicides. The application of herbicides to anticipate the soybean harvest is a practice that has been used by some producers, but studies have shown that desiccation may favor the decline in vigor and seed quality. Thus, the aim of this study was to evaluate during germination hydrogen peroxide accumulation, antioxidant mechanisms and protein profile in soybean seeds from desiccated plants to the herbicide glufosinate ammonium in the reproductive stage R7.1. To carry out these analyzes, the seeds were germinated and during the times 0, 24h, 48h and 72h of imbibition were taken samples of seeds for analysis. cultivating seeds NA5909RG from desiccated plants to be subjected to germination, enhanced accumulation of hydrogen peroxide and lower proline content over time, resulting in increased lipid peroxidation and lower intensity of the protein profile during germination against his witness. To cultivate Benso 1RR hydrogen peroxide levels seems to have worked as a flag, not observable difference

during germination in proline content and lipid peroxidation, and the higher intensity of the protein profile in relation to their witness. It was concluded that seeds grow NA5909RG from desiccated plants were more sensitive to herbicide application in R7.1, with higher oxidative stress during germination, which may explain in part the low vigor.

Key-words: Protein profile. Lipid peroxidation. Reactive oxygen species.

5.3 INTRODUÇÃO

A aplicação de herbicidas no estágio reprodutivo R7 em plantas de soja com a função de dessecar a planta para antecipar a colheita, é uma alternativa utilizada por produtores de sementes de soja, na tentativa de garantir sementes com alto vigor. Entretanto, alguns trabalhos vem demonstrando que a aplicação de dessecantes pode afetar negativamente a qualidade fisiologica das sementes, diminuindo seu vigor e germinação (GUIMARÃES et al., 2012; PINTO et al., 2014).

Um dos fatores que pode ocasionar a queda de vigor em sementes é o desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e sistemas antioxidantes. Kummar et al. (2015) relatam que espécies reativas de oxigênio têm um duplo papel na fisiologia de sementes, onde compreender a importância relativa dos efeitos benéficos e prejudiciais das EROs fornece informações importante para a melhoria e manutenção no vigor e na qualidade de sementes, podendo aumentar o rendimento das culturas.

Em concentração adequada, as EROs são necessárias para as plantas, funcionando como mensageiros hormonais para diversas funções nas plantas como fechamento estomático, biossíntese de lignina, morte celular programada, quebra de dormência e germinação (BAILLY et al., 2008; SHARMA et al., 2012; ISHIBASHI et al., 2013). Verma et al. (2015) tratando sementes de *Vigna* com Ederavone, um potente antioxidante de

radicais livres, observaram baixa mobilização de reservas, baixo percentual de germinação e menores comprimentos de plântulas associados a níveis baixos de peróxido de hidrogênio, indicando que o peróxido de hidrogênio pode ser um mecanismo sinalizador para a germinação.

O estresse oxidativo promovido pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (HO), associado com o mecanismos antioxidante ineficientes, podem ocorrer durante a germinação, reagindo com os ácidos graxos insaturados das membranas celulares, promovendo a peroxidação lipídica, que por sua vez pode acarretar em mudança no perfil proteico em função da oxidação de proteínas (JOB et al., 2005; YAMAUCHI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011). Wang et al. (2012) observaram que sementes de soja proveniente de plantas que passaram por estresse de alta temperatura e umidade na maturidade fisiológica apresentaram aumento de espécies reativas de oxigênio, principalmente o H_2O_2 , causando danos em estruturas celulares.

Entretanto, as plantas têm a capacidade de desintoxicar as espécies reativas de oxigênio com auxílio de diferentes antioxidantes, Cho; Seo (2005) relacionaram o menor acúmulo de H_2O_2 menor e peroxidação lipídica com o aumento atividade de enzimas antioxidantes da superóxido dismutase e ascorbato peroxidase em plântulas de *Arabidopsis* tolerante ao cádmio. Os mecanismos antioxidantes podem ser classificados em dois tipos, os enzimáticos e os não enzimáticos. Entre os enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase, a catalase e ascorbato peroxidase. Além das enzimas antioxidantes que atuam na detoxificação das EROs das plantas, existem os compostos não enzimáticos que podem exercer a mesma função (SMIRNOFF; CUMBES 1989; SHARMA et al., 2012) denominada osmólitos ou solutos compatíveis, entre eles pode-

se citar o ácido ascórbico, α - tocopherols, carotenóides e a prolina (GILL; TUTEJA, 2010).

A prolina é um aminoácido sintetizado a partir do ácido L-glutâmico, funcionando como um osmoprotetor com capacidade de aumentar a estabilidade das células em reter água sem afetar o metabolismo normal das plantas, também pode agir como estabilizador protéico e inibidor da peroxidação lipídica (HAMILTON; HECKATHORN 2001; GILL; TUTEJA 2010).

O equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênios (EROs) e mecanismos antioxidantes pode ser afetada por vários tipos de estresses abióticos e bióticos, como radiação UV, seca, calor e frio extremo, salinidade, patógenos, metais pesados e herbicidas (GILL; TUTEJA 2010; GOMES; GARCIA 2013). O glufosinato de amônio é um herbicida de contato, com capacidade de translocar-se a curta distância inibindo a glutamina sintetase e conseqüentemente o glutamato que é um precursor da prolina.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar alterações no perfil protéico durante a germinação em função do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidante em sementes de soja proveniente de plantas dessecadas com o herbicida glufosinato de amônio no estágio reprodutivo R7.1.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: as sementes foram produzidas e beneficiadas no município de Campos Novos-SC, na safra 2012/2013 conforme descrito por Pereira et al. (2015). As sementes foram selecionadas e classificadas em um jogo de peneiras 6,5mm. Após a classificação realizou-se a junção das sementes de cada repetição de campo para obtenção da amostra de trabalho da seguinte forma: separaram-se 1000 gramas de sementes da parcela útil de cada bloco (amostra simples), e misturou-as para obtenção da amostra composta de 4000

gramas. Dessa amostra, retirou-se uma amostra de 1.000 gramas (amostra média) a qual deu origem a amostra de trabalho de acordo com BRASIL (2009). Para o presente estudo foram utilizadas sementes da cultivar NA5909RG e Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e suas testemunhas (TST) que segundo Pereira et al (2015), não houve antecipação da colheita.

Peróxido de hidrogênio: os teores de peróxido de hidrogênio foi quantificado de acordo com o protocolo de Alexieva et al. (2001). Foram feitas 3 repetições com 0,2 g de semente de soja proveniente dos pontos 0h (semente seca), 24h, 48h e 72h selecionados da curva de embebição. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha, depois adicionou-se 2 mL tampão de extração (TCA 1%). O homogenizado foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação, para quantificação do H_2O_2 utilizou-se 200 μ L do sobrenadante acrescido de 800 μ L de iodeto de potássio e 200 μ L de tampão fosfato (0,1M pH 7,5), que foram incubados no gelo por 1h, na sequência as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 5 min e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 390 nm. Os resultados foram expressos em μ g/g de massa seca.

Prolina livre: o teor de prolina livre nas amostras foi determinado segundo metodologia proposta por Bates et al. (1973). Foram feitas 3 repetições com 0,25 g de sementes de soja nos tempos 0, 24h, 48h e 72h. As amostras foram extraídas em ácido sulfossalicílico (3% m/v). O extrato foi centrifugado (3600 rpm 15 min) recuperando-se o sobrenadante (2 ml) ao qual foram adicionados 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. O meio de reação foi incubado em banho-maria (100°C/1h), sendo a reação paralisada por imersão em banho de gelo. Após este procedimento, foram acrescentados 4 mL de tolueno, seguido de agitação vigorosa (20 s) e recuperação do sobrenadante aspirado da fase aquosa para

leitura. Os resultados foram expressos em μmol prolina g^{-1} peso fresco.

Quantificação proteína solúvel: foram feitas 3 repetições com 1g de semente de soja retirada nos tempos 0, 24h, 48h e 72h de germinação. As amostras foram maceradas em Nitrogênio Líquido até formar uma farinha. A extração foi realizada conforme Azevedo et al. (1988). As proteínas solúveis totais foram determinadas em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S, conforme método descrito por Bradford (1976) e os resultados expressos em mg.g^{-1} de massa seca de semente.

Peroxidação lipídica: a quantificação do malondialdeído (MDA) foi realizada conforme descrito por Heath e Packer (1968). Foram feitas 3 repetições com 0,2 g de semente de soja proveniente dos pontos 0, 24h, 48h e 72h selecionados da curva de embebição. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar uma farinha, depois adicionou-se 2 mL tampão de extração (TCA 1%). O homogenizado foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação, para quantificação do MDA utilizou-se 250 μL do sobrenadante acrescido de 1mL de TCA 20% + TBA 0,5%, os quais foram incubados por 30 minutos a 95°C em banho maria. A reação foi paralisada em gelo durante 10min, as amostras ficaram em repouso e protegidas de luz por 15min para sua estabilização, e na sequencia realizaram-se as leituras em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 600 e 535 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE): a eletroforese da fração protéica foi realizada em cuba vertical com sistema de eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE) em uma concentração de 12% (gel de resolução) e 3% (gel de empacotamento), utilizando sistema de mini-gel no tamanho de 8,3 cm x 10,2 cm (Mini Protein II) da Bio-Rad.

Após a quantificação dos teores de proteína de acordo com Bradford et al. (1976), uma parte correspondente a 20 µg de proteína foi adicionada a solução tampão de amostra contendo: água destilada; Tris-HCl pH 6,7; glicerol; SDS 10%; solução 0,5% de azul de bromofenol e 2-mercaptoetanol, na proporção 1:1; seguido por aquecimento em banho-maria a 100°C durante 5 minutos e resfriamento em gelo por 1 minuto e submetidas a eletroforese. O sistema de eletroforese contendo as amostras foi colocado em solução tampão com pH 8,3 (25 mM de Tris, 192mM de Glicina, 1% de SDS 10%) e tensão de 30V durante 3 horas em temperatura ambiente até a passagem das proteínas de acordo com Laemmli (1970).

Após a eletroforese, os géis foram lavados com água destilada para completa retirada da solução tampão, em seguida, incubados por 3 horas em solução corante de Coomassie Brilliant Blue R-250, contendo metanol, ácido acético glacial e água destilada. O excesso do corante foi retirado com solução descolorante até que as bandas proteicas se tornassem nítidas, em torno de 2 horas (ALFENAS, 1998).

O procedimento de avaliação foi realizado por comparação do perfil protéico das amostras em relação ao marcador molecular Sigma (*Wide Range* – 6,5 a 200 kDa) para determinar a massa molecular de cada banda de proteína presente no gel.

Posteriormente, foi realizada a foto documentação digital em transiluminador WL (*DNR Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro*, Jerusalém - Israel), com o software de captura de imagem Gel Capture, permitindo a visualização e o processamento de imagens das bandas proteicas reveladas nos géis. A análise do padrão eletroforético de cada tratamento foi realizada qualitativamente por meio da comparação visual na detecção diferencial de bandas.

Quantificação da catalase: foram feitas 3 repetições utilizando os 25 uL de extrato vegetal (proteína solúvel) extraídas de acordo com Azevedo et al. (1988) das semente de

soja retirada nos tempos 0, 24h, 48h e 72h de embebição proveniente de plantas dessecadas e suas testemunhas. O ensaio foi realizado a 25°C em uma solução contendo 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescida de 25 uL de H₂O₂ (solução 25%). A reação iniciou-se pela adição de 25 uL de extrato vegetal e a atividade foi determinada monitorando-se a degradação de H₂O₂ a 240 nm (pico de absorção do H₂O₂) durante o período de 1 minuto e dosagem contínua em intervalos de 1 segundo em temperatura ambiente, em cubetas de quartzo. Os resultados são expressos em umol/min/mg prot.

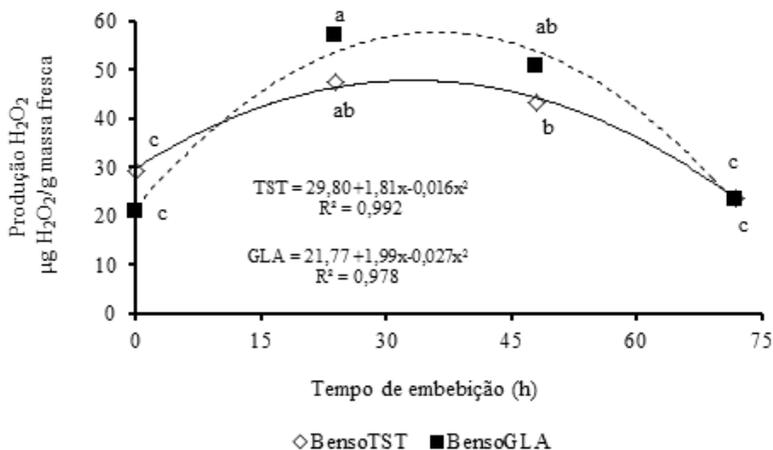
Análise estatística: o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para verificar a distribuição normal dos dados utilizou-se o teste de Shapiro Wilk (5%). Na seqüência os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Foi utilizado para comparar as médias nos tempos de embebição entre sementes de plantas dessecadas em relação a sua testemunha o teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os dados da catalase foram transformados em raiz quadrada. Para avaliar o comportamento do peróxido de hidrogênio e sistema antioxidante durante a germinação, além dos testes de média, foram ajustadas regressões polinomial com auxílio do programa estatístico Assistat® versão 7.7 beta (SILVA, 2011).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para a cultivar Benso1RR (Figura10) proveniente de plantas dessecadas durante a germinação foram semelhante aos teores de suas testemunha, não havendo diferença significativa entre os mesmos, apesar de se observar um aumento mais acentuado entre 24h e 48h nos teores de H₂O₂. No terceiro capítulo do presente estudo, observou-se que entre 24h e 48h ocorre a protrusão radicular para sementes de soja. Ishibashi et al. (2013) observaram em sementes de soja, que as espécies

reativas de oxigênio (EROs) produzido no eixo embrionário após a embebição das sementes induz a produção de etineno promovendo o alongamento das células na ponta da radícula. Segundo Moller et al. (2007), Bailly et al. (2008), Quan et al. (2008), Ye et al. (2011) e Sharma et al. (2012), o acúmulo de EROs pode ser um sinalizador atuando como mediador nas interações hormonais responsáveis pela germinação.

Figura 10 -Produção de H_2O_2 durante a germinação em sementes de soja da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST)



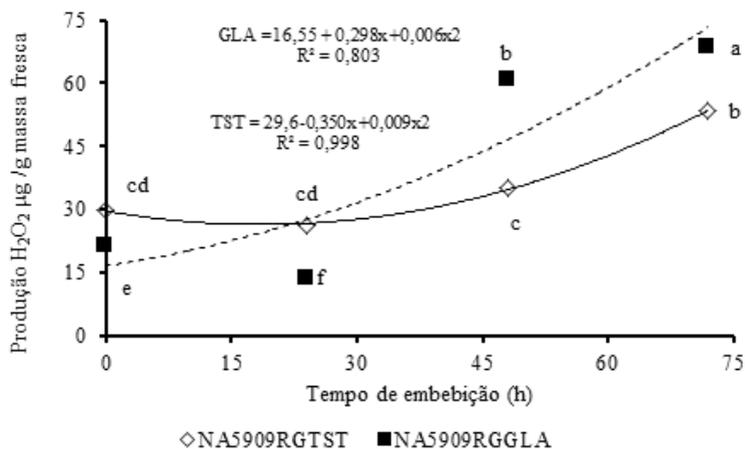
Letras diferentes compara teores de H_2O_2 em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01, CV(\%) = 17,81$.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Para a cultivar NA5909RG observou-se diferença nos teores de H_2O_2 nas sementes secas proveniente de plantas dessecadas em relação a sua testemunha. A partir de 24h, verificaram-se teores de peróxido de hidrogênio (Figura 11) superiores para sementes provenientes de plantas dessecadas quando comparado com sua testemunha. Nesse caso, o

peróxido de hidrogênio agiu como um agente causal de estresse oxidativo durante a germinação. Em 24h de embebição sementes de plantas dessecadas da cultivar NA5909RG apresentaram baixa protrusão radicular (Figura 7) e menor percentual de germinação ao final de 5 dias em relação a sua testemunha (Tabela 2), coincidindo com os elevados teores de H_2O_2 observada no presente capítulo.

Figura 11 - Produção de H_2O_2 durante a embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST)



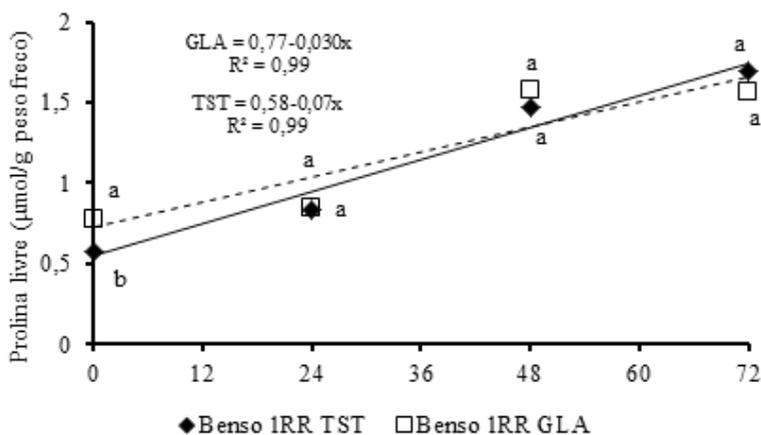
Letras diferentes compara teores de H_2O_2 em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01$, $CV(\%) = 11,56$.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Com relação aos teores de prolina, para a cultivar Benso1RR nas sementes secas, observou-se maiores teores para sementes proveniente de plantas dessecadas em relação as sementes provenientes de plantas testemunha. Entretanto, ao longo da germinação, apesar dos teores de prolina para sementes provenientes de plantas dessecadas terem sido

levemente superiores nas primeiras 48h de embebição em relação a sua testemunha, não houve diferença estatística entre as mesmas (Figura 12).

Figura 12 - Teor de prolina livre total durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar Benso1RR proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST)



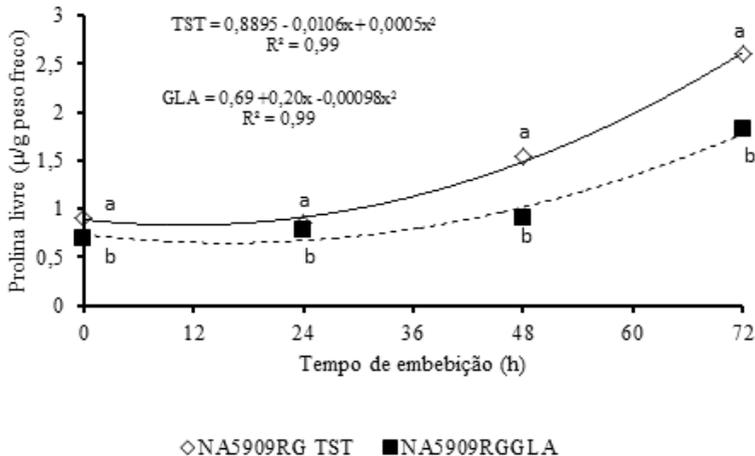
Letras diferentes compara teores de prolina em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01$, $CV(\%) = 7,14$.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Com relação aos teores de prolina em sementes secas para a cultivar NA5909RG observou-se maiores teores para sementes proveniente de plantas testemunha em relação as sementes provenientes de plantas dessecadas. Durante a germinação verificou-se menores teores de prolina em relação a sua testemunha ao longo do tempo (Figura 13). Como o glufosinato de amônio tem a capacidade de translocar-se a curta distância, uma possível explicação para os níveis inferiores de prolina para sementes provenientes de plantas dessecadas, seria a possibilidade do glufosinato de amônio quando aplicado em R7.1 ter entrado em contato com a

semente, através da diferença de potencial osmótico, inibindo a glutamina sintetase que é percussora da prolina.

Figura 13 - Teors de prolina livre total durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST)

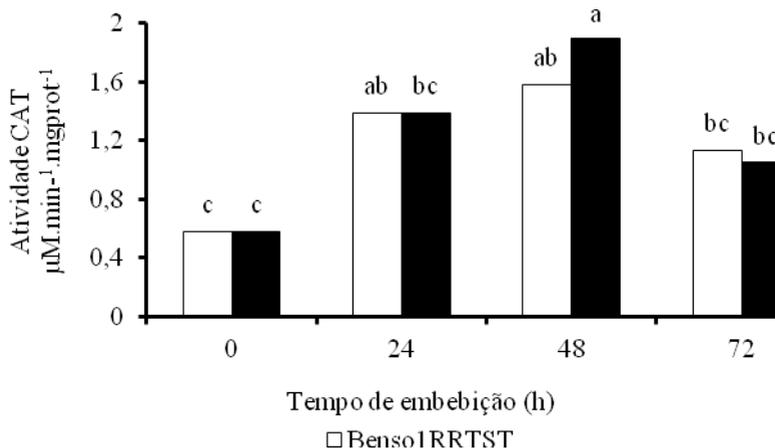


Letras diferentes compara teores de prolina em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan p <0,01, CV(%) = 6,35.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Para sementes da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas não foi observado diferença significativa na atividade da enzima catalase em relação a sua testemunha (Figura 14) durante a embebição, coincidindo com a produção de peróxido de hidrogênio que também não apresentou diferença estatística entre sementes proveniente de plantas dessecadas e suas testemunhas (Figura 10).

Figura 14 - Atividade da enzima Catalase (CAT) durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST)



Letras diferentes compara a atividade da catalase em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01$; CV = (%) 35,04.

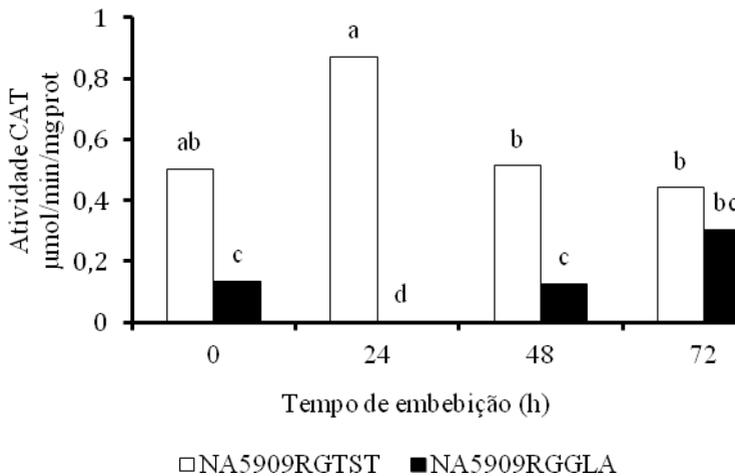
Fonte: produção do próprio autor (2016)

Sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas, apresentaram menor atividade enzimática durante a germinação em relação as suas testemunhas em até 48h de embebição (Figura 15). Em 24h de embebição, observou-se o maior pico de atividade da catalase para semente proveniente de plantas testemunha e menor pico de atividade para sementes proveniente de plantas dessecadas (Figura 15), coincidindo com a maior protrusão radicular (68%) para sementes provenientes de plantas testemunha e baixa protrusão radicular (28%) para sementes provenientes de plantas dessecadas conforme observadas no capítulo 3.

A baixa atividade da catalase para sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas pode explicar o elevado teor de peróxido de hidrogênio, que associado aos baixos teores de prolina promoveu a elevada peroxidação de

lipídios, levando ao baixo percentual de germinação observado no capítulo 3. Segundo Job et al. (2005) o estresse oxidativo pode ocorrer durante a durante a germinação, podendo induzir a oxidação de proteínas das sementes e por sua vez deletariamente afetar o vigor e germinação das mesmas.

Figura 15 - Atividade da enzima Catalase (CAT) durante 72h de embebição em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (GLA) ou não (TST)



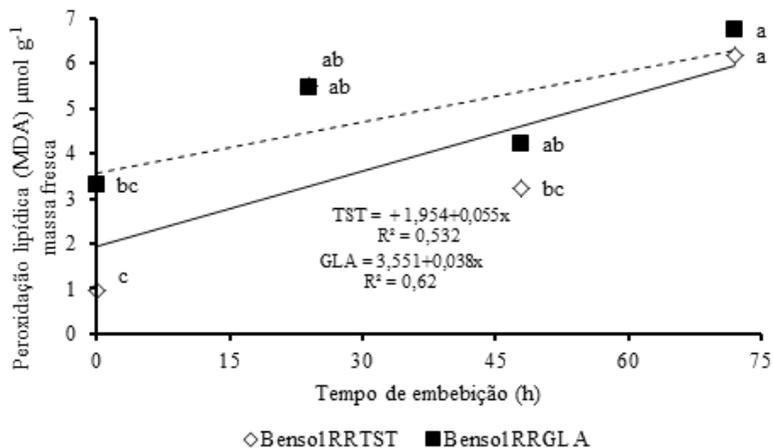
Letras diferentes compara a atividade da catalase em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01$; CV = (%) 26.05.

Fonte: produção do próprio autor (2016).

Para sementes da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas ou não, observou-se aumento contínuo nos teores de MDA durante as 72h de embebição, não havendo diferença entre os tratamentos (Figura 16). Esse resultado de peroxidação de lipídios parece estar fortemente relacionado com os dados de produção de peróxido de hidrogênio, teores de prolina e atividade da catalase que também não apresentaram

diferenças estatísticas entre sementes provenientes de plantas dessecadas e suas testemunhas.

Figura 16 - Peroxidação lipídica (MDA) durante a germinação em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST)



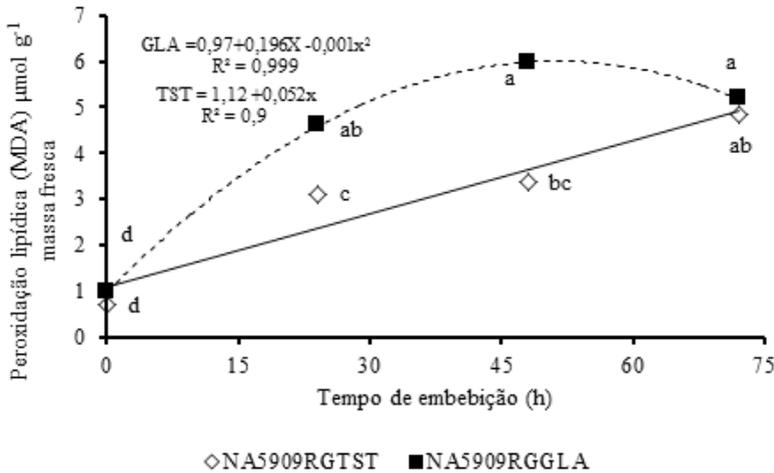
Letras diferentes compara a peroxidação lipídica em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01$; CV = (%) 31.79.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Sementes secas da cultivar NA5909RG não apresentaram diferença nos teores de MDA entre sementes proveniente de plantas dessecadas e suas testemunhas (Figura 17). Entretanto, durante a germinação nos tempos 24h e 48h foi observado maiores teores de MDA proveniente de plantas dessecadas em relação a sua testemunha, indicando maior estresse oxidativo em relação as suas testemunhas. Essa maior peroxidação lipídica pode ser explicada pelo aumento dos teores de peróxido de hidrogênio que ocorre nesse momento, coincidindo com a baixa atividade da catalase e baixos teores de prolina. Esses resultados podem explicar o baixo percentual

de germinação observado no capítulo 3 para sementes da cultivar NA5909RG.

Figura 17 - Peroxidação lipídica (MDA) durante a germinação em sementes de soja da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio (GLA) e não dessecadas (TST)



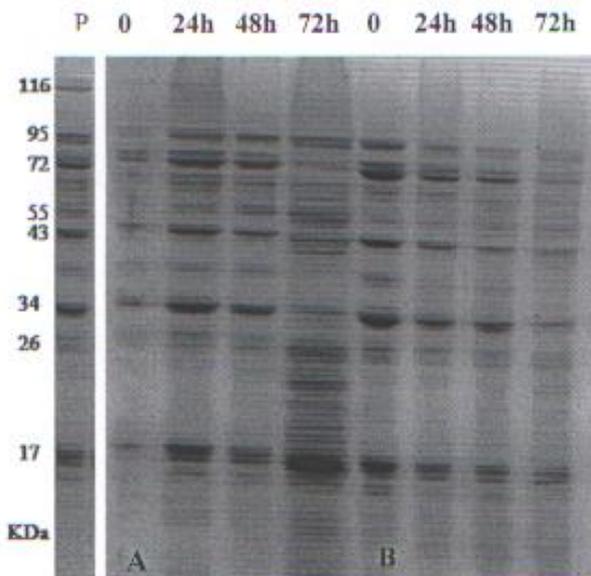
Letras diferentes compara a peroxidação lipídica em sementes proveniente de plantas dessecadas com sua testemunha no mesmo tempo através do teste Duncan $p < 0,01$. CV(%)=24.57.

Fonte: produção do próprio autor (2016)

Para o perfil protéico das sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas testemunha (Figura 18A), não observou-se em 72 h a presença de proteínas entre 95 KDa e 56 KDa (β -conglucina) e 34 KDa (glicina de cadeia ácida), porém observou-se proteínas de 17 KDa (glicina de cadeia básica). Para sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas (Figura 18B) observou-se baixa intensidade a partir de 24h para a β -conglucina e glicina (ácida e básica) em relação a sua testemunha.

A baixa intensidade das bandas observada no perfil protéico para a cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas, coincide com a baixa mobilização de proteína solúvel durante a germinação e baixo percentual de germinação observada no capítulo 3 (Figura 7). Além disso, a baixa intensidade das bandas nesse período coincide com a maior peroxidação lipídica. Segundo Yamauchi et al. (2008) e Job et al. (2005) a peroxidação lipídica altera o perfil protéico em função da oxidação de proteínas que pode ocorrer em função de algum tipo estresse, o que pode explicar a baixa intensidade das bandas observada para a cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas.

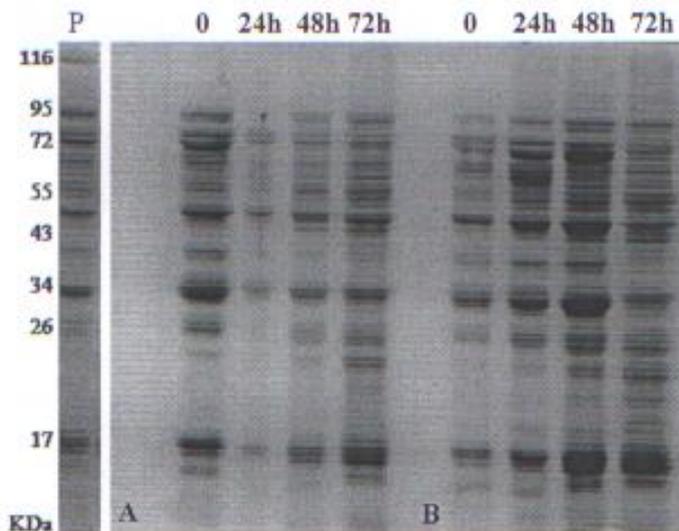
Figura 18A-18B - Perfil de proteína de sementes de soja da cultivar NA5909RG durante 0, 24h, 48h e 72h de embebição. A-Semente proveniente de plantas testemunha; B-Semente proveniente de plantas dessecadas, P-peso padrão



Fonte: produção do próprio autor (2016)

Para sementes da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas observou-se nos tempos 24h e 48h, que correspondem a fase II de embebição para soja, maior intensidade das bandas em relação a sua testemunha (Figura 19A-19B), para proteínas de peso molecular entre 95 KDa a 56 KDa, correspondendo a β -conglucina e também proteínas de 34 KDa e 17 KDa representando a glicina na sua forma ácida e básica respectivamente. A maior intensidade no perfil protéico nos tempos 24 e 48h estão diretamente relacionadas com os teores de H_2O_2 , prolina e atividade da catalase observado nesse período. Sabe-se que a prolina é um aminoácido que pode funcionar como um osmoprotetor com capacidade de aumentar a estabilidade das células em reter água sem afetar o metabolismo normal das plantas, também pode agir como estabilizador protéico e inibidor da peroxidação lipídica (HAMILTON; HECKATHORN 2001; GILL; TUTEJA 2010).

Figura 19A-19B - Perfil de proteína de sementes de soja da cultivar Benso1RR durante 0, 24h, 48h e 72h de embebição. A- Semente proveniente de plantas testemunha, B-Semente proveniente de plantas dessecadas, P-peso padrão



Fonte: produção do próprio autor (2016)

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas com glufosinato de amônio durante a germinação apresentaram desequilíbrio entre os teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atividade da catalase e teores de prolina, acarretando em maior estresse oxidativo, observado através da peroxidação lipídica, que pode ter influenciado na baixa intensidade das bandas do perfil protéico (oxidação de proteínas). Em contra partida, sementes da cultivar Benso 1RR proveniente de plantas dessecadas não apresentaram desequilíbrio entre os teores de H_2O_2 , atividade da catalase e prolina, sendo que e a partir de 24 h os teores de H_2O_2 foram levemente superiores a sua testemunha, levando a hipótese de que o H_2O_2 pode ter funcionado como um sinalizador de hormônio necessário para a germinação, sendo necessário estudo mais aprofundado para tal afirmação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação do glufosinato de amônio em plantas de soja no estágio reprodutivo R7.1 afetou negativamente a qualidade fisiológica e vigor da cultivar NA5909RG. Após 48h da aplicação do produto já foi possível observar um aumento nos teores de peróxido de hidrogênio e elevada peroxidação lipídica associado a baixos teores de prolina para essa cultivar.

Durante o processo de germinação a mobilização de proteína solúvel para a cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecada foi afetada negativamente ocasionando o menor percentual de germinação, provavelmente em função do estresse oxidativo observado durante a germinação e aos baixos teores de prolina e baixa atividade da catalase em relação a sua testemunha. Ao contrário a cultivar Benso1RR, não apresentou diferença na mobilização de reservas, nem no percentual de germinação e vigor entre sementes provenientes de plantas dessecadas e suas testemunhas provavelmente em função do sistema antioxidante mais eficiente dessa cultivar. Dessa forma, a aplicação do glufosinato não é indicada no presente estudo para a cultivar NA5909RG pois diminuiu vigor das sementes em função do estresse oxidativo observado durante a germinação promovendo o baixo percentual de germinação.

Uma possível explicação para a maior sensibilidade das sementes da cultivar NA5909RG proveniente de plantas dessecadas seria a possibilidade da molécula do glufosinato de amônio ter entrando em contato com a semente. Como o glufosinato de amônio pode translocar-se a curta distância, características morfológicas e a composição química das vagens podem contribuir ou não para a translocação do herbicida afetando a qualidade da semente. Sendo assim, é importante em futuras pesquisas, estudar as características morfológicas e a composição química das vagens logo após a aplicação do herbicida e tentar relacionar com os mecanismos enzimáticos, estresse oxidativo e a qualidade fisiológica da semente.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell Environ.**, . Oxford, v. 24, p.1337–1344, 2001.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de izoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa, MG.: UFV, 1998.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum.** Copenhagen,v. 104, p. 280-292, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA). Seed Vigor Testing Handbook. n. 32. 1983.

AZIZ, A.; LARHER, F. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica nappus* L. **Journal of Plant Physiology.** Jena, v. 153, n. 5-6, p. 754-762, 1998.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research.**, Wallingford,v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

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

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**. The Hague,v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILBORST, H. W. M.; NONOGAKI, H., *Seeds e Physiology of Development*. **Germination and Dormancy**, 3 ed. Springer, New York, 2013.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994; 445 p.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de reservas. Capítulo 10. In: FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. (orgs.). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 125-134, 2004.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHOST, H. W. M. M. Embebição e Reativação do Metabolismo. Capítulo 9. In: FERREIRA, A. G.; BOPRGUETTI, F. (orgs.). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, p. 149-162, 2004.

CARVALHO, L. B. Dinâmica Fisiológica. Capítulo 4. In: CARVALHO, L. B. (org.). **Herbicidas**. Lages, SC, p. 21-52, 2013.

CHENG, L.; LI S.; HE, G. Isolation and expression profile analysis of genes relevant to chilling stress during seed imbibition in soybean [*Glycine max* (L.) Meer.]. **Agricultural Sciences in China**. Beijing, v. 8, n. 5, p. 521-528, 2009.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1671292708602424>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

Cho, U. H.; Seo, N. H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Sci**. Clare, v. 168, p. 113-120, 2005.

CLEGG, K. M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of the Science of Food and Agricultural.**, New York, v. 3, p. 40-44, 1956.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto 2015, Safra 2014/2015, v. 2, Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: CONAB 2015.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A. Tecnologia para produção de sementes de soja de alta qualidade – **Circular técnica 40-Série Sementes**. Londrina: Embrapa Soja, 2007, 12 p.

GARCIA, J. S.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, M. Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development. **Journal Agriculture Food Chemistry**. Estados Unidos, v. 54, p. 8623-8630, 2006.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, p. 909-930, 2010.

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia.**, v. 68, n. 3, p.351-357, 2013.

GUIMARÃES, V. F.; HOLLMANN, M. J.; FIOREZE, S. L.; ECHER, M. M.; RODRIGUES-COSTA, A. C. P.;

ANDREOTTI, M. Produtividade e qualidade de sementes de soja em função de estádios de dessecação e herbicidas. **Planta Daninha**. Viçosa, v. 30, n. 3, p. 567-573, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 ed., Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAMILTON, E. W.; HECKATHORN, S. A. Mitochondrial adaptation to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betain. **Plant Physiology**. Rockville, v. 126, p. 1266-1274, 2001.

HAN, C.; YIN, X.; HE, D.; YANG, P. Analysis of Proteome Profile in Germinating Soybean Seed, and Its Comparison with Rice Showing the Styles of Reserves Mobilization in Different Crops. **Plos One**. San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2013.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; JACOB, E. A.; MACHADO, R. D.; FISS, G.; ZIMMER, P. D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Revista Bragantia**. Campinas, v. 69, n. 3, p.727-734, 2010.

NONOGAKY, H.; BASSELB, G. W.; BEWLEY, J. D.
Germination—Still a mystery. **Plant Science**. Limerick, v. 179,
p. 574-581, 2010.

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

ISHIBASHI, Y.; KODA Y.; ZHENG, S. H.; YUASA
T.; IWAYA-INOUE, M. Regulation of soybean seed
germination through ethylene production in responseto reactive
oxygen species. **Annals of Botany**. London, v. 1, p.1-8, 2013.

JOB, C.; RAJJOU.; LOVIGNY, L. Y.; BELGHAZI, M.; JOB,
D. Patterns of Protein Oxidation in Arabidopsis Seeds and
during Germination. **Plant Physiology**. Rockville, v. 138, n. 2,
p. 790-802, 2005.

JONES, S. I.; VODKIN, L. O. Using RNA-Seq to Profile
Soybean Seed Development. **Plos One**. San Francisco, v. 8, n.
3, p.1-12, 2013.

LACERDA, A. L. S.; LAZARINI, E.; SÁ, M. E.; VALÉRIO
FILHO, W. V. Efeitos da dessecação de plantas de soja no
potencial fisiológico e sanitário de sementes. **Revista
Bragantia**. Campinas, v. 64, n. 3, p. 447-457, 2005.

LACERDA, A. L. S.; LAZARINI, E.; SÁ, M. E.; VALÉRIO
FILHO, W. V. Armazenamento de sementes de soja
dessecadas e avaliação da qualidade fisiológica, bioquímica e

sanitária. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v. 25, n. 2, p. 97-105, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**. London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid method for phitate determination. **Journal Agricultural Food Chemistry**. Washington, v. 28, p. 313-315, 1980.

LEHNER, A.; MAMADOU, N.; POELS, P.; CÔME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. **Journal of Cereal Science**. Melbourne, v. 47, n. 3, p. 555-565, 2008.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: From genomics to the Field. **Plant Science**. Ireland, v. 179, n. 1, p. 554-564, 2010.

LEYMARIE, J.; VITKAUSKAITE, G.; HOANG, H. H.; GENDREAU, E.; CHAZOULE, V.; MEIMOUN, P. et al. Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of Arabidopsis Seed Dormancy. **Plant Cell Physiology**. Japan, v. 53, n. 1, p. 96-106, 2012.

LINDSTROM, J. T.; VODKIN, L. O. A Soybean Cell Wall Protein 1s Affected by Seed Color Genotype. **The Plant Cell**. v. 3, p. 561-571, 1991.

KIM, H. T.; CHOI, U. K.; RYU, H. S.; LEE, S. J.; KWON, O. S. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1814, n. 9, p. 1178-1187, 2011.

KUMAR, S. P. J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**. London, v. 116, n. 6, p. 663-668, 2015.

KRANNER, I.; COLVILLE L. E. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental Experimental Botany**. Elmsford, v. 72, n. 1, p. 93-105, 2011.

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

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (orgs.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES, 1999. c. 3, p. 3.1-3.24.

MA, F.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C. A. JZEN, M. G. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. **Annals of Botany**. London, v. 94, p. 213-228, 2004.

MARTINEZ, A. P.; CORAZZA.; MARTINEZ, P. C.; SOUZA, M. C.; BRAZACA, S. G. C. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciência Tecnologia Alimentos**. Campinas,, v. 31, p. 23-30, 2011.

MENGARDA, L. H. G.; LOPES, J. C. A.; RODRIGO S. A.; ZANOTTI, R. F.; MANHONE, P. R. Alternating temperature and accelerated aging in mobilization of reserves during germination of *Carica papaya* L. Seeds. **Journal of Seed Science**. Viçosa, v. 37, n. 1, p. 16-25, 2015.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**. California, v. 58, p. 459-481, 2007.

MOREIRA, A. A.; MANDARINO, J. M. G.; NEVES, S. R. D.; LEITE, R. S.; OLIVEIRA, M. A. Teordeácido fítico em cultivares de soja cultivados em diferentes regiões do Paraná e São Paulo. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 23, p. 393-398, 2012.

MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; GRATAO, P. L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L. O. et al. Biochemical responses of ethylene-insensitive Neve ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stress.

Environmental and Experimental Botany. Elmsford, v. 71, n. 2, p.306-320, 2011.

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

OBENDORF, R. L.; ZIMMERMAN, A. D.; ZHANG, Q. I.; CASTILLO A.; KOSINA, S. M.; BRYANT, E. G. et al. Accumulation of Soluble Carbohydrates during Seed Development and Maturation of Low-Raffinose, Low-Stachyose Soybean. **Crop science.** Madison, v. 49, p. 329-341, 2009.

OLIVEIRA, C. M. G.; KRYZANOWSKI, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relationship between pod permeability and seed quality in soybean. **Journal of Seed Science.** Viçosa, v. 36, n. 3, p.273-281, 2014.

PEREIRA, T.; COELHO, C. M. M.; SOUZA, C. A.; MANTOVANI, A.; MATHIAS, V. Dessecação química para antecipação de colheita em cultivares de soja. **Semina: Ciências Agrárias.** Londrina, v. 36, n. 4, p. 2383-2394, 2015.

PEREIRA, W. A.; PEREIRA, S. M. A.; DIAS, D. C. F. S. Dynamics of reserves of soybean seeds during the development of seedlings of different commercial

cultivars. **Journal Seed Science**. Viçosa, v.37, n. 1, p. 63-69, 2015.

PINTO, M. A. B.; BASSO, C. J.; KULCZYNSKI, S. M.; BELLE, C. Productivity and physiological quality of seeds with burn down herbicides at the pre harvest of bean crops. **Journal of Seed Science**. Viçosa, v. 36, n. 4, p. 384-391, 2014.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**. Oxford, v. 5, n. 3, p. 209-216, 2007.

QUAN, L. J.; ZHANG, B.; SHI, W. W.; LI, H. Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal Integrative Plant Biology**. Victoria, v. 50, n. 1, p. 2-18, 2008.

QUEIROZ, C. G. S. et al. Chilling induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea Arabica* L. roots. **Biology Plantarum**. Prague, v. 41, n. 3, p. 403-413, 1998.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Annual Reviews of Plant Biology**. Palo Alto, v. 63, p. 507-533, 2012.

RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; GROOT, S. P. C.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiology**, Minnesota, v. 148, p. 620-641, 2008.

RITCHIE, S.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1982; 20 p.

REDDY, P., S.; JOGESWAR, G.; RASINENI, G. K.; MAHESWARI, M.; REDDY, A. R.; VARSHNEY, R. K.; KISHOR P. B. K. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v. 94, p. 104-113, 2015.

SAS. SAS Institute Inc® 2009. Cary, NC, USA, Licence UDESC: SAS Institute Inc, 2009.

SCOTT, J. J. Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. **Plant Physiology**. Rockville, v. 95, n. 1, p. 1298-1301, 1991.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful

Conditions. **Journal of Botany**. Georgetown, v. 1, p.1-26, 2012.

SILVA, P. A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural, durante o desenvolvimento e a secagem de sementes**. Lavras, MG: UFLA, 2006. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras: UFLA, 2006.

SILVA, F. A. S. **Assistat**. Versão 7.7 beta (2011). Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**. United Kingdom, v. 9, p. 214-219, 1998.

STAJNER, D.; MILOŠEVIĆ, M. B.; POPOVIĆ, M. Irradiation Effects on Phenolic Content, Lipid and Protein Oxidation and Scavenger Ability of Soybean Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**. Switzerland, v. 8, p. 618-627, 2007.

TEULAT-MERAH, B.; MORERE-LE PAVEN, M. C.; RICOULT, C.; AUBRY, C.; PELTIER, D. cDNA-AFLP profiling in the embryo axes during common bean germination. **Biologia Plantarum**. London, v. 55, n. 3, p. 437-447, 2011.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; PINTO, M. C.; GARA, L. A. Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism

during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal Experimental Botany**. London, v. 52, p. 647-1654, 2001.

VERMA, G.; MISHRA, S.; SANGWAN, N.; SHARMA, S. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. **Journal of Plant Physiology**. Rockville, v.184, p. 79-88, 2015.

VEIGA, A., D.: ROSA, S. D. V. F.; SILVA, P. A.; OLIVEIRA, J. A.; ALVIM, P. O.; DINIZ, K. A. Tolerância a dessecação em sementes de soja. **Ciência agrotécnica**. Lavras, v. 31, n. 3, p. 773-780, 2007.

YAMAUCHI, Y.; FURUTERA, A.; SEKI, K.; TOYODA, Y.; TANAKA, K.; SUGIMOTO, Y. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v. 46, n. 1, p. 786-793, 2008.

YE, N.; ZHU, G.; LIU, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; LIU, R.; SHI, L.; JIA, L.; ZHANG, J. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. **Journal Experimental Botany**. Oxford, v. 63, p. 1809-1822, 2011.

WANG, W. L.; LIU, S. J.; SONG, S. Q.; MOLLER, I. M. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v. 86, n. 1, p. 1-15, 2015.

WANG, L. Q.; MA, H.; SONG, L.R.; SHU, Y. J.; GU, W. H. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of proteomics**. Amsterdam, v. 75, n. 7, p. 2109-2121. 2012.

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

WILSON, K. A.; RIGHTMIRE, B. R.; CHEN, J. C.; TAN-WILSON, A. L. Differential Proteolysis of Glycinin and β -Conglycinin Polypeptides during Soybean Germination and Seedling Growth. **Plant Physiology**. Rockville, v. 82, n. 1, p. 71-76, 1986.