Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Sementes esverdeadas de soja: efeitos sobre o desempenho das plantas em campo

Lucas Sousa Capelaro

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2022

Lucas Sousa Capelaro
Engenheiro Agrônomo

Sementes esverdeadas de soja: efeitos sobre o desempenho das plantas em campo

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SILVIO MOURE CICERO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Capelaro, Lucas Sousa
Sementes esverdeadas de soja: efeitos sobre o desempenho das plantas em campo / Lucas Sousa Capelaro. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.
68 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Clorofila não degradada em sementes 2. Potencial fisiológico de sementes 3. Produtividade de grãos I. Título

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida, aos meus pais, Ademir Luiz Capelaro e Ana Luisa Elste Sousa Capelaro, pelos ensinamentos, apoio, paciência, carinho e amor que me ofereceram. Tudo que sou hoje devo a vocês. Muito obrigado. À minha irmã, Julia Capelaro, pela amizade, carinho e relação de cumplicidade.

À minha noiva, Bruna Garbatti Factor, pela amizade, carinho, amor, paciência e pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

À toda minha familia e amigos, que sempre foram parte especial em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao professor Silvio Moure Cícero, pela dedicada orientação, paciência e inúmeros conhecimentos transmitidos, fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profisisonal. Muito obrigado pela confiança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Eng. Agrônomo Dr. José de Barros França-Neto, pela valiosa colaboração e sugestões durante a realização da pesquisa, conhecimentos transmitidos, paciência e amizade. O trabalho não seria o mesmo sem a sua contribuição, muito obrigado!

À Eng. Agrônomo Msc. Helena M. C. P. Chamma, pela paciência, ensinamentos e apoio nas análises no Laboratório de Análise de Sementes.

Aos funcionários do departamento, principalmente Adilson, Davi, Hodair, João, Cacá e Luciane.

À Cocari Semente e Atto Sementes, pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela disponibilidade do Equipamento Multiusuário (EMU), processo número 18/03793-5, essencial para realização desta pesquisa.

Aos meus pais e minha irmã, por todo apoio, amor e carinho. Muito obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha noiva, Bruna Garbatti Factor, por todo apoio durante essa e todas as etapas da minha vida. Sem você tudo seria mais difícil. Muito obrigado por estar sempre ao meu lado.

A todos os alunos de mestrado e doutorado da área de tecnologia de sementes.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

SUMÁRIO

RESUMO.....6
ABSTRACT 7
1. INTRODUÇÃO 9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....11
2.1. Ocorrência de sementes esverdeadas de soja 11
2.2. As moléculas de clorofila e seu processo de degradação 16
2.3. Deterioração das sementes 22
2.4. Fluorescência de clorofila e seu uso na tecnologia de sementes 25
3. MATERIAL E MÉTODOS 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
4.1. Potencial fisiológico das sementes 37
4.2. Desempenho das plantas em campo.....49
5. CONCLUSÕES 59
REFERÊNCIAS.....60

RESUMO

Sementes esverdeadas de soja: efeitos sobre o desempenho das plantas em campo

A ocorrência de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja tem se tornado cada vez mais frequente, muito em função das altas temperaturas e restrições hídricas durante a fase de maturação das sementes. A presença de clorofila não degradada nas sementes e os seus efeitos sobre o potencial fisiológico de sementes de soja já são amplamente estudados, porém, pouco se encontra sobre os seus efeitos no potencial fisiológico das sementes e como manifesta-se sobre o desempenho das plantas em campo, principalmente em relação produtividade. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos de sementes esverdeadas de soja sobre a produtividade de grãos. Para tanto, o trabalho foi realizado em dois locais (Piracicaba, SP e Londrina, PR) na safra 2018/19, utilizando-se sementes do cultivar CD 272 IPRO, e num local (Piracicaba, SP) na safra 2019/20, utilizando-se sementes do cultivar BMX Desafio. Foram constituídos oito tratamentos contendo 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sua massa com sementes esverdeadas. Com a finalidade de caracterizar o material em estudo, as sementes dos referidos tratamentos foram avaliadas pelos testes de fluorescência de clorofila, de germinação, de envelhecimento acelerado, de tetrazólio e de condutividade elétrica. Posteriormente, foram realizados os três experimentos de campo conforme especificado anteriormente. Concluiu-se que a presença de mais do que 6 % de sementes esverdeadas de soja afeta, negativamente, a produtividade de grãos. Assim, lotes de sementes contendo mais do que 6 % de sementes esverdeadas não devem ser utilizados para semeadura.

Palavras-chave: Clorofila não degradada em sementes, Potencial fisiológico de sementes, Produtividade de grãos

ABSTRACT

Green soybean seeds: effects on field plant performance

The occurrence of greenish seeds in soybean seed lots has become increasingly frequent, largely due to high temperatures and water restrictions during the seed maturation phase. The presence of undegraded chlorophyll in seeds and its effects on the physiological potential of soybean seeds are already widely studied, however, little is found about its effects on the physiological potential of seeds and how it manifests itself on field plant performance, especially in relation to productivity. Thus, the objective of this research was to evaluate the effects of greenish soybean seeds on grain yield. Therefore, the work was carried out in two locations (Piracicaba, SP and Londrina, PR) in the 2018/19 crop, using seeds of the CD 272 IPRO cultivar, and in one location (Piracicaba, SP) in the 2019/20 crop, using up seeds of the BMX Challenge cultivar. Eight treatments were constituted containing 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % and 14 % of its mass with greenish seeds. In order to characterize the material under study, the seeds of these treatments were evaluated by chlorophyll fluorescence, germination, accelerated aging, tetrazolium and electrical conductivity tests. Subsequently, the three field experiments were carried out as previously specified. It was concluded that the presence of more than 6% of greenish soybean seeds negatively affects grain yield. Therefore, seed lots containing more than 6% greenish seeds should not be used for sowing.

Keywords: Non-degraded chlorophyll in seeds, Physiological potential of seeds, Grain yield

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor e exportador de soja, sendo a principal cultura do país. Para atingir altos patamares de produtividade, uma série de medidas devem ser tomadas, como a escolha correta de cultivares e das áreas, semeadura na época correta, regulagem de semeadoras, prescrição de fertilizantes de acordo com análises de solo e extração da cultura, manejo fitossanitário adequado, entres outros. Porém, todas essas medidas podem ser comprometidas se o produtor não utilizar sementes de alta qualidade, que expressem seu potencial produtivo mesmo sob condições adversas (MARCOS-FILHO, 2015).

No caso das sementes de soja, as condições ambientais presentes nas regiões produtoras de sementes da referida espécie, bem como algumas práticas adotadas na condução dos campos de sementes, podem prejudicar a qualidade das sementes produzidas (FRANÇA-NETO et al., 2016). Dentre os problemas presentes na produção de sementes de soja no Brasil, as sementes esverdeadas têm se tornado cada vez mais frequentes, uma vez que altas temperaturas no período de maturação das sementes, fator fundamental para a ocorrência de sementes esverdedas, são comuns nas regiões produtoras de semente de soja (FRANÇA-NETO et al., 2012; PÁDUA et al., 2009a). Além disso, quando há períodos de estiagem associados a altas temperaturas ocorrendo, principalmente, durante o processo de maturação das sementes, os efeitos são mais severos, resultando em uma quantidade maior de sementes esverdeadas (com maior retenção de clorofila não degradada) por área (PÁDUA et al., 2009b).

Os efeitos das sementes esverdeadas sobre o potencial fisiológico de lotes de sementes de soja têm sido amplamente estudados por diversos pesquisadores. Costa et. al (2001) observaram que sementes com coloração esverdeada, principalmente com cores mais intensas, envolvendo a região do eixo embrionário apresentaram índices elevados de deterioração por umidade e, consequentemente, redução na germinação, vigor e viabilidade dessas sementes. Teixeira et al. (2020) também observou a redução no vigor de sementes com a presença de clorofila em seus tecidos. Além disso, Costa et al. (2001) concluiram que, devido aos efeitos deletérios das sementes esverdeadas sobre lotes de sementes de soja, a quantidade máxima de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja deveria ser de 10%, a fim de evitar prejuízos aos produtores de grãos.

Zorato et al. (2007) concluíram em seus estudos que a clorofila presente nas sementes de soja é um indicativo de redução do potencial fisiológico das sementes, onde a quantidade de sementes esverdeadas e intensidade de coloração das mesmas, presentes nos lotes de sementes podem interferir, em maior ou menor intensidade, no potencial fisiológico dos lotes de sementes. Essa conclusão levantou um questionamento sobre os efeitos estarem relacionados a quantidade de sementes esverdeadas de soja, assim como a sua intensidade de coloração, presente nos lotes de sementes.

Os resultados observados por Cicero et al. (2009) corroboram com os resultados obtidos por Zorato et al. (2007), uma vez que ao utilizar a técnica de fluorescência de clorofila em lotes de sementes de soja, foi possível confirmar os efeitos da clorofila não degradada sobre a qualidade das sementes; no referido trabalho, com a separação de sementes de soja com alta fluorescência de clorofila de sementes de soja com baixa fluorescência de clorofila, foi possível aprimorar o potencial fisiológico dos lotes de sementes utilizados.

Como observado, os efeitos das sementes esverdeadas sobre o potencial fisiológico de lotes de sementes de soja já são amplamente estudados, o que proporcionou a indústria a seguir certas diretrizes, principalmente na quantidade de sementes esverdeadas presentes em lotes de sementes de soja, afim de garantir a qualidade dos mesmos. Porém, quando o assunto é o efeito das sementes esverdeadas sobre a produção de grãos de soja, nada se sabe a respeito desses efeitos. Será que conclusões observadas em diversos trabalhos laboratoriais tem relação com o desempenho dessas plantas no campo? Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito de sementes esverdeadas de soja sobre o potencial fisiológico e como manifesta-se no desempenho das plantas em campo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ocorrência de sementes esverdeadas de soja

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] possui grande destaque na agricultura brasileira, sendo a principal cultura em termos de área cultivada e produção de grãos, com 39,1956 milhões de hectares e 138,153 milhões de toneladas, na safra 2020/21, resultando em uma produtividade de 3525 kg/ha (CONAB, 2022). Este cenário justifica a necessidade da utilização de sementes de soja de alta qualidade, uma vez que sua utilização fornece condições para um bom estabelecimento da cultura no campo e a possibilidade de alcançar altos índices de produtividade.

Para se produzir sementes de soja de alta qualidade é necessário que ocorram na fase final de maturação e na colheita condições climáticas favoráveis, quais sejam, ausência de precipitações pluviais e temperaturas amenas, por volta de 22 ºC (FRANÇA-NETO et al., 2007). No Brasil, devido às condições climáticas tropicais, a produção de sementes de soja de alta qualidade pode ser afetada, principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste (FRANÇA-NETO et al., 2005), por meio da ocorrência de sementes esverdeadas em lotes de sementes , resultando em acentuada redução de seu potencial fisiológico.

As sementes esverdeadas de soja ocorrem devido ao processo de degradação da clorofila que foi interrompido parcial ou totalmente, devido à morte prematura das plantas ou devido à maturação forçada das sementes , principalmente se esses processos ocorrem sob condições de elevadas temperaturas. Dessa maneira, há a presença das moléculas de clorofila nos tecidos das sementes, provocando o aspecto visual “esverdeado” (Figura 1).

Figura 1. Sementes esverdeadas de soja. Fonte: França-Neto et al., 2012.

Os estresses ambientais, principalmente os causados por altas temperaturas, possuem um grande efeito negativo sobre a produção e a qualidade das sementes de soja. Segundo Pádua et al. (2009b), estudos apontam que temperaturas acima de 30 ºC durante os estádios fenológicos R5 e R6, quando ocorre intensa translocação de fotoassimilados da planta para as sementes, podem causar sérios prejuízos à produção e à qualidade das sementes.

Sob altas temperaturas, a velocidade de transferência de matéria seca da planta para as sementes aumenta, ao passo que as taxas de fotossíntese diminuem e a velocidade do processo de degradação das moléculas de clorofila não aumenta, provocando o aparecimento das sementes esverdeadas de soja (MARCOS-FILHO, 2015). Quando as altas temperaturas estão associadas a períodos de estiagem, os efeitos são mais severos, resultando em uma quantidade maior de sementes de soja com moléculas de clorofila não degradadas.

Dentre os fatores bióticos que podem causar a ocorrência de sementes esverdeadas estão as doenças radiculares(FRANÇA-NETO et al., 2012), da haste e as foliares (PINTO et al., 2011; ZORATO; WATANABE, 2006), o intenso ataque de insetos sugadores, principalmente os percevejos e o ataque de nematóides (FORTI et al., 2015).

A característica genética do cultivar está diretamente ligada à incidência de sementes esverdeadas (FRANÇA-NETO et al., 2005; NOGUEIRA; SEDIYAMA, 2013; PÁDUA et al., 2009a; PALMER et al., 2004), sendo ela a base que determina maior ou menor incidência de sementes esverdeadas de soja. A expressão de determinados genes pode estar relacionada com maiores ou menores incidência de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja, uma vez que genes da família *Stay Green (SGR)* produzem proteínas chave na degradação da clorofila, uma vez que os genes SGR codificam uma proteína direcionada aos cloroplastos (PARK et al., 2007). Teixeira et al. (2016) verificaram que o cultivar de soja BRS 133, descrito como tolerante ao surgimento de sementes esverdeadas, apresentou maior expressão dos genes *SGR 1* e *2 (D1, D2), PPH2* e *NYC1_1*, todos pertencentes à família SGR, enquanto os mesmos genes, presentes no cultivar MG/46 BR-Conquista, suscetível ao surgimento de sementes esverdeadas, tiveram sua expressão prejudicada.

Muitos fatores abióticos também podem afetar a ocorrência de sementes esverdeadas de soja. O manejo inadequado da área, como a distribuição inadequada de fertilizantes e corretivos podem causar desbalanceamento nutricional, favorecendo a desuniformidade de maturação e, por consequência, o surgimento de sementes esverdeadas de soja (FRANÇA-NETO et al., 2005).

A aplicação de certos produtos, como a utilização de herbicidas para dessecação de plantas de soja, com o intuito de uniformizar a maturação e a colheita dos campos de produção de sementes, também pode forçar a maturação das sementes, impossibilitando a degradação total da clorofila e, consequentemente, a ocorrência de sementes esverdeadas (FRANÇA-NETO et al., 2012; ZORATO et al., 2007). Além disso, a dessecação mata a planta e as sementes passam por um processo de desidratação forçado. Em estudo realizado por Adams et al. (1983), sementes desidratadas de forma lenta possuíam cerca de 1 µg de clorofila/semente, enquanto sementes que passaram pelo processo de desidratação de forma rápida e permaneceram visivelmente esverdeadas, apresentaram cerca de 29 µg de clorofila/semente.

Certos fungicidas utilizados para controle da doença ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, também podem favorecer o aparecimento de sementes esverdeadas (PINTO et al., 2011; ZORATO; WATANABE, 2006).

A ocorrência de sementes esverdeadas de soja pode estar relacionada com o posicionamento das vagens na planta. Plantas de soja que foram submetidas à maturação forçada das sementes ou que tiveram morte prematura apresentaram

maior quantidade de sementes esverdeadas no terço inferior da planta, onde constatou-se que 21,2 % das sementes produzidas no terço inferior apresentavam pigmentação esverdeada, ao passo que apenas 3,5 % das sementes produzidas no terço superior da planta apresentavam esta tonalidade (FRANÇA-NETO et al., 2005).

O tipo, a duração dos estresses e o estádio fenológico em que ocorrem estão diretamente relacionados com a intensidade de ocorrência de sementes esverdeadas dentro de um lote de sementes. Se a morte da planta ocorre na fase final do estádio fenológico R5, a coloração verde estará restrita ao tegumento, podendo diminuir durante o período de armazenamento; porém, se ocorrer durante as etapas iniciais do estádio fenológico R5, a presença de moléculas de clorofila se estenderá por todas as partes das sementes, como o tegumento, os cotilédones e o eixo embrionário, se mantendo mesmo após o armazenamento (FRANÇA-NETO et al., 2012). Bohner (2005) descreveu que existem duas classificações para as sementes esverdeadas de soja: a primeira classificação refere-se a sementes que possuem o tegumento esverdeado e os cotilédones na coloração amarela, sendo classificadas como “classe 2”; já as sementes que apresentam coloração esverdeada por toda a extensão da semente, com presença de clorofila tanto no tegumento quanto nos cotilédones e eixo embrionário são classificadas como “sementes danificadas”.

Assim, pode-se assumir que a intensidade de retenção da clorofila nas sementes é diretamente proporcional à redução do potencial fisiológico das mesmas (ZORATO; WATANABE, 2006). Na presença da coloração esverdeadas mais intensa nos cotilédones das sementes de soja, estes são gravemente comprometidos, com alto número de células deterioradas, o que pode afetar a a translocação das substâncias de reservas para o eixo embrionário durante o processo de germinação, comprometendo o desempenho da semente (ZORATO et al., 2007). O estudo realizado por Pádua et al. (2007) confirmou esses fatos, verificando-se que as sementes esverdeadas apresentaram no teste de condutividade elétrica maiores índices de lixiviação de solutos, indicando, assim, que o sistema de membranas celulares da semente estava desorganizado, em consequência da maturação forçada e da morte prematura da planta.

A produção de sementes de soja de alta qualidade é um complexo sistema, uma vez que são inúmeros fatores que podem influenciar a ocorrência de sementes

esverdeadas nos campos de produção de sementes. Porém, todos os fatores podem, de alguma maneira, ser influenciados pelas ações do homem. O uso de cultivares mais tolerantes à incidência de sementes esverdeadas , a semeadura dos campos de produção de sementes dentro do período recomendado, controle adequado de pragas, doenças e plantas daninhas, adubação realizada de maneira adequada e a realização da dessecação dos campos nos estádios fenológicos recomendados são algumas medidas que podem, ao menos, reduzir a quantidade de sementes esverdedas nos lotes de sementes de soja produzidos.

A qualidade das sementes é composta pelos atributos genético, físico, fisiológico e sanitário. Apesar dos quatro atributos que compõem a qualidade das sementes possuírem importância igual para composição da qualidade, o potencial fisiológico é o que chama maior atenção entre os tecnologistas de sementes e entre os produtores (MARCOS-FILHO, 2015), uma vez que lotes de sementes com alto potencial fisiológico possuem germinação e estabelecimento rápido e uniforme da população adequada de plantas no campo, mesmo em condições adversas, garantindo um retorno econômico favorável ao agricultor. Quando não é priorizado este componente e são utilizadas sementes de soja de baixo potencial fisiológico, são obtidas lavouras com emergência de plântulas desuniforme e com atraso no desenvolvimento de algumas plantas, que certamente no futuro se tornarão plantas “dominadas” e não conseguirão atingir potencial produtivo para alto rendimento, quando comparado às sementes de alto potencial fisiológico.

A redução do potencial fisiológico das sementes esverdeadas de soja está relacionada, justamente, a presença de moléculas de clorofila nos tecidos das sementes. Zorato et al. (2007) concluíram que a presença de clorofila é indicativo de redução do potencial fisiológico em sementes de soja. Diferentes porcentagens de sementes esverdeadas de soja em lotes de sementes interferem, em maior ou menor intensidade, no seu potencial fisiológico. Teixera et al. (2020) verificaram que à medida que a porcentagem de sementes esverdeadas de soja aumentou em lotes de sementes do cultivar 5958RSF IPRO, importantes parâmetros que compõem o potencial fisiológico foram afetados, causando um descréscimo na viabilidade e no potencial fisiológico dos lotes de sementes utilizados.

Devido ao seu dano sobre o potencial fisiológico de lotes de sementes de soja, Pádua et al. (2007) verificaram que a porcentagem de sementes esverdeadas em um lote de sementes deve ser de, no máximo, 9%, pois em sua maioria, tais

sementes estão mortas ou originam plântulas anormais. Essas conclusões reforçam os resultados obtidos por Costa et al. (2001), onde os autores destacaram que, com a utilização de lotes de sementes com porcentagem de sementes esverdeadas de 10% ou mais, houve severa redução na germinação, sendo menor do que a germinação mínima estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (80%).

2.2. As moléculas de clorofila e seu processo de degradação

Todas as plantas possuem pigmentos associados às fotorrespostas, sendo os principais os fitocromos, relacionados com respostas morfogenéticas das plantas, e as clorofilas, pigmentos verdes que estão diretamente relacionados com o processo de fotossíntese (FRANÇA-NETO et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013). Quimicamente, todas as clorofilas são porfirinas, classe de moléculas orgânicas com uma estrutura geral de anel tetrapirrólico, ligados por ligações metínicas, que possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico. As clorofilas possuem uma cadeia fitol, localizada no carbono 20 (C20) do quarto anel, sendo a parte hidrofóbica da molécula, enquanto as demais partes das moléculas de clorofila são hidrofílicas (JACKSON, 1976).

Existem mais de um tipo de clorofila, sendo elas: a clorofila a (Chl a), presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica; a clorofila b (Chl b), presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; clorofila c (Chl c), em feofitas e diatomáceas; clorofila d (Chl d), em algas vermelhas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Nos vegetais superiores, como a soja, encontram-se somente as clorofilas do tipo *a* e *b.* A estrutura da clorofila *b* difere da clorofila *a* na ligação presente na posição 3 do grupo tetrapirrólico, onde o radical do grupo metil (-CH3), presente na clorofila *a*, é substituído por um grupo aldeído (-CHO), alterando ligeiramente a posição das duas principais faixas de absorção, pela mudança da distribuição dos elétrons na molécula (HALL; RAO, 1980; JACKSON, 1976)

As clorofilas são sintetizadas nos cloroplastos, a partir do aminoácido glutamato. Para as reações biossintéticas, incluindo a incorporação de glutamato nas proteínas, o mesmo é convertido em RNA de transferência de glutamil (tRNA) em uma reação em duas etapas que requer ATP e é catalisada pela glutamil-tRNA sintetase. O grupo α-carboxil “ativado”, ligado ao tRNA por uma ligação éster reativa, é então reduzido pelo NADPH para outro produto reativo, o 1-semialdeído glutamato

(GSA), na reação catalisada pela glutamil-tRNA redutase (GTR). O GSA é rapidamente convertido em ácido α-aminolevulínico (ALA) (WILLOWS, 2006). A partir daí, há a formação de pirrol simples, porfobilinogênio e sua polimerização pela descarboxilação e oxidação para produzir protoporfirina IX. Essa rota de síntese é comum à síntese de todos os compostos porfirínicos e ocorre no escuro. A partir da formação da molécula de protoporfirina IX, as próximas etapas em diante são exclusivas da via biossintética das moléculas de clorofila (WILLOWS, 2006).

A inserção do magnésio (Mg) na posição central da molécula de clorofila e a ciclização do ácido propiônico no terceiro anel da molécula levam à formação do protoclorofilídeo. Após a formação do protoclorofilídeo, é necessária a redução fotoquímica do quarto anel da molécula para produzir o holocromo da clorofila *a*. A próxima etapa consiste na fotoconversão da molécula em clorofilídeo. Feita a conversão, a cadeia de fitol é adicionada à molécula e, com sua adição, são produzidas as moléculas de clorofila. Após sua síntese, as moléculas são incorporadas às membranas dos tilacóides (HALL; RAO, 1980; WILLOWS, 2006).

As clorofilas se apresentam nas formas *a* e *b* em vegetais superiores na proporção 1:3 e são fundamentais no processo fotossintético, já que captam energia luminosa, que será transformada em energia química utilizada pela planta para seu desenvolvimento e produção (TAIZ; ZEIGER, 2013). No processo de fotossíntese, as clorofilas absorvem a energia luminosa proveniente dos fótons, em um dado comprimento de onda e, a partir dessa energia luminosa, iniciam a cadeia de eventos da fase fotoquímica do processo fotossintético. Na primeira parte da fotossíntese, a energia absorvida dos fótons é convertida em dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH, e ao mesmo tempo o O_2 é produzido por meio da hidrólise da água. Nas reações de carboxilação, o ATP e o NADPH são utilizados para reduzir o CO_2 para formar glicose e outros compostos orgânicos.

Durante a fase final do processo de maturação das sementes, à medida em que a semente caminha para atingir o ponto de maturidade fisiológica, processos metabólicos ocorrem a fim de preparar as sementes para um novo ciclo produtivo, com a finalidade de que as mesmas possam originar plantas que perpetuem a espécie. Dentre os processos metabólicos que ocorrem durante a maturação das sementes está o processo de degradação de moléculas de clorofila nos tecidos das sementes. A degradação da clorofila é fundamental tanto para a produção de sementes como para a produção de grãos de soja, uma vez que a degradação da

clorofila é um dos sistemas presentes nos vegetais superiores para evitar uma quantidade excessiva de clorofila livre nos tecidos. Os seus catabólitos podem, potencialmente, desencadear a foto-oxidação, resultando em espécies reativas de oxigênio (EROs) (TRIPATHY; OELMÜLLER, 2012).

O funcionamento do processo de degradação da clorofila e de outros pigmentos nos tecido vegetais foi descoberto no final da década de 1990 e, para a soja, foi uma importante descoberta devido à magnitude da presença do pigmento sobre a qualidade das sementes e dos grãos comercializados (SINNECKER et al., 2005). No caso dos grãos e produtos industrializados, a presença de clorofila aumenta o custo de refino do óleo, já que a sua presença exige processos específicos para remoção (MANDARINO, 2005), enquanto as sementes que possuem o pigmento parcialmente degradado apresentam qualidade reduzida (MARCOS-FILHO, 2015).

A degradação da clorofila, de maneira geral, ocorre em duas etapas: na primeira etapa são produzidos compostos intermediários com coloração esverdeada, como as feofitinas, os clorofilídeos e os feoforbídeos (HEATON; MARANGONI, 1996; MANGOS; BERGER, 1997). A segunda etapa da reação é responsável pela perda da coloração verde das sementes, formando compostos incolores e polares (MIIHLECKER et al., 1997; OBERHUBER et al., 2001). A formação dos compostos intermediários coloridos ocorre nos plastídeos, enquanto subsequentes modificações e isomerização dos compostos incolores são realizadas no citosol e vacúolo, respectivamente (HÖRTENSTEINER, 2013).

O processo da degradação das moléculas de clorofila em folhas, frutos e sementes ocorre por meio da rota metabólica PAO (*pheophorbide a oxygenase*) (Figuras 2 e 3) e inicia-se com a conversão da molécula de clorofila *b* em clorofila *a*, em um processo redutivo de duas etapas, realizado pelas enzimas clorofila *b* redutase e hidroxymetil clorofila *a* redutase (HCAR) (RÜDIGER, 2003; TANAKA; TANAKA, 2006). Estudos realizados indicaram que a estrutura da catabólitos de clorofila possue uma relação estrutural direta com a clorofila *a* (Figura 2). No entanto, nenhum catabólito análogo portador de um grupo formil, como exibido nas moléculas de clorofila *b* (Figura 2), pode ser identificado (MOSER et al., 2009; MULLER et al., 2006). A presença de catabólitos com relação estrutural direta com as moléculas de clorofila *a* pode ser explicada pela especificidade da enzima PAO com a molécula de clorofila *a*.

Feita a conversão das moléculas de clorofila *b* em clorofila *a*, o processo de degradação da clorofila em frutos e sementes continua por meio da remoção da cadeia fitol da clorofila *a* por meio da enzima clorofilase, dando origem ao catabólito clorofilídeo *a.* A molécula clorofilídeo *a* tem o seu átomo central de magnésio retirado por meio da enzima magnésio dequelatase, transformando-se em feoforbídeo *a* (Figura 2) (HÖRTENSTEINER; KRÄUTLER, 2011).

O ferforbídeo *a*, último pigmento do tipo clorina presente no processo de degradação das moléculas de clorofila, tem seu anel oxidativo aberto pela enzima PAO, que se liga a um átomo de oxigênio na posição C-5 do feoforbídeo *a* (HÖRTENSTEINER et al., 1998), dando origem ao composto denominado de catabólito de clorofila vermelha, ou *Red chlorophyll catabolite (RCC)* (Figura 2). Os catabólitos RCC serão reduzidos à catabólitos de clorofila fluorescentes primários (*pFCC)*, por meio da enzima RCC redutase. Até a presente etapa, as reações ocorrem dentro do cloroplasto dos tecidos das sementes em fase final do processo de maturação. Para serem armazenados de maneira segura, os produtos finais do processo de degradação das clorofilas são destinados aos vacúlos das células. O processo de transporte dos catabóltios para o vacúolo das células, envolve a passagem pelo envelope dos cloroplastos, citosol das células, tonoplastos e plastídios e envolvem processos de transporte ativo de substância. Apesar da identidade dos transportadores permanecer incerta, acredita-se que os catabólitos transportados são os FCCs (MATILE; SCHELLENBERG; PEISKER, 1992; RODONI et al., 1996). Os catabólitos *pFCC* transportados para o citosol das células podem sofrer alterações dando origem à catabólitos de clorofila fluorescentes primários modificados (*mFCCs*), hipermodificados (hFCCs) e FCCs urobilinogênicos (UCCs), dependendo da espécie estudada (HÖRTENSTEINER, 2013).

No citosol os FCCs e suas modificações são transportados para dentro dos vacúolos das células e, devido ao pH ácido presente na organela, são isomerados, resultando nos catabólitos não fluorescentes de clorofila (*NCCs),* composto incolor e não fluorescente devido à mudança da localização das duplas ligações. O transporte dos FCCs para dentro dos vacúolos ocorre por meio de transportadores ABC (cassete de ligação em ATPs) (TOMMASINI et al., 1998). Nos vacúolos, os NCCs são armazenados e não apresentam mais potencial de danos às células vegetais.

Os NCCs identificados até agora, em diversas espécies, são derivados da clorofila *a*, como indicado por um grupo metil ligado no carbono C7 (HÖRTENSTEINER, 2006; KRAUTLER, 2003), reforçando a necessidade da conversão da clorofila *b* em clorofila *a* no início do processo de degradação das moléculas de clorofila.

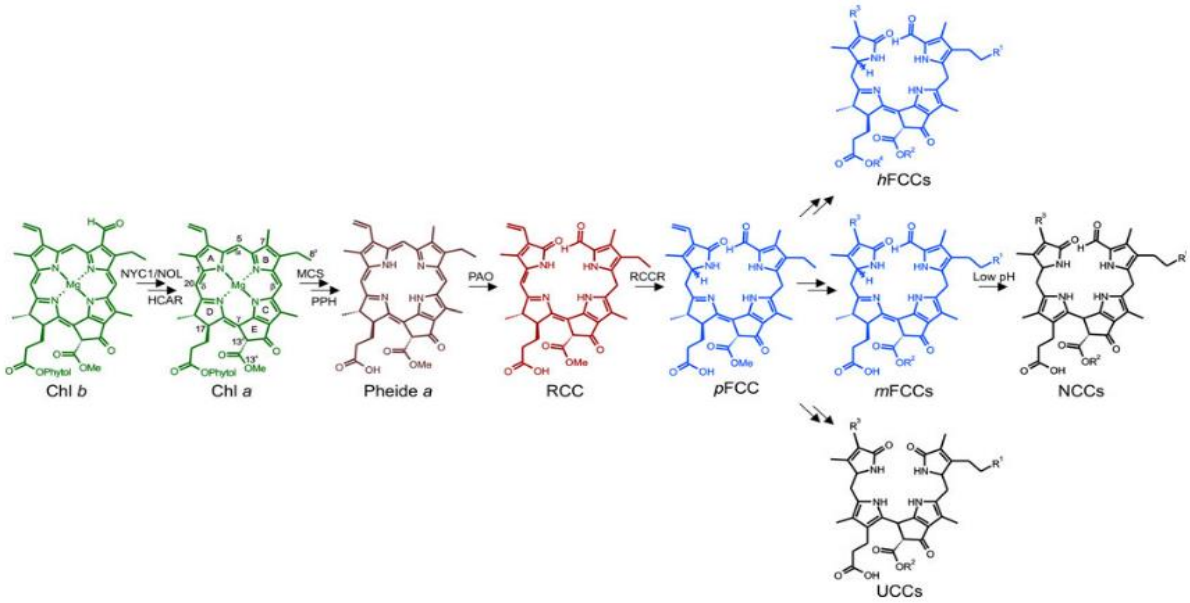

Figura 2. Processo de degradação da clorofila e seus catabólitos.
Fonte: HÖRTENSTEINER, 2013.

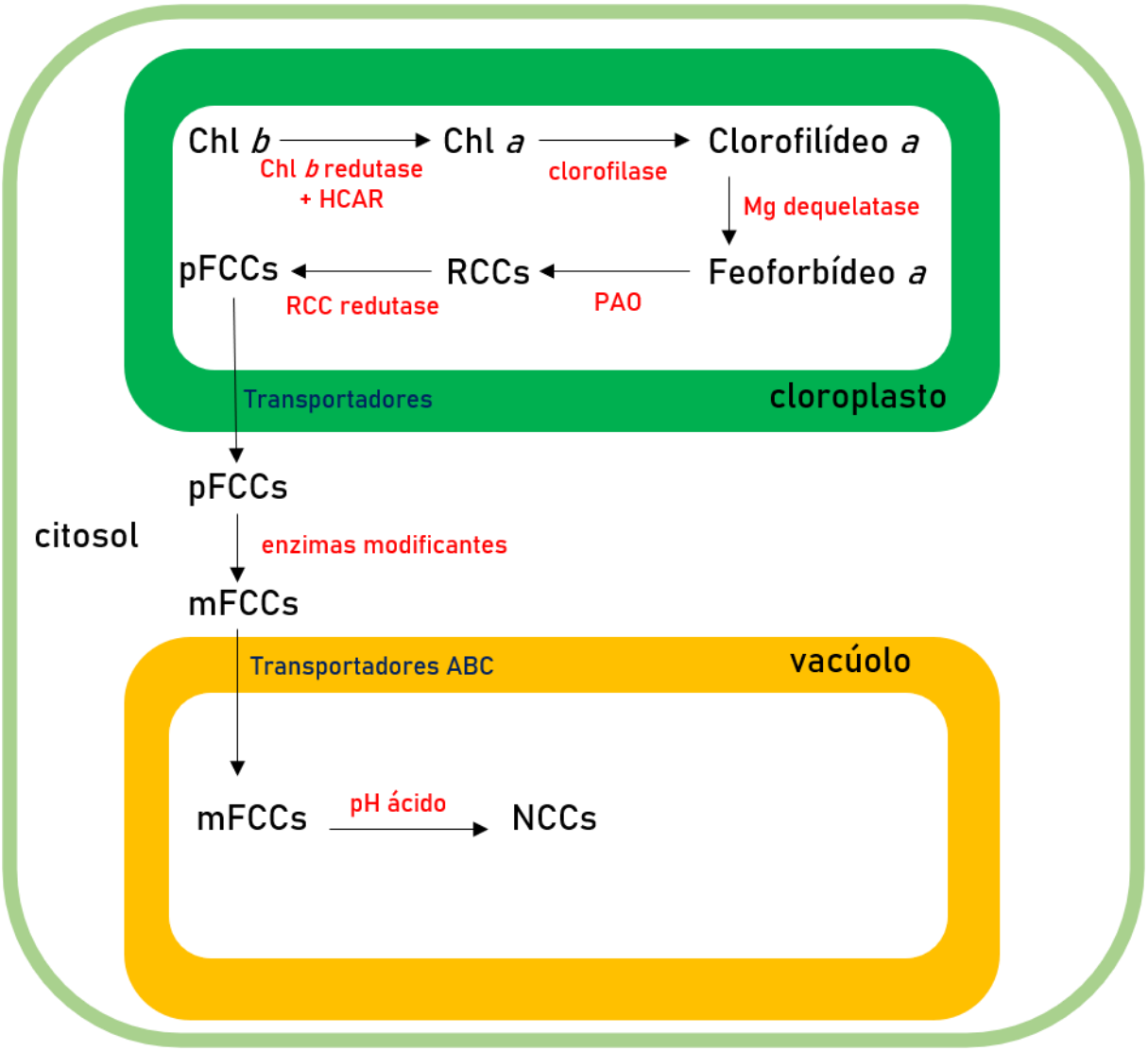

Figura 3. Processo de degradação da clorofila, enzimas envolvidas e local das reações.
Fonte: adaptado de HÖRTENSTEINER, 2011.

O processo de degradação da clorofila ocorre por aspectos bioquímicos, fortemente influenciados por fatores ambientais, que irão regular a transcrição e tradução de hormônios vegetais diretamente ligados à regulação de genes envolvidos na rota metabólica de degradação das moléculas de clorofila. Estudos demonstraram que os hormônios etileno e ABA atuam no processo. O etileno atua na regulação transcricional dos genes catabólitos de clorofila promovendo a perda de coloração dos compostos. Já o ABA atua mediando a degradação da clorofila

pelo gene ABI3 durante a maturação da semente (GAO et al., 2016; LI et al., 2013; YIN et al., 2016).

Além disso, a presença de mutantes de diferentes espécies ressalta a importância do processo de degradação da clorofila para viabilidade das plantas. Mutantes que apresentaram defeitos na enzima PAO apresetaram morte celular, uma vez que houve acúmulo de feoforbídeo *a,* composto intermediário do processo de degradação da clorofila com atividade oxidativa (HIRASHIMA; TANAKA; TANAKA, 2009; PRUZINSKA et al., 2003; TANAKA; TANAKA, 2007). Genótipos de *Arabdopsis thaliana* que apresentaram ausência da enzima clorofila *b* redutase resultaram em fenótipos *Stay-green*, uma vez que sem a conversão da clorofila *b* em clorofila *a* não é possível que o processo de degradação da clorofila continue (NAKAJIMA et al., 2012).

2.3. Deterioração das sementes

O processo de deterioração recebe considerável atenção da pesquisa em ciência e tecnologia de sementes, sendo estudado há mais de 57 anos (DELOUCHE, 1963) e sendo temas de revisões de literatura de importantes pesquisadores (MCDONALD, 1999; PRIESTLEY, 1986; SMITH; BERJAK, 1995). A deterioração das sementes pode ser definida como um complexo de mudanças que ocorrem com o passar do tempo, causando alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas, resultando na redução no potencial fisiológico das sementes até ocasionar a sua morte (DELOUCHE, 2002; MARCOS-FILHO, 2015). O processo de deterioração das sementes é contínuo, inexorável e irreversível, iniciando-se logo após a semente alcançarem sua maturidade fisiológica, sendo influenciado pela espécie, teor de água presente nas sementes e temperatura do ambiente (DELOUCHE, 1963). Popinigis (1985) também definiu a deterioração como um processo inevitável e irreversível, sendo mínima no momento da maturidade fisiológica das sementes.

A taxa de deterioração é influenciada por fatores bióticos, abióticos e pela interação desses fatores (MCDONALD, 1999). As implicações relacionadas à umidade relativa do ar e temperatura durante o período de armazenamento, combinados com grau de umidade das sementes, são consideradas como as principais causas da deterioração das sementes durante seu armazenamento. Quando essas implicações ocorrem simultaneamente, o efeito é intensificado,

reduzindo, substancialmente, a qualidade das sementes (BEWLEY; BLACK; HOLMES, 2006; SMITH; BERJAK, 1995).

Os fatores característicos às sementes também influenciam a sua longevidade. Diferentes espécies possuem diferentes taxas de deterioração de sementes, bem como lotes de sementes de uma mesma espécie também possuem diferentes níveis de deterioração, uma vez que essa taxa pode variar amplamente em razão das condições presente no ambiente em que as sementes foram produzidas, os estresses sofridos durante o período de produção, além das condições de pós-colheita. As sementes possuem seu máximo potencial fisiológico quando atingem o ponto de maturidade fisiológica. A partir daí a velocidade em que o processo de deterioração ocorre e a manutenção do potencial fisiológico das sementes vão depender das condições impostas nas diferentes etapas que ocorrem desde a colheita das sementes até a sua semeadura.

As alterações do vigor da semente ocorrem simultaneamente à evolução da transferência de fotoassimilados da planta para as sementes e acúmulo de matéria seca nas sementes. Assim, a quantidade de sementes vigorosas aumenta com o transcorrer do processo de maturação e atinge valor máximo quando a semente atinge o máximo acúmulo de reservas ou está próxima de atingir (MARCOS-FILHO, 2015). Marcos-Filho (2015) destacou que apesar das sementes alcançarem o seu máximo potencial fisiológico no ponto de maturidade fisiológica, o mesmo não deve ser encarado como sinônimo de alto nível de desempenho. As condições climáticas durante o período de produção, bem como estresses bióticos a abióticos e estado nutricional da planta contribuem diretamente para determinar os índices de germinação e de vigor obtidos quando as sementes se desligam da planta, bem como o potencial de armazenamento dessas sementes.

O processo de deterioração das sementes ocorre de maneira diferente conforme a espécie estudada e suas composições químicas. Para sementes de cereais, a peroxidação de lipídios é considerada como um mecanismo secundário do processo de deterioração. Por outro lado, para sementes de espécies oleaginosas, como a soja, a peroxidação de lipídios é o principal mecanismo do processo de deterioração (BRACCINI; BRACCINI; SCAPIM, 2001). Wilson e McDonald (1986), concluíram que a peroxidação de lipídios é uma importante causa de deterioração das sementes, estando diretamente relacionada com o declínio de vigor e viabilidade.

Sementes esverdeadas de soja são resultantes da morte prematura da planta, associada com a maturação forçada das mesmas, principalmente em ambientes com elevadas temperaturas ($\geq$ 30 ºC). Caso períodos de estiagem ocorram durante a fase final de maturação das sementes, havendo a rápida desidratação das sementes, a presença de sementes esverdeadas pode se intensificar, devido ao bloqueio total ou parcial do processo de degradação da clorofila, restringindo a primeira etapa de sua degradação da clorofila, onde há a formação dos compostos intermediários coloridos (PÁDUA et al., 2009a; SINNECKER et al., 2005). Essa pode ser uma hipótese relacionada aos efeitos das sementes esverdeadas sobre o potencial fisiológico dos lotes de sementes de soja.

As propriedades relacionadas à absorção de luz pelas moléculas de clorofila e seus catabóltios, fundamentais para o processo fotossintético, são justamente a razão pela qual são consideradas moléculas nocivas e com alto potencial de fototoxicidade celular. Além disso, as moléculas de clorofilas possuem uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, as quais reagem facilmente com ácido, base, oxigênio e luz. Tais moléculas reagem facilmente com O_2 na presença de luz, formando espécies de oxigênio ativas (foto-oxidação), que oxidam outras moléculas, incluindo lipídios e proteínas (SCHOEFS, 2002). Os produtos originados da oxidação da clorofila podem ter efeitos oxidantes ou atividades fotoxidativas, além da clorofila reagir com compostos intermediários da peroxidação de lipídios e peróxidos (ENDO; USUKI; KANEDA, 1984). Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica, permeabilidade de membranas e liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos, culminando com a morte celular.

A enzima lipoxigenase oxida as moléculas de clororfila, quando na presença de ácidos graxos insaturados (ENDO; USUKI; KANEDA, 1984), liberando elétrons, os quais possuem propriedade oxidativa. Assim, é possível que a presença de clorofila na semente venha a intensificar o processo de deterioração. Deste modo, o *degreening*, processo pelo qual ocorre a degradação da clorofila nas sementes (JALINK et al., 1998; WARD et al., 1995) é necessário para reduzir a possibilidade das moléculas de clorofila produzirem elétrons livres, os quais estão diretamente relacionados aos danos oxidativos (JALINK et al., 1999).

2.4. Fluorescência de clorofila e seu uso na tecnologia de sementes

Atualmente, no Brasil, os produtores de sementes de soja realizam a detecção da quantidade de sementes esverdeadas presentes em um lote de sementes de soja por meio da análise visual, a olho nu. O referido método se mostra subjetivo, de eficiência limitada e oneroso, uma vez que o número de lotes a serem avaliados pode ser alto, dependendo do analista e na eficácia de sua identificação (ANDRADE et al., 2016).

Uma vez que o método de detecção de sementes esverdeadas de soja a olho nu pode apresentar limitações, buscou-se opções dentre os equipamentos corriqueiramente utilizados no processo de beneficiamento de sementes de soja para avaliar a separação de sementes esverdeadas de soja das sementes amarelas. Segundo França-Neto et al. (2005), o uso da mesa gravitacional para remoção de sementes esverdeadas do lote de sementes beneficiados não se mostrou eficiente na remoção destas sementes. Ainda, segundo França-Neto et al. (2005), o uso de máquinas que realizam a separação de sementes com base nas diferenças de coloração se mostrou parciamente interessante, uma vez que reduziu significativamente a porcentagem de sementes esverdeadas nos lotes de sementes de soja estudados mas, ainda assim, a porcentagem final de sementes esverdeadas presente nos lotes de sementes de soja beneficiados se mostrou alta, acima de 10 %, valor recomendado por Costa et al. (2001) como máximo para um lote ser comercializado sem a perda de sua qualidade.

As limitações presentes no processo de beneficiamento de sementes de soja em relação à detecção de sementes esverdeadas apontam a necessidade de utilização de métodos de decteção de sementes esverdeadas que sejam rápidos, eficientes, economicamente viáveis e não destrutivos. Assim, a técnica de fluorescência de clorofila desponta como uma possível técnica de ser utilizada para detecção de sementes esverdeadas de soja.

A clorofila é uma molécula orgânica com propriedade de fluorescência, ou seja, ao absorver os fótons provenientes da luz, seus elétrons são excitados, fazendo-os saltar para níveis energéticos superiores. O excesso de energia presente nessa molécula é transformado em movimento e em radiação, principalmente quando o elétron retorna ao seu estado energético inicial, fazendo com que essa radiação seja emitida na forma de luz e calor (TAIZ; ZEIGER, 2013; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012). Por meio dessa propriedade presente nas moléculas

da clorofila, é possível estabelecer uma eventual relação entre a quantidade de clorofila presente nas sementes, o valor de fluorescência emitido pelas clorofilas e a qualidade das sementes avaliadas.

Jalink et al. (1998) propuzeram o uso da técnica de fluorescência da clorofila do tegumento de sementes como um método de análise de sementes não destrutivo, podendo determinar a maturidade das sementes e associar tais resultados com a qualidade das mesmas . Segundo os autores, a referida técnica apresenta como vantagem a sua alta sensibilidade, não sendo um método destrutivo das sementes e a rapidez com que a fluorescência é avaliada e a especificidade por um único pigmento, a clorofila. Pela especificidade do comprimento de onda e excitação e emissão da fluorescência das moléculas de clorofila, outros pigmentos ou substâncias, não interferem na determinação do objeto em estudo (MAXWELL; JOHNSON, 2000; MURCHIE; LAWSON, 2013). Os resultados de Jalink et al. (1998) reforçam que a medição da fluorescência de clorofila é um método altamente específico, onde outras substâncias que podem interferir a coloração das sementes não contribuem para o sinal de fluorescência da clorofila.

A técnica de fluorescência de clorofila consiste no uso de equipamento que emite fótons de maior energia para excitar a clorofila presente na amostra, que depois emitem fótons de energia mais baixos. Para isso, a técnica de análise de fluorescência de clorofila se baseia no uso de fontes emissoras de luz, combinada com filtros óticos, câmeras digitais CCD (*charge-coupled device*) e detectores de luz (JALINK et al., 1998; OOMS; DESTAIN, 2011). As fontes emissoras de luz emitem pulsos rápidos (μs) e saturantes na faixa do espectro vermelho (650 a 750 nm). As moléculas de clorofila absorvem a luz emitida, excitam-se e, ao voltar ao seu estado natural, emitem fluorescência (MAXWELL; JOHNSON, 2000; MURCHIE; LAWSON, 2013). Os sinais e as imagens são capturados e processados via softwares multiespectrais (JALINK et al., 1999).

A detecção da fluorescência de clorofila funciona para todas as espécies que apresentam problemas de maturação das sementes, nas quais a clorofila sofre degradação durante o processo de maturação, podendo ser utilizada para a avaliação da maturidade e qualidade das sementes. Dessa maneira, relizaram-se estudos com *Arabidopsis thaliana* (NAKAJIMA et al., 2012), arroz (HAY; TIMPLE; VAN DUIJN, 2015), chicória (OOMS; DESTAIN, 2011), melão (WILSON; KHAN; WELBAUM, 2014), tomate (LI; WANG; MENG, 2016) e repolho (JALINK et al.,

1998), onde buscou-se relacionar os valores obtidos de fluorescência de clorofila com a germinação das sementes das espécies estudadas. Observou-se uma relação inversamente proporcional entre o sinal de fluorescência de clorofila e o resultado do teste de germinação, ou seja, sementes com maior fluorescência de clorofila, apresentaram germinação reduzida.

Em relação às sementes de soja, um dos poucos estudos utilizando a técnica de fluorescência de clorofila foi realizado por Cicero et al. (2009), onde utilizou-se a técnica visando o beneficiamento de sementes para melhoria da qualidade de lotes de sementes em estudo . Os autores verificaram que a utilização da técnica de fluorescência de clorofila na separação de sementes esverdeadas de soja mostrou-se eficiente, resultando na obtenção de lotes de sementes com melhor potencial fisiológico. Ainda, segundo Cicero et al. (2009), quando realizou-se a separação de sementes com baixa fluorescência de clorofila daquelas com alta fluorescência em cinco lotes de sementes de soja, os lotes que apresentavam sementes com baixa fluorescência de clorofila apresentaram germinação acima de 86%; por outro lado, os lotes que apresentavam sementes com alta fluorescência apresentaram germinação entre 60% e 80%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Análise de Sementes, de Análise de Imagens e na área experimental do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba/São Paulo. Além da realização do experimento na ESALQ, etapas experimentais de campo foram realizadas na Embrapa Soja, em Londrina/Paraná.

Utilizou-se nesta pesquisa sementes de soja de dois cultivares, CD 2728 IPRO utilizado na safra de 2018/19 e Desafio RR 8473 RSF utilizado na safra 2019/20. A partir dos lotes fornecidos, realizou-se a separação das sementes em duas amostras iniciais: (i) sementes esverdeadas; (ii) sementes com coloração amarela. Para a separação das sementes esverdeadas utilizou-se uma lupa, com aumento de 10 vezes, para facilitar a visualização do pigmento verde nas sementes. Adotou-se como semente esverdeada qualquer semente de soja que apresentasse tonalidade verde, independente da intensidade de coloração. A amostra de sementes amarelas foi subdividida em 8 sub-amostras de 1,5 Kg, que foram utililizadas para confecção das amostras utilizadas nesta pesquisa. Com as 8 sub-amostras de 1,5 kg, retirou-se de cada uma quantidades distintas de sementes, em massa, para posterior adição da mesma massa em sementes esverdeadas de soja, as quais foram devidamente misturadas (homogeneizadas) com as sementes amarelas. Assim, ao final desta etapa, foram constituídas amostras (tratamentos) de sementes contendo 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas.

Experimento em Laboratório

Imediatamente após a confecção, os oito tratamentos foram submetidos aos testes descriminados a seguir para sua caracterização.

Fluorescência de clorofila: para a obtenção das imagens de fluorescência de clorofila das sementes utilizou-se 4 repetições de 50 sementes de cada tratamento, sendo que as imagens foram obtidas com o equipamento *SeedReporter*, com as seguintes características técnicas: i) sensor ótico CCD, de 1,3 Mp (16 bits); ii) lentes de 10 Mp; iii) área de imagem de 32x24 cm² (70 cm de altura); iv) resolução de 200 Lp/mm.

A disposição das sementes no interior do equipamento foi feita por meio de uma placa de plástico (11 cm x 11 cm), com coloração preta e contendo 50 orifícios para acomodação das sementes, posicionada em um suporte metálico do próprio equipamento, com 70 cm de altura. As imagens e a análise de fluorescência de clorofila de cada tratamento foram obtidas em duas etapas: (i) aquisição das imagens por meio do equipamento *SeedReporter* e (ii) análise das imagens por meio do softwatre Data Analisys, versão 5.4.7-64b.

Os parâmetros para aquisição das imagens utilizados foram: i) *macro focus*: 273; ii) *binning*: 1x1; iii) *dark frames*: 1; iv) *data frames:* 1; v) *meas power:* 50%; vi) *Chl.fl Shutter*: 3000 µs; Chl.fl Gain: 300. Os parâmetros definidos e utilizados para processamento e análise das imagens de fluorescência de clorofila das sementes foram: i) mask level: 5000; ii) stretch (CF): 10.

Teste de germinação: as sementes foram distribuídas sobre papel-toalha para germinação, previamente umedecidos com água na proporção de 2,5 vezes a massa do papel (Brasil, 2009). Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes por tratamento, mantidas em germinador a 25 °C ± 1°C. As avaliações foram efetuadas no quarto e no sétimo dia após instalação do teste e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais, conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Envelhecimento acelerado: utilizou-se caixas de plástico (11 cm x 11 cm x 3 cm) como compartimentos individuais. A umidade relativa do ar no interior dessas caixas foi obtida pela adição de 40 ml de água ao fundo, conforme descrição efetuada por Marcos-Filho, Novembre e Chamma (2000). As quatro repetições de cada tratamento foram distribuídas de modo a constituir camada única tomando toda a superfície da tela metálica suspensa no interior de cada caixa. A temperatura utilizada foi de 41 ºC, onde as sementes permaneceram durante 48 horas no interior da câmara jaquetada de água. Após o referido período, realizou-se o de teste de germinação a 25º C, durante quatro dias, sendo computado ao final do teste a porcentagem média de plântulas normais para cada tratamento (MARCOS-FILHO; NOVEMBRE; CHAMMA, 2000).

Teste de tetrazólio: foi realizado empregando-se três repetições de 100 sementes, onde cada repetição foi dividida em duas subamostras de 50 sementes, para cada tratamento. As sementes foram pré-condicionadas em papel-toalha, previamente umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a sua massa, por 16 horas, à temperatura de 25 ºC. Após o referido período, as sementes foram colocadas em copos plásticos, submersas em solução 0,075 % de sal de 2,3,5 trifenil tetrazólio, por três horas, à temperatura de 40 ºC ± 1 ºC, em estufa, para desenvolvimento da coloração (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998). Após o período de coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e as avaliações de vigor e viabilidade seguiram os critérios estabelecidos por França Neto; Krzyzanowski; Costa (1999).

Condutividade elétrica: Realizou-se o teste com quatro repetições de 100 sementes, para cada tratamento. As sementes foram acondicionadas para embeber em copos plásticos, submersas em água destilada, por 24 horas à temperatura de 20 ºC (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Após esse período, foi feita a leitura em condutivímetro, sendo os resultados expressos em $\mu mhos.g^{-1}.cm^{-1}$.

Experimentos em campo

A pesquisa foi realizada em área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (LPV/ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), no município de Piracicaba/São Paulo e na área experimental da EMBRAPA Soja, no município de Londrina/PR entre os períodos de outubro de 2018 a março de 2019 (para os dois locais) e outubro de 2019 a março de 2020 (experimento realizado apenas em Piracicaba). As precipitações pluviais e temperaturas médias do período de realização dos experimentos estão apresentadas na na Figura 4.

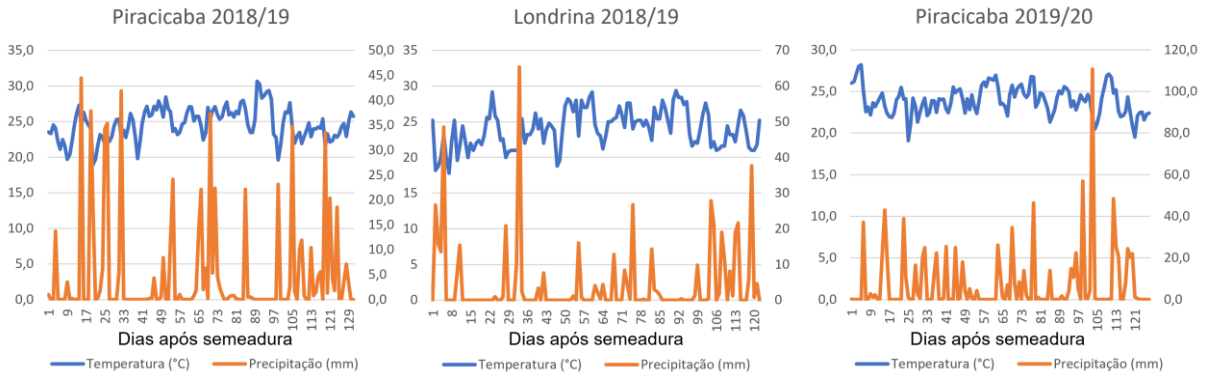

Figura 4. Dados meteorológicos: precipitação pluvial e temperaturas médias diárias, durante o ciclo da cultura da soja nas safras de Piracicaba2018/19, Londrina 2018/19 e Piracicaba 2019/20.

O delineamento experimental adotado para os experimentos de campo foi o delineamento de blocos casualizados (DBC), contendo 4 blocos com 8 unidades experimentais (parcela). Cada unidade experimental era composta de quatro linhas de 5 metros e, como área útil das unidades experimentais, descartou-se as linhas laterais de cada unidade e 50 centímetros das extremidades das linhas centrais.

Com base no teste de germinação, calculou-se a quantidade de sementes necessárias para semeadura, por metro, para que todos as amostras compartilhassem da mesma população de plantas recomendada pelos obtentores do material genético. O espaçamento utilizado entre linhas foi de 45 cm. A população sugerida para ambos os cultivares, segundo as empresas obtentoras do germoplasma, foi de 400 mil plantas/ha +5% de reserva técnica. Para isso, utilizou-se a quantidade de sementes/m para cada tratamento indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Germinação e quantidade de sementes/m utilizada para os cultivares CD 2728 IPRO e BMX Desafio RR para atingir a população desejada.

CD 2728 IPRO			BMX DESAFIO RR		
Trat.	**Germinação**	**Sementes/m**	**Trat.**	**Germinação**	**Sementesm**
0 %	98 %	19	0 %	95 %	19
2 %	89 %	21	2 %	88 %	21
4 %	89 %	21	4 %	88 %	21
6 %	87 %	21	6 %	86 %	21
8 %	82 %	22	8 %	83 %	21
10 %	83 %	22	10 %	83 %	21
12 %	80 %	22	12 %	80 %	22
14 %	80 %	22	14 %	77 %	23

O solo onde foi realizado os experimentos de Piracicaba/SP é classificado como Nitossolo Vermelho eutrófico de textura argilosa, apresentando relevo plano a levemente inclinado. O preparo do solo foi realizado de forma convencional e a abertura de sulcos e adubação foram realizadas em seguida. Com base na análise química do solo e na necessidade para o desenvolvimento da cultura, utilizou-se a formulação NPK 4-30-10 na dose de 300 $kg.ha^{-1}$ no sulco de semeadura. De forma complementar, forneceu-se em pré-emergência 200 $kg.ha^{-1}$ de cloreto de potássio, totalizando, assim, 150 $kg.ha^{-1}$ de potássio total. O fornecimento complementar de nitrogênio foi por meio da fixação biológica, utilizando 300 mL/ha de MasterFix Soja (*Bradyrhizobium japonicum*), aplicado no sulco de semeadura.

O solo do experimento de Londrina/PR é classificado como Nitossolo Vermelho eutrófico de textura argilosa. O preparo do solo foi realizado de forma convencional e a abertura de sulcos e adubação foram realizadas em seguida. Com base na análise química do solo e na necessidade para o desenvolvimento da cultura, utilizou-se a formulação NPK 5-37-00 na dose de 240 $kg.ha^{-1}$ no sulco de semeadura. O potássio foi fornecido em pré-emergência 249 $kg.ha^{-1}$ de cloreto de potássio, totalizando, assim, 150 $kg.ha^{-1}$ de potássio total. O fornecimento complementar de nitrogênio foi por meio da fixação biológica de nitrogênio, utilizando 300 mL/ha de MasterFix Soja (*Bradyrhizobium japonicum*), aplicado no sulco de semeadura.

Previamente à semeadura, as sementes de ambos cultivares foram tratadas com inseticida Cropstar, de princípio ativo Tiodicarbe e Imidacloprido, na dose de 500 mL por 100 kg de sementes, visando o controle de pragas iniciais na cultura. Posteriormente, realizou-se a semeadura dos experimentos com base nas quantidades de sementes presentes da tabela 1.

O manejo de plantas daninhas foi realizado com a aplicação do produto Gramoxone 200, princípio ativo Paraquat, em pré-semeadura do experimento na dose de 2 $L.ha^{-1}$ e em pós-emergência quando as plantas estavam no estádio fenológico V4, por meio do herbicida RoundUp WG, princípio ativo Glyphosate, na dose de 2 $L.ha^{-1}$. Além disso, foi realizada capina manual em algumas parcelas visando a minimização da matocompetição. O controle de pragas foi realizado com inseticidas de princípios ativos, Lambda-Cialotrina, Clorpirifós, Profenofós + Lufenuron, Acefato, Tiametoxam + Lambda-Cialotrina e Acetamiprido + Fenpropatrina por meio de pulverizações, seguindo dose de bula e número de

aplicações permitidos, sempre que necessário.

O manejo de doenças foi realizado por meio de fungicidas de princípios ativos Trifloxistrobina + Proticonazol, Azoxistrobina + Benzovindiflupir, Fluxapiroxade + Piraclostrobina e Mancozebe, através de pulverizações, seguindo a dose de bula e número de aplicações permitidas, sempre que necessário.

A irrigação, por meio de aspersores, foi utilizada apenas nos primeiros dias após a semeadura, permitindo, assim, a emergência adequada das plântulas e obtenção do estande de plantas almejado para o desenvolvimento do experimento.

Após a instalação dos experimentos em campo, foram realizadas as avaliações discriminadas a seguir.

Estande inicial de plantas: o estande inicial de plantas foi obtido 21 dias após a semeadura (DAS), por meio da média de 4 pontos de avaliação de 1m dentro da área útil da parcela, escolhidos de forma aleatória. Em cada ponto de avaliação contou-se o número de plantas emersas.

Altura de plantas no florescimento: a altura das plantas no florescimento foi obtida por meio da média de altura de 5 plantas de soja presentes na área útil da parcela. Adotou-se como altura o intervalo entre a base das plantas e o meristema apical das mesmas. Os dados foram expressos em cm.

Altura de plantas na colheita: a altura das plantas na colheita foi realizada a partir da média de altura de 5 plantas presentes na área útil da parcela, coletadas no dia anterior à colheita das unidades experimentais. Adotou-se como altura o intervalo entre a base das plantas e o meristema apical das mesmas. Os dados foram expressos em cm.

Estande final de plantas: o estande final de plantas foi obtido no dia anterior à colheita, por meio da média de 4 pontos de avaliação de 1m dentro da área útil da

parcela, escolhidos de forma aleatória. Em cada ponto de avaliação contou-se o número de plantas remanescentes em 1 metro.

Componentes de produtividade: para as avaliações dos componentes de produtividade foram determinados o número de vagens por planta, o número de grãos por vagem e a massa de mil grãos. Os dados foram obtidos a partir de 10 plantas coletadas na área útil da unidade experimental.

Produtividade: a produtividade dos tratamentos foi obtida por meio da colheita das plantas presentes nas áreas úteis das parcelas e posteriormente trilhadas em trilhadeira estacionária. Os grãos limpos foram pesados sendo determinado o teor de água e, em seguida, foi calculado o rendimento em $kg.ha^{-1}$, a 13% de teor de água. A massa de grãos utilizadas na determinação da massa mil grãos foi acrescentada ao restante da massa produzida por cada parcela, afim de se obter a produtividade real de cada unidade experimental.

Análise estatística

Os dados dos testes relacionados ao potencial fisiológico e as variáveis de campo foram submetidos à normaliadade de resíduos (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Bartlett). Os dados de potencial fisiológico apresentaram normalidade de residuos e homogeneidade de variância. Assim, procedeu-se à análise de variância (ANOVA). O teste de comparação de média utilizado foi do Scott-Knott ($p<0.05$).

Para os dados de campo, nenhum dos modelos para as variáveis contempladas atendeu todos os pressupostos paramétricos da ANOVA. Assim, optou-se por utilizar método de Kruskal-Wallis para análise dos dados (método não paramétrico equivalente a ANOVA) e como teste de comparação de média, utilizou-se o teste de Dunn. Os resultados foram expressos na forma de gráficos, com os intervalos de confiança ($\alpha = 0.05$) dos tratamentos para as variáveis consideradas

representados nos gáficos pelas barras com a média ao centro. Tratamentos com mesmo intervalo de confiança podem ser considerados equivalentes

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Potencial fisiológico das sementes

Foram observados efeitos das sementes esverdeadas sobre o potencial fisiológico das sementes de soja dos dois cultivares (Figura 5). Para a germinação (Figura 5), observou-se que os tratamentos, dos dois cultivares, que não possuíam sementes esverdeadas em sua composição, apresentaram germinação superior quando comparados aos demais tratamentos. Os tratamentos contendo 2 % e 4 % de sementes esverdeadas para o cultivar CD2728 IPRO (Figura 5a) apresentaram germinação inferior ao das sementes que não possuíam sementes esverdeadas, porém foram superiores aos demais tratamentos. No cultivar BMX Desafio RR, tal como ocorreu no outro cultivar, o tratamento que não possuía sementes esverdeadas teve desempenho superior à aqueles contendo sementes esverdeadas, contudo, desta vez, além dos tratamentos contendo 2 %, 4 % de sementes esverdeadas, também o tratamento com 6 % de sementes esverdeadas apresentou germinação superior aos demais tratamentos (Figura 5b).

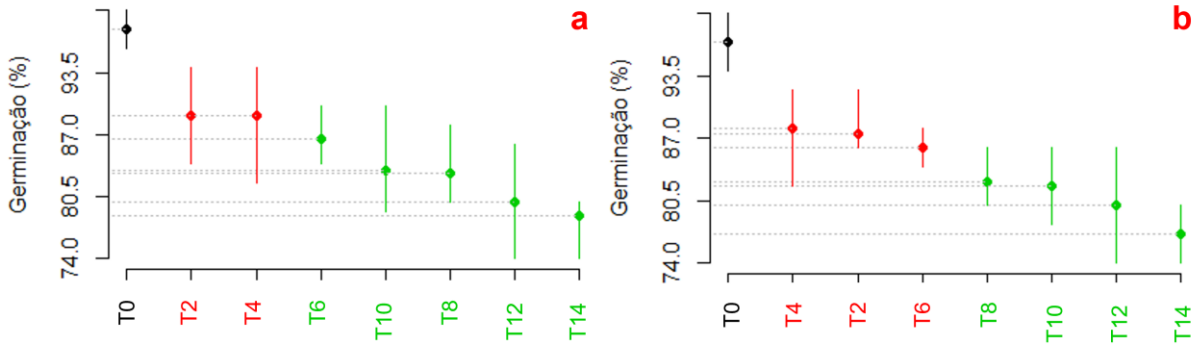

Figura 5. Germinação de sementes de soja dos tratamentos contendo diferentes porcentagens de sementes esverdeadas dos cultivares CD2728 IPRO (a) e BMX Desafio RR (b). As cores representam os diferentes grupos estatísticos obtidos pela análise de Scott-Knott (α = 0,05).

A medida em que a quantidade de esverdeadas aumenta, a germinação tende a diminuir. Resultados obtidos reafirmam os relatados por Pádua et. al. (2007), que observaram a redução do potencial fisiológico das sementes esverdadas de soja.

Durante o processo de germinação, todo o mecanismo metabólico das sementes é reativado, o processo respiratório e demais etapas do metabolismo da sementes são ativados, preparando a semente para a germinação (BEWLEY; BLACK, 1994). Porém, a presença de moléculas de clorofila nos tecidos das

sementes pode influenciar negativamente o processo germinativo, uma vez que reagem facilmente com outras moléculas, sofrendo oxidação, o que dará origem a espécies reativas de oxigênio (EROs), oxidando outras moléculas, incluindo lipídios e proteínas (SCHOEFS, 2002).

Os produtos originados da oxidação da clorofila podem ter efeitos oxidantes ou atividades fotoxidativas, além da clorofila reagir com compostos intermediários da peroxidação de lipídios e peróxidos (ENDO; USUKI; KANEDA, 1984). Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica, permeabilidade de membranas e liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos, culminando com a morte celular. Para sementes de espécies oleaginosas, como a soja, a peroxidação de lipídios é o principal mecanismo do processo de deterioração (BRACCINI; BRACCINI; SCAPIM, 2001).

Assim, todo o aparato metabólico de sementes que contenham quantidades consideráveis de moléculas de clorofila está parcial ou totalmente comprometido, o que irá afetar, diretamente o potencial fisiológico das sementes. Castro & Hillhorst (2000), Obroucheva (2010) e Bewley et. al (2013), destacaram que entre os principais eventos do processo de germinação estão o reparo do sistema de membranas, reparo de DNA, reparo e multiplicação de mitocôndrios, ativação de enzimas para síntese e hidrólise de substâncias como amido, proteína, aminoácidos, RNA mensageiro entre outros eventos. Com os danos causados pela reação das moléculas de clorofila, grande parte desses eventos pode não ocorrer ou ocorrer de forma errônea, o que resulta em plântulas anormais e sementes mortas.

Os testes de germinação são realizados em condições ótimas de temperatura e umidade, não indicando os possíveis efeitos das condições ambientais adversas em que as sementes podem ser submetidas. Assim, pode-se utilizar de uma série de testes de vigor, a fim de observar a resposta dessas sementes frente as condições adversas em que as sementes poderão enfrentar. Um dos testes mais utilizados é o de envelhecimento acelerado, tendo a premissa que tratamentos de sementes de maior vigor apresentam germinação superior, após esse procedimento.

Os resultados do teste de envelhecimento acelerado (Figura 6) apontam a divisão em dois grupos de tratamentos para o cultivar CD 2728 IPRO e a divisão em três grupos de tratamentos para o cultivar BMX Desafio RR. À medida em que a porcentagem de sementes esverdeadas aumentou, a germinação após o teste de envelhecimento acelerado apresentou declínio mais acentuado. Para ambos os

cultivares verifica-se que o limite para divisão do grupo de tratamentos com menor germinação é o lote contendo 8% de sementes esverdeadas. Os resultados obtidos são similares ao estudo de Costa el al. (2001), que observou que valores acima de 10% de sementes esverdeadas em tratamentos de sementes de soja resultam em declínio de vigor das sementes.

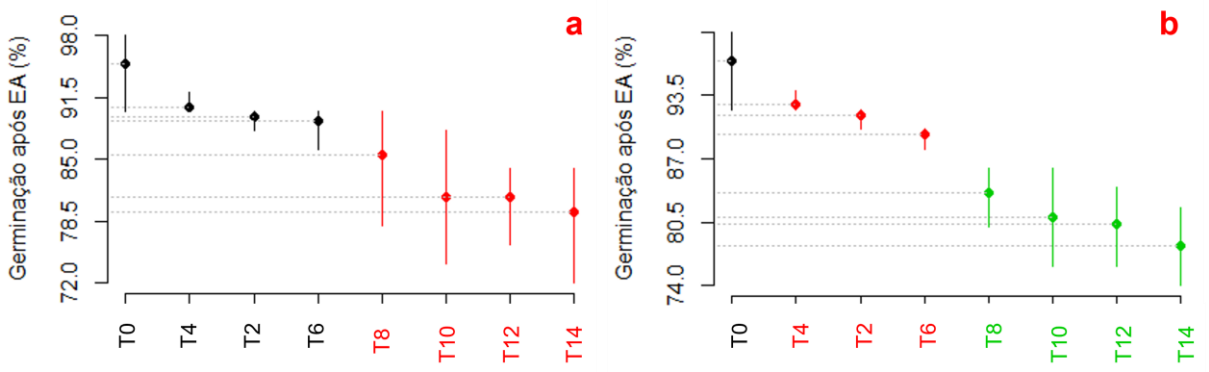

Figura 6. Germinação das sementes após o envelhecimento acelerado dos tratamentos contendo diferentes porcentagens de sementes esverdeadas dos cultivares CD2728 IPRO (a) e BMX Desafio RR (b). As cores representam os diferentes grupos estatísticos obtidos pela análise de Scott-Knott (α = 0,05).

Na Figura 7, é possível observar que a medida em que a porcentagem de sementes esverdeadas aumenta nos tratamentos de sementes de ambos os cultivares, maior é a quantidade de solutos lixiviados. O resultado corrobora com os resultados obtidos por Zorato et. al (2007) e Bordignon et. al (2017), que observaram maior condutividade elétrica em tratamentos de sementes de diversos cultivares de soja com altas porcentagens de sementes esverdeadas. Harringnton (1973) e Vieira e Krzyzanowski (1999) relacionaram a quantidade de lixiviados na solução de embebição à integridade das membranas celulares, afetando negativamente o processo de síntese de enzimas, a elongação celular e a divisão da célula e, consequentemente, o vigor das sementes.

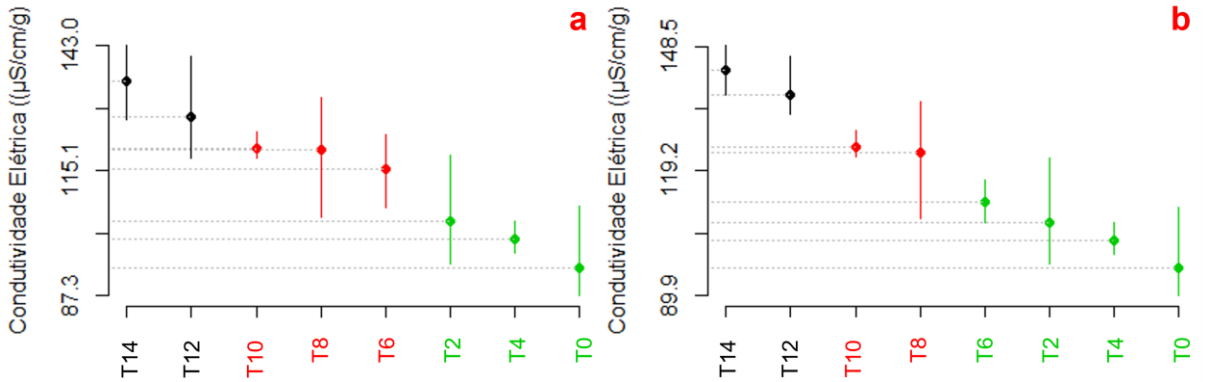

Figura 7. Condutividade elétrica das sementes de soja dos tratamentos contendo diferentes porcentagens de sementes esverdeadas dos cultivares CD2728 IPRO (a) e BMX Desafio RR (b). As cores representam os diferentes grupos estatísticos obtidos pela análise de Scott-Knott (α = 0,05).

Durante a perda de água das sementes, na fase final da maturação, o mecanismo metabólico das sementes atua para proteger a estrutura celular, uma vez que o sistema de membranas é sensível aos danos originados pela desidratação (Marcos-Filho, 2015). Assim, a perda de água gradual das sementes permite a atuação de mecanismos protetores, conferindo maior resistência aos desequilíbrios celulares causados pela desidratação. Porém, quando a desidratação ocorre de forma abrupta, promovida por condições ambientais adversas, como altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar e, ou dessecação por meio de herbicidas, aplicados no estádio fenológico errado, não há a atuação desses mecanismos protetores, o que leva a desorganização das membranas celulares (KERMODE, 1997). Além disso, a rápida desidratação de sementes de soja inibe parcial ou totalmente a degradação da clorofila. A presença de moléculas de clorofila nos tecidos das sementes incita uma série de reações que levam a peroxidação de lipídios, principal componente das membranas celulares.

Dessa forma, ao realizar o teste de condutividade elétrica em sementes de soja esverdeada, espera-se que quanto maior o nível de sementes esverdeadas no lote de sementes, maior a lixiviação de solutos celulares, devido à desorganização das membranas e, ou a reação da clorofila com os tecidos das sementes.

O teste de tetrazólio mostrou o impacto das sementes esverdeadas sobre o potencial fisiológico dos tratamentos de sementes de soja estudados. A análise da viabilidade das sementes do cultivar CD2728 IPRO (Figura 8a), indica que os tratamentos que continham de 0% a 8% de sementes esverdeadas formaram um grupo distinto dos tratamentos que possuiam 10%, 12% e 14% de sementes esverdeadas, sendo que as sementes do primeiro grupo apresentaram maior

viabilidade em relação às sementes do segundo grupo. Ao se analisar os resultados de viabilidade dos tratamentos do cultivar BMX Desafio (Figura 8b), é possível verificar a formação de 3 grupos distintos, de acordo com a porcentagem de viabilidade. O primeiro grupo, com maior viabilidade, foi composto pelos tratamentos com 0%, 2% e 4% de sementes esverdeadas. Já os tratamentos que continham de 6% a 12% de sementes esverdeadas formaram o grupo com valores intermediários de viabilidade. Por último, o lote que continha 14% de sementes esverdeads compôs o grupo com menor valor de viabilidade entre os tratamentos analisados.

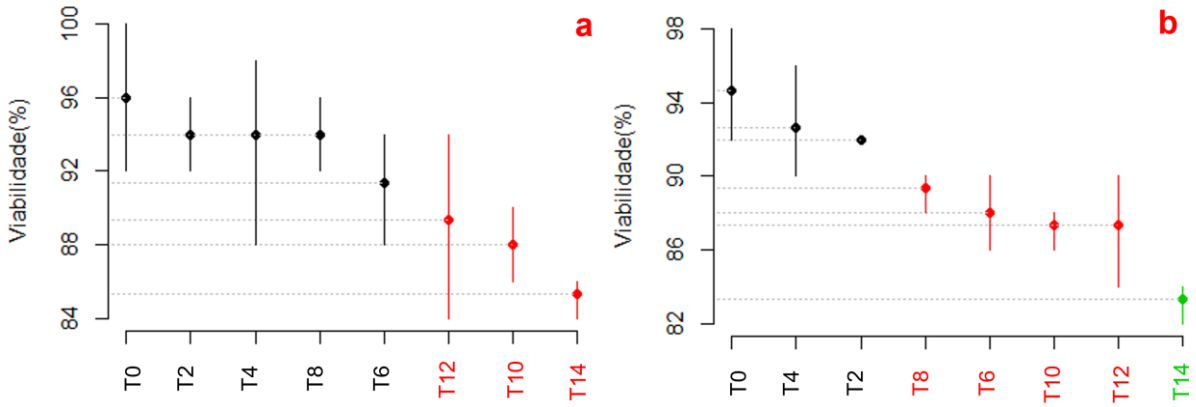

Figura 8. Resultados de viabilidade de sementes de soja, obtidos por meio do teste de tetrazólio, dos tratamentos contendo diferentes porcentagens de sementes esverdeadas dos cultivares CD2728 IPRO (a) e BMX Desafio RR (b). As cores representam os diferentes grupos estatísticos obtidos pela análise de Scott-Knott (α = 0,05).

Para a avaliação de vigor, por meio do teste de tetrazólio (Figura 9), observou-se uma maior sensibilidade na análise estatística, muito em função de como o teste é interpretado. Cada semente analisada é classificada como viável ou inviável, com os tipos de danos anotados. A classificação de viabilidade vai de 1 a 8, sendo sementes com notas de 1 a 5 consideradas viáveis, e sementes com notas de 6 a 8 consideradas inviáveis. Dentro das sementes viáveis, somente as que foram listadas com notas de viabilidade entre 1 e 3 são consideradas vigorosas (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018). Ainda segundo França-Neto e Krzyzanowski (2018), o nível de vigor é classificado da seguinte forma: (i) muito alto – igual ou superior a 90%; (ii) alto – entre 85 a 89%; (iii) médio – entre 75 a 84%; (iv) baixo – igual ou inferior a 74%.

Para o cultivar CD2728 IPRO (Figura 9a), os resultados de vigor também foram classificados em dois grupos distintos. Estes, porém, apresentaram diferenças em sua composição quando comparado aos seus resultados de viabilidade (Figura

8a). O grupo de maior vigor foi composto pelos tratamentos T0, T2 e T4. Já o grupo com menor vigor foi composto pelos tratamentos que continham de 6 % a 14 % de sementes esverdeadas. Apesar de serem considerados viáveis, os tratamentos com 6 % e 8 % de sementes esverdeadas apresentaram vigor classificado como médio, muito em razão da presença de tecidos deteriorados, ocasionados pela reação oxidativa entre molécula de clorofila e as membranas celulares (HÖRTENSTEINER; KRÄUTLER, 2011).

Para o cultivar BMX Desafio, também foram mantidas a formação de três grupos, quando comparado aos resultados de viabilidade (Figura 8b), com apenas uma pequena modificação no grupo com menor vigor (Figura 9b). O grupo de maior vigor foi composto pelos tratamentos T0, T2 e T4, com classificação de vigor como muito alta para o T0 e alto para os tratamentos T2 e T4. O grupo composto pelos tratamentos T6, T8 e T10 teve os seus níveis de vigor classificados como médio. Por outro lado, os tratamentos T12 e T14 formaram o grupo de menor vigor, tendo o vigor classificado como baixo.

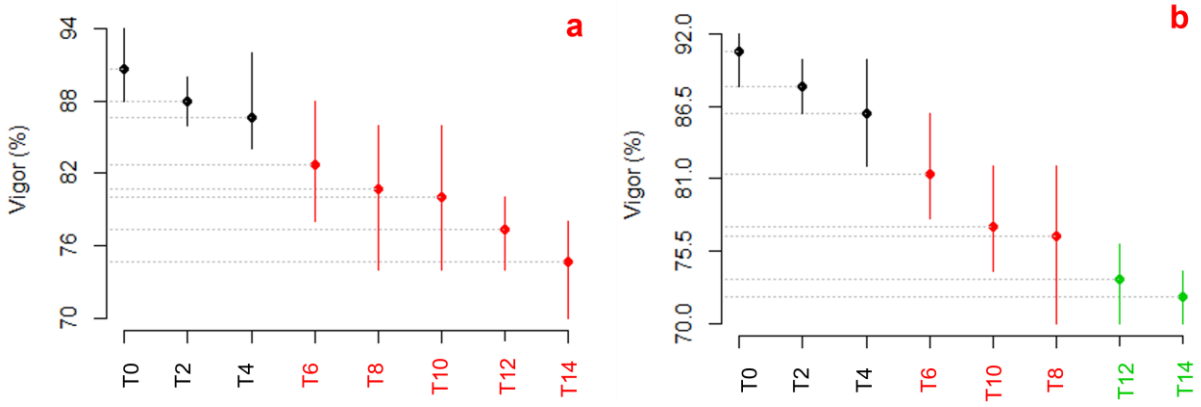

Figura 9. Resultados de vigor de sementes, obtidos por meio do teste de tetrazólio, dos tratamentos contendo diferentes porcentagens de sementes esverdeadas dos cultivares CD2728 IPRO (a) e BMX Desafio RR (b). As cores representam os diferentes grupos estatísticos obtidos pela análise de Scott-Knott (α = 0,05).

Os testes de germinação e envelhecimento acelerado necessitam de um número significativo de dias desde a sua instalação até avaliação final, o que, em muitos casos, não é interessante para a indústria sementeria de soja, uma vez que a identificação e diagnose rápida de problemas em cada etapa da cadeia produtiva é fundamental para tomadas de decisões que minimizem danos e assegurem a qualidade das sementes produzidas. Dessa forma, o teste de tetrazólio passou a ser o teste de vigor mais utilizado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de

soja, uma vez que os resultados são obtidos no mesmo dia de instalação do teste, apresentando alto grau de precisão e confiabilidade dos resultados.

Ao obter os dados de fluorescência de clorofila das sementes dos tratamentos utilizados nesse experimento, observou-se que os tratamentos que continham maior porcentagem de sementes esverdeadas, de ambos os cultivares, também possuíam maior fluorescência de clorofila (Figura 10). Observa-se que os grupos estatísticos formados para os tratamentos dos cultivares CD 2728 IPRO (Figura 10a) e BMX Desafio RR (Figura 10b) foram similares, com 4 grupos, diferindo apenas na composição dos grupos com menor fluorescência de clorofila. Para o cultivar CD 2728 IPRO, o grupo com menor fluirescência de clorofila foi formado apenas pelo lote contendo 0 % de sementes esverdeadas (T0). Já para o cultivar BMX Desafio RR, o grupo com menor fluiorescência de clorofila foi composto pelos tratamentos contendo 0 % e 2 % de sementes esverdeadas. Para ambos os cultivares, os tratamentos contendo a maior quantidade de sementes esverdeadas, 12 % e 14%, formaram o grupo estatístico com maior valor de fluorescência de clorofila.

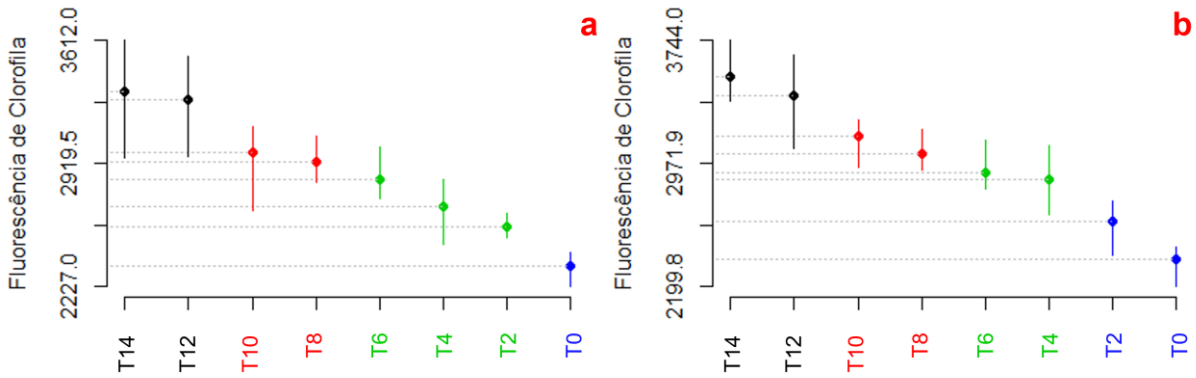

Figura 10. Fluorescência de clorofila das sementes de soja dos tratamentos contendo diferentes porcentagens de sementes esverdeadas dos cultivares CD2728 IPRO (a) e BMX Desafio RR (b). As cores representam os diferentes grupos estatísticos obtidos pela análise de Scott-Knott (α = 0,05).

Os resultados da presente pesquisa corroboram com os resultados obtidos por Cicero et al. (2009), que verificaram que quanto maior a fluorescência de clorofila nas semente de soja, maiores são os efeitos negativos sobre o seu potencial fisiológico. De maneira similar, Galletti et al. (2020) observaram que para sementes de tomate e de cenoura, os tratamentos cujas sementes apresentavam menor potencial fisiológico foram os que apresentaram maior sinal de fluorescência de clorofila.

Nas Figuras 11 e 12 é possível observar a composição de algumas amostras contendo 0 %, 8 % e 14 % de sementes esverdeadas de ambos os cultivares e as respectivas imagens de fluorescência de clorofila. Sementes que apresentam coloração mais clara são sementes que possuem o pigmento de clorofila nos tecidos. Quanto mais clara a semente, maior a quantidade de clorofila não degradada e, consequentemente, maior o sinal de fluorescência de clorofila da mesma.

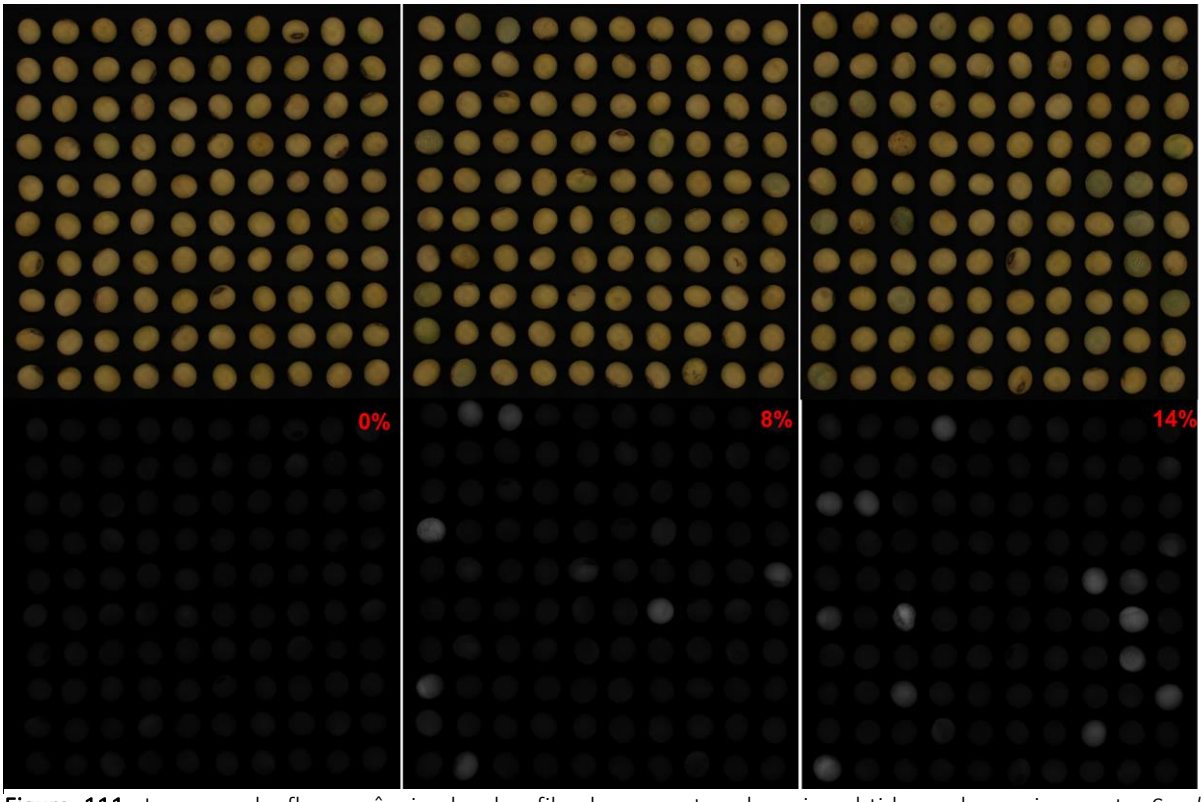

Figura 111. Imagens de fluorescência de clorofila de sementes de soja, obtidas pelo equipamento *Seed Reporter,* cultivar CD2728 IPRO, contendo 0%, 8% e 14% de sementes esverdeadas. A intensidade da coloração branca das sementes é diretamente proporcional a intensidade de flourescência de clorofila.

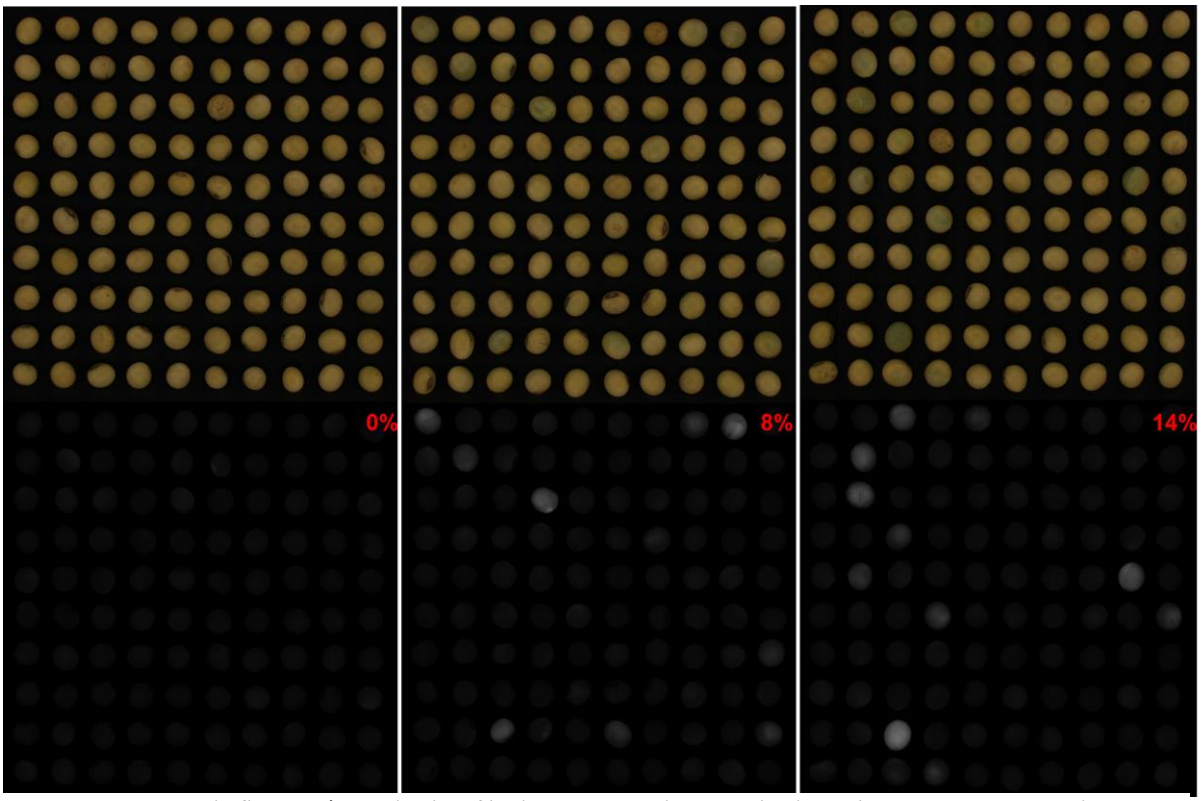

Figura 12. Imagens de fluorescência de clorofila de sementes de soja, obtidas pelo equipamento *Seed Reporter,* cultivar BMX Desafio RR, contendo 0%, 8% e 14% de sementes esverdeadas. A intensidade da coloração branca das sementes é diretamente proporcional a intensidade de flourescência de clorofila.

4.2. Desempenho das plantas em campo

Os resultados observados no experimento instalado em Piracicaba, na safra 2018/19, para estande inicial de plantas, estande final de plantas, altura de plantas no florescimento e altura de plantas na colheita serão apresentados e discutidos a seguir.

O estande incial dos tratamentos relativos ao cultivar CD272 IPRO que continham 8 %,10 %, 12 % e 14 % de sementes esverdeadas foi maior do que os tratamentos que continham 0 %, 2 %, 4 % e 6 % de sementes esverdeadas (Figura 13a). Porém, estatisticamente, apenas os tratamentos T0 e T2 apresentaram população significativamente diferente dos tratamentos T8 e T10. Uma possível explicação para isso é o fato de a medida em que a germinação dos tratamentos diminui, aumenta-se a quantidade de sementes utilizadas por metro para atingir a população desejada. Outra possível explicação para o referido fato foi relativo ao maior número de sementes utilizadas nos tratamentos com maior quantidade de sementes esverdeadas que poderiam não germinar (é importante destacar que após a semeadura, procedeu-se a irrigação por aspersão em todas as parcelas a fim de assegurar codições adequadas para a emergência das plântulas). Assim, apesar de apresentaram menor potencial fisiológico, os tratamentos com maior número de sementes esverdeadas, não passaram por condições ambientais adversas durante o processo de germinação, favorecendo um maior estande inicial de plantas.

Ao se analisar o estande final de plantas (Figura 13b), avaliado no dia da colheita, é possível observar que os tratamentos com 10 % e 14 % com sementes esverdeadas foram os que apresentaram maior população final. Alguns estudos que buscaram relacionar a população com a produtividade obtiveram resultados que apresentaram baixa resposta de plantas de soja à medida em que a população de plantas se modificava (MOORE, 1991; TOURINO; DE REZENDE; SALVADOR, 2002). A população final de plantas na cultura da soja é muito relativa, uma vez que a soja é conhecida como uma cultura com certa plasticidade de produção, onde a densidade de plantas modifica a morfologia das plantas e a sua relação com os componentes de produtividade, o que permite que a cultura se adeque às condições ambientais, permitindo a estabilidade de produção sob uma gama de amplitude de população. Vazquez et al. (2008) constatou que a cultura é capaz de suportar reduções significativas de população sem afetar a produtividade.

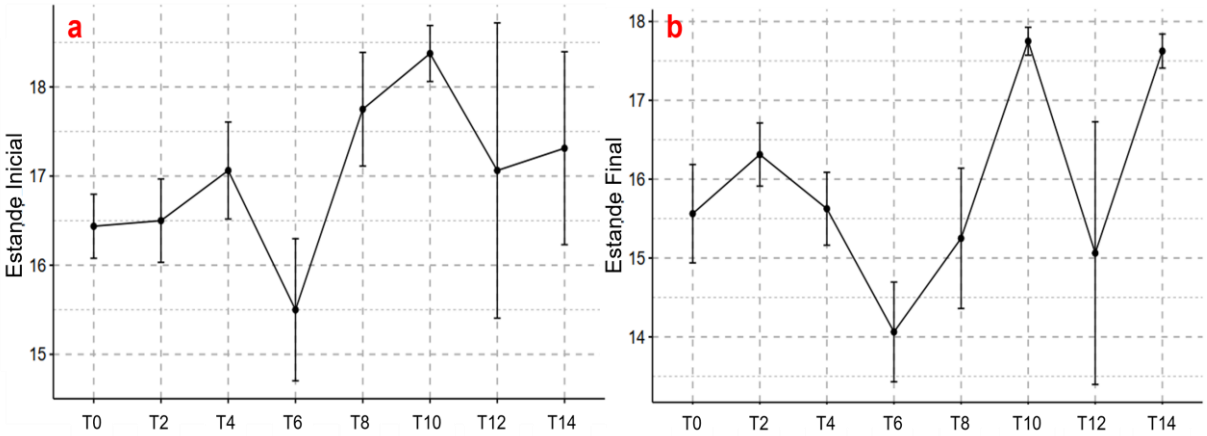

Figura 12. Estande inicial de plantas (a) e estande final de plantas (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, relativos ao experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2018/19.

A altura das plantas de soja, apesar de não ser um componente de produtividade, está diretamente relacionado com a produtividade, uma vez que influencia na quantidade nós reprodutivos e, consequentemente, a quantidade de vagens e grãos por planta. Na Figura 14 é possível observar a altura das plantas dos tratamentos no florescimento (Figura 14a) e a altura final das plantas mensuradas no dia da colheita (Figura 14b). Os tratamentos com 4 % e 6 % de sementes esverdeadas foram os que apresentaram maior altura no início do florescimento, apresentando diferença significativa quando comparados aos tratamentos com 12 % e 14 % de sementes esverdeadas (Figura 14a). O tratamento T0 apresentou diferença significativa apenas em relação ao tratamento T12. França-Neto et al. (1983) observaram que plantas de soja originadas de tratamentos com alto vigor apresentaram 12,8 % a mais de altura quando comparados a plantas originadas de tratamentos de sementes com baixo vigor.

O cultivar CD 2728 IPRO apresenta crescimento indeterminado, o que faz com que o mesmo inicie o florescimento no terço inferior da planta e continue até atingir o meristema apical, cessando o crescimento das plantas. Assim, a altura final das plantas observadas no experimento é maior do que a observada no início do florescimento (Figura 14b). O tratamento sem a presença de sementes esverdeadas (T0) apresentou maior altura final das plantas, apresentando, porém, diferenças significativas apenas quando comparado os tratamentos T2, T8 e T12. A diferença entre o tratamento contendo 0 % de sementes esverdeadas, que apresentou maior altura, e o lote contendo 12 % de sementes esverdeadas, com menor altura final de plantas, foi de cerca de 5cm.

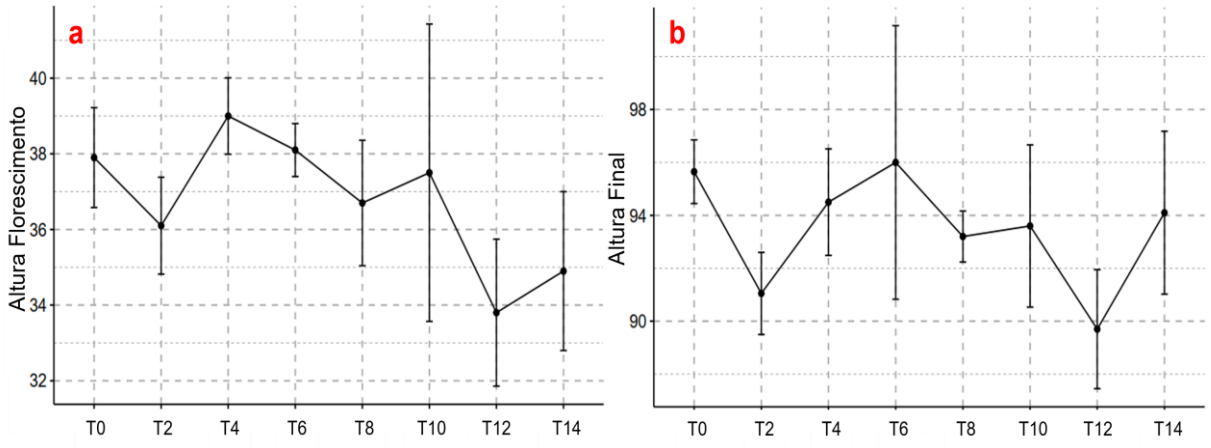

Figura 13. Altura das plantas no florescimento (a) e altura final das plantas (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, relativas ao experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2018/19.

Os componentes de produtividade da soja, além do número de plantas/área, são formados pelo número de vagens por planta, número de grãos por vagem e pela massa de grãos, comumente expresso em peso de mil grãos. Na Figura 15 é possível verificar os resultados obtidos para o número de vagens por planta (Figura 15a) e para o número de grãos por vagem (Figura 15b). O número de vagens por planta foi similar para a maioria dos tratamentos, onde apenas o tratamento T12 se diferenciou dos demais por apresentar menor número de vagens (Figura 15a). Naturalmente, na cultura da soja, as flores são produzidas em abundância, porém, um elevado número de flores e de vagens jovens são abortados, variando entre 20 % a 82 % do total das estruturas reprodutivas produzidas (CARLSON et al., 1987; NONOKAWA et al., 2012). Porém sob condições adversas, quando as plantas são menos vigorosas, o número de abortamento será maior comparado ao das plantas mais vigorosas, resultando em menos vagens por planta.

Por outro lado, ao se analisar os resultados obtidos da variável de graõs por vagem (Figura 15b) observa-se que, apesar de não apresentar diferenças estatísticas, os tratamentos com menor porcentagem de sementes esverdeadas apresentaram maior número médio de grãos por vagem. Estatisticamente, os tratamentos T2, T4 e T6 apresentaram maior número de grãos por vagem quando comparados ao tratamento contendo 14 % de sementes esverdeadas. A quantidade de grãos por vagem contabilizada levou em conta somente grãos bem formados, excluindo-se aqueles abortados. Os tratamentos T10 e T14, com maior quantidade de sementes esverdeadas, apresentaram maior número de grãos abortados.

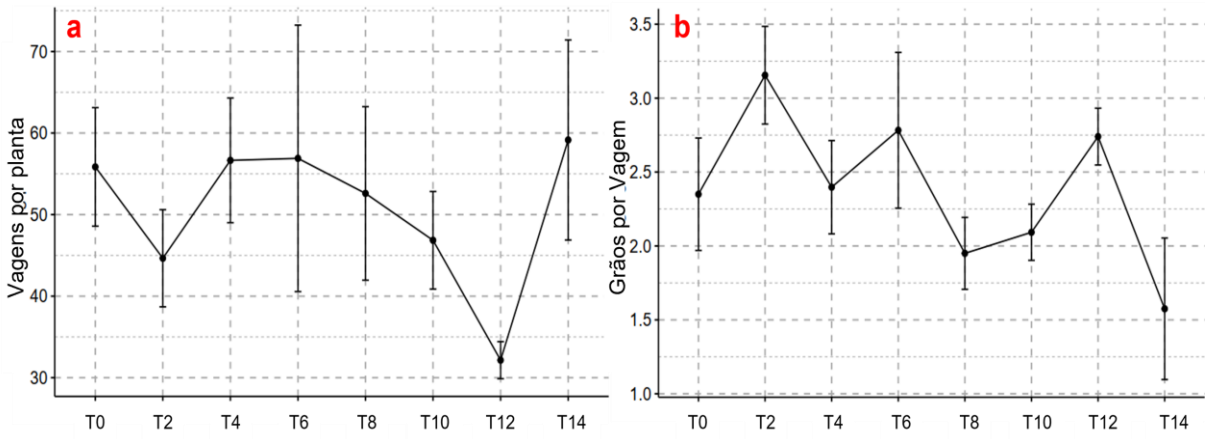

Figura 14. Número de vagens por planta (a) e número de grãos por vagem (b) dos oito ltratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, relativos ao experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2018/19.

A massa de de grãos está diretamente relacionada à capacidade em que a planta possui em translocar fotoassimilados produzidos nas folhas para os grãos. Os resultados obtidos de massa de mil grãos (Figura 16a) foram, de maneira geral, similares entre os tratamentos, tendo apenas o tratamento com 12 % de sementes esverdeadas apresentado menor massa de grãos quando comparado aos demais tratamentos.

Ao analisar os resultados de produtividade (Figura 16b), os tratamentos T0, T2, T4 e T6 não apresentaram diferenças significativas entre si e foram superiores em relação aos tratamentos T8, T10, T12 e T14, ficando evidenciado que a partir de 8 % de sementes esverdeadas presentes na semeadura resultaram em perdas de produtividade. Costa el al. (2001) e Pádua et al. (2005) relataram que tratamentos de sementes de soja que contenham acima de 10% de sementes esverdeadas não devem ser utilizados para semeadura, uma vez que podem resultar em menores produtividades; entretanto, naquele trabalho, os autores não realizaram experimentos de campo que comprovassem as referidas informações. Assim, a partir dos resultados de desempenho de sementes esverdeadas em campo, observou-se impactos negativos sobre a produtividade a partir 8 % de sementes esverdeadas presentes e não acima de 10 %, como relatado pelos autores citados.

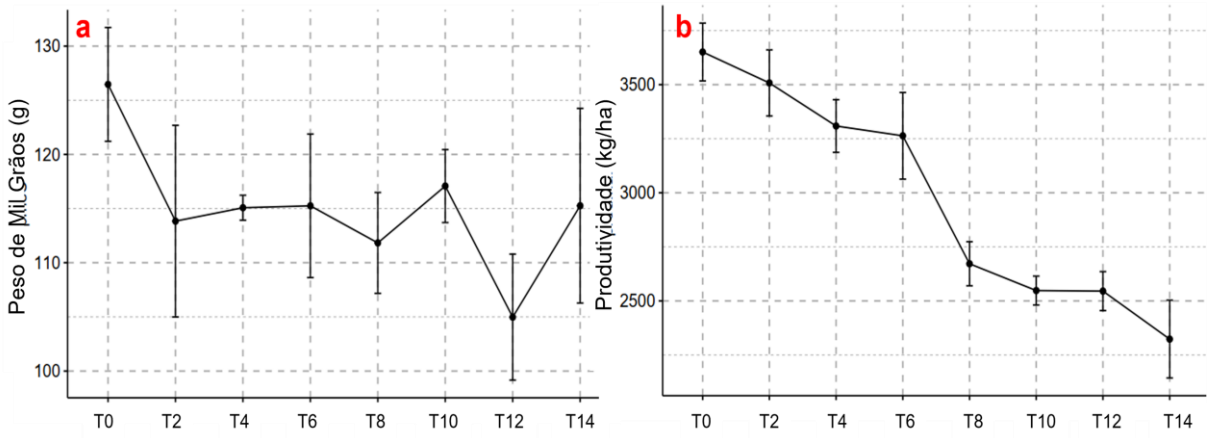

Figura 15. Massa de mil grãos (a) e Produtividade (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, relativas ao experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2018/19.

Na safra de 2018/19 o experimento com o mesmo cultivar foi realizado em Londrina/PR. Os resultados observados, de forma geral, foram similares aos observados na área experimental de Piracicaba/SP, na mesma safra.

A variável de estande inicial apresentou diferenças signifitivas entre o tratamento que continha 0% de sementes esverdeadas e os demais tratamentos, sendo o tramento com 0 % de sementes esverdeadas inferior aos demais (Figura 17a). Essa diferença observada pode ser justificada pelo fato de que a quantidade de sementes utilizada na semeadura variou conforme a porcentagem de germinação de cada tratamento, tendo a quantidade de sementes utilizadas na semeadura menor para o tratamento T0 que evidentemente apresentava o maior valor de germinação.

Conforme relatado no experimento de Piracicaba, também no experimento de Londrina foi realizada irrigação após a seameadura para assegurar uma adequada emergência das plântulas; evidentemente, sementes esverdeadas que apresentam vigor mais baixo podem germinar, como de fato ocorreu nos dois experimentos.

Por outro lado, ao analisar os dados referentes ao estande final de plantas de cada tratamento (Figura 17b) observa-se que o tratamento sem a presença de sementes esverdeadas (T0) praticamente manteve o estande ao passo que todos tratamentos com a presença de sementes esverdeadas tiveram redução no estande, sendo que alguns destes tratamentos (T2 e T10) apresentaram maiores reduções; é importante destacar que muitas sementes esverdeadas que germinaram tinham vigor mais baixo, principalmente aquelas com coloração verde mais pronunciada e

com maior quantidade de clorofila não degradada, que acabaram morrendo antes da colheita.

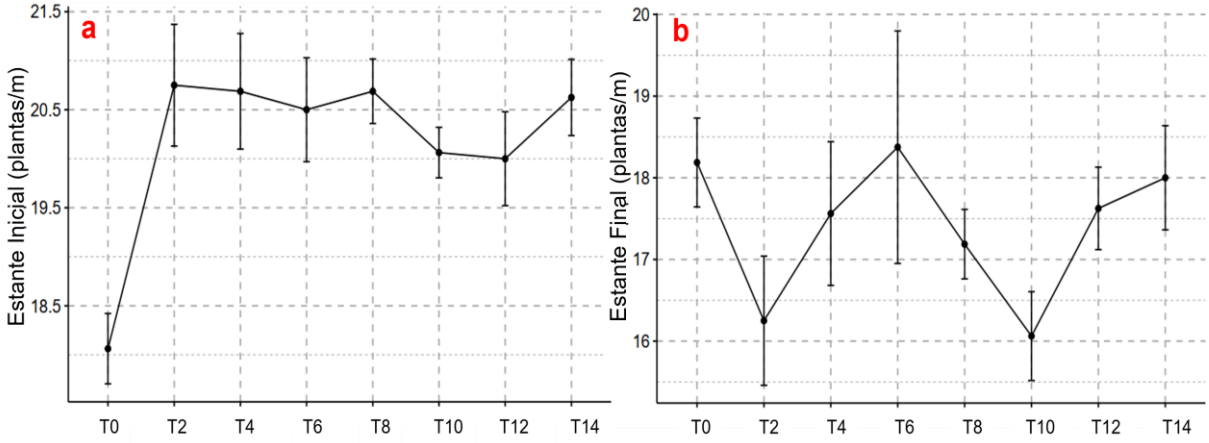

Figura 16. Estande inicial de plantas (a) e estande final de plantas (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, em experimento realizado em Londrina/PR, safra 2018/19.

Tratamentos que possuem sementes com baixo vigor podem não sofrer impacto negativo no estabelecimento no estande inicial, porém o baixo vigor das sementes pode provocar reduções na velocidade de emergência das plântulas, uniformidade de emergência das plântulas, tamanho inicial de plantas, morte das plântulas antes de completarem o ciclo e, consequentemente, causarem reduções no estande final, exatamente como ocorreu na presente pesquisa. Segundo Kolchinski et al. (2005), os fatores aqui relatados podem afetar o acúmulo de matéria seca/área e, consequentemente, afetar o rendimento final da cultura.

A desuniformidade de emergência de plântulas, segundo Egli (1993), causa vantagens competitivas para as plantas de soja cujas sementes germinaram primeiro. Nafziger et al. (1991) observaram, para a cultura do milho que o aumento da desuniformidade de emergência de plântulas reduziu, significativamente, o rendimento das plantas cujas plântulas tiveram emergência mais tardia.

Na Figura 18, é possível observar a altura das plantas durante o florescimento (Figura 18a) e a altura de plantas ao final do ciclo da cultura (Figura 18b). Em relação ao florescimento, a altura das plantas foi, de maneira geral, similar, sendo que apenas o tratamento que continha 2 % de sementes esverdeadas apresentou maior altura quando comparado aos demais tratamentos. No final do ciclo da cultura, verificou-se que os tratamentos que continham 0 %, 2 % e 4 % apresentaram maior

altura quando comparados aos tratamentos com 8 % e 14 % de sementes esverdeadas, o que corrobora com os resultados obtidos por Egli (1993).

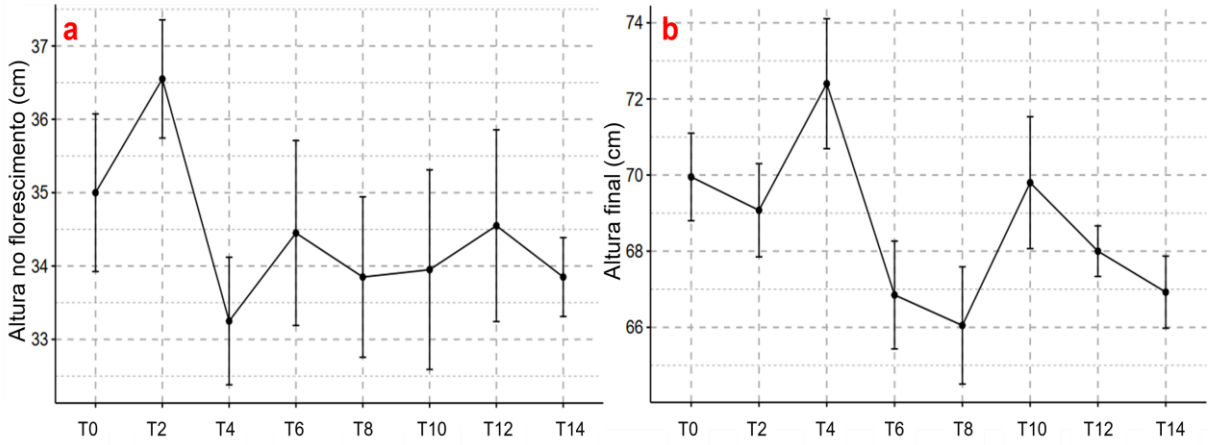

Figura 17. Altura das plantas no florescimento (a) e altura final das plantas (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, no experimento realizado em Londrina/PR, safra 2018/19.

A altura das plantas, na cultura da soja, está diretamente relacionada a sua capacidade de produção, uma vez que apresenta maior quantidade de nós reprodutivos (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). Além disso, plantas originadas de sementes com alto vigor tendem a apresentar maior desenvolvimento inicial, o que pode favorecer em maior altura quando comparadas às plantas originadas de tratamentos de sementes de baixo vigor.

Em relação aos componentes de produtividade, o tratamento que não continha sementes esverdeadas em sua composição apresentou maior número de vagens quando comparado aos tratamentos T2, T8, T10, T12 e T14 (Figura 19a). De maneira geral, observou-se que os tratamentos que continham sementes esverdeadas em sua composição apresentaram maior número de grãos por vagem (Figura 19b). Entretando, a medida em que a quantidade de sementes esverdeadas aumentou nos tratamentos, menor o número de vagens por planta (Figura 19a). O número de grãos por planta é um importante fator para determinar a produtividade, uma vez que plantas que apresentam maior quantidade grãos, tende a ter uma maior produção por área (SEDIYAMA, 2013; SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). Aliado ao número de vagens por planta, a quantidade de grãos por vagens também é um importante fator que afeta a produtividade da cultura da soja.

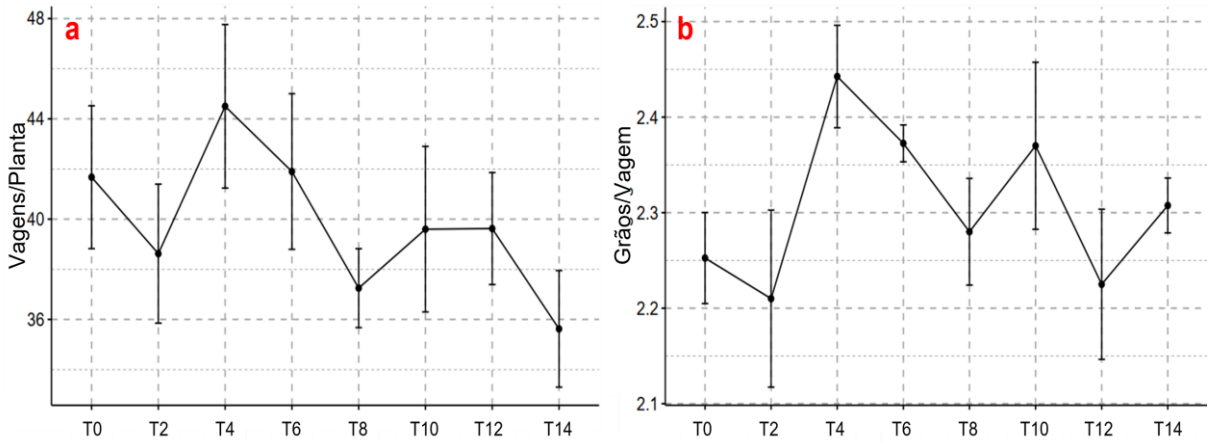

Figura 18. Número de vagens por planta (a) e número de grãos por vagens (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, no experimento realizado em Londrina/PR, safra 2018/19.

Quanto à massa de mil graõs (Figura 20a), verificou-se que os tratamentos apresentaram, de maneira geral, massas semelhantes, sendo que apenas o tratamento T2 teve superioridade em relação aos tratamentos T0, T12 e T14. O menor número de vagens por planta e menor número de grãos por vagens dos tratamentos com maior porcentagem de sementes esverdeadas pode ter favorecido a relação fonte/dreno, proporcionando massas semelhantes entre a maioria dos tratamentos estudados. Em relação a produtividade, assim como observado em Piracicaba/SP, safra 2018/19, utilizando o mesmo cultivar, a interação entre os componentes de produtividade, como estande de plantas, vagens por planta, grãos por vagem e massa de mil grãos, resultou em dois principais grupos de produtividade (Figura 20b). O primeiro grupo, com maior produção, foi composto pelos tratamentos que continham de 0 % a 6 % de sementes esverdeadas. O segundo grupo, com menor produtividade, foi composto pelos tratamentos com 8 % a 14 % contendo sementes esverdeadas.

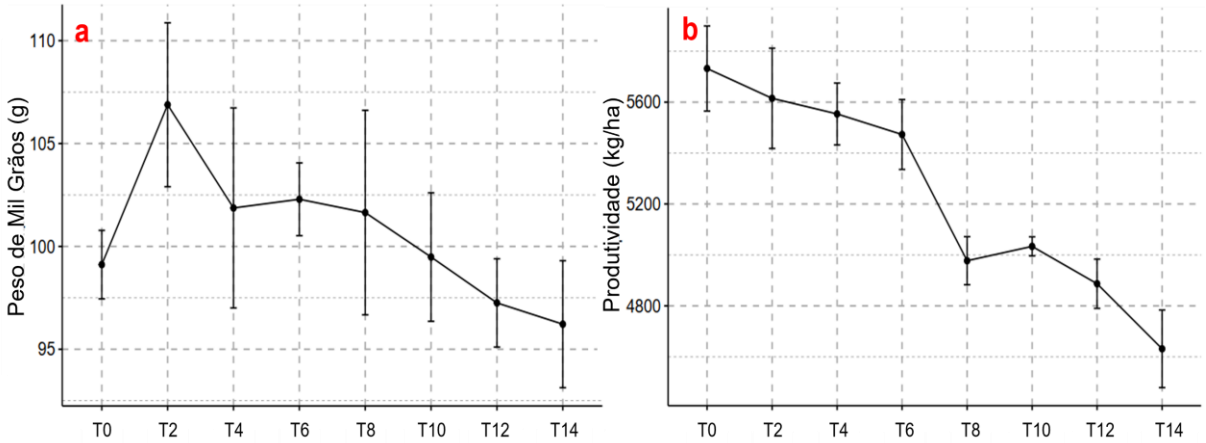

Figura 19. Massa de mil grãos (a) e produtividade (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar CD2728 IPRO, no experimento realizado em Londrina/PR, safra 2018/19.

Para o terceiro experimento realizado em Piracicaba, na safra 2019/20, agora com o cultivar BMX Desafio, observou-se que o estande inicial não apresentou diferença entre os tratamentos estudados (Figura 21a). Ao se analisar os resultados do estande final de plantas (Figura 21b), observa-se comportamento similar ao observado no estande inicial, sendo que apenas o tratamento T8 apresentou estande final inferior ao dos tratamentos T10 e T12.

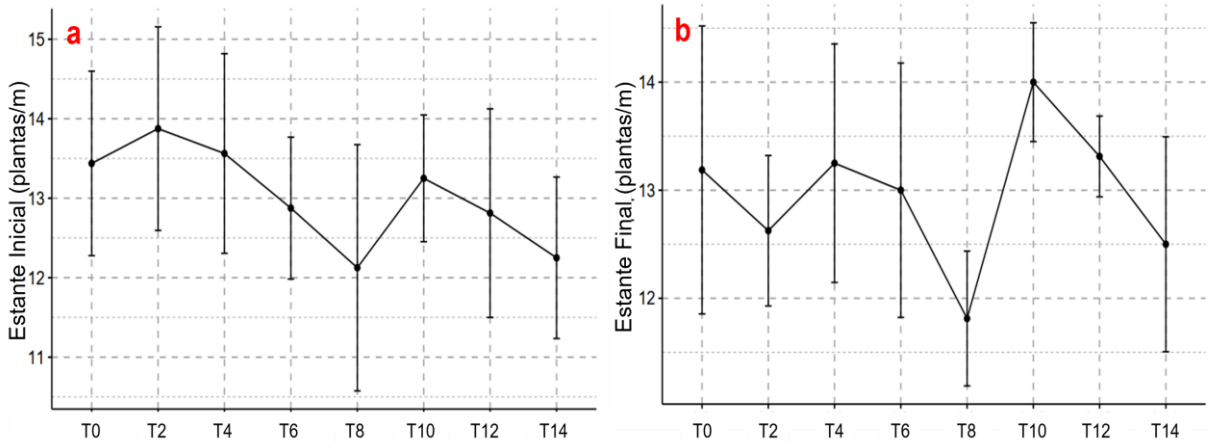

Figura 20. Estande inicial de plantas (a) e estande final de plantas (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar BMX Desafio, no experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2019/20.

Em relação a altura das plantas observada no início do florescimento (Figura 22a), é possível verificar que os tratamentos T0, T2 e T4 apresentaram alturas superiores aos dos tratamentos T6 e T8; entretanto, os tratamentos T6 e T8 apresentaram comportamento similar aos tratamentos T10, T12 e T14, Quanto à altura no final do ciclo (Figura 22b), observou-se que os tratamentos T0, T2 e T4 apresentaram alturas superiores ao do tratamento T14. Ao comparar somente o

tratamento T2 com os demais tratamentos, verificou-se superioridade do mesmo em relação aos tratamentos que continham porcentagem de sementes esverdeadas superiores a 6%.

Para algumas culturas, como o caso do trigo, verificou-se que diferenças no vigor do lote de sementes resultaram em diferenças na taxa de crescimento inicial relativo, com efeitos refletidos em estádios posteriores do desenvolvimento das plantas, em que as plantas provenientes de tratamentos com potencial fisiológico eleveado obtiveram maior produtividade (KHAH; ROBERTS; ELLIS, 1989). Para soja, Scheeren et al. (2010) observaram que tratamentos com maior vigor apresentaram maior altura, resultando em maior produtividade.

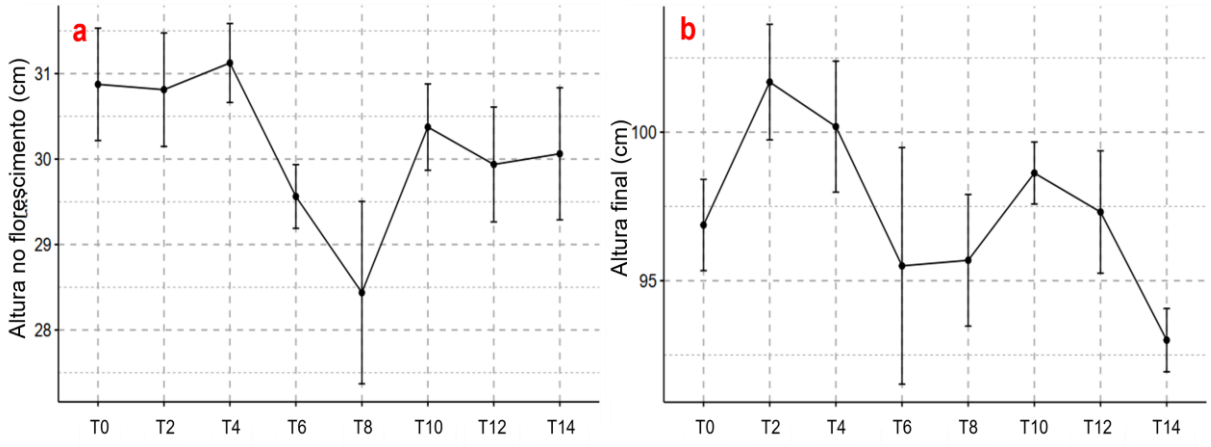

Figura 21. Altura das plantas no florescimento (a) e altura final das plantas (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar BMX Desafio, no experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2019/20.

O número de vagens por planta observado apresentou diferenças quando se faz o confronto do tratamento T0 com os tratamentos T2, T6, T8, T10 e T14, sendo que o tratamento T0 foi o que apresentou maior número de vagens, sendo cerca de 10 % a 15 % superior aos citados tratamentos (Figura 23a). Quanto ao número de grãos por vagem, verificou-se comportamenro similar entre os tratamentos T0, T2, T4 e T6, os quais foram superiores nem relação aos tratamentos T10, T12 e T14, ao passo que o tratamento T8 teve comportamento intermediário (Figura 23b).

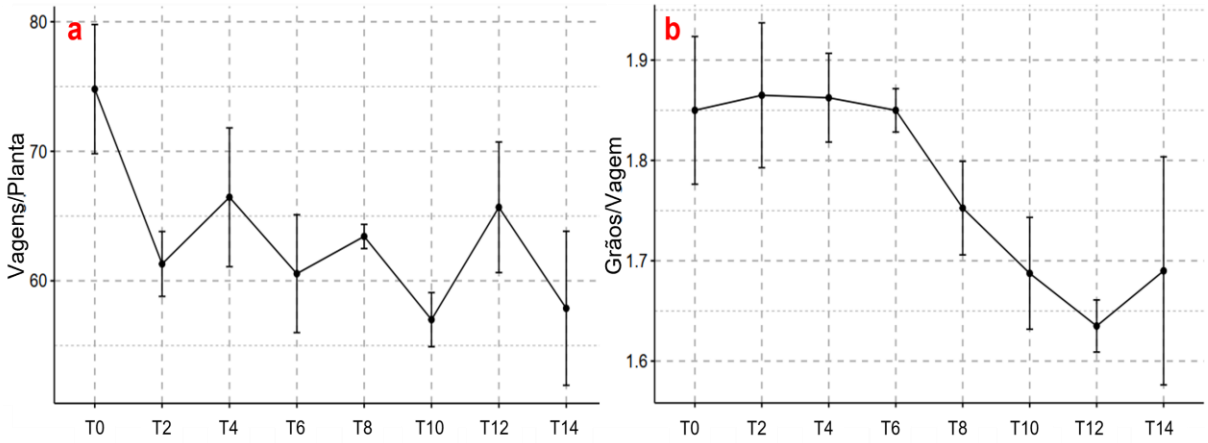

Figura 22. Número de vagens por planta (a) e número de grãos por vagem (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar BMX Desafio, no exrealizado em Piracicaba/SP, safra 2019/20.

Quanto a massa de mil grãos (Figura 24a), foi observado comportamento similar entre os tratamentos. Por outro lado, os tratamentos T0, T2 e T3 apresentaram produtividades similares e foram superiores aos demais tratamentos (Figura 24b).

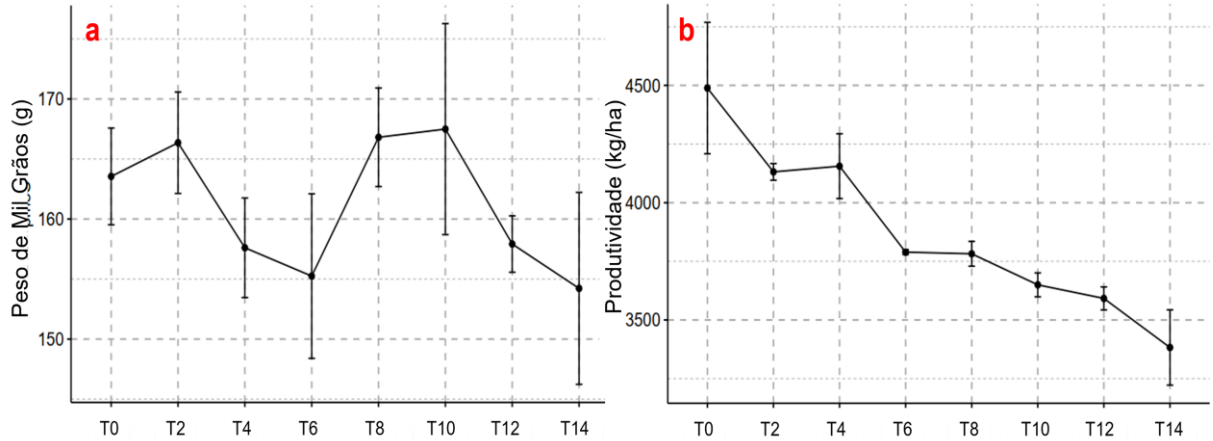

Figura 23. Massa de mil grãos (a) e produtividade (b) dos oito tratamentos de sementes de soja, cultivar BMX Desafio, no experimento realizado em Piracicaba/SP, safra 2019/20.

Levando-se em cosideração os três experimentos de campo, os dois primeiros realizados em dois locais (Piracicaba e Londrina) na safra 2018/19 com o cultivar CD272 IPRO e o terceiro experiment realizado em Piracicaba na safra 2019/20 com o cultivar BMX Desafio, ficou evidenciada que a presença, na semeadura, de mais do que 6 % de sementes esverdeadas, ou seja, com mais de 6 % de sementes

contendo clorofila não degradada, tem reflexos negativos na produtividade de grãos. Assim, tratamentos de sementes de soja que apresentem mais do que 6 % de sementes esverdeadas não devem ser utilizados para semeadura.

5. CONCLUSÕES

A presença de mais do que 6 % de sementes esverdeadas de soja, ou seja, com mais do que 6 % de sementes contendo clorofila não degradada, afeta a produtividade de grãos. Assim, tratamentos de sementes contendo mais do que 6 % de sementes esverdeadas não devem ser utilizados para semeadua.

REFERÊNCIAS

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

ANDRADE, D.; PIRES, R.; CARVALHO, M.; SANTOS OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, A.; SILVA, M.; PINTO, C. Detection of green seeds in soybean lots by the seeds analisys system (SAS). **International Journal of Current Research**, [s. l.], v. 8, p. 26462–26465, 2016.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 1. ed. New York: Plenum Press, 1994.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M.; HOLMES, P. **The encyclopedia of seeds: science, technology and uses.** Wallingford, UK: CABI Publishing, 2006.

BOHNER, H. **Green Soybeans**, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2005. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/green_beans02.htm>

BORDIGNON, B. C. S.; VEIGA, V. V.; BIANCHINI, F.; SHIMOIA, E. P. Percentual de sementes esverdeadas e sua influência na qualidade fisiológica de doze cultivares de soja. **PERSPECTIVA**, [s. l.], v. v.41, n. 155, p. 25–33, 2017.

BRACCINI, A. L.; BRACCINI, M. C. L.; SCAPIM, C. A. Mecanismos de deterioração de sementes. **Informativo ABRATES**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 10–15, 2001.

CARLSON, D. R. .; DYER, D. J. .; COTTERMAN, C. D.; DURLEY, R. C. The Physiological Basis for Cytokinin Induced Increases in Pod Set in IX93-100 Soybeans. **Plant Production Science**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 233–239, 1987.

CICERO, S. M.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. Use of chlrophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 145–151, 2009.

CONAB. **Séries Históricas de Grãos - Soja**. 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/item/download/31214_aa0666b1afe52788a92abce2658e68d9>.

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

DELOUCHE, J. C. Seed deterioration. **Seed World**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 14–15, 1963.

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

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; INOMOTO, M. M.; SLIWINSKA, E.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. Meloidogyne javanica infection of soybean plants: Plant response, seed quality and green seeds occurrence. **Seed Science and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 409–420, 2015.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. .; BARRETO, J. . Efeitos de níveis de vigor das sementes sobre diversas características agronômicas de soja. In: **Resultaados de Pesquisa de Soja 1982/83**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1983. p. 70–73.

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 – Série Sementes.** Londrina.

FRANÇA-NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; CARVALHO, M. L. M. De; COSTA, O.; BRUMATTI, P. S. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Da; HENNING, A. A.; SANCHES, D. P. Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica. **Embrapa - Circular Técnica, 38**, Londrina, p. 1–8, 2005.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja.** 1a. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2018.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PÁDUA, G. P.; LORINI, I.; HENNING, F. A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidadeDocumentos 380**. Londrina.

FRANÇA-NETO, J. de B.; PÁDUA, G. P. De; KRZYZANOWSKI, F. C.; CARVALHO, M. L. M. De; HENNING, A. A.; LORINI, I. Semente Esverdeada de Soja: Causas e Efeitos Sobre o Desempenho Fisiológico. **EMBRAPA - Circular Técnica 91**, Londrina, p. 1–16, 2012.

GALLETTI, P. A.; CARVALHO, M. E. A.; HIRAI, W. Y.; BRANCAGLIONI, V. A.; ARTHUR, V.; BARBOZA DA SILVA, C. Integrating Optical Imaging Tools for Rapid and Non-invasive Characterization of Seed Quality: Tomato (Solanum lycopersicum L.) and Carrot (Daucus carota L.) as Study Cases. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 11, n. December, p. 1–17, 2020.

GAO, S.; GAO, J.; ZHU, X.; SONG, Y.; LI, Z.; REN, G.; ZHOU, X.; KUAI, B. ABF2, ABF3, and ABF4 Promote ABA-Mediated Chlorophyll Degradation and Leaf Senescence by Transcriptional Activation of Chlorophyll Catabolic Genes and Senescence-Associated Genes in Arabidopsis. **Molecular plant**, England, v. 9, n. 9, p. 1272–1285, 2016.

HALL, D. O.; RAO, K. K. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1980.

HARRINGTON, J. . Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 453–461, 1973.

HAY, F. R.; TIMPLE, S.; VAN DUIJN, B. Can chlorophyll fluorescence be used to determine the optimal time to harvest rice seeds for long-term genebank storage? **Seed Science Research**, [s. l.], v. 25, v. 2015/04/08, n. 3, p. 321–334, 2015.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 8–15, 1996.

HIRASHIMA, M.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Light-independent cell death induced by accumulation of pheophorbide a in Arabidopsis thaliana. **Plant & cell physiology**, Japan, v. 50, n. 4, p. 719–729, 2009.

HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll Degradation During Senescence. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 55–77, 2006.

HÖRTENSTEINER, S. Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 505–517, 2013.

HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1807, n. 8, p. 977–988, 2011.

HÖRTENSTEINER, S.; WÜTHRICH, K. L.; MATILE, P.; ONGANIA, K. H.; KRÄUTLER, B. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 25, p. 15335–15339, 1998.

JACKSON, A. H. Structure, properties and distribution of chlorophylls. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. 2nd. ed. London: Academic Press, 1976. p. 1–63.

JALINK, H.; FRANDAS, A.; VAN DER SCHOOR, R.; BINO, J. B. Chlorophyll fluorescence of the testa of brassica oleracea seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 55, p. 88–93, 1998.

KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance seeds. **Seed Science Research**, [s. l.], v. 7, p. 75–95, 1997.

KHAH, E. M. .; ROBERTS, E. H. .; ELLIS, R. H. Effects on seed ageing on growth and yield of spring wheat at different plant-population densities. **Field Crops Research**, [s. l.], v. 20, p. 175–190, 1989.

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

KRAUTLER, B. Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites. In: KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. (Eds.). **The Porphyrin Handbook**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 183–209.

LI, C.; WANG, X.; MENG, Z. Tomato seeds maturity detection system based on chlorophyll fluorescence. **Optical Design and Testing VII**, [s. l.], v. 10021, p. 1–7, 2016.

LI, Z.; PENG, J.; WEN, X.; GUO, H. Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in Arabidopsis. **The Plant cell**, United States, v. 25, n. 9, p. 3311–3328, 2013.

MANDARINO, J. M. G. **Coloração esverdeada nos grãos de soja e seus derivados**. Londrina.

MANGOS, T. J.; BERGER, R. G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, [s. l.], v. 204, n. 5, p. 345–350, 1997.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015.

MATILE, P.; SCHELLENBERG, M.; PEISKER, C. Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. **Planta**, [s. l.], v. 187, p. 230–235, 1992.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 177–237, 1999.

MIIHLECKER, W.; ONGANIA, K.-H.; KRAUTLER, B.; MATILE, P.; HORTENSTEINER, S. Tracking Down Chlorophyll Breakdown in Plants: Elucidation. **Angew. Chem. Int Ed Engl.**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 401–404, 1997.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GANDUL-ROJAS, B.; GARRIDO-FERNANDEZ, J.; GALLARDO-GUERRERO, L. Pigments present in virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 192–196, 1990.

MOORE, S. H. Uniformity of planting spacing effect on soybean population parameters. **Crop Science**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 1049–1051, 1991.

MOSER, S.; MÜLLER, T.; OBERHUBER, M.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll catabolites - Chemical and structural footprints of a fascinating biological phenomenon. **European Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], n. 1, p. 21–31, 2009.

MULLER, T.; MOSER, S.; ONGANIA, K. H.; PRUZINSKA, A.; HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. A divergent path of chlorophyll breakdown in the model plant Arabidopsis thaliana. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 40–42, 2006.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis : a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 64, n. 13, p. 3983–3998, 2013.

NAFZIGER, E. D.; CARTER, P. R.; GRAHAM, E. E. Response of corn to uneven emergence. **Crop Science**, [s. l.], v. 31, p. 811–815, 1991.

NAKAJIMA, S.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll b Reductase Plays an Essential Role in Maturation and Storability of Arabidopsis Seeds 1 [W]. [s. l.], v. 160, n. September, p. 261–273, 2012.

NOGUEIRA, A. P. O.; SEDIYAMA, T. Fatores que Afetam a Viabilidade das Sementes. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologia de Produção de Sementes de Soja**. Londrina: Mecenas, 2013. p. 89–108.

NONOKAWA, K. .; NAKAJIMA, T. .; NAKAMURA, T. .; KOKUBUN, M. Effect of Synthetic Cytokinin Application on Pod Setting of Individual Florets within Raceme in Soybean. **Plant Production Science**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 79–81, 2012.

OBERHUBER, M.; BERGHOLD, J.; MÜHLECKER, W.; HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown - On a nonfluorescent chlorophyll catabolite from spinach. **Helvetica Chimica Acta**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 2615–2627, 2001.

OOMS, D.; DESTAIN, M.-F. Evaluation of chicory seeds maturity by chlorophyll fluorescence imaging. **Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 168–177, 2011.

PÁDUA, G. P. De; CARVALHO, M. L. M. De; FRANÇA-NETO, J. D. B.; GUERREIRO, M. C.; GUIMARÃES, R. M. Response of soybean genotypes to the expression of green seed under temperature and water stresses. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 140–149, 2009. a.

PÁDUA, G. P. De; FRANÇA-NETO, J. D. B.; CARVALHO, M. L. M. De; COSTA, O.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Da. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 128–138, 2007.

PÁDUA, G. P. De; FRANÇA-NETO, J. D. B.; CARVALHO, M. L. M. De; KRZYZANOWSKI, F. C.; GUIMARÃES, R. M. Incidence of green soybean seeds as a function of environmental stresses during seed maturation. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 150–159, 2009. b.

PALMER, R. G.; PFEIFFER, T. W.; BUSS, G. R.; KILEN, T. C. Qualitative Genetics. In: **Soybeans: Improvement, Production, and Uses**. Agronomy Monograph SV - 16Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2004. p. 137–233.

PARK, S.-Y.; YU, J.-W.; PARK, J.-S.; LI, J.; YOO, S.-C.; LEE, N.-Y.; LEE, S.-K.; JEONG, S.-W.; SEO, H. S.; KOH, H.-J.; JEON, J.-S.; PARK, Y.-I.; PAEK, N.-C. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. **The Plant cell**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1649–64, 2007.

PINTO, T. L. F.; CICERO, S. M.; FRANÇA NETO, J. de B.; DOURADO NETO, D.; FORTI, V. A. Fungicidas foliares e a doença ferrugem asiática na produção e na qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 680–688, 2011.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. 2a. ed. Brasilia: ABRATES, 1985.

PRIESTLEY, D. A. **Seed aging**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1986.

PRUZINSKA, A.; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HORTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 25, p. 15259–15264, 2003.

RODONI, S.; GINSBURG, S.; VOGT, E.; MARTINOIA, E.; MATILE, P.; HO, S. How Plants Dispose of Chlorophyll Catabolites. A directly energized carrier that transports tetrapyrrolic catabolites of chlorophyll into the vacuole. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 271, p. 27233–27236, 1996.

RÜDIGER, W. The last step of chlorophyll synthesis. In: KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. (Eds.). **The Porphyrin Handbook**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 71–108.

SCHEEREN, B. R.; PESKE, S. T.; SCHUCH, L. O. B.; BARROS, A. C. A. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 35–41, 2010.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 361–371, 2002.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção de sementes de soja**. 1. ed. Londrina: Editora Mecenas, 2013.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja do plantio à colheita**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2015. Disponível em: <http://www.buscaintegrada.usp.br/primo_library/libweb/action/display.do?tabs=detailsTab&ct=display&fn=search&doc=usp_base01002688515&indx=1&recIds=usp_base01002688515&recIdxs=0&elementId=0&renderMode=poppedOut&displayMode=full&frbrVersion=&dscnt=0&scp.scp>

SINNECKER, P.; BRAGA, N.; MACCHIONE, E. L. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Mechanism of soybean (Glycine max L. Merrill) degreening related to maturity stage and postharvest drying temperature. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 269–279, 2005.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccations of seed associates mycoflora during storage. In: JAYME, K.; GALLI, G. (Eds.). **Seed development and germination**. New York: Basel-Hang Yong, 1995. p. 701–746.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TANAKA, A.; TANAKA, R. Chlorophyll metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 248–255, 2006.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. **Annual review of plant biology**, United States, v. 58, p. 321–346, 2007.

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

TEIXEIRA, R. N.; LIGTERINK, W.; FRANÇA-NETO, J. de B.; HILHORST, H. W. M.; DA SILVA, E. A. A. Gene expression profiling of the green seed problem in Soybean. **BMC Plant Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

TEIXEIRA, S. B.; DA SILVA, J. G.; MENEGUZZO, M. R. R.; MARTINS, A. B. N.; MENEGHELLO, G. E.; DE TUNES, L. V. M. Green soybean seeds: Effect on physiological quality. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 1–6, 2020.

TOMMASINI, R.; VOGT, E.; FROMENTEAU, M.; HÖRTENSTEINER, S.; MATILE, P.; AMRHEIN, N.; MARTINOIA, E. An ABC-transporter of Arabidopsis thaliana has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. **Plant Journal**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 773–780, 1998.

TOURINO, M. C. C.; DE REZENDE, P. M.; SALVADOR, N. Row spacing, plant density and intrarow plant spacing uniformity effect on soybean yield and agronomic characteristics. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 1071–1077, 2002.

TRIPATHY, B. C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1621–1633, 2012.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence - Principles and Applications**. 2. ed. [s.l.] : Wiley-VCH, 2012.

VAZQUEZ, G. H.; CARVALHO, N. M. D. E.; BORBA, M. M. Z. Redução Na População De Plantas Sobre a Produtividade e a Qualidade Fisiológica da Semente de Soja. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 1–11, 2008.

VIEIRA, R. .; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. .; FRANÇA-NETO, J. D. B. (Eds.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1–26.

WARD, K.; SCARTH, R.; DAUN, J.; VESSEY, J. K. Chlorophyll degradation in summer oilseed rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 413–420, 1995.

WILLOWS, R. D. Chlorophyll Synthesis. In: WISE, R. R.; HOOBER, J. K. (Eds.). **The Structure and Function of Plastids**. 1. ed. [s.l.] : Springer Netherlands, 2006. p. 295–313.

WILSON, D. .; MCDONALD, M. . The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, [s. l.], v. 14, p. 296–300, 1986.

WILSON, H.; KHAN, O.; WELBAUM, G. Chlorophyll Fluorescence in Developing “Top Mark” Cantaloupe (Cucumis melo) Seeds as an Indicator of Quality. **Seed Technology**, [s. l.], v. 36, p. 103–113, 2014.

YIN, X.-R.; XIE, X.-L.; XIA, X.-J.; YU, J.-Q.; FERGUSON, I. B.; GIOVANNONI, J. J.; CHEN, K.-S. Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 86, n. 5, p. 403–412, 2016.

ZORATO, M. de F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA NETO, J. de B. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 11–19, 2007.

ZORATO, M. de F.; WATANABE, P. A. . Soja esverdeada: a degradação parcial da clorofila. In: SUZUKI, S.; YUYAMA, M. .; CAMACHO, S. (Ed.). **Boletim de Pesquisa de Soja**. Rondonópolis: Fundação MT, 2006. p. 229–232.