

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CATHARINA ORTIZ THOMAZELLA

Relação da fluorescência de clorofila com a qualidade fisiológica de
sementes de soja

Piracicaba

2022

CATHARINA ORTIZ THOMAZELLA

Relação da fluorescência de clorofila com a qualidade fisiológica de
sementes de soja

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a Clíssia Barboza da Silva

Piracicaba

2022

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Thomazella, Catharina Ortiz

Relação da fluorescência de clorofila com a qualidade fisiológica de sementes de soja / Catharina Ortiz Thomazella; Clíssia Barboza da Silva. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

74 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Análise de imagens 2. Fotossíntese de cotilédones 3. Sensores ópticos 4. Vigor de sementes I. Título.

CDU 535.371 : (581.132 + 633.34)

Elaborada por:

Rubenildo Oliveira da Costa

CRB-8/79468

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais e irmã, com muito amor e gratidão por seu imenso apoio, compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do processo de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à espiritualidade, que com sabedoria e amor trazem oportunidades e desafios, amparam e ensinam a todos em suas jornadas.

Aos meus pais, Fernanda e Nelson, pelo amor, carinho, dedicação, suporte incondicional aos meus estudos, imenso apoio emocional nos momentos difíceis, paciência, por tudo!

À minha irmã, Luísa, pelo companheirismo, carinho, paciência, apoio e orientação nos momentos difíceis.

À minha avó Jó, pelo amor, carinho, dedicação e apoio durante toda a minha vida.

Às minhas cachorras Ursa e Branca, pela alegria, amor e carinho diários.

Ao meu amigo e colega Luan, pela ajuda, orientação, suporte e parceria desde que nos conhecemos!

Ao João e à Magê, pela grande amizade, suporte e risadas desde a graduação!

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realização do Mestrado e apoio durante a realização do mesmo e divulgação dos resultados.

Ao Professor Valter Arthur, por disponibilizar o Laboratório de Radiobiologia e Ambiente (LRA) para a realização da pesquisa e apoio na divulgação dos resultados.

À técnica do LRA, Lúcia Cristina, pela acolhida e por toda a ajuda durante a realização da pesquisa.

À Professora Dra. Clíssia, pela oportunidade e por me mostrar o funcionamento real do mundo acadêmico; até o último momento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processos 2017/15220-7; 2018/03802-4; 2018/01774-3; 2018/03793-5 e 2020/09407-0) pela concessão da bolsa de Mestrado, auxílios financeiros e equipamentos multiusuários (EMUs) disponibilizados, tornando possível a realização desta pesquisa e meu crescimento científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001), pela bolsa concedida no início do Mestrado e auxílio financeiro para participação no XXI Congresso Brasileiro de Sementes.

À empresa Sementes JHS e ao seu gerente técnico Rinaldo Grassi, pela gentileza e colaboração à minha pesquisa através da doação das sementes de soja do cultivar M8349IPRO.

À empresa Lagoa Bonita Sementes e à Raquel Modena Wutzki, pela gentileza e colaboração à minha pesquisa através da doação das sementes de soja do cultivar M5917IPRO.

RESUMO

THOMAZELLA, C. O. **Relação da fluorescência de clorofila com a qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2022. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

O uso de tecnologias de imagens para monitoramento da fluorescência de clorofila tem surgido como alternativa eficaz na avaliação de aspectos relacionados à qualidade fisiológica de sementes, contribuindo para a redução da subjetividade dos testes tradicionais e baixa reprodutibilidade entre laboratórios. Durante a germinação de sementes de soja, os cotilédones assumem papel fundamental para o desenvolvimento das plântulas, a partir da mobilização de reservas, e posteriormente, pelo seu papel fotossintetizante. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a potencialidade de imagens de fluorescência de clorofila na germinação e estabelecimento inicial de plântulas como novo marcador da qualidade fisiológica das sementes de soja, e estabelecer possíveis relações com as diferenças observadas nos testes tradicionais. A pesquisa foi conduzida em duas etapas, utilizando sementes dos cultivares M8349IPRO e M5917IPRO. Na primeira etapa, foram estudadas cinco classes de sementes envelhecidas artificialmente para definição do momento mais adequado para análise de imagens de fluorescência de clorofila média (FC_M), mínima (F_0) e máxima (F_M), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_V/F_M), e índice de clorofila (C_{IDX}). Na segunda etapa da pesquisa, sementes naturalmente envelhecidas (armazenadas por seis meses) foram avaliadas e comparadas com sementes não armazenadas para validação da técnica. Os resultados de cada etapa foram correlacionados com o teste de germinação (contagem aos cinco e oito dias), envelhecimento acelerado com solução salina saturada, condutividade elétrica, emergência, índice de velocidade de emergência e comprimento médio de plântulas, com base nos coeficientes de correlação de Spearman. As imagens captadas no quarto dia de germinação foram eficientes para distinguir classes de sementes de soja com diferentes níveis de vigor. Entretanto, a eficiência dos parâmetros F_V/F_M , FC_M e F_0 foi dependente do genótipo, enquanto que F_M se mostrou adequada para identificar diferenças de vigor em ambos os cultivares, independentemente do tipo de envelhecimento. A fluorescência de clorofila foi reduzida em plântulas produzidas de sementes artificialmente e naturalmente envelhecidas, com fortes correlações com os testes tradicionais. Portanto, a técnica de imagem de fluorescência de clorofila é uma ferramenta eficiente na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja.

Palavras-chave: Análise de imagens. Vigor de sementes. *Glycine max*. Fotossíntese de cotilédones. Sensores ópticos.

ABSTRACT

THOMAZELLA, C.O. **Relationship between chlorophyll fluorescence and soybean seed physiological quality**. 2022. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

The use of computerized techniques of image analysis based on chlorophyll fluorescence of seeds and seedlings has emerged as an effective method in the evaluation of aspects related to the physiological quality of seeds, becoming a promising alternative in overcoming the subjectivity of traditional tests, and the low reproducibility between laboratories. During the germination of soybean seeds, the cotyledons play a fundamental role for the development of the seedlings from the mobilization of reserve, and later, for their photosynthetic role. Therefore, the present study aimed to analyze the potential of chlorophyll fluorescence imaging during the germination and early establishment of seedlings as a new marker of physiological quality of soybean seeds, and to establish possible relations with differences observed on traditional tests. The research was conducted in two experimental periods using seeds of M8349IPRO and M5917IPRO cultivars. During the first period, five classes of seeds artificially aged were studied to define the most appropriate time for the analysis of images of minimal (F_0), maximal (F_M) and average (CF_A) chlorophyll *a* fluorescence, maximum quantum yield of PSII (F_V/F_M) and chlorophyll index (C_{IDX}). During the second research period, naturally aged seeds (six months) were analyzed and compared with non-stored seeds to technical validation. The results of each period were correlated with the results obtained in the germination test (5 and 8 days), saturated salt accelerated aging, electrical conductivity, seedling emergence, emergency speed index and seedling length based on Spearman Rank correlation coefficient. The chlorophyll fluorescence images taken on the fourth day of germination were efficient to distinguish the soybean seed classes with different vigor levels. Meanwhile, the efficiency of F_V/F_M , CF_A and F_0 was dependent of the genotype, whereas F_M identified the vigor differences between seeds classes of both cultivars, independently of the aging methods. The chlorophyll fluorescence was reduced in seedlings originated from artificially and naturally aged seeds, with strong correlations with the conventional tests. Therefore, chlorophyll fluorescence imaging is an efficient method to evaluate the physiological potential of soybean seeds.

Keywords: Image analysis. Seed vigor. *Glycine max*. Cotyledon photosynthesis. Optical sensors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Aspectos gerais da cultura da soja	15
2.2. Qualidade fisiológica de sementes	15
2.3. Metodologias de imagens para análise da qualidade fisiológica de sementes	17
2.4. Metodologias de imagens baseadas em fluorescência de clorofila e fotossíntese de plântulas	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Análise da qualidade fisiológica das sementes	24
3.1.1. Teste de germinação	24
3.1.2. Envelhecimento acelerado com solução salina saturada	24
3.1.3. Condutividade elétrica	25
3.1.4. Emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência	25
3.1.5. Análise automatizada do comprimento médio de plântulas	25
3.1.6. Massa seca, fluorescência e índice de clorofila <i>a</i> e índice de antocianinas do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones de plântulas	26
3.2. Fluorescência de clorofila inicial das sementes	27
3.3. Avaliação da fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas	28
3.4. Procedimento estatístico	28
4 RESULTADOS	32
4.1. Qualidade fisiológica de sementes artificialmente envelhecidas	32

4.2. Fluorescência de clorofila inicial das sementes envelhecidas artificialmente	35
4.3. Fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas provenientes de sementes artificialmente envelhecidas.....	36
4.4. Correlação entre parâmetros de fluorescência de clorofila de plântulas provenientes de sementes envelhecidas artificialmente com testes convencionais	51
4.5. Qualidade fisiológica de sementes naturalmente envelhecidas (armazenamento comercial)	53
4.6. Fluorescência de clorofila inicial das sementes naturalmente envelhecidas.....	56
4.7. Fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas provenientes de sementes naturalmente envelhecidas	57
4.8 Correlação entre parâmetros de fluorescência de clorofila de plântulas provenientes de sementes naturalmente envelhecidas com testes convencionais	59
5 DISCUSSÃO	61
5.1. Imagens de fluorescência de clorofila na avaliação da qualidade fisiológica de sementes	61
5.2. Plasticidade de parâmetros de fluorescência de clorofila	63
5.3. Efeito do envelhecimento artificial e natural nos padrões de fluorescência de clorofila durante a germinação	64
5.4. Imagens de fluorescência de clorofila de plântulas como um novo marcador da qualidade fisiológica de sementes de soja	65
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

A utilização de sementes de alta qualidade é fundamental para o desenvolvimento inicial adequado das plantas em campo e sucesso da produção agrícola. Os métodos atualmente empregados e determinados por lei para a avaliação da viabilidade e vigor de sementes foram desenvolvidos e estabelecidos a muitos anos, sendo baseados, principalmente, na experiência do analista para a interpretação dos resultados, o que possibilita a divergência entre laboratórios. Além disso, os métodos são morosos e destrutivos, exigindo o descarte do material após sua análise.

O avanço tecnológico na área da visão computacional e o desenvolvimento de equipamentos de imagens de alta definição associados a *softwares* com alta capacidade de processamento, tem possibilitado o aprimoramento de técnicas com potencial de análise da qualidade de sementes, e dentre estas, inclui a imagem de fluorescência de clorofila. A partir do princípio de competição entre as formas de dissipação de energia absorvida pela molécula de clorofila, a fluorescência se tornou ferramenta chave para avaliar, indiretamente, a fotossíntese. Dentre as vantagens da utilização de imagens de fluorescência de clorofila, destaca-se a rapidez, a objetividade dos resultados e a possibilidade de medições contínuas com o mesmo material, visto que técnica não é destrutiva.

A soja é uma das principais culturas produzidas no mundo em razão do seu uso na alimentação animal e humana, no setor industrial, no setor de cosméticos, dentre outros. A crescente demanda mundial por alimentos impulsiona o crescimento da produção da soja ano após ano para novos patamares, exigindo a utilização de sementes de alto vigor para formação de estandes uniformes e desenvolvimento adequado das plantas, assim como métodos mais eficientes e dinâmicos de análise da qualidade das sementes.

No início da germinação das sementes de soja, o processo de embebição possibilita a síntese de clorofilas. Após a emergência no campo de produção, ocorre o esverdeamento dos cotilédones e ativação das moléculas de clorofila, dando início a síntese de fotoassimilados, fundamentais para a sobrevivência da plântula, uma vez que os tecidos de reserva dos cotilédones são insuficientes até que as folhas primárias sejam capazes de sustentar a plântula.

Uma vez que a clorofila e a fotossíntese dos cotilédones têm grande importância para a germinação e desenvolvimento da plântula, as imagens de fluorescência de clorofila têm potencial de fornecer *insights* a respeito da atividade fotossintética cotiledonar durante o processo de germinação, e indiretamente do vigor das sementes, isto é, as imagens de fluorescência de clorofila podem ser utilizadas como novo marcador da qualidade fisiológica.

Desta forma, o objetivo da presente pesquisa consistiu em estudar a potencialidade de imagens de fluorescência de clorofila captadas durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas de soja como novo marcador da qualidade fisiológica, e estabelecer possíveis relações com as diferenças observadas nos testes tradicionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da cultura da soja

No Brasil, a produção de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a maior entre as oleaginosas e umas das principais a nível mundial. As sementes de soja possuem cerca de 40% (VRATARIĆ; SUDARIĆ, 2008) e 21% (PANTHEE et al., 2004) da massa seca constituída de proteínas e lipídios, respectivamente. Este insumo com alto teor proteico e de óleo, há décadas, é amplamente utilizado para alimentação animal e humana (THOENES, 2004), bem como para a fabricação de produtos industrializados e biocombustíveis (VILLANUEVA; ALVAREZ, 2017).

A soja é considerada a razão do desenvolvimento da agricultura empresarial brasileira, sendo considerada um mecanismo de desenvolvimento econômico e social do País (DALL'AGNOL, 2016). Nas últimas décadas, a produção de soja brasileira cresceu progressivamente safra após safra, se tornando uma das principais mundialmente. Para a safra 2022/2023, estima-se produção recorde de mais de 390 milhões de toneladas, ou seja, quase 40% da produção mundial (USDA, 2022a). Além de ser o maior produtor, o Brasil é o principal exportador a cinco anos, com estimativa de comercialização de 89,5 milhões de toneladas (USDA, 2022b), com crescimento estimado de quase 5% ao ano (DALL'AGNOL, 2016).

Para o sucesso da safra, é fundamental a instalação das lavouras com sementes de alta qualidade, pois estas representam insumo básico (BISHAW; NIANE; GAN, 2007), e contêm as características genéticas do cultivar, sendo responsáveis pela transferência dos avanços da genética para o campo (MARCOS-FILHO, 2015; DALL'AGNOL, 2016). Além disso, diante da importância da cultura, a utilização da semente de soja de alta qualidade é importante mecanismo de segurança alimentar (ELIAS, 2018).

2.2. Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade de sementes é um conjunto de características formado por atributos genéticos, físicos, fisiológicos e de sanidade (BISHAW; NIANE; GAN, 2007; MARCOS-FILHO, 2015; DALL'AGNOL, 2016; ELIAS, 2018) que quando em equilíbrio, garantem a semente de alta qualidade (COSTA et al., 2021). A interação destes atributos com o meio ambiente determina a qualidade da semente, principalmente durante o seu desenvolvimento e maturação (ELIAS, 2018).

Os atributos genéticos se referem à pureza varietal, ou seja, a manutenção das características genéticas selecionadas para um determinado cultivar. Os parâmetros físicos dizem respeito a um lote de sementes uniforme, sem contaminação de sementes de outras espécies, enquanto que a sanidade está relacionada à ausência de patógenos e pragas (BISHAW *et al.*, 2007; MARCOS-FILHO, 2015). Por fim, os parâmetros fisiológicos são compostos pela viabilidade, vigor e longevidade das sementes, indicando a aptidão ou não de manifestar seus mecanismos metabólicos vitais, e influenciando diretamente tanto o comportamento da semente durante o armazenamento como no estabelecimento da plântula após a semeadura (MARCOS-FILHO, 2015; COSTA *et al.*, 2021). A viabilidade é expressa pela germinação das sementes, determinada em condições ótimas (BISHAW *et al.*, 2007; MARCOS-FILHO, 2015). Por outro lado, o vigor é um atributo complexo que representa o potencial de desempenho da semente em diversas situações ambientais, estando relacionado principalmente à emergência e desenvolvimento das plântulas (MARCOS-FILHO, 2015). Sementes de soja de alto vigor são fundamentais para o sucesso da emergência, uniformidade do estande e de grãos com alto conteúdo de matéria seca (EBONE *et al.*, 2020). A longevidade está associada à capacidade da semente manter a viabilidade durante o armazenamento (BEWLEY *et al.*, 2013).

Nos programas de controle de qualidade de sementes, são empregados testes para certificação da pureza física dos lotes, viabilidade, identificação de sementes com danos mecânicos, presença de pragas ou quaisquer outros sintomas que venham afetar o desempenho das sementes (BRASIL, 2009). A verificação dos parâmetros fisiológicos, ou da qualidade fisiológica (expressão utilizada por diversos autores e empregada neste trabalho) das sementes é primordial para garantir a qualidade da produção (MARCOS-FILHO, 2015). Na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, destaca-se o teste de germinação, a emergência de plântulas, os testes de envelhecimento acelerado e de tetrazólio (VIEIRA *et al.*, 2003; MARCOS-FILHO, 2015). Esses testes apresentam pontos que os tornam ineficientes, lentos e com risco de imprecisão em razão da dependência da experiência do analista. Por exemplo, a duração dos testes de germinação e emergência limita a tomada de decisões, que necessita de dinamismo, e embora algumas metodologias sejam mais rápidas, como o teste de tetrazólio, seus procedimentos de execução e avaliação são manuais e dependentes da experiência do analista, tornando clara a necessidade de utilização de procedimentos mais objetivos e dinâmicos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja (DE SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2018).

2.3. Metodologias de imagens para análise da qualidade fisiológica de sementes

As imagens digitais e os *softwares* de análise de imagens têm sido objeto de intenso estudo e aperfeiçoamento diante do potencial para reconhecimento automático de objetos. Com o avanço tecnológico, estas ferramentas têm sido aperfeiçoadas concomitantemente com a redução de seus custos. Na área da Tecnologia de Sementes, em que os resultados dos testes de qualidade se baseiam em observações visuais de analistas, a análise de imagens tem possibilitado a obtenção de resultados mais rápidos e objetivos, senão mais econômicos (SAKO, 2000; HUANG et al., 2015).

O primeiro trabalho de análise de sementes a partir de técnicas de imagens foi publicado por McCormac, Keffe e Draper (1990) com lotes de sementes de alface (SAKO, 2000). Atualmente, o aperfeiçoamento da visão computacional tem proporcionado a geração de imagens RGB (*red, green and blue channels*) com alta definição, permitindo a análise do vigor de sementes a partir do comprimento das plântulas resultantes (POWELL, 2022), assim como do desempenho germinativo, mudanças de parâmetros morfológicos e de cor (DEVKULE; AUTADE; NARKHEDE, 2017). Adicionalmente, as imagens digitais têm sido combinadas com outras técnicas, intensificando a aplicação de vários métodos para a análise de sementes e plantas, incluindo a espectroscopia (MA; TSUCHIKAWA; INAGAKI, 2020), a fluorescência de clorofila (BAKER, 2008; LICHTENTHALER, 2021), as imagens multiespectrais (BOELT et al., 2018), dentre outras (RAHMAN; CHO, 2008).

Os métodos de imagens permitem a análise contínua do material, e podem determinar a germinação, o vigor e a longevidade de sementes de forma rápida, objetiva e não destrutiva (BAKER, 2008). Por exemplo, em trabalhos conduzidos por Brandani et al. (2022) foi possível a determinação do vigor de sementes de soja com plântulas aos seis dias de idade, enquanto que Sako et al. (2004) demonstrou que isso também pode ser feito com plântulas aos três dias de idade.

2.4. Metodologias de imagens baseadas em fluorescência de clorofila e fotossíntese de plântulas

A fluorescência de clorofila é, de forma simplificada, a emissão de luz dos tecidos fotossintetizantes. Desde o século XIX (GOVINDJEE, 2004), o conhecimento da ocorrência de fluorescência de clorofila tem fornecido *insights* e informações complexas a respeito da fotossíntese (KRAUSS; WEIS, 1991).

Ao absorver energia, a molécula de clorofila se torna altamente instável e perde quase instantaneamente parte do *quantum* absorvido por transmissão de calor (BOLHAR-NORDENKAMP; OQUIST, 1993). Na verdade, a energia presente na molécula de clorofila pode ser liberada por três principais meios: transmissão de calor, transferência da energia para a fotoquímica (o processo de fotossíntese em si), ou pela emissão de um fóton, isto é, a fluorescência de clorofila.

Devido ao caráter competitivo entre a fluorescência e outras formas de liberação de energia da molécula de clorofila, o aumento da ocorrência de um destes processos implica na redução do outro (BOLHAR-NORDENKAMP; OQUIST, 1993; FRACHEBOUD, 2004). Não há um consenso na literatura quanto ao valor quantitativo da fluorescência de clorofila em relação aos demais processos; entretanto, pode-se afirmar que o montante é baixo. Segundo Maxwell e Johnson (2000), apenas de 1 a 2% da energia absorvida na forma de luz pelas espécies vegetais resulta em liberação de fluorescência. Já para Fracheboud (2004), este valor varia de 3% a 5%. Em todo caso, a quantificação da fluorescência de clorofila permite a avaliação indireta de vários processos da fotossíntese (MAXWELL; JOHNSON, 2000), sendo observada tanto no fotossistema II como no fotossistema I (FRANCK; JUNEAU; POPOVIC, 2002). Entretanto, a participação do fotossistema I na ocorrência de fluorescência não é expressiva em comprimentos de onda abaixo de 700 nm (BAKER, 2008).

Dentre os principais parâmetros da fluorescência de clorofila, estão a fluorescência mínima (F_0), máxima (F_M) e a eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_V/F_M), obtidos quando o tecido vegetal está adaptado no escuro. Nesta condição ambiente, o fotossistema II é considerado “aberto” e a plastoquinona QA está em estado oxidado máximo (BAKER, 2008; MURCHIE; LAWSON, 2013). Para a obtenção de F_0 , é emitida uma luz não actínica, isto é, incapaz de estimular a fotossíntese, e, embora o fotossistema II continue aberto, é emitido um nível mínimo de fluorescência. Em seguida, com a emissão de um *flash* rápido de luz actínica no tecido vegetal (BAKER, 2008), a QA sofre máxima redução e o fotossistema II é fechado momentaneamente. Assim, o *quenching* fotoquímico passa a ser nulo e a fluorescência de clorofila será máxima, F_M . De acordo com informações de Krauss e Weis (1991), enquanto a F_M representa cerca de 3% da luz absorvida pelo aparato fotossintético, a F_0 representa apenas 0,6%, devido à competição entre a fluorescência e o evento fotoquímico. A diferença entre F_M e F_0 representa a fluorescência variável (F_V) (BAKER, 2008; MURCHIE; LAWSON, 2013).

A eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II, expressa pela razão F_V/F_M , indica a diferença entre a fluorescência de dois estados definidos (KRAUSS; WEIS,

1991), determinando o valor máximo da energia produzida pela redução de QA, e indiretamente, o *quantum* máximo da fotoquímica do fotossistema II (BAKER, 2008; MURCHIE; LAWSON, 2013). Desta forma, não indica a energia utilizada pelo fotossistema II sob luz ambiente, mas apenas seu limite máximo (BAKER, 2008). Este parâmetro é um dos mais utilizados, e é considerado de fácil determinação, sendo utilizado frequentemente para verificação dos efeitos de estresses no desempenho da fotossíntese, que reduzem o valor de F_V/F_M . Vários autores demonstraram que seu valor médio para tecidos vegetais sem efeito de estresses é próximo de 0,832 (KRAUSS; WEIS, 1991; BAKER, 2008; MURCHIE; LAWSON, 2013).

Inicialmente, as medições eram realizadas por fluorímetros apenas em ambiente escuro ou com luz controlada (MURCHIE; LAWSON, 2013). Para a medição, a luz emitida deveria passar por um filtro para reduzir a radiação para comprimentos de onda menores que 620 nm. A fluorescência era detectada por um filtro de comprimento de onda específico, geralmente menor que 700 nm. Contudo, esse sistema poderia causar uma série de problemas com a exatidão dos valores obtidos, como descritos por Bolhar-Nordenkamp e Oquist (1993).

Em 1984, Quick e Horton desenvolveram uma metodologia aceita na literatura e utilizada até os dias atuais: a medição modulada de captação de fluorescência, detectada na presença de luz ambiente (MAXWELL; JOHNSON, 2000; TAKAYAMA; KONISHI; OMASA, 2003; MURCHIE; LAWSON, 2013). Nesta metodologia, a fonte luminosa utilizada é ligada e desligada em alta frequência, isto é, modulada (SCHREIBER; SCHLIWA; BILGER, 1986; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Os aparelhos mais modernos de detecção da fluorescência de clorofila apresentam pulso luminoso de saturação e diodos emissores de luz (LED) com comprimento de onda de 630 a 670 nm para a excitação da molécula de clorofila (TAKAYAMA; KONISHI; OMASA, 2003; GALETTI et al., 2020). Os sinais de fluorescência são capturados por dispositivos de carga acoplada (CCD), capazes de estimar o fluxo de elétrons no interior dos tecidos vegetais. Os dados da câmera CCD associados aos coletados por câmeras digitais de alta definição, equipadas com sensores ópticos robustos, são processados por *softwares* com alta capacidade de análise, fornecendo rapidamente resultados acerca da distribuição espacial da fluorescência de clorofila de um determinado tecido vegetal (TAKAYAMA; KONISHI; OMASA, 2003; KENANOGLU; DEMIR; JALINK, 2013).

O uso de métodos computadorizados de análise de imagens de fluorescência de clorofila tem surgido como alternativa promissora na superação das limitações dos testes fisiológicos atualmente empregados para análise de sementes, por serem rápidos e objetivos, e

capazes de sanar possíveis divergências de resultados entre laboratórios, além de apresentarem potencial de padronização, permitindo, ainda, que os resultados sejam comparados aos testes tradicionalmente utilizados (KENANOGLU; DEMIR; JALINK, 2013). Além disso, a análise de imagens possibilita a meditação contínua e rotineira de um mesmo tecido vegetal de forma não destrutiva (BAKER, 2008).

A técnica de fluorescência de clorofila tem sido empregada para detecção da suscetibilidade e *status* fisiológico de plantas (WANG et al., 2017) e de outros organismos fotossintetizantes a agentes de estresses (BAKER, 2008; BADGER, 2009; STEPIEN; JOHNSON, 2009; AGATHOKLEOUS; FENG; PEÑUELAS, 2020), bem como na identificação de mutações e de genótipos (BADGER, 2009), nas respostas fotossintéticas de genótipos para seleção durante o melhoramento genético (HERRITT; FRITSCHI, 2020) e para estudo do efeito de patógenos nos mecanismos de defesa de folhas de soja (FORTUNATO et al., 2018).

Na área de Tecnologia de Sementes, a técnica de fluorescência de clorofila tem sido empregada com sucesso na detecção de sementes esverdeadas de soja, caracterizadas por apresentarem baixo potencial fisiológico (FRANÇA-NETO et al., 2005; PÁDUA et al., 2007), na separação de sementes maduras e imaturas (JALINK et al., 1998), e como marcador do desempenho fisiológico de sementes durante a germinação, pelo monitoramento da fluorescência de clorofila (BISOGNIN; VELASQUEZ; WIDDERS, 2005; ARIYARATHNA; WEERASENA; BENERAGAMA, 2020; VIDAK et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021), ou de alterações no fotossistema II de cotilédones (BAKER, 2008; ZHANG et al., 2010a; ZHENG et al., 2011; KIRCHER; SCHOPFER, 2012). Além disso, o monitoramento contínuo da germinação com a técnica permite acompanhar a síntese de clorofilas durante a embebição de água pelas sementes (VAN DER BURG et al., 2010).

A clorofila tem papel importante durante o estabelecimento e desenvolvimento inicial de plântulas. Imediatamente após a emergência da plântula, ocorre acúmulo de clorofilas e esverdeamento dos cotilédones (HARRIS; MACKENDER; SMITH, 1986; BROWN; HUBER, 1987; MAREK; STEWART, 1992; ARNIM; DENG, 1996; ERBÁS et al., 2016), adquirindo características semelhantes às folhas, inclusive aquisição da capacidade fotossintética (LOVELL; MOORE, 1970), funcionando tanto como órgãos mobilizadores de reservas como fotossintéticos.

O acúmulo de clorofilas nos tecidos é dependente de luz, de modo que os cotilédones passam a se tornar fotossinteticamente ativos após a emergência da plântula (ARNIM; DENG, 1996). Srinivasan e Oliver (1995) verificaram que nas primeiras horas de iluminação de

cotilédones, ocorre um aumento considerável na síntese de proteínas envolvidas no desenvolvimento de cloroplastos. Em seguida, a fotossíntese cotiledonar passa a produzir quantidade expressiva de fotoassimilados para o crescimento da plântula (LOVELL; MOORE, 1970; BROWN; HUBER, 1987; SANTOS; BUCKERIDGE, 2004) até que o aparato fotossintético das folhas primárias seja capaz de suprir os fotoassimilados necessários para o término da germinação (HARRIS; MACKENDER; SMITH, 1986). Assim, os cotilédones exercem uma função indispensável nesse processo, conforme comprovado por vários autores (AMPOFO; MOORE; LOVELL, 1976; LASLEY; GARBER, 1978; BISOGNIN; VELASQUEZ; WIDDERS, 2005; ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010a), e portanto, o monitoramento da síntese de clorofila e da fotossíntese de cotilédones é fundamental para verificar o desempenho de plântulas durante a germinação, principalmente em condições de estresse (ZHENG et al., 2011; KIRCHER; SCHOPFER, 2012; MONTAÑA et al., 2014).

Na literatura, tem sido documentado que os carboidratos produzidos pela fotossíntese de cotilédones contribuem cerca de três vezes mais no desenvolvimento da plântula do que os carboidratos provenientes da mobilização de reserva (BROWN; HUBER, 1987; SANTOS; BUCKERIDGE, 2004). Logo, o monitoramento da síntese de clorofila e/ou fotossíntese de cotilédones como marcador do desempenho de plântulas tem recebido atenção de pesquisadores (BISOGNIN; VELASQUEZ; WIDDERS, 2005; ZHENG et al., 2011; KIRCHER; SCHOPFER, 2012; MONTAÑA et al., 2014).

A fotossíntese cotiledonar de plântulas de soja (HARRIS et al., 1986; BROWN; HUDSON, 2015) e mamona (ZHENG et al., 2011) foi suficiente para equilibrar perdas de energia devido a mobilização de carboidratos, lipídios e proteínas em fases iniciais do processo de germinação. Em pepino, Lasley e Garber (1978) comprovaram que mesmo cotilédones reduzidos em 50% do tamanho, apresentavam quase 80% de troca de CO₂. Em estudos realizados com maracujá roxo, a redução na percentagem de emergência de plântulas foi acompanhada de menor síntese de clorofila dos cotilédones (MONTAÑA et al., 2014).

O desenvolvimento da raiz primária de plântulas de pepino e, conseqüentemente, o estabelecimento inicial das plântulas, foi dependente diretamente da fotossíntese de cotilédones (BISOGNIN; AMARANTE; DELLAI, 2004; BISOGNIN; VELASQUEZ; WIDDERS, 2005), e acredita-se que os fotossintatos produzidos pelos cotilédones foram direcionados, em grande parte, para o desenvolvimento da raiz primária pela proximidade desses dois tecidos. Entretanto, Santos e Buckeridge (2004) verificaram que o desenvolvimento da parte aérea de plântulas de *Hymenaea courbaril* foi dependente principalmente da capacidade fotossintética

de cotilédones. Ainda, Sasaki e Kozlowski (1968) demonstraram que a redução da fotossíntese de cotilédones é acompanhada por uma supressão no desenvolvimento de folhas primárias.

A dependência da fotossíntese cotiledonar de plântulas de abóbora híbrida (cv. Tetsukabuto) se estendeu até os seis dias após a emergência, promovendo incremento da área foliar e massa seca da raiz primária (AMARANTE; BISOGNIN; CANCI, 1995). Em *Acer negundo* e *Fagus sylvatica* (AMPOFO; MOORE; LOVELL, 1976) e em soja (MAREK; STEWART, 1992) foram observadas altas taxas de crescimento de plântulas em função da fotossíntese realizada pelos cotilédones. Em *Pinus resinosa*, a fotossíntese de cotilédones colaborou efetivamente na expansão das folhas primárias (SASAKI; KOZLOWSKI, 1968). A liberação rápida de oxigênio e produção de açúcares por meio da fotossíntese cotiledonar foi verificada em *Haloxylon persicum*, *H. ammodendron* e *Suaeda physophora*, tendo sido vantajosa em razão dessas espécies passarem por hipoxia durante a germinação, em condições de alagamentos intermitentes (ZHANG et al., 2010b).

Em estudos realizados por Kircher e Schopfer (2012), o crescimento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana* foi induzido pela produção de sacarose proveniente especificamente da síntese de fotoassimilados nos cotilédones. A raiz primária de *Kielimeyera coriacea* se desenvolveu em função das reservas já existentes e da fotossíntese realizada pelos cotilédones (SABOYA; BORGUETTI, 2012). A transcrição de genes responsáveis por respostas envolvidas na síntese de unidades glicosídicas, que são fornecidas por cotilédones fotossinteticamente ativos em soja, foi cerca de quatro vezes maior do que no restante da plântula (LI; SWAMINATHAN; HUDSON, 2011).

Diante do exposto, a técnica de imagens de fluorescência de clorofila se mostra uma técnica versátil e importante para o monitoramento de processos fisiológicos de sementes e plântulas, apresentando assim grande potencial para avaliação do vigor de sementes de soja de forma mais rápida e objetiva, sem a destruição do material e sem depender da experiência de analistas para a determinação do resultado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, Brasil, utilizando sementes de dois cultivares de soja (M8349IPRO e M5917IPRO), com cinco níveis de vigor. As sementes foram colhidas na safra 2019/2020, sendo as sementes do cultivar M8349IPRO produzidas em Correntina, BA, Brasil, e doadas pela empresa J&H Sementes, e as sementes do cultivar M5917IPRO produzidas em Paranapanema, SP, Brasil, e doadas pela empresa Lagoa Bonita. As sementes foram mantidas acondicionadas em sacos de papel Kraft (folha dupla), e mantidas a 10 °C e 40% de umidade relativa do ar (UR) durante todo o período experimental.

Os padrões de fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas foram analisados a partir de sementes artificialmente e naturalmente envelhecidas, sendo a pesquisa conduzida em duas etapas experimentais: etapa 1: estudo de cinco classes de sementes artificialmente envelhecidas para definição do tempo mais adequado para análise de imagens de fluorescência de clorofila média (FC_M), F_0 , F_M , F_v/F_M , e índice de clorofila (C_{IDX}); etapa 2: verificação da potencialidade da técnica de imagem de fluorescência de clorofila, comparando sementes armazenadas e não armazenadas.

O envelhecimento artificial foi realizado a partir da distribuição das sementes em camada única sobre tela de aço inox, suspensa no interior de caixa de plástico transparente (11,0 cm × 11,0 cm × 3,5 cm) contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram cobertas com tampa e mantidas a 42 °C e $98 \pm 2\%$ de UR por 0 (controle), 16, 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, as sementes foram submetidas à secagem a 20 °C por 24 horas, para que alcançassem os teores de água iniciais (5,5% para o cultivar M8349IPRO e 5,8% para o cultivar M5917IPRO). Já no envelhecimento natural (armazenamento), as sementes não envelhecidas artificialmente foram armazenadas a 20 °C e UR variando de 19 a 42%, durante seis meses.

O teor de água das sementes foi determinado com base no método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, utilizando duas repetições de 50 sementes, sendo determinado conforme a seguinte equação (BRASIL, 2009):

$$\text{Teor de água (\%)} = 100(P-p) / (P-t)$$

Em que: P = peso úmido

p = peso seco

t = peso do recipiente de metal com tampa

As sementes artificialmente e naturalmente envelhecidas (após o armazenamento) foram comparadas quanto à qualidade fisiológica, e os padrões de fluorescência de clorofila durante a germinação, conforme procedimentos a seguir:

3.1. Análise da qualidade fisiológica das sementes

3.1.1. Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada classe de vigor. Antes do teste de germinação, as sementes foram pré-condicionadas a fim de evitar danos por embebição rápida de água. Para o pré-condicionamento, as sementes foram distribuídas sobre tela de aço inox, suspensa no interior de caixa de plástico transparente (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) contendo 40 mL de água destilada, permanecendo em ambiente controlado com temperatura constante de 25 °C por 16 horas. Posteriormente, as sementes foram semeadas sobre duas folhas de substrato papel (28,0 cm x 38,0 cm) e recobertas com uma terceira folha, previamente umedecidas com volume de água equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato seco. Os rolos formados foram colocados em sacos de plástico, e mantidos a 25 °C e fotoperíodo de oito horas. A porcentagem de plântulas normais foi calculada no 5º dia (primeira contagem) (YAGUSHI; COSTA; FRANÇA-NETO, 2014) e no 8º dia após a instalação do teste (BRASIL, 2009).

3.1.2. Envelhecimento acelerado com solução salina saturada

Para o envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS), foram utilizadas 300 sementes posicionadas em camada única sobre tela suspensa no interior de caixa de plástico transparente (11,0 cm x 11,0 cm x 3,5 cm) (MARCOS-FILHO; NOVENBRE; CHAMMA, 2001) contendo 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio - NaCl (40 g de NaCl para 100 mL de água destilada) (YAGUSHI; COSTA; FRANÇA-NETO, 2014). As caixas foram tampadas e mantidas durante 48 horas em câmara do tipo “jaquetada de água” regulada a 42 °C (DUTRA; VIEIRA, 2004). Em seguida, duas repetições de 50 sementes foram utilizadas para determinação do teor de água (MARCOS-FILHO, 1999), e quatro repetições de 50 sementes foram submetidas ao teste de germinação, a 25 °C e fotoperíodo de oito horas, conforme procedimentos descritos no item 3.1.1. A porcentagem de plântulas normais foi determinada aos quatro dias após a semeadura (MARCOS-FILHO; NOVENBRE; CHAMMA, 2001; YAGUSHI; COSTA; FRANÇA-NETO, 2014).

3.1.3. Condutividade elétrica

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, previamente pesadas em balança de precisão (0,01 g), e em seguida, imersas em recipiente de plástico contendo 75 mL de água destilada, a 25 °C por 24 horas (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Antes das leituras, cada recipiente foi brevemente agitado com o objetivo de homogeneizar a solução com os lixiviados das sementes (VIEIRA, 1994), e a condutividade elétrica da solução foi determinada utilizando um condutivímetro Tecnal Tec-4MP. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

3.1.4. Emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência

Quatro repetições de 50 sementes foram semeadas em caixas de plástico (33,0 cm x 21,8 cm x 10,3 cm) contendo areia previamente esterilizada e umedecida com volume de água equivalente a 50% da capacidade de retenção de água (BRASIL, 2009; MARCOS-FILHO; KIKUTI; LIMA, 2009). As caixas permaneceram sob condições não controladas, e a determinação da porcentagem de plântulas emergidas foi feita aos oito dias (MARCOS-FILHO; KIKUTI; LIMA, 2009). O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado segundo a equação de Maguire (1962), a partir da contagem diária do número de plântulas emergidas:

$$IVE = \sum (n_i/t_i)$$

Em que: n_i = número de plântulas emergidas no dia da contagem

t_i = número de dias em que foi realizada a contagem, após a instalação do teste.

3.1.5. Análise automatizada do comprimento médio de plântulas

Cinco repetições de 20 sementes por classe de vigor foram colocadas para germinar em substrato papel, adotando os procedimentos descritos no item 3.1.1, entretanto, as sementes foram posicionadas no terço superior da folha de papel. Oito dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para papel cartonado preto (30,0 x 23,0 cm), e posicionadas no interior da cabine do equipamento SeedReporter™ (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda) para captura de imagens RGB de alta resolução (2.448 x 2.448 pixels; 3,69 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). O comprimento médio das plântulas (em pixels) foi determinado de forma automatizada pelo *software* SeedReporter™ (versão 5.5.1) após a segmentação das imagens, isto é, após todos os pixels do fundo da imagem serem rotulados com o valor de zero (pixel preto). O tamanho dos “esqueletos” das plântulas foi calculado com base na junção dos pixels da região do cotilédone-hipocótilo-raiz primária da imagem de cada plântula segmentada (Figura 1). A calibração da

primeira imagem permitiu a alteração padronizada da unidade de pixels para milímetros para extração dos dados de todas as imagens subsequentes. Para isso, um objeto-referência (tamanho conhecido) foi posicionado no limite interno do papel cartonado, contendo a primeira repetição de plântulas a ser analisada. A informação sobre o tamanho do objeto-referência (em mm), foi inserida no *software* para a associação do número de pixels do objeto na imagem com suas medidas em milímetros, permitindo a extração do comprimento médio das plântulas também em milímetros. Após a extração dos dados, os valores foram convertidos em centímetros.

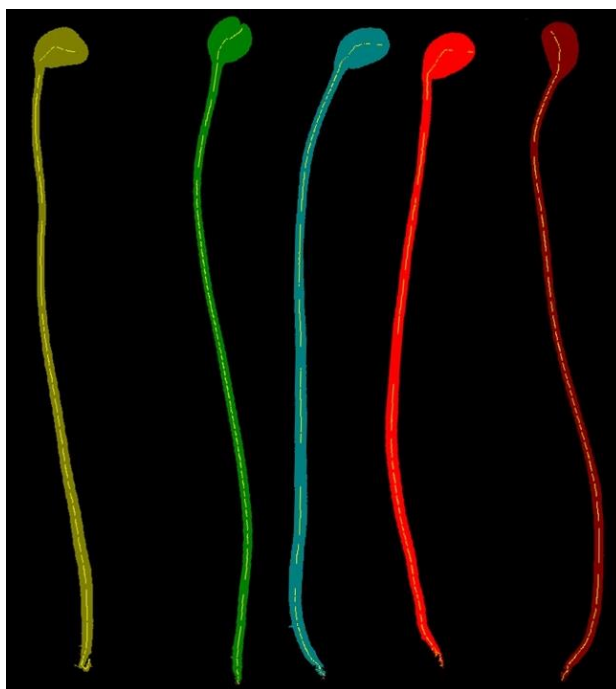


Figura 1 – Imagem digital de plântulas de soja com oito dias de idade (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO), com destaque para o “esqueleto” (linhas em amarelo), calculado pelo *software* SeedReporter™ (versão 5.5.1). O reconhecimento e separação de cada plântula da amostra ocorre de forma automática pelo *software*, a partir do mapeamento dos pixels com cores diferentes para cada objeto (plântula).

3.1.6. Massa seca, fluorescência e índice da clorofila *a* e índice de antocianinas do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones de plântulas

A massa seca, FC_M , C_{IDX} e índice de antocianinas (A_{IDX}) do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones foram determinados em plântulas com oito dias de idade. As plântulas foram preparadas seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.5. A FC_M , C_{IDX} e A_{IDX} foram calculados a partir de imagens multiespectrais utilizando o equipamento SeedReporter™ (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda) e o *software* SeedReporter™ versão 5.5.1. As folhas primárias foram removidas imediatamente antes da captura das imagens dos

cotilédones, e *vice-versa*, para evitar que a sobreposição natural destas partes prejudicasse a determinação dos parâmetros.

Antes da aquisição das imagens, foi feito o ajuste individual e automatizado da intensidade da luz para otimizar a iluminação das plântulas e melhorar a relação sinal-ruído. Para excitação das moléculas de clorofila, foram utilizados LEDs de 620 nm e fluxo de fótons de $6.320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A FC_M foi detectada a 730 nm pela câmera CCD do equipamento e o sinal foi transmitido para um conversor analógico-digital de 14 bits. O C_{IDX} e o A_{IDX} foram calculados com base nos dados da reflectância (ρ) a 710 e 770 nm ($C_{IDX} = [\rho_{770}/ \rho_{710}] - 1$) (GITELSON; GRITZ; MERZLYAK, 2003), e a 540, 710 e 770 nm ($A_{IDX} = \rho_{770} * [1/ \rho_{540}] - [1/ \rho_{710}]$) (GITELSON et al., 2001).

Após a segmentação (conforme descrito no item 3.1.5), foi feita a separação manual das partes da plântula com auxílio do cursor, e os valores de FC_M , C_{IDX} e A_{IDX} do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones foram calculados considerando a média dos pixels de cada uma destas partes.

Após a captura das imagens de FC_M , C_{IDX} e A_{IDX} , as diferentes partes das plântulas de cada repetição foram inseridas separadamente em sacos de papel e secos em estufa a 80°C por 24 horas (CORRÊA; COELHO, 2021), resfriados em dessecador, e posteriormente pesados em balança analítica de precisão (0,001 g) para a determinação da massa seca média do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones das plântulas.

3.2. Fluorescência de clorofila inicial das sementes

Para determinação da fluorescência inicial das sementes, foram capturadas imagens de FC_M de quatro repetições de 50 sementes, posicionadas em placas de acrílico pretas (10,0 x 10,0 cm) utilizando o equipamento SeedReporter™ (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda). As placas foram posicionadas a 20,0 cm dos LEDs de excitação (620 nm). A excitação das moléculas de clorofila, e detecção da fluorescência (730 nm) foi realizada conforme descrito no item 3.1.6. Antes da aquisição das imagens, a intensidade de luz foi ajustada para evitar sobrecarga. Em seguida, imagens de alta resolução (2.448 x 2.448 pixels; 3,69 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) foram geradas. As imagens de FC_M foram processadas pelo *software* SeedReporter™ versão 5.5.1.

3.3. Avaliação da fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas

Para a avaliação da fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas, foram utilizadas quatro repetições contendo 10 recipientes de poliestireno de 500 mL (cinco sementes/recipiente), preenchidos com uma mistura de casca de pinus, turfa e vermiculita, contidos. Os recipientes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada a 25 °C, UR variando de 44 a 73%, e fotoperíodo de 16 horas utilizando LEDs de 13 Watts. A distância entre a superfície do substrato e os LEDs foi de 17,0 cm. Aos quatro dias após a semeadura, foi feito o desbaste das plântulas para evitar sobreposição das folhas, mantendo-se uma plântula por recipiente.

Nos tratamentos provenientes de sementes artificialmente envelhecidas, foram capturadas imagens de FC_M , F_0 , F_M , F_V/F_M e C_{IDX} (GITELSON; GRITZ; MERZLYAK, 2003) aos 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 e 14 dias após a semeadura, utilizando o equipamento SeedReporter™ (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda). Para os tratamentos de armazenamento (plântulas provenientes de sementes envelhecidas naturalmente), os padrões da FC_M , F_0 , F_M , F_V/F_M e C_{IDX} foram analisados somente aos quatro dias do teste de germinação (tempo considerado mais promissor no estudo de sementes artificialmente envelhecidas). A excitação das moléculas de clorofila, e detecção da fluorescência foi realizada conforme descrito no item 3.1.6.

Antes da aquisição das imagens, foi feito o ajuste individual e automatizado da intensidade da luz para otimizar a iluminação das plântulas e melhorar a relação sinal-ruído. Para obtenção de dados, foi feita a adaptação prévia das amostras no escuro por 30 minutos (JANSEN et al., 2009). A diferença entre F_0 e F_M representa a F_V . A partir dos sinais de F_0 , F_M e F_V detectados, foram geradas imagens de F_V/F_M ($= F_M - F_0 / F_M$) (MAXWELL; JOHNSON, 2000; BAKER, 2008). Após a segmentação, os dados foram extraídos considerando a média de todos os pixels da imagem.

3.4. Procedimento estatístico

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo aplicados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de Bartlett antes da comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados foram processados com o *software* estatístico R (versão 4.0.2, pacote Exp.Des). Para os dados de F_0 , F_M , F_V/F_M , FC_M e C_{IDX} durante a germinação,

foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (variância) e de Nemenyi (comparação múltipla) (pacote PMCMRplus), uma vez que nem todos parâmetros apresentaram dados normais e homogêneos ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Considerando que o primeiro dia de captura das imagens (4º dia do experimento), apresentou dados normalizados para todos os parâmetros de fluorescência, C_{IDX} e F_V/F_M , os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($P > 0,05$). Antes da utilização dos testes não paramétricos, tentou-se a transformação Box-Cox dos dados. Entretanto, não foi encontrado lambda (Pacote MASS) comum entre os dias de captura das imagens, capaz de normalizar os dados e homogeneizar as variâncias destes, para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 2). Outros coeficientes de transformação foram testados e também não possibilitaram a utilização dos testes paramétricos.

Por fim, foi feita a correlação dos dados de F_0 , F_M , F_V/F_M , FC_M e C_{IDX} coletados aos quatro dias após a semeadura com os testes de germinação, condutividade elétrica, EASS, emergência, IVE e comprimento médio de plântulas. Os coeficientes de correlação de Spearman foram obtidos com o pacote “Hmisc” do *software* estatístico R (versão 4.0.2). Para análise da correlação de Spearman, adotou-se a interpretação dos valores absolutos apresentada por Schober et al. (2018): inexistente (0,0 – 0,09); fraca (0,1-0,39); moderada (0,4 – 0,69); forte (0,7 – 0,89) e muito forte (0,9-1,0).

Tabela 1 – Probabilidade de significância (valor-*p*) da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste Bartlett dos dados originais de fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima (F_M), eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_M), fluorescência média da clorofila *a* (FC_M) e índice de clorofila *a* (C_{IDX}) durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.) dos cultivares M8349IPRO e M5917IPRO. Os dados atendem ao pressuposto da normalidade e homogeneidade se valor-*p* > 0,05.

M8349IPRO		<i>Shapiro-Wilk</i>					<i>Bartlett</i>				
Dia	F₀	F_M	F_v/F_M	FC_M	C_{IDX}	F₀	F_M	F_v/F_M	FC_M	C_{IDX}	
4	0,654	0,208	0,777	0,272	0,339	0,106	0,273	0,200	0,053	0,324	
5	0,824	0,784	0,002	0,725	0,91	0,308	0,244	0,000	0,874	0,66	
6	0,165	0,770	0,000	0,958	0,995	0,005	0,050	0,000	0,156	0,28	
7	0,036	0,189	0,000	0,080	0,372	0,001	0,013	0,000	0,001	0,014	
8	0,001	0,001	0,000	0,003	0,002	0,003	0,001	0,000	0,002	0,000	
10	0,000	0,000	0,005	0,000	0,1848	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	
12	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
14	0,148	0,001	0,000	0,029	0,089	0,043	0,001	0,000	0,000	0,666	

M5917IPRO		<i>Shapiro-Wilk</i>					<i>Bartlett</i>				
Dia	F₀	F_M	F_v/F_M	FC_M	C_{IDX}	F₀	F_M	F_v/F_M	FC_M	C_{IDX}	
4	0,06	0,11	0,09	0,24	0,9	0,08	0,37	0,06	0,12	0,4	
5	0,02	0,04	0,54	0,06	0,16	0,05	0,96	0,12	0,08	0,00	
6	0,23	0,20	0,06	0,26	0,42	0,55	0,86	0,03	0,72	0,46	
7	0,41	0,57	0,71	0,35	0,21	0,28	0,75	0,07	0,93	0,43	
8	0,71	0,046	0,05	0,00	0,00	0,28	0,12	0,02	0,54	0,02	
10	0,03	0,24	0,17	0,76	0,26	0,09	0,03	0,00	0,08	0,11	
12	0,16	0,26	0,06	0,21	0,48	0,24	0,04	0,00	0,49	0,09	
14	0,00	0,00	0,00	0,007	0,04	0,013	0,06	0,00	0,23	0,06	

Tabela 2 – Valores de λ para transformação Box-Cox dos dados originais de fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima (F_M), eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_M), fluorescência média da clorofila *a* (FC_M) e índice de clorofila *a* (C_{IDX}) durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.) dos cultivares M8349IPRO e M5917IPRO.

Dia	M8349IPRO					M5917IPRO				
	F₀	F_M	F_v/F_M	FC_M	C_{IDX}	F₀	F_M	F_v/F_M	FC_M	C_{IDX}
4	0,1	0,3	1,8	0,2	-0,2	0,8	0,8	1,4	0,8	0,3
5	1,5	1,5	3,6	1,0	0,9	4,6	1,1	3,6	0,7	-1,8
6	4,1	3,7	13,0	3,1	1,6	2	1,7	8,9	1,9	0,6
7	6,3	5,0	19,2	4,3	3,5	0,3	1,4	7,1	0,8	2,3
8	3,7	4,8	17,0	4,0	5,3	0	1,7	7,4	1,1	3,2
10	8,8	9,5	20,0	9,2	9,9	3,3	5	8,7	3,6	5,2
12	7,3	9,0	20,0	7,4	6,1	3,9	4	3,9	2,7	5,8
14	6,5	9,6	20,0	10,4	5,8	1,9	3,5	11,3	2,5	6

4. RESULTADOS

4.1. Qualidade fisiológica de sementes artificialmente envelhecidas

No estudo das classes de sementes do cultivar M8349IPRO, verificou-se redução na germinação apenas a partir de 48 horas de envelhecimento, aos cinco e oito dias após a semeadura (Figura 2A). Em paralelo, houve um aumento expressivo nos valores de condutividade elétrica (Figuras 2B), menor resistência ao estresse provocado pelo EASS (Figura 2C), emergência (Figura 2D), IVE (Figura 2E) e comprimento médio das plântulas (Figura 2F). Comparando todos os testes, as diferenças no vigor das sementes foram melhor detectadas pelo teste de EASS, que separou as sementes em quatro grupos: (i) sementes envelhecidas por 0 e 16 horas, (ii) sementes envelhecidas por 24 horas, (iii) sementes envelhecidas por 48 horas, e (iv) sementes envelhecidas por 72 horas (Figura 2C). Com relação ao comprimento médio das plântulas, verificou-se efeito hormético (estímulo) do estresse térmico promovido pelo envelhecimento artificial por 16 horas, com decréscimo significativo verificado apenas nas sementes envelhecidas por 48 e 72 horas (Figura 2F).

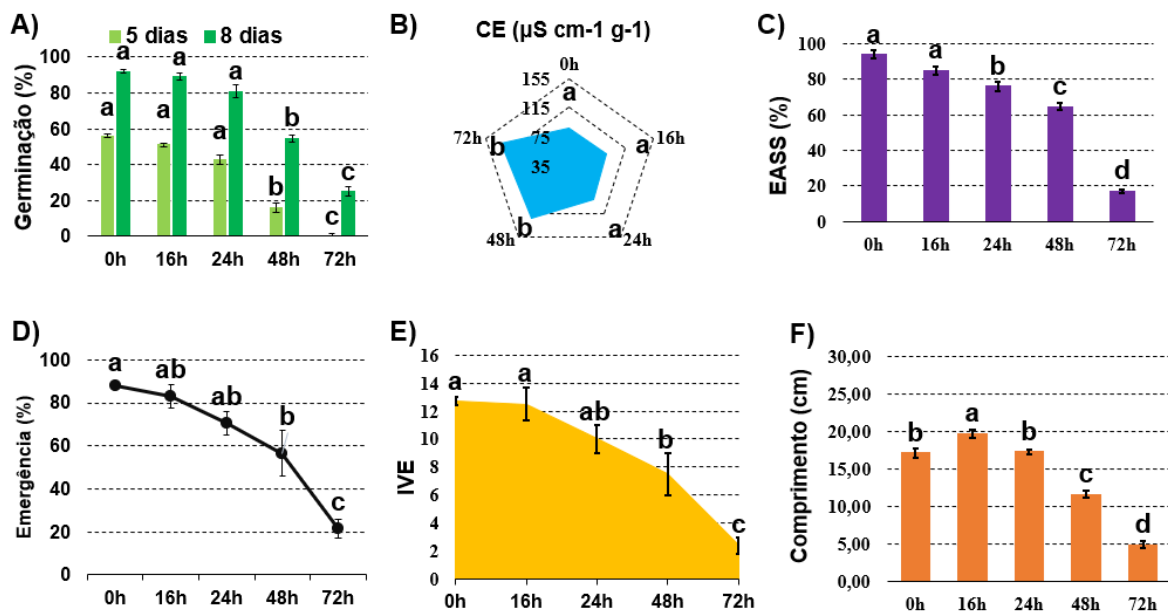


Figura 2 – Qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas com base no teste de germinação aos cinco e oito dias (A), condutividade elétrica – CE (B), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal – EASS (C), emergência (D), índice de velocidade de emergência – IVE (E) e comprimento médio de plântulas gerado pelo *software* SeedReporter™ (F). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$)

A avaliação da massa seca das diferentes partes das plântulas do cultivar M8349IPRO aos oito dias de idade (Figura 3A), indicou que houve menor consumo de reservas cotiledonares das plântulas provenientes das classes menos vigorosas (48 h e 72 h), concomitantemente com a inibição do desenvolvimento do hipocótilo e das folhas primárias destas classes (Figura 3A). Interessantemente, antes de haver alteração significativa na massa seca dos cotilédones das plântulas com o avanço do envelhecimento, a FC_M (Figura 3B) e o C_{IDX} (Figura 3C) dos cotilédones foram afetados, com redução significativa a partir de 24 horas de envelhecimento, indicando maior sensibilidade destes parâmetros para monitoramento de mudanças provocadas pelo estresse.

A FC_M das folhas primárias (Figura 3B) foi menos prejudicada, enquanto que no hipocótilo houveram diferenças significativas (Figura 3B). Os resultados obtidos para o C_{IDX} (Figura 3C), revelaram que a redução na fluorescência dos cotilédones com 24 horas de envelhecimento (Figura 3B) foi acompanhada de decréscimo no conteúdo dessas moléculas. Entretanto, nas folhas primárias, houve incremento no conteúdo de clorofila *a* e de antocianinas nos tempos de 16 e 24 horas, evidenciando efeito hormético para estes parâmetros (Figuras 3C, D). Já no hipocótilo, foi detectado aumento no C_{IDX} no tempo de 72 horas de envelhecimento (Figura 3C) e no A_{IDX} das classes de 48 e 72 horas (Figura 3D).

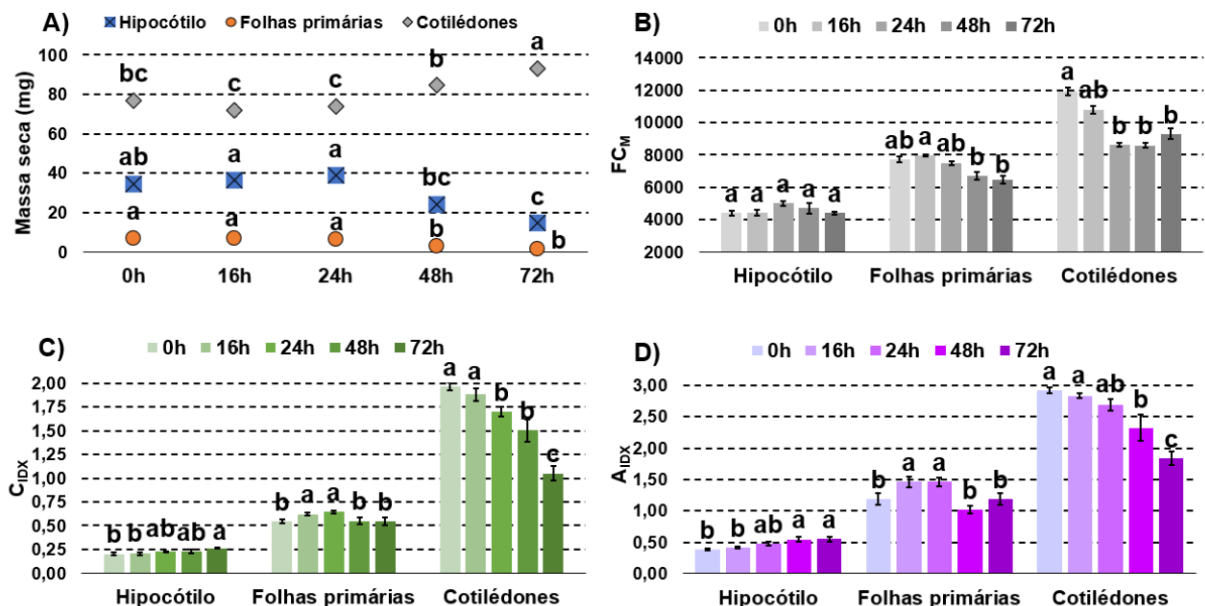


Figura 3 – Massa seca (A), fluorescência média da clorofila *a* (FC_M) (B), índice de clorofila *a* (C_{IDX}) (C) e índice de antocianinas (A_{IDX}) (D) do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) aos oito dias de idade, provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

No cultivar M5917IPRO, o teste de germinação indicou redução no desempenho das sementes a partir de 24 horas de envelhecimento, aos cinco e oito dias após a semeadura (Figura 4A). Houve aumento nos valores de condutividade elétrica (Figura 4B), concomitantemente com menor resistência ao estresse provocado pelo EASS (Figura 4C). Entretanto, somente após 48 horas de envelhecimento artificial, foi observada redução significativa na porcentagem de emergência (Figura 4D) e IVE (Figura 4E). Já o decréscimo no comprimento das plântulas ocorreu após 24 horas (Figura 4F). Portanto, o efeito do envelhecimento artificial no vigor das sementes foi melhor identificado pelos testes de condutividade elétrica e EASS, por separarem as sementes deste cultivar também em quatro grupos distintos: (i) sementes envelhecidas por 0 horas, (ii) sementes envelhecidas por 16 e 24 horas, (iii) sementes envelhecidas por 48 horas, e (iv) sementes envelhecidas por 72 horas (Figura 4B e 4C).

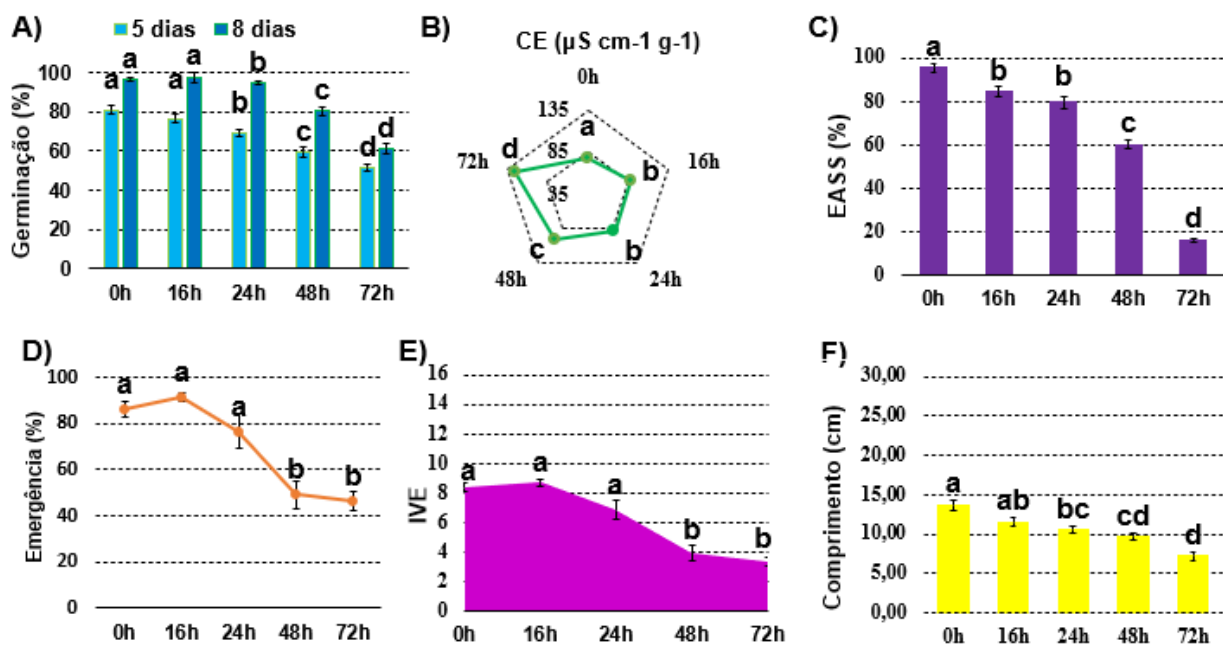


Figura 4 – Qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas com base no teste de germinação aos cinco e oito dias (A), condutividade elétrica – CE (B), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal – EASS (C), emergência (D), índice de velocidade de emergência – IVE (E) e comprimento médio de plântulas gerado pelo *software* SeedReporter™ (F). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Similarmente ao cultivar M8349IPRO, também foi identificada menor eficiência de utilização das reservas pela classe mais envelhecida (72 horas), conforme verificado pela diferença da massa seca do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones desta classe (Figura 5A). Isto pode estar associado ao menor desenvolvimento do hipocótilo e das folhas primárias (Figura 5A). A intensidade de FC_M (Figura 5B) e o C_{IDX} (Figura 5C) dos cotilédones reduziram

nos tempos de 48 e 72 horas (Figuras 5B, C). Adicionalmente, houve efeito hormético na FC_M do hipocótilo e das folhas primárias, de modo que houve aumento da fluorescência a partir de 16 horas, e redução nos tempos de envelhecimento maiores (Figura 5B). Apesar disto, não houve redução no C_{IDX} do hipocótilo e das folhas primárias (Figura 5C). Diferentemente do cultivar M8349IPRO, o A_{IDX} do hipocótilo declinou nos tempos de envelhecimento intermediários (efeito hormético), porém, à medida que o conteúdo desse pigmento reduziu nos cotilédones, houve incremento nas folhas primárias (Figura 5D).

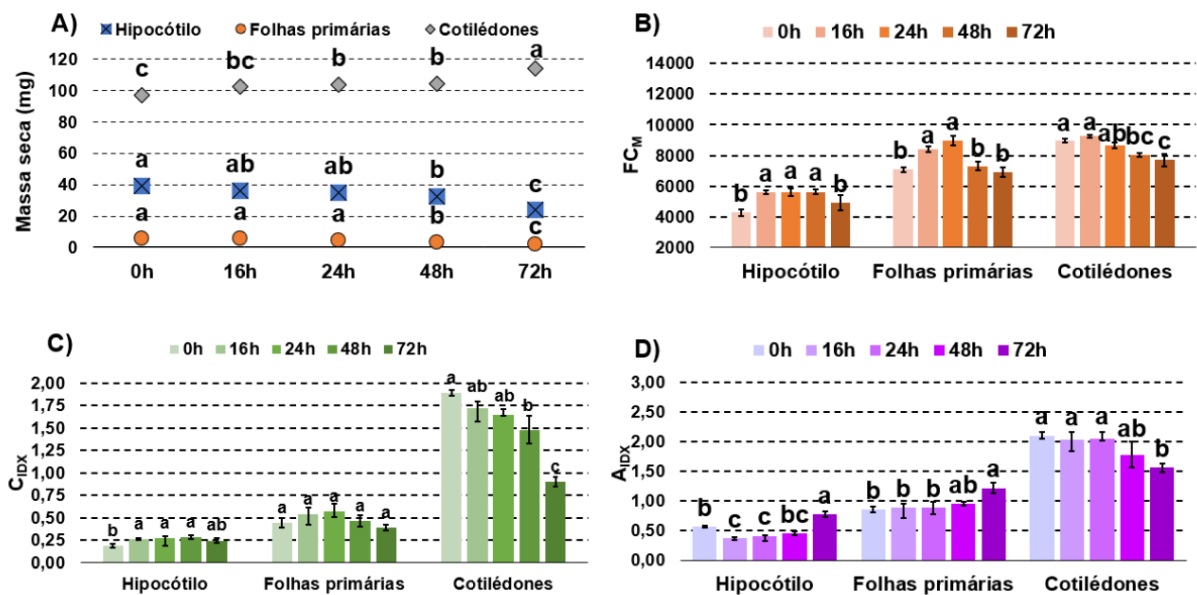


Figura 5 – Massa seca (A), fluorescência média da clorofila *a* (FC_M) (B), índice de clorofila *a* (C_{IDX}) (C) e índice de antocianinas (A_{IDX}) (D) do hipocótilo, folhas primárias e cotilédones das plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) aos oito dias de idade, provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.2. Fluorescência de clorofila inicial das sementes envelhecidas artificialmente

Foram capturadas imagens de FC_M das sementes antes da germinação (Figura 6) para análise exploratória de cada classe de vigor e detecção da possível presença de sementes esverdeadas. Os dados de fluorescência de clorofila inicial das sementes indicaram aumento nos sinais de ambos os cultivares com o avanço do tempo de envelhecimento (Figura 6). Para o cultivar M8349IPRO (Figura 6A), esse aumento foi significativo nas sementes mais envelhecidas, ou seja, classes de 48 e 72 horas, enquanto que no cultivar M5917IPRO (Figura 6B), houve aumento mais precoce, a partir de 16 horas de envelhecimento, com pico no envelhecimento de 72 horas.

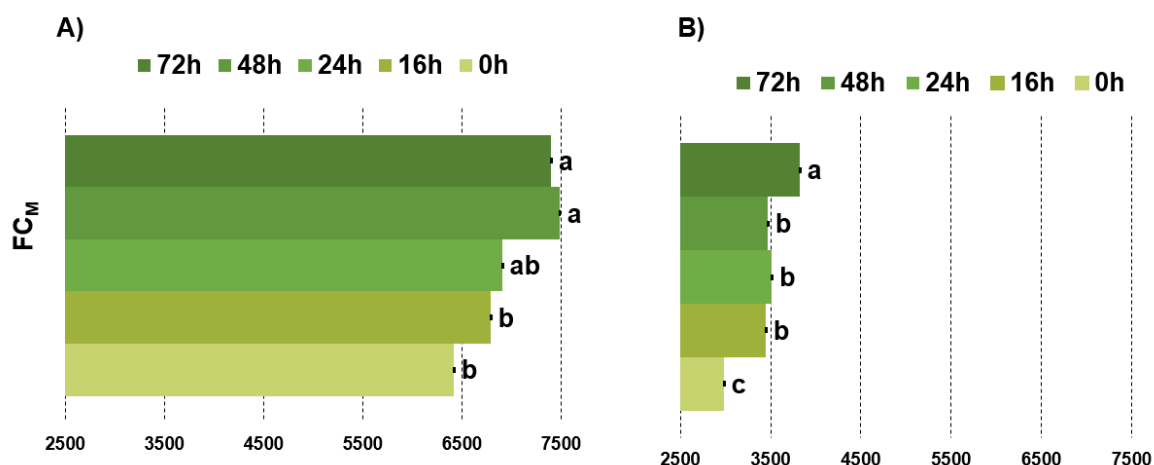


Figura 6 – Fluorescência média da clorofila *a* (FC_M) de sementes de soja (*Glycine max* L.) dos cultivares M8349IPRO (A) e M5917IPRO (B) envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas, obtida pela combinação de excitação-emissão de 620-730nm. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3. Fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas provenientes de sementes artificialmente envelhecidas

A análise não paramétrica dos dados obtidos para o cultivar M8349IPRO (4 e 5 dias), no geral, revelou que os sinais de F_0 , F_M , FC_M , e F_v/F_M foram eficientes na detecção de diferenças de vigor (p -valor $< 0,05$), especialmente entre as classes de sementes não envelhecidas e mais envelhecidas (72 horas) (Tabelas 3, 4, 5 e 6), acompanhada de alterações no conteúdo de clorofila *a* (Tabela 7). Entretanto, à medida que os estádios de desenvolvimento das plântulas progrediram, as diferenças significativas oscilaram entre os tipos de classes para cada parâmetro analisado (Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7). Por exemplo, no 8º dia, os parâmetros de F_0 (Tabela 3E) e F_M (Tabela 4E) se mostraram eficientes na identificação de diferenças de vigor entre as classes de sementes não envelhecidas e sementes envelhecidas por 48 e 72 horas, e no 10º e 12º dia, os sinais de F_0 continuaram a separar as sementes não envelhecidas das duas classes de sementes com maior tempo de envelhecimento (Tabela 3F e 3G). Por outro lado, nesses estádios de desenvolvimento da plântula (ou seja, 10 e 12 dias de idade), o F_M se mostrou menos sensível, separando apenas as sementes não envelhecidas da classe de 72 horas (Tabelas 4F e 4G), e enquanto isso, os sinais de F_v/F_M possibilitaram distinções somente entre as classes de 16 e 48 horas (Tabela 6F, G).

Tabela 3- Teste de Nemenyi (p -valor) para a fluorescência mínima (F_0) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,682	-	-	-
24h	0,566	0,644	-	-	24h	0,378	0,989	-	-
48h	0,102	0,135	0,875	-	48h	0,451	0,997	1,000	-
72h	0,006	0,009	0,311	0,875	72h	0,003	0,154	0,378	0,311
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,010	-	-	-	16h	0,966	-	-	-
24h	0,009	0,009	-	-	24h	0,719	0,489	-	-
48h	0,280	0,280	0,850	-	48h	0,076	0,028	0,682	-
72h	0,530	0,530	0,980	0,990	72h	0,040	0,013	0,527	0,999
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,875	-	-	-	16h	0,451	-	-	-
24h	0,527	0,976	-	-	24h	0,819	0,976	-	-
48h	0,024	0,251	0,605	-	48h	0,040	0,788	0,414	-
72h	0,005	0,884	0,311	0,989	72h	0,006	0,414	0,135	0,976
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,527	-	-	-	16h	0,680	-	-	-
24h	0,527	1,000	-	-	24h	0,450	1,000	-	-
48h	0,012	0,898	0,898	-	48h	0,150	0,570	0,790	-
72h	0,006	0,343	0,343	0,875	72h	0,150	0,870	0,980	0,980

Tabela 4 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a fluorescência máxima (F_M) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A)		4 dias				B)		5 dias			
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h		
16h	1,000	-	-	-	16h	0,898	-	-	-		
24h	0,566	0,644	-	-	24h	0,378	0,898	-	-		
48h	0,102	0,135	0,875	-	48h	0,076	0,451	0,937	-		
72h	0,006	0,009	0,311	0,875	72h	0,002	0,040	0,311	0,788		
C)		6 dias				D)		7 dias			
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h		
16h	0,996	-	-	-	16h	0,989	-	-	-		
24h	0,998	0,965	-	-	24h	0,998	0,965	-	-		
48h	0,311	0,154	0,489	-	48h	0,224	0,076	0,378	-		
72h	0,006	0,224	0,135	0,953	72h	0,076	0,020	0,154	0,989		
E)		8 dias				F)		10 dias			
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h		
16h	0,953	-	-	-	16h	0,983	-	-	-		
24h	0,605	0,953	-	-	24h	0,983	1,000	-	-		
48h	0,034	0,199	0,605	-	48h	0,076	0,251	0,251	-		
72h	0,007	0,065	0,311	0,989	72h	0,028	0,118	0,118	0,996		
G)		12 dias				H)		14 dias			
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h		
16h	0,919	-	-	-	16h	0,605	-	-	-		
24h	0,377	0,875	-	-	24h	0,199	0,953	-	-		
48h	0,056	0,343	0,898	-	48h	0,028	0,566	0,937	-		
72h	0,007	0,088	0,527	0,965	72h	0,012	0,848	0,998	0,989		

Tabela 5 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a fluorescência média da clorofila a (FC_M) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,999	-	-	-
24h	0,919	0,875	-	-	24h	0,994	0,965	-	-
48h	0,199	0,154	0,682	-	48h	0,280	0,175	0,527	-
72h	0,016	0,011	0,154	0,875	72h	0,028	0,013	0,088	0,875
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,937	-	-	-	16h	1,000	-	-	-
24h	0,965	1,000	-	-	24h	0,870	0,940	-	-
48h	0,719	0,251	0,311	-	48h	1,000	1,000	0,920	-
72h	0,154	0,020	0,028	0,848	72h	0,340	0,250	0,040	0,280
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,940	-	-	-	16h	0,451	-	-	-
24h	0,250	0,720	-	-	24h	0,919	0,919	-	-
48h	0,250	0,720	1,000	-	48h	0,566	0,013	0,135	-
72h	0,920	1,000	0,750	0,750	72h	0,489	0,009	0,102	1,000
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,644	-	-	-	16h	0,976	-	-	-
24h	0,566	1,000	-	-	24h	0,566	0,898	-	-
48h	0,819	0,102	0,076	-	48h	0,719	0,343	0,047	-
72h	0,378	0,013	0,009	0,953	72h	0,251	0,065	0,004	0,937

Tabela 6 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,983	-	-	-
24h	0,996	1,000	-	-	24h	1,000	0,953	-	-
48h	0,224	0,311	0,414	-	48h	0,378	0,135	0,489	-
72h	0,020	0,034	0,056	0,875	72h	0,047	0,009	0,076	0,875

C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,994	-	-	-	16h	0,998	-	-	-
24h	0,999	1,000	-	-	24h	0,605	0,788	-	-
48h	0,311	0,135	0,199	-	48h	0,898	0,754	0,135	-
72h	0,135	0,047	0,076	0,994	72h	0,414	0,251	0,013	0,919

E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,790	-	-	-	16h	0,527	-	-	-
24h	0,550	1,000	-	-	24h	0,819	0,989	-	-
48h	0,290	0,930	0,990	-	48h	0,527	0,016	0,065	-
72h	1,000	0,930	0,750	0,490	72h	0,819	0,065	0,199	0,989

G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,175	-	-	-	16h	0,850	-	-	-
24h	0,682	0,898	-	-	24h	0,680	1,000	-	-
48h	0,719	0,005	0,760	-	48h	0,820	0,220	0,120	-
72h	0,989	0,056	0,378	0,937	72h	1,000	0,820	0,640	0,850

Tabela 7 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a índice da clorofila a durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,999	-	-	-
24h	0,919	0,875	-	-	24h	0,994	0,965	-	-
48h	0,199	0,154	0,682	-	48h	0,280	0,175	0,527	-
72h	0,016	0,011	0,154	0,875	72h	0,028	0,013	0,088	0,875

C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,937	-	-	-	16h	1,000	-	-	-
24h	0,965	1,000	-	-	24h	0,870	0,940	-	-
48h	0,719	0,251	0,311	-	48h	1,000	1,000	0,920	-
72h	0,154	0,020	0,028	0,848	72h	0,340	0,250	0,040	0,280

E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,940	-	-	-	16h	0,451	-	-	-
24h	0,250	0,720	-	-	24h	0,919	0,919	-	-
48h	0,250	0,720	1,000	-	48h	0,566	0,013	0,135	-
72h	0,920	1,000	0,750	0,750	72h	0,489	0,009	0,102	1,000

G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,644	-	-	-	16h	0,976	-	-	-
24h	0,566	1,000	-	-	24h	0,566	0,898	-	-
48h	0,819	0,102	0,076	-	48h	0,719	0,343	0,047	-
72h	0,378	0,013	0,009	0,953	72h	0,251	0,065	0,004	0,937

Ao final do experimento (14º dia), embora não tenham sido observadas diferenças entre os sinais de F_0 e F_V/F_M das classes (Tabelas 3H e 6H, respectivamente), os sinais de F_M e FC_M mostraram diferença significativa entre as classes de 0 vs. 48 h e 0 vs. 72 horas (F_M) (Tabela 4H) e entre as classes de 24 vs. 48 h e 24 vs. 72 horas (FC_M) (Tabela 5H).

No 7º e 8º dia do experimento, nenhuma diferença significativa foi detectada no C_{IDX} (p -valor > 0,05) (Tabela 7D, E), sendo as diferenças marcantes nos períodos finais de avaliação para as classes de 16 vs. 48 horas (10º dia) (Tabela 7F), 16 vs. 72 horas e 24 vs. 72 horas (12º dia) (Tabela 7G), e 24 vs. 48 horas e 24 vs. 72 horas (14º dia) (Tabela 7H).

Uma vez que os dados obtidos de plântulas aos quatro dias de idade atenderam ao pressuposto da normalidade e homogeneidade para todos os parâmetros de fluorescência de clorofila, C_{IDX} e F_V/F_M (Tabela 1), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os sinais de FC_M , F_0 e F_M diminuíram com o avanço do período de envelhecimento artificial (Figura 7A-C), concomitantemente com uma redução nos valores de F_V/F_M e conteúdo de clorofila (Figura 7D, E), havendo melhor discriminação do vigor para a FC_M , F_0 e F_M (Figura 7A,B,C), com separação das sementes em quatro grupos, similarmente ao teste de EASS (Figura 2C): (i) sementes envelhecidas por 0 e 16 horas, (ii) sementes envelhecidas por 24 horas, (iii) sementes envelhecidas por 48 horas, e (iv) sementes envelhecidas por 72 horas. As diferenças na intensidade do sinal de F_M entre estes grupos foram ilustradas na Figura 8.

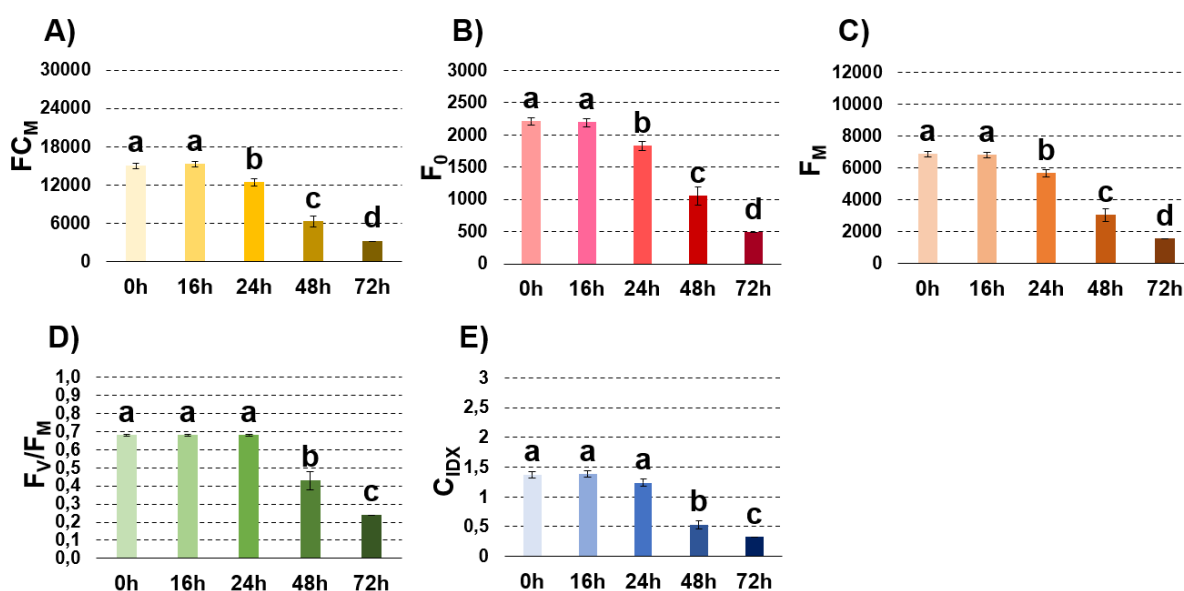


Figura 7 – Fluorescência média - FC_M (A), mínima - F_0 (B) e máxima - F_M (C) da clorofila *a*, eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II - F_V/F_M (D), e índice de clorofila *a* - C_{IDX} (E) de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) aos quatro dias de idade, provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

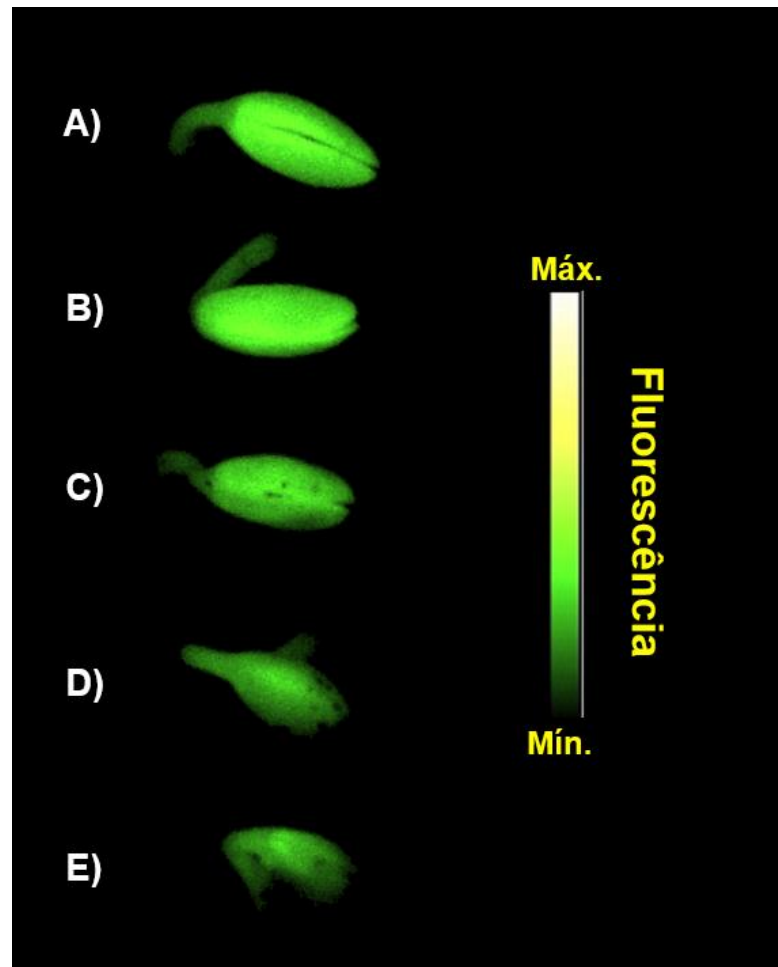


Figura 8 – Imagens de fluorescência máxima (F_M) da clorofila a de uma plântula representativa de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) aos quatro dias de idade para classes de sementes envelhecidas artificialmente por 0 (A), 16 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 horas (E).

No início do estabelecimento das plântulas do cultivar M5917IPRO (4º dia) já foi possível identificar diferenças entre classes de vigor para todos os parâmetros estudados (FC_M , F_0 , F_M , F_V/F_M , e C_{IDX}) (Tabelas 8-12), contudo, isso aconteceu principalmente para as classes de vigor mais distintos, ou seja, 0 vs 48 horas e 0 vs 72 horas, não sendo possível identificar diferenças entre classes de maior vigor (0 vs 16 horas e 0 vs 24 horas). Com o avanço do desenvolvimento das plântulas, houveram diferenças significativas também entre as classes de 16 e 72 horas para os níveis de F_0 (Tabela 8C-H), F_M (Tabela 9B-G) e FC_M (Tabela 10-B-G), porém, as diferenças estatísticas entre as classes de 16 e 72 horas desapareceram no 14º dia para o parâmetro F_M (Tabela 9H).

Em relação aos níveis de F_V/F_M , além das diferenças estatísticas constatadas no 4º dia, também foi possível separar as classes de 0 vs. 48 horas e 16 vs. 48 horas no 5º dia, 0 vs. 72 horas e 16 vs. 72 horas no 6º dia, 16 vs. 72 horas no 10º dia e de 24 vs. 72 horas no 14º dia (Tabela 11B,C,F,H). Para o C_{IDX} , as diferenças foram marcantes apenas entre o período de 4º e

7º dia, separando os grupos de 0 vs. 48 horas (4º e 5º dia), 0 vs. 72 horas (4º, 5º e 6º dia), 16 vs. 48 horas (4º e 5º dia), 16 vs. 72 horas (4º, 5º, 6º e 7º dia) (Tabela 12A-D), não sendo detectadas variações significativas no C_{IDX} entre as classes com o avanço da idade das plântulas (Tabela 12E-H).

A avaliação das imagens do quarto dia após a semeadura pelo teste de Tukey indicou redução em todos os parâmetros de fluorescência, F_V/F_M e C_{IDX} do cultivar M5917IPRO (Figura 13). A FC_M (Figura 13A) e a F_M (Figura 13C) foram os parâmetros que melhor segregaram as classes de sementes: (i) 0 e 16 horas; (ii) 24 horas; (iii) 48 e 72 horas. A eficiência quântica máxima (Figura 13D) identificou os dois grupos observados nos testes de emergência e IVE (Figura 4D, E), ou seja, (i) 0, 16, 24 horas e (ii) 48 e 72 horas. Para a F_0 e o C_{IDX} (Figuras 13B, E) a redução foi significativa apenas a partir de 24 horas de envelhecimento, mas com comportamento similar entre as classes de 48 e 72 horas.

Tabela 8 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a fluorescência mínima (F_0) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,875	-	-	-	16h	0,875	-	-	-
24h	0,527	0,975	-	-	24h	0,251	0,819	-	-
48h	0,013	0,175	0,489	-	48h	0,016	0,199	0,819	-
72h	0,009	0,135	0,414	1,000	72h	0,005	0,088	0,605	0,997
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,999	-	-	-
24h	0,378	0,378	-	-	24h	0,414	0,566	-	-
48h	0,199	0,199	0,996	-	48h	0,118	0,199	0,965	-
72h	0,011	0,011	0,605	0,819	72h	0,006	0,013	0,451	0,848
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,989	-	-	-	16h	0,999	-	-	-
24h	0,451	0,754	-	-	24h	0,199	0,311	-	-
48h	0,065	0,199	0,875	-	48h	0,118	0,199	0,999	-
72h	0,003	0,016	0,311	0,875	72h	0,024	0,047	0,919	0,975
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,999	-	-	-
24h	0,451	0,343	-	-	24h	0,754	0,875	-	-
48h	0,175	0,118	0,983	-	48h	0,605	0,754	0,999	-
72h	0,034	0,020	0,754	0,965	72h	0,016	0,034	0,311	0,451

Tabela 9 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a fluorescência máxima (F_M) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,975	-	-	-	16h	0,976	-	-	-
24h	0,414	0,788	-	-	24h	0,414	0,788	-	-
48h	0,020	0,102	0,682	-	48h	0,028	0,135	0,754	-
72h	0,009	0,056	0,527	0,999	72h	0,006	0,040	0,451	0,989
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,994	-	-	-
24h	0,451	0,489	-	-	24h	0,414	0,682	-	-
48h	0,175	0,199	0,983	-	48h	0,102	0,251	0,953	-
72h	0,011	0,013	0,527	0,848	72h	0,005	0,020	0,414	0,848
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,976	-	-	-	16h	1,000	-	-	-
24h	0,311	0,682	-	-	24h	0,251	0,343	-	-
48h	0,076	0,280	0,965	-	48h	0,224	0,311	1,000	-
72h	0,003	0,024	0,451	0,848	72h	0,013	0,024	0,788	0,819
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,994	-	-	-	16h	0,983	-	-	-
24h	0,566	0,311	-	-	24h	0,989	1,000	-	-
48h	0,199	0,076	0,965	-	48h	0,605	0,898	0,875	-
72h	0,047	0,013	0,719	0,975	72h	0,028	0,118	0,102	0,566

Tabela 10 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a fluorescência média de clorofila a (FC_M) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,975	-	-	-	16h	0,976	-	-	-
24h	0,414	0,788	-	-	24h	0,414	0,788	-	-
48h	0,013	0,076	0,605	-	48h	0,024	0,088	0,682	-
72h	0,013	0,076	0,605	0,999	72h	0,011	0,047	0,527	0,999
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,994	-	-	-
24h	0,605	0,489	-	-	24h	0,343	0,605	-	-
48h	0,154	0,118	0,919	-	48h	0,102	0,279	0,983	-
72h	0,024	0,016	0,527	0,953	72h	0,005	0,023	0,5273	0,848
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,996	-	-	-	16h	1,000	-	-	-
24h	0,311	0,682	-	-	24h	0,280	0,414	-	-
48h	0,102	0,223	0,9526	-	48h	0,154	0,251	1,000	-
72h	0,004	0,0133	0,377	0,8191	72h	0,009	0,020	0,682	0,848
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,0	-	-	-	16h	1,00	-	-	-
24h	0,527	0,414	-	-	24h	0,898	0,953	-	-
48h	0,527	0,414	1,0	-	48h	0,644	0,754	0,989	-
72h	0,047	0,028	0,754	0,754	72h	0,028	0,047	0,251	0,527

Tabela 11 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	1,000	-	-	-
24h	0,719	0,819	-	-	24h	0,343	0,414	-	-
48h	0,040	0,065	0,527	-	48h	0,009	0,013	0,605	-
72h	0,028	0,047	0,451	1,000	72h	0,175	0,224	0,996	0,819
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,990	-	-	-
24h	0,343	0,414	-	-	24h	0,680	0,410	-	-
48h	0,135	0,175	0,989	-	48h	0,820	0,570	1,000	-
72h	0,034	0,047	0,848	0,983	72h	0,490	0,250	1,000	0,980
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,953	-	-	-
24h	0,750	0,570	-	-	24h	0,451	0,118	-	-
48h	0,870	0,720	1,000	-	48h	0,527	0,154	1,000	-
72h	0,250	0,140	0,920	0,820	72h	0,076	0,009	0,898	0,848
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,975	-	-	-	16h	0,754	-	-	-
24h	0,875	0,527	-	-	24h	0,055	0,566	-	-
48h	0,719	0,343	0,998	-	48h	0,682	1,000	0,644	-
72h	0,280	0,076	0,848	0,953	72h	0,953	0,311	0,006	0,251

Tabela 12 - Teste de Nemenyi (p -valor) para a índice de clorofila a (C_{IDX}) durante o estabelecimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO), provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas; p -valor < 0,05 indica diferença significativa entre as classes de sementes.

A) 4 dias					B) 5 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,975	-	-	-	16h	0,997	-	-	-
24h	0,527	0,875	-	-	24h	0,605	0,819	-	-
48h	0,013	0,007	0,489	-	48h	0,005	0,016	0,251	-
72h	0,020	0,010	0,566	1,000	72h	0,008	0,010	0,819	0,875
C) 6 dias					D) 7 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	1,000	-	-	-	16h	0,983	-	-	-
24h	0,754	0,788	-	-	24h	0,937	0,682	-	-
48h	0,175	0,199	0,848	-	48h	0,819	0,489	0,998	-
72h	0,016	0,020	0,311	0,898	72h	0,076	0,016	0,378	0,566
E) 8 dias					F) 10 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,996	-	-	-	16h	1,000	-	-	-
24h	0,788	0,566	-	-	24h	0,378	0,280	-	-
48h	0,989	1,000	0,489	-	48h	0,414	0,311	1,000	-
72h	0,224	0,102	0,875	0,076	72h	0,055	0,054	0,919	0,898
G) 12 dias					H) 14 dias				
	0h	16h	24h	48h		0h	16h	24h	48h
16h	0,788	-	-	-	16h	0,848	-	-	-
24h	0,875	0,224	-	-	24h	0,682	0,998	-	-
48h	0,527	0,056	0,976	-	48h	1,000	0,819	0,644	-
72h	0,175	0,173	0,719	0,965	72h	0,644	0,518	0,056	0,682

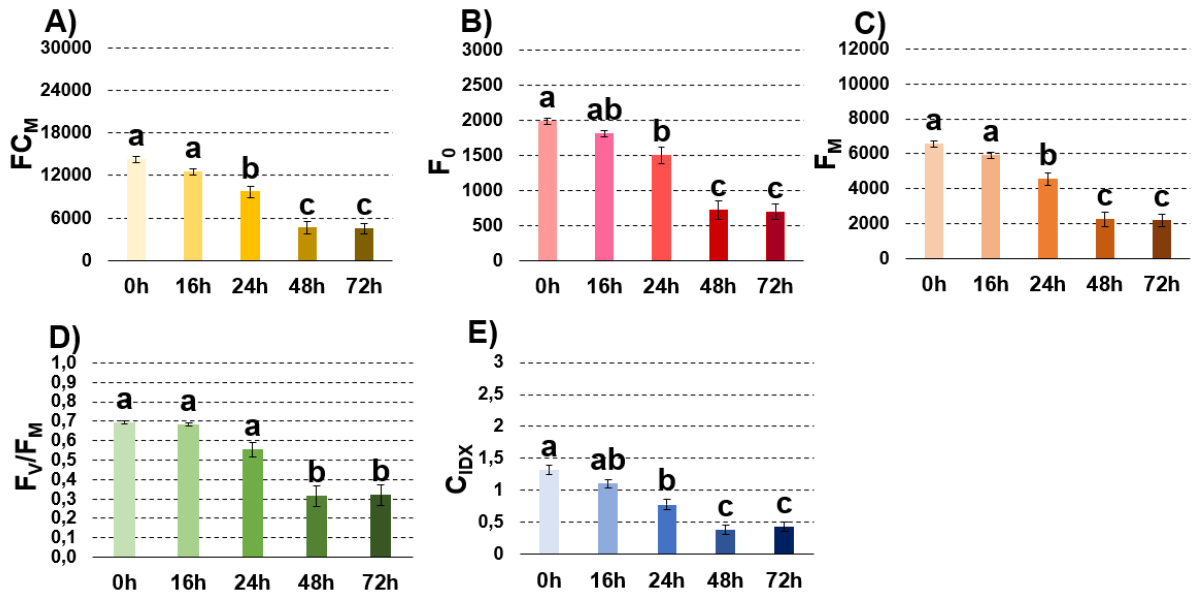


Figura 13 – Fluorescência média - FC_M (A), mínima - F₀ (B) e máxima (F_M) (C) da clorofila *a*, eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II - F_v/F_M (D), e índice de clorofila *a* - C_{idx} (E) de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO), aos quatro dias de idade, provenientes de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas. Médias (± erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

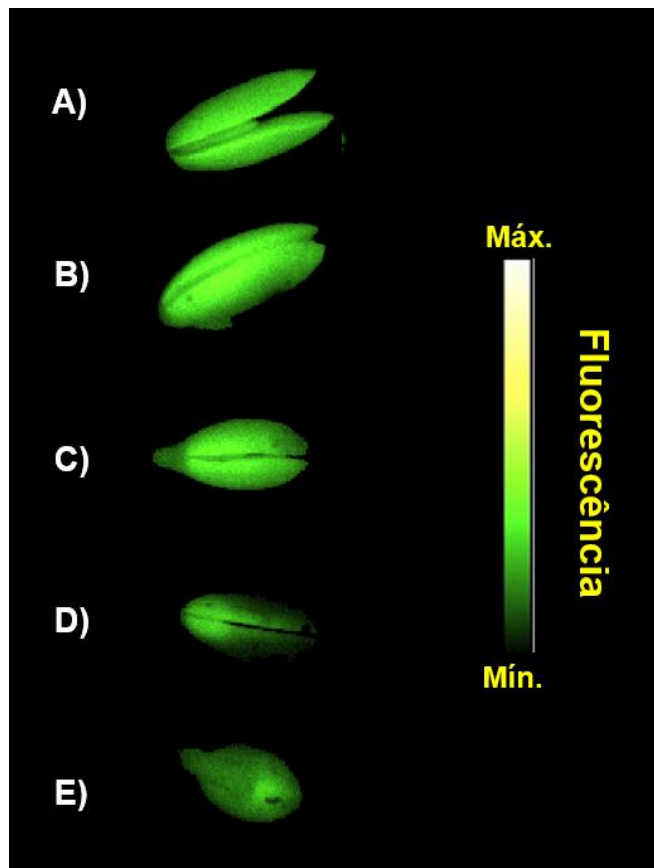


Figura 14 – Imagens de fluorescência máxima (F_M) da clorofila *a* de uma plântula representativa de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) aos quatro dias de idade para classes de sementes envelhecidas artificialmente por 0 (A), 16 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 horas (E).

4.4. Correlação entre parâmetros de fluorescência de clorofila de plântulas provenientes de sementes envelhecidas artificialmente com testes convencionais

Para as sementes do cultivar M8349IPRO, os parâmetros de FC_M , F_0 , F_M , F_V/F_M e C_{IDX} das plântulas apresentaram forte correlação com os testes fisiológicos (Figura 15). Os maiores coeficientes de correlação foram obtidos entre as seguintes variáveis: 0,96 (comprimento de plântulas vs. F_0 ou F_V/F_M), -0,95 (condutividade elétrica vs. FC_M ou F_M ou F_V/F_M ou C_{IDX}), 0,94 (germinação aos cinco dias vs. F_0 ; EASS vs. F_V/F_M), 0,89 (emergência vs. F_0 ou F_V/F_M ; IVE vs. F_0 ou F_M ou F_V/F_M).

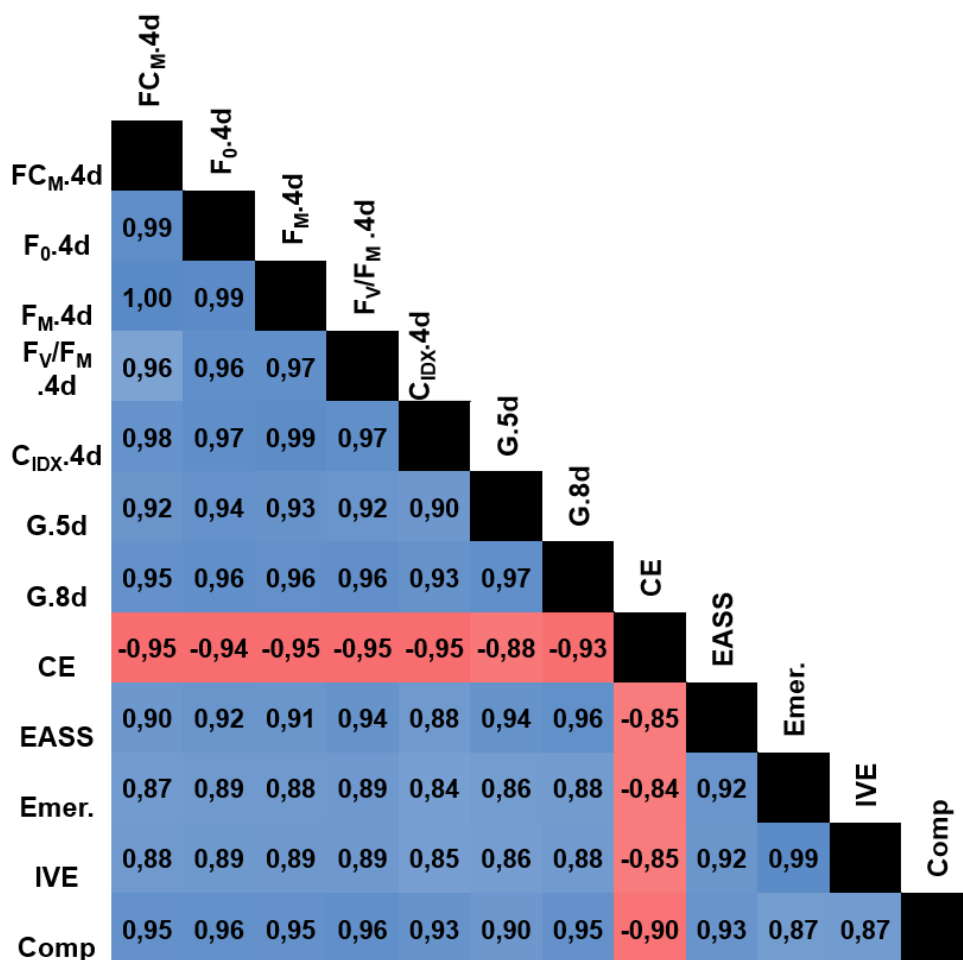


Figura 15 - Coeficientes de correlação de Spearman entre parâmetros de fluorescência média (FC_M), mínima (F_0) e máxima (F_M) da clorofila *a*, eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_V/F_M) e índice de clorofila *a* (C_{IDX}) de plântulas aos quatro dias de idade, provenientes de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) envelhecidas artificialmente por 0, 16, 24, 48 e 72 horas e testes convencionais utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes (germinação aos cinco (G.5d) e oito (G.8d) dias, condutividade elétrica (CE), envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS), emergência (Emer.) índice de velocidade de emergência (IVE) e comprimento de plântulas (Comp)).

Nas sementes do cultivar M5917IPRO, os coeficientes de correlação não apresentaram altos valores absolutos em comparação com o cultivar M8349IPRO. A matriz de correlação dos

resultados de FC_M , F_0 , F_M , F_V/F_M e C_{IDX} das plântulas (Figura 16) indicou forte correlação desses parâmetros com a germinação aos cinco dias ($\geq 0,80$) e IVE ($\geq 0,82$). Os maiores coeficientes de correlação foram obtidos entre IVE e a FC_M (0,89). As correlações mais fracas foram obtidas para o comprimento de plântulas (0,36-0,44).

	FC_{M-4d}																		
FC_{M-4d}																			
F_{0-4d}	0,98																		
F_{M-4d}	1,00	0,98																	
F_V/F_M .4d	0,98	0,97	0,98																
C_{IDX-4d}	0,96	0,90	0,96	0,93															
G.5d	0,85	0,83	0,85	0,81	0,80														
G.8d	0,78	0,78	0,78	0,76	0,72	0,90													
CE	-0,81	-0,80	-0,81	-0,77	-0,77	-0,86	-0,92												
EASS	0,82	0,81	0,82	0,79	0,77	0,86	0,93	-0,97											
Emer.	0,85	0,84	0,84	0,81	0,77	0,74	0,73	-0,73	0,76										
IVE	0,89	0,88	0,88	0,85	0,82	0,82	0,79	-0,80	0,83	0,99									
Comp	0,40	0,37	0,40	0,36	0,44	0,60	0,60	-0,70	0,69	0,26	0,36								

Figura 16 - Coeficientes de correlação de Spearman entre parâmetros de fluorescência média (FC_M), mínima (F_0) e máxima (F_M) de clorofila *a*, eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_V/F_M) e índice de clorofila *a* (C_{IDX}) de plântulas aos quatro dias de idade, provenientes de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) envelhecidas artificialmente por 0,16, 24, 48 e 72 horas e testes convencionalmente utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes (germinação aos cinco (G.5d) e oito (G.8d) dias, condutividade elétrica (CE), envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS), emergência (Emer.) índice de velocidade de emergência (IVE) e comprimento de plântulas com oito dias de idade (Comp.).

4.5. Qualidade fisiológica de sementes naturalmente envelhecidas (armazenamento comercial)

Após o envelhecimento natural (armazenamento por seis meses) das sementes do cultivar M8349IPRO, os resultados dos testes tradicionais (Figura 17), indicaram redução significativa na germinação aos cinco e oito dias (Figura 17A), no IVE (Figura 17E) e no comprimento das plântulas (Figura 17F), e paralelamente, houve aumento da condutividade elétrica (Figura 17B). Por outro lado, o teste de EASS (Figura 17C) e a emergência de plântulas (Figura 17D) não foram suficientemente sensíveis para discriminar diferenças de vigor entre os grupos de sementes armazenadas e não armazenadas.

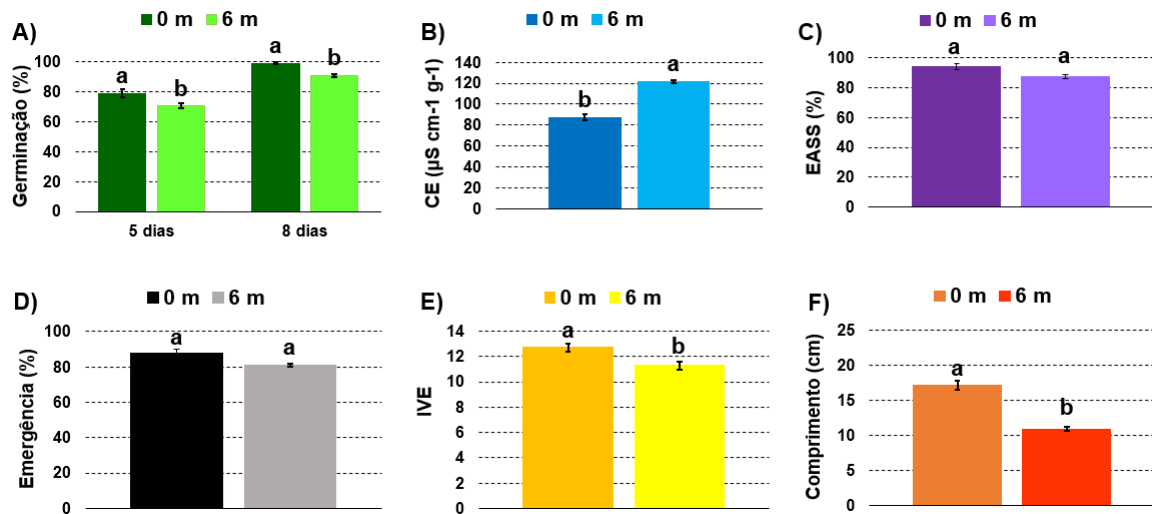


Figura 17 - Qualidade fisiológica inicial e após o armazenamento de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) por seis meses (20 °C, UR 19 a 42%) utilizando o teste de germinação aos cinco e oito dias (A), condutividade elétrica - CE (B), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal – EASS (C), emergência (D), índice de velocidade de emergência – IVE (E) e comprimento de plântulas gerado pelo *software* SeedReporter™ (F). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Por outro lado, após seis meses de armazenamento das sementes do cultivar M5917IPRO, foi detectada redução no potencial fisiológico em todos os testes empregados. Houve redução da germinação aos cinco e oito dias (Figura 18A), aumento considerável na condutividade elétrica das sementes (Figura 18B), diminuição do desempenho no EASS (Figura 18C), emergência (Figura 18D), IVE (Figura 18E) e comprimento de plântulas (Figura 18F).

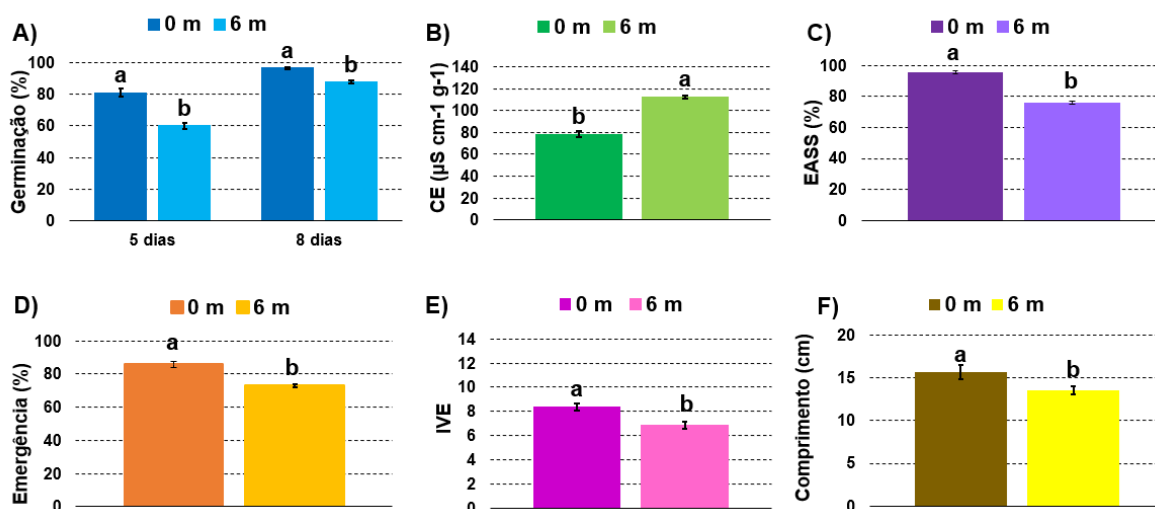


Figura 18 – Qualidade fisiológica inicial e após o armazenamento de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) por seis meses (20 °C, UR 19 a 42%) utilizando o teste de germinação aos cinco e oito dias (A), condutividade elétrica - CE (B), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal – EASS (C), emergência (D), índice de velocidade de emergência – IVE (E) e comprimento de plântulas gerado pelo *software* SeedReporter™ (F). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Após o envelhecimento natural das sementes do cultivar M8349IPRO por seis meses, não foi constatada alteração significativa na massa seca do hipocótilo e dos cotilédones das plântulas aos oito dias de idade (Figura 19A e 19C), sendo verificado apenas redução na massa seca das folhas primárias (Figura 19B). Por outro lado, foi observado aumento expressivo na intensidade da FC_M emitida pelo hipocótilo (Figura 19D), mas nenhuma mudança significativa foi detectada na fluorescência das folhas primárias (Figura 19E) e dos cotilédones (Figura 19F). Apesar de ter havido aumento na fluorescência do hipocótilo (Figura 19D), o conteúdo destas moléculas permaneceu inalterado (Figura 20A), assim como o conteúdo de antocianinas (Figura 20D). Em geral, esses pigmentos decresceram somente nos cotilédones (Figura 20C).

Diferentemente do cultivar M8349IPRO, as plântulas do cultivar M5917IPRO apresentaram redução acentuada na massa seca do hipocótilo (Figura 21A), mas foi similar nas folhas primárias e cotilédones (Figura 21B, C). A FC_M foi mais sensível que a massa seca, havendo maiores sinais em todas as partes das plântulas provenientes de sementes armazenadas (Figuras 21D-F). Este aumento nos sinais ocorreu em paralelo com o incremento no conteúdo de clorofila *a* do hipocótilo e das folhas primárias (Figuras 22A e 22B), porém, nos cotilédones, o aumento dos sinais foi acompanhado de redução destas moléculas (Figura 22C). Simultaneamente, o conteúdo de antocianinas das diferentes partes da plântula apresentou comportamento semelhante ao de antocianinas após o armazenamento das sementes (Figura 22D-F).

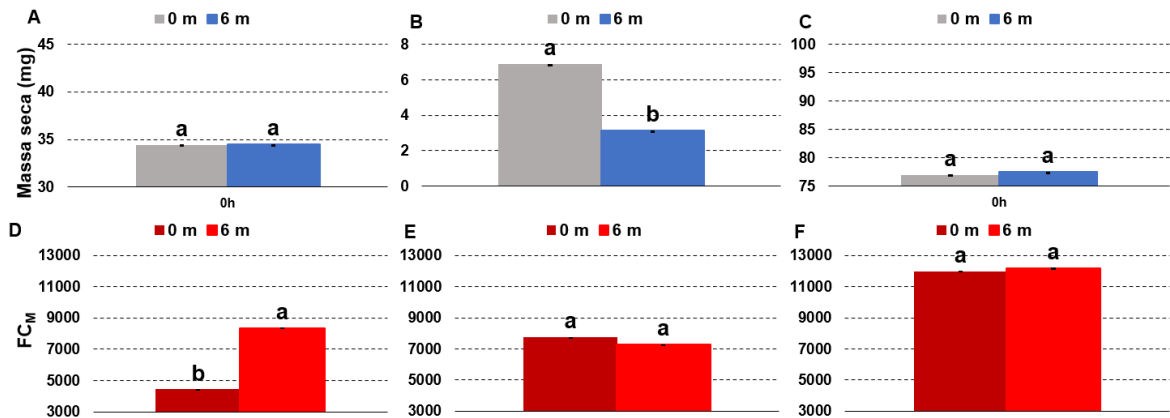


Figura 19 – Massa seca do hipocótilo (A), folhas primárias (B) e cotilédones (C) e fluorescência da clorofila *a* do hipocótilo (D), folhas primárias (E) e cotilédones (F) antes (0 m) e após o armazenamento de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) por seis meses (20 °C, UR 19 a 42%). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

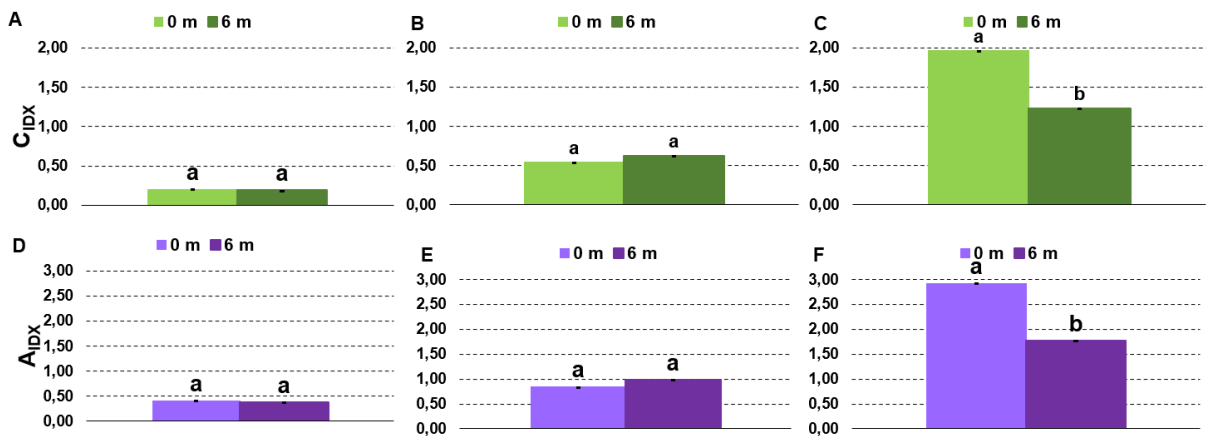


Figura 20 – Índice de clorofila *a* do hipocótilo (C_{IDX}) (A), folhas primárias (B) e cotilédones (C) e índice de antocianinas (A_{IDX}) do hipocótilo (D), folhas primárias (E) e cotilédones (F) antes (0 m) e após o armazenamento de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) por seis meses (6 m) (20 °C, UR 19 a 42%). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

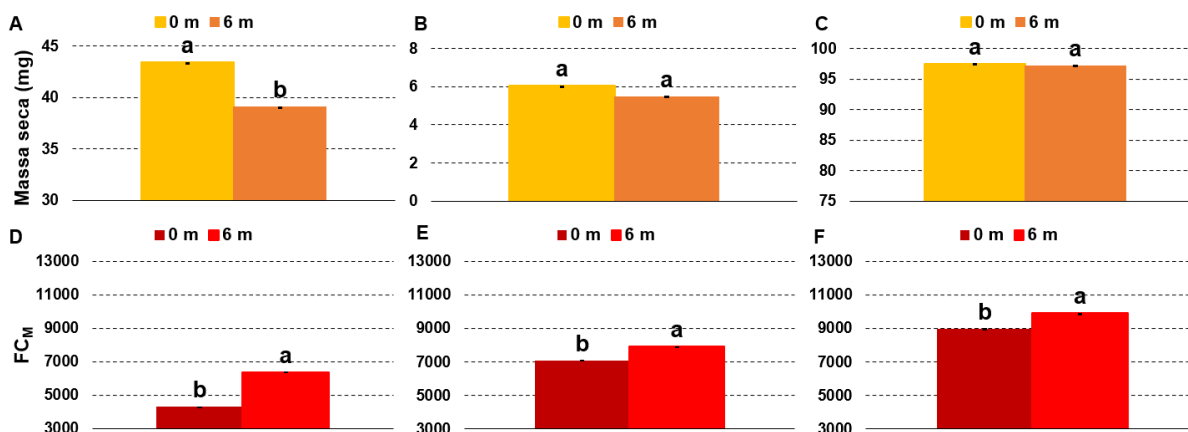


Figura 21 – Massa seca do hipocótilo (A), folhas primárias (B) e cotilédones (A-C) e fluorescência da clorofila *a* do hipocótilo (D), folhas primárias (E) e cotilédones (F) antes (0 m) e após o armazenamento de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) por seis meses (20 °C, UR 19 a 42%). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

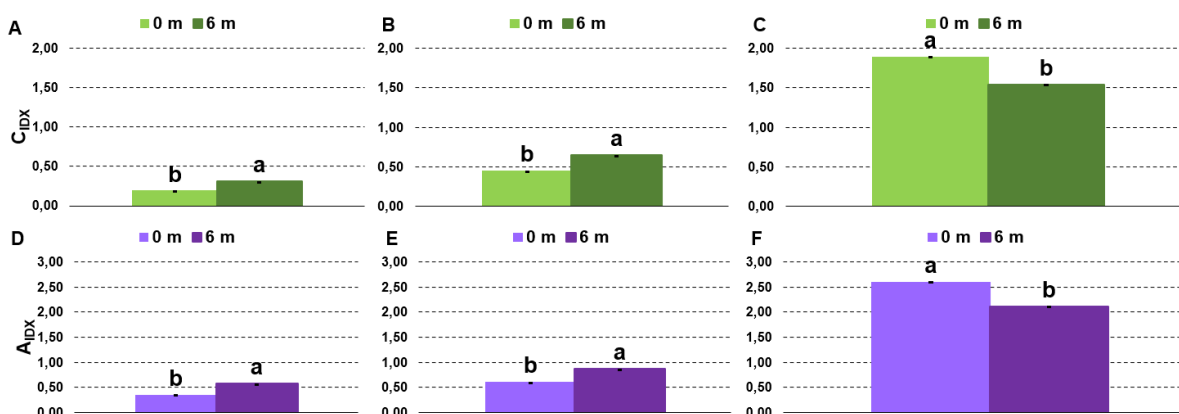


Figura 22 - Índice de clorofila *a* do hipocótilo (C_{IDX}) (A), folhas primárias (B) e cotilédones (C) e índice de antocianinas (A_{IDX}) do hipocótilo (D), folhas primárias (E) e cotilédones (F) antes (0 m) e após o armazenamento de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) por seis meses (20 °C, UR 19 a 42%). Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.6. Fluorescência de clorofila inicial das sementes naturalmente envelhecidas

Para o cultivar M8349IPRO, similarmente ao envelhecimento artificial, o armazenamento induziu uma maior síntese na intensidade da FC_M das sementes (Figura 23A). Em contrapartida, apesar da FC_M das sementes do cultivar M5917IPRO ter sido sensível aos efeitos do envelhecimento artificial (Figura 6B), as sementes não foram significativamente afetadas após o armazenamento por seis meses (Figura 23B).

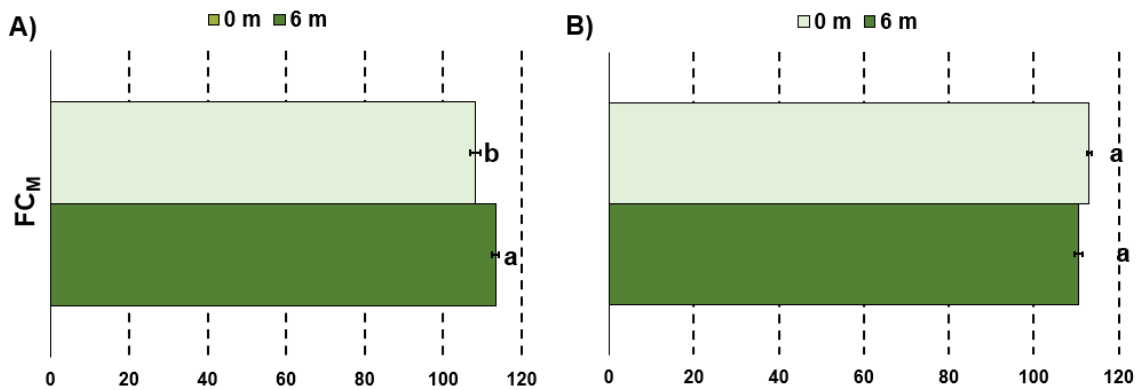


Figura 23 – Fluorescência média da clorofila *a* (FC_M) de sementes de soja (*Glycine max* L.) dos cultivares M8349IPRO (A) e M5917IPRO (B) antes (0 m) e após o armazenamento por seis meses (6 m) (20 °C, UR 19 a 42%), obtida pela combinação de excitação-emissão de 620-730nm. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.7. Fluorescência de clorofila durante a germinação e estabelecimento inicial de plântulas provenientes de sementes naturalmente envelhecidas

Após o armazenamento das sementes, os padrões de fluorescência de clorofila foram analisados aos quatro dias após a semeadura (tempo considerado mais adequado na análise das sementes artificialmente envelhecidas). Os dados extraídos das imagens de plântulas do cultivar M8349IPRO (Figura 24), revelaram redução nas variáveis F_M (Figuras 24C e 26A), F_V/F_M (Figura 24D) e C_{IDX} (Figura 24E). Entretanto, não houve efeito significativo do armazenamento nos níveis de FC_M (Figura 24A) e F_0 (Figura 24B) neste cultivar.

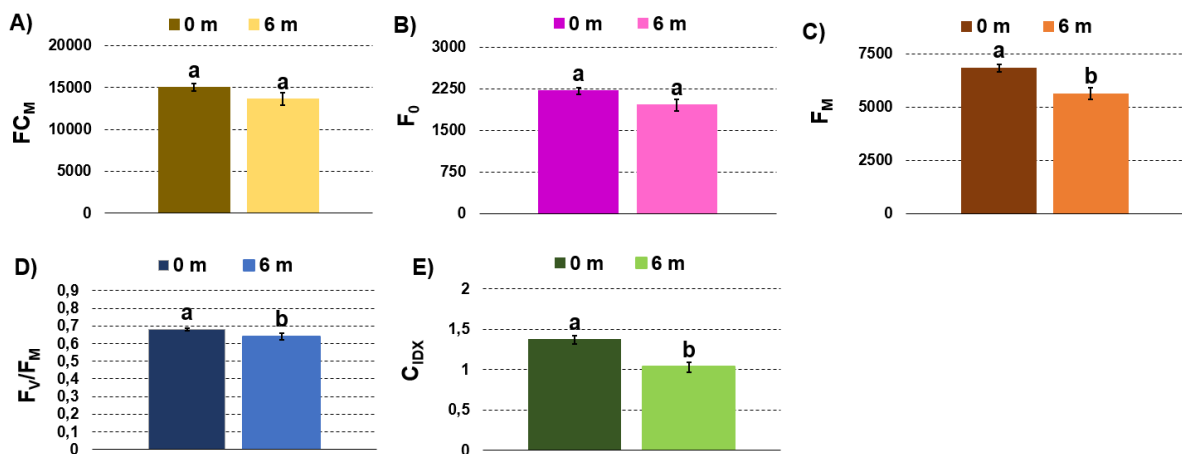


Figura 24 – Fluorescência média - FC_M (A), mínima - F_0 (B) e máxima - F_M (C) da clorofila *a*, eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II - F_V/F_M (D) e índice de clorofila *a* - C_{IDX} (E) de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) aos quatro dias de idade, antes e após o armazenamento das sementes por seis meses. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para o cultivar M5917IPRO, o efeito do armazenamento promoveu redução em todos os parâmetros de fluorescência (Figuras 25A-C), no F_V/F_M (Figura 25D) e no C_{IDX} (Figura 25E). A variação da intensidade de F_M das plântulas antes e após o período de armazenamento das sementes foi ilustrada na Figura 26.

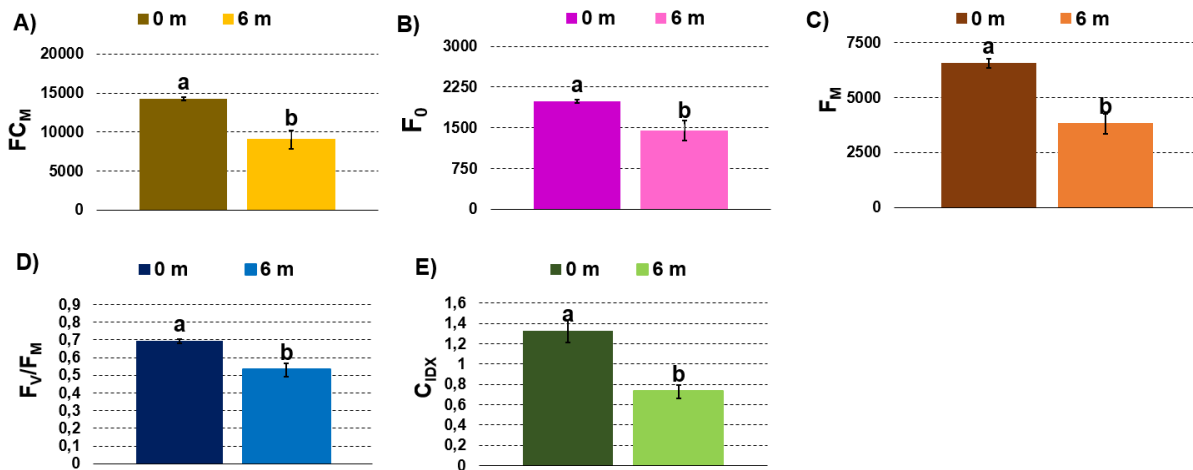


Figura 25 – Fluorescência média (A), mínima - F_0 (B) e máxima - F_M (C) da clorofila *a*, eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II - F_V/F_M (D) e índice de clorofila *a* (E) de plântulas de soja (*Glycine max* L.; cultivar M5917IPRO) aos quatro dias de idade, antes e após o armazenamento das sementes por seis meses. Médias (\pm erro padrão) seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

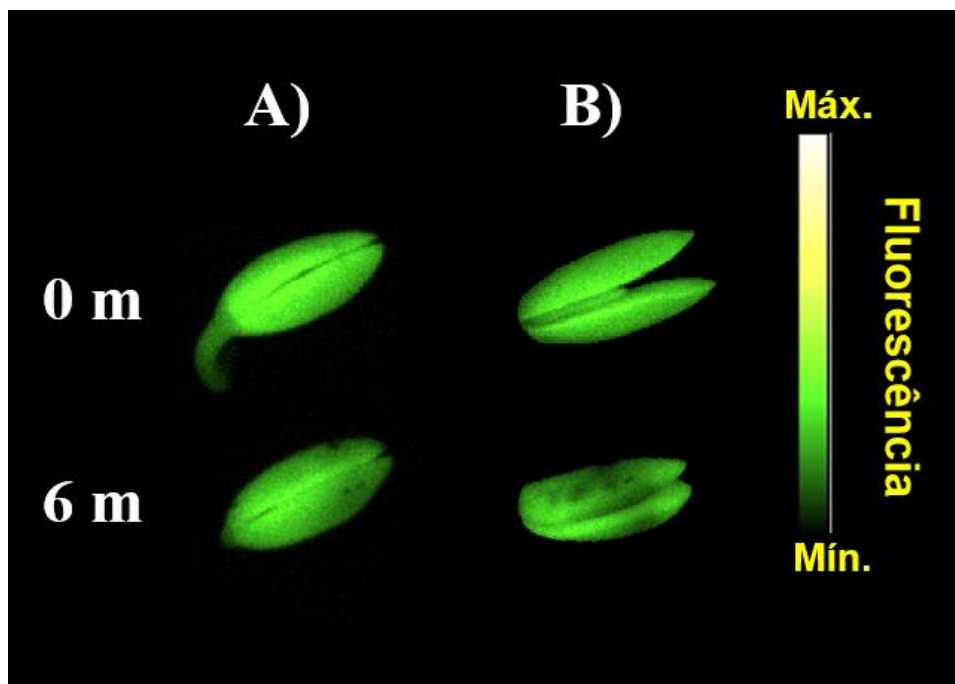


Figura 26 - Imagens de fluorescência máxima (F_M) da clorofila *a* utilizando uma plântula representativa de classes de sementes não armazenadas (0 m) e armazenadas durante seis meses (6 m) dos cultivares M8349IPRO (A) e M5917IPRO (B).

4.8. Correlação entre parâmetros de fluorescência de clorofila de plântulas provenientes de sementes naturalmente artificialmente com testes convencionais

Após o envelhecimento natural das sementes do cultivar M8349IPRO promovido pelo armazenamento durante seis meses, verificou-se que as correlações mais fortes ($\geq \pm 0,70$) se deram entre os seguintes parâmetros: -0,78 (condutividade elétrica vs. C_{IDX}), 0,76 (germinação aos cinco dias vs. F_V/F_M ; germinação aos oito dias vs. C_{IDX}), 0,74 (comprimento de plântulas vs. F_V/F_M ou C_{IDX}) e 0,70 (emergência vs. C_{IDX}) (Figura 27). Portanto, para as sementes armazenadas, os maiores coeficientes de correlação foram obtidos entre os parâmetros fisiológicos e o C_{IDX} .

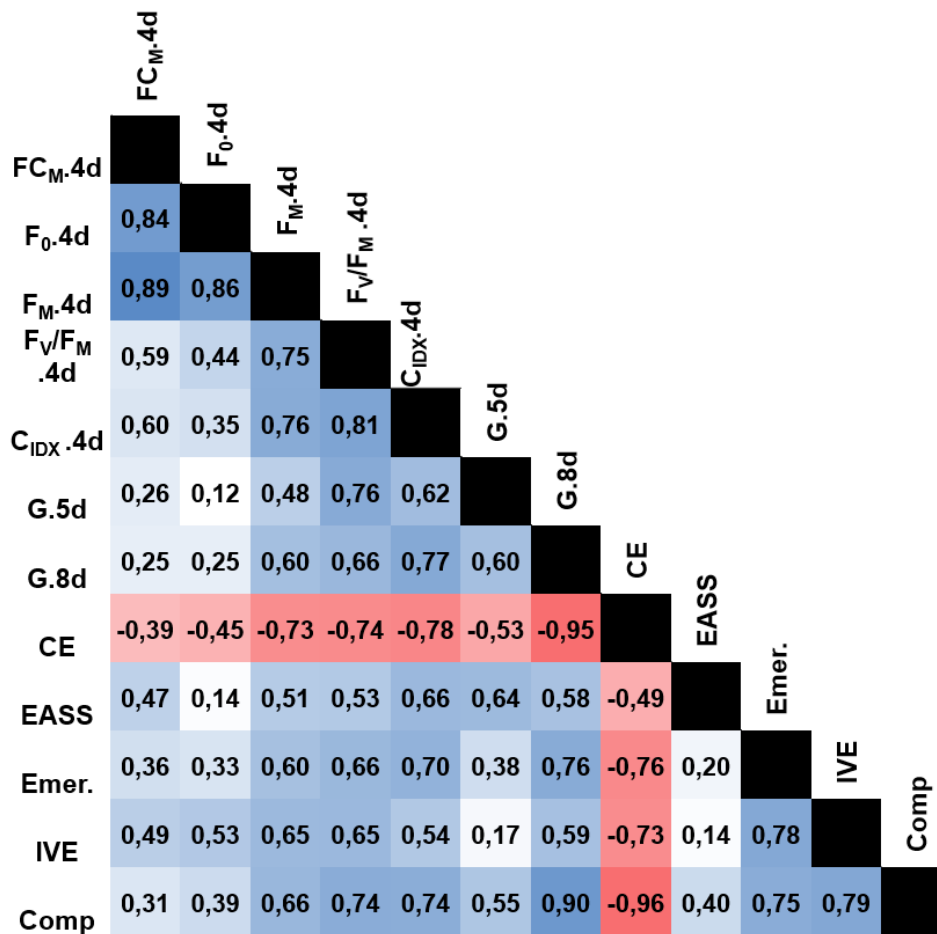


Figura 27 - Coeficientes de correlação de Spearman entre parâmetros de fluorescência média (FC_M), mínima (F_0) e máxima (F_M) da clorofila a , eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_V/F_M) e índice de clorofila a (C_{IDX}) de plântulas aos quatro dias de idade, provenientes de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) armazenadas por seis meses e testes convencionais utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes (germinação aos cinco (G.5d) e oito (G.8d) dias, condutividade elétrica (CE), envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS), emergência (Emer.) índice de velocidade de emergência (IVE) e comprimento médio de plântulas com oito dias de idade (Comp.).

Para a cultivar M5917IPRO (Figura 28), os coeficientes de correlação foram mais elevados, atingindo 0,96 entre a germinação aos cinco dias e a F_M . Coeficientes de correlação superiores a 0,90 também foram observados entre a germinação aos cinco dias e a FC_M (0,94) ou F_V/F_M (0,91), condutividade elétrica com F_M (-0,91) ou F_V/F_M (-0,92) ou C_{IDX} (-0,90), EASS com C_{IDX} (-0,90).

	FC_M .4d	F_0 .4d	F_M .4d	F_V/F_M .4d	C_{IDX} .4d	G.5d	G.8d	CE	EASS	Emer.	IVE	Comp
FC_M .4d												
F_0 .4d	0,90											
F_M .4d	0,99	0,85										
F_V/F_M .4d	0,89	0,70	0,91									
C_{IDX} .4d	0,91	0,70	0,95	0,90								
G.5d	0,94	0,80	0,96	0,91	0,87							
G.8d	0,31	0,32	0,34	0,04	0,29	0,27						
CE	-0,88	-0,61	-0,91	-0,92	-0,90	-0,92	-0,12					
EASS	0,84	0,54	0,89	0,88	0,90	0,87	0,22	-0,97				
Emer.	0,33	0,06	0,41	0,31	0,41	0,36	0,42	-0,50	0,66			
IVE	0,20	-0,09	0,31	0,31	0,35	0,28	0,21	-0,42	0,58	0,93		
Comp	0,63	0,30	0,69	0,77	0,87	0,61	0,09	-0,78	0,81	0,39	0,41	

Figura 28 - Coeficientes de correlação de Spearman entre parâmetros de fluorescência média (FC_M), mínima (F_0) e máxima (F_M) da clorofila a , eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II (F_V/F_M) e índice de clorofila a (C_{IDX}) de plântulas aos quatro dias de idade, provenientes de sementes de soja (*Glycine max* L.; cultivar M8349IPRO) armazenadas por seis meses e testes convencionalmente utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes (germinação aos cinco (G.5d) e oito (G.8d) dias, condutividade elétrica (CE), envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS), emergência (Emer.) índice de velocidade de emergência (IVE) e comprimento médio de plântulas com oito dias de idade (Comp.).

5. DISCUSSÃO

A soja é a principal oleaginosa cultivada no mundo, e a mais importante do agronegócio brasileiro. Os grãos possuem alto teor de proteínas e de óleo, amplamente utilizados para alimentação animal e humana, bem como para a fabricação de produtos industrializados e biocombustíveis (VILLANUEVA; ALVAREZ, 2017). A instalação das lavouras de soja é realizada por meio de sementes que demandam alta qualidade para adequada transferência dos avanços da genética para o campo, com reflexos sobre o rendimento e a qualidade final do produto colhido.

Em geral, nos programas de controle de qualidade de sementes de soja, são empregados testes fisiológicos baseados em metodologias que dependem da experiência do analista, além de requerem tempo considerável para serem executados (HUANG et al., 2015; MARCOS-FILHO, 2015; BOELT et al., 2018). Frente a esses desafios, alternativas que busquem otimizar o processo de análise dos padrões de qualidade das sementes e ofereçam resultados mais precisos têm atraído a atenção da indústria, particularmente pelo aumento da demanda mundial por alimentos.

Devido à sua grande relevância econômica, a semente de soja foi utilizada na presente pesquisa para verificar a potencialidade de métodos não destrutivos baseados em imagem de fluorescência de clorofila com a qualidade fisiológica das sementes. A intensidade de fluorescência de clorofila é proporcional ao acúmulo e atividade deste pigmento nos tecidos (MAXWELL; JOHNSON, 2000) e, portanto, está diretamente relacionada às taxas fotossintéticas das plântulas. A atividade fotossintética cotiledonar é importante para a soja e outras espécies (ZHANG et al., 2008), porque as reservas acumuladas nestes tecidos durante a maturação não são suficientes para fornecer energia ao eixo embrionário até o momento em que a planta se torne autossuficiente através da atividade fotossintética das folhas primárias (LOVELL; MOORE, 1970; HARRIS; MACKENDER; SMITH, 1986; SONG et al., 2005).

5.1. Imagens de fluorescência de clorofila na avaliação da qualidade fisiológica de sementes

Nesta pesquisa, as novas abordagens de imagens de fluorescência de clorofila foram comparadas aos principais testes utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, ou seja, testes de germinação, condutividade elétrica, EASS, emergência, IVE e comprimento de plântulas (MARCOS-FILHO, 2015). Para obtenção de resultados mais

precisos, foi verificado o comportamento das sementes de cultivares distintos (M8349IPRO e M5917IPRO), envelhecidas artificialmente e naturalmente (armazenamento comercial) a fim de verificar se a eficiência do método era independente das particularidades intrínsecas dos tipos de deterioração. Os padrões de fluorescência de clorofila foram analisados nos estádios iniciais de estabelecimento da plântula.

Em um primeiro momento, a partir dos resultados obtidos nos testes fisiológicos, verificou-se que nenhum método tradicional conseguia estratificar todas as classes de sementes envelhecidas artificialmente, independente do cultivar (Figuras 2 e 4), indicando, portanto, a baixa sensibilidade dos métodos atualmente disponíveis. Nas sementes naturalmente envelhecidas, a eficiência dos testes fisiológicos foi dependente do genótipo, ou seja, apenas os testes de germinação, condutividade elétrica, IVE e comprimento médio de plântulas conseguiram separar as sementes não armazenadas das sementes armazenadas do cultivar M8349IPRO (Figura 17), enquanto todos os testes conseguiram separar as sementes do cultivar M5917IPRO (Figura 18). Isto pode estar relacionado ao fato de que o processo de deterioração das sementes é um processo também influenciado pelas características genéticas, além do ambiente (RAJJOU et al., 2008; BEWLEY; BLACK, 2013). Por exemplo, a perda de integridade das membranas avaliada pelo teste de condutividade elétrica, após o envelhecimento artificial foi mais evidente no cultivar M5917IPRO (Figuras 4B) comparada ao cultivar M8349IPRO (Figura 2B). Reforça esta hipótese o fato de que outros autores consideraram a cultivar M8349IPRO mais estável do que outras em seus experimentos (KUDIESS, 2015; LOBO, 2021).

Os danos provocados pelo envelhecimento artificial também reduziram a transferência de massa seca dos cotilédones para o hipocótilo e folhas primárias, constatado pelo aumento de massa dos cotilédones (Figuras 3A e 5A). Concomitantemente, houve aumento ou efeito hormético no conteúdo de antocianinas (pigmento antioxidante) do hipocótilo e das folhas primárias (Figuras 3D e 5D). Com o avanço da deterioração, essas mudanças também foram acompanhadas de alterações no pigmento e fluorescência de clorofila das plântulas (Figuras 3B, C e 5B, C) e de sementes (Figura 6).

Nas plântulas provenientes de sementes de menor vigor, a menor capacidade de síntese de clorofilas pode explicar a redução dos níveis de F_v/F_m (Figuras 7, 13, 24 e 25). Além disso, essa menor capacidade de síntese de clorofilas nas plântulas pode estar associada à menor velocidade de emergência (Figuras 2E, 4E, 17E e 18E). Conforme observado por Ebone et al. (2020), sementes de soja com alto vigor emergiram mais rápido que as de baixo vigor. A emergência é fundamental para que os tecidos cotiledonares da soja se tornem

fotossinteticamente ativos (HARRIS; MACKENDER; SMITH, 1986; GONZALES; VODKIN, 2007) pois a luz é fator indispensável para a redução das protoclorofilidas em clorofilidas, a penúltima etapa da síntese de clorofilas (ZHONG et al., 2010; SENGE et al., 2014).

Em geral, quando as sementes foram analisadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), o parâmetro F_M foi o que mais se destacou na separação das classes de sementes (Figuras 7C, 13C, 24C), embora a FC_M (Figuras 7A, 13A e 25A), o F_0 (Figuras 7B e 25B), o F_v/F_M (Figura 24D e 25D) e o C_{IDX} (Figuras 24E e 25E) também foram importantes na classificação do vigor.

Para o parâmetro F_M , os maiores coeficientes de correlação foram obtidos com o teste de germinação aos 5 dias (0,96; Figura 28), germinação aos oito dias (0,96; Figura 15), IVE (0,88; Figura 16) e condutividade elétrica (-0,73; Figura 27). Similarmente, foi demonstrado que a técnica de fluorescência de clorofila pode ser uma importante ferramenta para indicar a capacidade de germinação de sementes de feijão (ARIYARATHNA; WEERASENA; BENERAGAMA, 2020; VIDA K et al., 2020).

5.2. Plasticidade de parâmetros de fluorescência de clorofila

Neste trabalho, a técnica de imagem de fluorescência de clorofila foi testada em diferentes tempos durante o estabelecimento das plântulas de soja. Foi constatado que as diferenças significativas observadas inicialmente em todos os parâmetros de fluorescência foram atenuadas com o decorrer do desenvolvimento das plântulas. Por exemplo, no cultivar M5917IPRO, as variações de F_v/F_M foram reduzidas já no 7º dia (Tabela 11D), e permaneceu sem variação no 8º (Tabela 11E) e 12º dia (Tabela 11G). Portanto, os resultados indicam uma plasticidade das plântulas de soja, ou seja, a capacidade de rápida adaptação e minimização de efeitos negativos de origem externa (LAITINEM e NIKOLOSKI, 2018), diante da deterioração provocada pelo envelhecimento artificial, conforme comprovado por Ebone *et al* (2020) após avaliar o vigor e desenvolvimento de plântulas de soja provenientes de sementes com diferentes potenciais fisiológicos, obtidos por envelhecimento artificial. Singh e Amritphale (1992) também observaram a plasticidade do fotossistema II dos tecidos cotiledonares de soja após os mesmos não observarem diferenças significativas na atividade dos cloroplastos entre dos cotilédones de sementes envelhecidas e não envelhecidas artificialmente. Efeito similar também foi constatado por Ozga *et al.* (2004) em sementes de ervilha, em que não houve alteração do crescimento das plântulas após o envelhecimento artificial das sementes.

A plasticidade também foi observada a partir dos sinais de F_v/F_M de plântulas de *Athyrium pachyphlebium* C. (HUANG et al., 2015) e de carvalho vermelho (VALLADARES et al., 2002) após alteração nos níveis de luminosidade durante o desenvolvimento vegetativo.

Sendo assim, é sugerido que a nova metodologia proposta seja aplicada ainda no início do desenvolvimento das plântulas (quatro dias após a semeadura) para a obtenção de resultados precisos sobre a qualidade fisiológica das sementes de soja.

5.3. Efeito do envelhecimento artificial e natural nos padrões de fluorescência de clorofila durante a germinação

O envelhecimento artificial tem sido amplamente utilizado para estudar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à diminuição do vigor das sementes (XIN et al., 2014; EBONE et al., 2020; BARBOZA DA SILVA et al., 2021), particularmente durante o armazenamento. No armazenamento, ocorre redução da atividade de enzimas antioxidantes responsáveis por minimizar a ação dos radicais livres (CHHABRA et al., 2019; EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019). O desequilíbrio entre a atividade antioxidante e os níveis das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica provocam a deterioração e reduzem o vigor das sementes (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019; EBONE et al., 2020).

A temperatura, a UR e o teor de água das sementes impactam diretamente na intensidade da deterioração (BEWLEY; BLACK, 2013; MAHJABIN et al., 2015; MARCOS-FILHO, 2015; CHHABRA et al., 2019). Durante o envelhecimento natural, as sementes são submetidas a UR e temperaturas consideravelmente inferiores às do envelhecimento artificial. Desta forma, o citoplasma celular permanece no estado vítreo, ou seja, apresenta baixa mobilidade molecular, propiciando uma deterioração lenta (SUN; LEOPOLD, 1993; RAJJOU et al., 2008). Por sua vez, o envelhecimento artificial é conduzido sob altas temperaturas e UR (SUN; LEOPOLD, 1993; RAJJOU et al., 2008; BEWLEY; BLACK, 2013), promovendo maior liquidez citoplasmática e mobilidade molecular, estimulando não somente as reações oxidativas e peroxidativas, como também outros processos degenerativos. Apesar disso, o envelhecimento artificial promove atividades moleculares semelhantes ao envelhecimento natural, porém intensificadas (RAJJOU et al., 2008). Na verdade, segundo Bewley e Black (2013), em condições de alta mobilidade molecular, os mecanismos de proteção são rapidamente exauridos. Em contrapartida, o baixo teor de água, característico das sementes envelhecidas naturalmente em ambiente controlado leva a ineficiência dos processos antioxidantes.

Na presente pesquisa, embora os parâmetros de fluorescência de clorofila tenham variado em função do tipo de envelhecimento das sementes (artificial ou natural), a técnica de foi eficiente na avaliação do vigor de sementes tanto deterioradas de forma acelerada como em condições de armazenamento comercial (seis meses, 20 °C) de forma rápida e não destrutiva.

Dessa forma, no contexto de banco de germoplasma de sementes, essa abordagem pode melhorar a precisão dos testes de qualidade, fornecendo melhor compreensão sobre o potencial de armazenamento das sementes de soja.

5.4. Imagens de fluorescência de clorofila de plântulas como um novo marcador da qualidade fisiológica de sementes de soja

No presente trabalho, buscou-se identificar possíveis relações da análise de imagens de parâmetros da fluorescência de clorofila de plântulas de soja com as diferenças observadas em seis testes de fisiológicos. Os parâmetros extraídos das imagens das plântulas aos quatro dias de idade segregaram as classes de vigor estabelecidas artificialmente em agrupamentos similares ao observado nos testes tradicionais. Para o cultivar M8349IPRO, a FC_M e a F_M (Figuras 7A, C) das plântulas apresentaram comportamento similar ao EASS (Figura 2C). No caso da cultivar M5917IPRO, embora a FC_M e a F_M (Figura 13A, C) tenham segregado as classes de forma diferente dos testes convencionais (Figura 4), o F_v/F_M (Figura 13D) agrupou as classes da mesma maneira que a emergência e o IVE (Figura 4D, E).

As sementes armazenadas por seis meses, de ambos os cultivares, tiveram redução em F_M (Figuras 24C e 25C), F_v/F_M (Figura 24D e 25D) e C_{IDX} (Figura 24E e 25E), e independente do tipo de envelhecimento (artificial ou natural), as correlações foram fortes e muito fortes com os testes fisiológicos (Figuras 15, 16, 27 e 28). As fortes correlações dos parâmetros com o teste de condutividade elétrica (>0.7 para ambos os cultivares), por exemplo, mostram que esta técnica pode ser utilizada para estimar indiretamente a integridade da membrana celular das sementes de soja (PRADO et al., 2019), indicando assim o nível de deterioração das sementes (BEGUM; JERLIN; JAYANTHI, 2013; EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019)

Assim, o trabalho provou que imagens de fluorescência de clorofila de plântulas durante o desenvolvimento inicial, principalmente através da F_M , podem ser utilizada como marcador da qualidade fisiológica de sementes de soja de forma objetiva a partir das imagens das plântulas em tempo 50% menor que o teste de germinação (BRASIL, 2009), o que pode contribuir para a eficiência e otimização das análises de sementes soja. Futuramente buscar-se-á fazer o mesmo estudo com um maior número de genótipos, períodos maiores de armazenamento e possivelmente, a utilização de sementes secas, que tornariam a análise do vigor com as imagens de fluorescência ainda mais ágil.

6. CONCLUSÕES

A imagem de fluorescência de clorofila de plântulas de soja com quatro dias de idade é uma ferramenta eficaz para determinação qualidade fisiológica das sementes, havendo redução na fluorescência à medida em que há redução no vigor, com forte correlação com os testes convencionalmente utilizados para avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

A eficiência dos parâmetros de eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, fluorescência média e inicial da clorofila na identificação de diferenças de vigor em sementes de soja é dependente do genótipo, enquanto que a fluorescência máxima apresenta potencial, independente do cultivar.

REFERÊNCIAS

- AGATHOKLEOUS, E.; FENG, Z.; PEÑUELAS, J. Chlorophyll hormesis: are chlorophylls major components of stress biology in higher plants? **Science of the Total Environment**, Cham, v. 726. 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138637
- AMARANTE, C. V. T.; BISOGNIN, D. A.; CANCI, P. C. Contribuição das folhas cotiledonares para o crescimento inicial de plantas de abóbora híbrida cv. Tetsukabuto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 17–21, 1995.
- AMPOFO, S. T.; MOORE, K. G.; LOVELL, P. H. Cotyledon photosynthesis during seedling development in acer. **New Phytologist**, New York, v. 76, n. 1, p. 41–52, 1976.
- ARIYARATHNA, R. A. I. S.; WEERASENA, S. L.; BENERAGAMA, C. K. Application of polyphasic OJIP chlorophyll fluorescent transient analysis as an indicator for testing of seedling vigour of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). **Tropical Agricultural Research**, Peradeniya, v. 31, n. 2, p. 106-115, 2020. doi: 10.4038/tar.v31i2.8372.
- ARNIM, A. V.; DENG, X. W. Light control of seedling development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, New Haven, v. 47, n. 1, p. 215–243, 1996.
- BADGER, M. R. Chlorophyll fluorescence screening of *Arabidopsis thaliana* for CO₂ sensitive photorespiration and photoinhibition mutants. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 36, n. 11, art. 867, 2009.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, 2008.
- BARBOZA DA SILVA, C. et al. Autofluorescence-spectral imaging as an innovative method for rapid, non-destructive and reliable assessing of soybean seed quality. **Scientific Reports**, London, v. 11, art. 17834, 2021. doi:10.1038/s41598-021-97223-5.
- BRANDANI, E. B. et al. Image analysis for the evaluation of soybean seeds vigor. **Acta Agronômica**, Palmira, v. 70, n. 3, 2022. doi: 10.15446/acag.v70n3.92093.
- BEGUM, A. J.; JERLIN, R.; JAYANTHI, M. Seed quality changes during storage of oil seeds-a review. **International Journal of Scientific Research**, Ahmedabad, v. 2, n. 10, p. 1-2, 2013.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Longevity, storage, and deterioration. In: BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**, 3. ed. New York: Springer, 2013. p. 341-371.
- BISHAW, Z.; NIANE, A. A.; GAN, Y. Quality seed production. In: YADAV, S. S.; MCNEIL, D. L.; STEVENSON, P. C. **Lentil: an ancient crop for modern times**. Dordrecht: Springer, 2007. cap. 21, p. 349–383.
- BISOGNIN, D. A.; VELASQUEZ, L.; WIDDERS, I. Cucumber seedling dependence on cotyledonary leaves for early growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 531–539, 2005.
- BISOGNIN, D. A.; AMARANTE, C. V. T.; DELLAI, J. Contribuição das folhas cotiledonares para o crescimento e estabelecimento de plântulas de cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 309-313, 2004.

BOELT, B. et al. Multispectral imaging – a new tool in seed quality assessment? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 28, p. 222–228, 2018.

BOLHAR-NORDENKAMPFAND, H. R.; OQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O. et al. (ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. Dordrecht: Springer, 1993. p. 193-206.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BROWN, A. V.; HUDSON, K. A. Developmental profiling of gene expression in soybean trifoliolate leaves and cotyledons. **BMC Plant Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.

BROWN, C. S.; HUBER, S. C. Characteristics of soybean cotyledon photosynthesis. **Progress in Photosynthesis Research**, Raleigh, v. 111, n. 8, p. 725–728, 1987.

CHHABRA, R.; SHABNAM, A.; SINGH, T. Seed Aging, Storage and Deterioration: An Irresistible Physiological Phenomenon. **Agricultural Reviews**, Karnal, v. 40, n. 3, p. 234-238, 2019.

CORRÊA, H. S. B.; COELHO, C. M. M. Vigor de sementes de soja e sua relação com a mobilização das reservas sob condições adversas de ambiente. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA (SIC UDESC), 31., 2021, Florianópolis. Anais Florianópolis: UDESC, 2021. Disponível em: https://www.udesc.br/arquivos/udesc/id_cpmenu/14614/142__VIGOR_DE_SEMENTES_DE_SOJA_E_SUA_RELA__O____16342355489167_14614.pdf. Acesso em: 4 ago.2022.

COSTA, C. J. et al. The importance of physiological quality of seeds for agriculture. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 17, n. 4, p. 102–119, 2021. Disponível em: <https://journal.unoeste.br/index.php/ca/article/view/4078>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DALL´AGNOL, A. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1043614/a-embrapa-soja-no-contexto-do-desenvolvimento-da-soja-no-brasil-historico-e-contribuicoes>. Acesso em: 21 jan. 2021.

DE SOUZA JÚNIOR, M. et al. Rumo à melhoria de produtividade e sustentabilidade agrícola por meio da classificação automática do vigor de sementes de soja. In: SEMINÁRIO INTEGRADO DE SOFTWARE E HARDWARE (SEMISH), 45., 2018, Natal. **Anais ...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Computação, 2018. doi: 10.5753/semish.2018.3428.

DEVKULE, S. N.; AUTADE, A. D.; NARKHEDE, G. W. Computerized seed imaging: it's applications in seed science research. **Agriculture Update**, Muzaffarnagar, v. 12, p. 284-286, 2017. (TECHSEAR-1).

DUTRA, A. S.; VIEIRA, R. D. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.715-721, mai-jun, 2004.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-les-Moulineaux, v. 145, p. 34-42, 2019.

EBONE, L. A. et al. Biochemical profile of the soybean seed embryonic axis and its changes during accelerated aging. **Biology**, Basel, v. 9, n. 8, art. 186, 2020.

ELIAS, S. G. The importance of using high quality seeds in agriculture systems. **Agricultural Research & Technology**, Irvine, v. 4, n. 18, 2018. Disponível em: <https://juniperpublishers.com/artoaj/pdf/ARTOAJ.MS.ID.555961.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2022.

ERBAŞ, S. et al. Mobilization of seed reserves during germination and early seedling growth of two sunflower cultivars. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Braunschweig, v. 89, p. 217–222, 2016.

FORTUNATO, A. A. et al. Chlorophyll a fluorescence imaging of soya bean leaflets infected by *Corynespora cassiicola*. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 166, p. 782– 789, 2018. doi: 10.1111/jph.12761.

FRACHEBOUD, Y. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. **Environmental Science**, 2004. Disponível em: <http://jaguar.fcav.unesp.br/download/deptos/biologia/durvalina/TEXT0-71.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2021.

FRANCK, F.; JUNEAU, P.; POPOVIC, R. Resolution of the photosystem I and photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1556, p. 239-246, 2002. doi: 10.1016/S0005-2728(02)00366-3.

FRANÇA-NETO, J. B. et al. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 8 p. (Circular Técnica, 38).

GALLETTI, P. A. et al. 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**, Lausanne, v. 11, art. 577851, 2020.

GITELSON, A. A.; GRITZ, Y.; MERZLYAK, M. N. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 3, p. 271–282, 2003.

GITELSON, A. A.; MERZLYAK, M. N.; CHIVKUNOVA, O. B. Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 38–45, 2001. Disponível em: [https://bioone.org/journals/photochemistry-and-photobiology/volume-74/issue-1/0031-8655_2001_074_0038_OPANEO_2.0.CO_2/Optical-Properties-and-Nondestructive-Estimation-of-Anthocyanin-Content-in-Plant/10.1562/0031-8655\(2001\)074%3C0038:OPANEO%3E2.0.CO;2.short](https://bioone.org/journals/photochemistry-and-photobiology/volume-74/issue-1/0031-8655_2001_074_0038_OPANEO_2.0.CO_2/Optical-Properties-and-Nondestructive-Estimation-of-Anthocyanin-Content-in-Plant/10.1562/0031-8655(2001)074%3C0038:OPANEO%3E2.0.CO;2.short). Acesso em: 18 jun. 2021.

GONZALES, D. O.; VODKIN, L. O. Specific elements of the glyoxylate pathway play a significant role in the functional transition of the soybean cotyledon during seedling development. **BMC Genomics**. Londres, v. 8, p. 468-490, 2007.

GOVINDJEE, G. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In: PAPAGEORGIU, G. C.; GOVINDJEE, G. (ed.). **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**. Dordrecht: Springer, 2004. cap. 1, p. 1 – 41. doi: 10.1007/978-1-4020-3218-9.

HARRIS, M.; MACKENDER, R. O.; SMITH, D. L. photosynthesis of cotyledons of soybean seedlings. **New Phytologist**, Belfast, v. 104, n. 3, p. 319–329, 1986.

HERRITT, M. T.; FRITSCHI, F. B. Characterization of photosynthetic phenotypes and chloroplast ultrastructural changes of soybean (*Glycine max*) in response to elevated air temperatures. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.00153.

HUANG, M. et al. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Science and Technology**, Wallisellen, v. 43, p. 337-366, 2015.

JALINK, H. et al. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 504, p. 219–228, 1999. doi: 10.17660/ActaHortic.1999.504.23.

JANSEN, M. et al. Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via Growscreen Fluoro allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 36, n. 11, p. 902–914, 2009.

KENANOGLU, B. B.; DEMIR, I.; JALINK, H. Chlorophyll fluorescence sorting method to improve quality of capsicum pepper seed lots produced from different maturity fruits. **HortScience**, Virginia, v. 48, n. 8, p. 965–968, 2013.

KIRCHER, S.; SCHOPFER, P. Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 28, p. 11217–11221, 2012.

KRAUSE, G. H.; WEIS E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis—the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p. 313–349, 1991.

KUDIESS, D. **Estabilidade de cultivares de soja em dois locais e três épocas de semeadura no oeste da Bahia**. 2015. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

LAITINEN, R. A. E.; NIKOLOSKI, Z. Genetic basis of plasticity in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 739-745, 2019.

LASLEY, S. E.; GARBER, M. P. Photosynthetic contribution of cotyledons to early development of cucumber. **Hortscience**, Alexandria, v.13, n. 1, p. 191-193, 1978.

LI, Y.; SWAMINATHAN, K.; HUDSON, M. E. Rapid, organ-specific transcriptional responses to light regulate photomorphogenic development in dicot seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, n. 4, p. 2124–2140, 2011.

LICHTENTHALER, H. K. Multi-colour fluorescence imaging of photosynthetic activity and plant stress. **Photosynthetica**, Praha, v. 59, special issue, p. 364-380, 2021. Disponível em: https://ps.ueb.cas.cz/artkey/phs-202103-0002_multi-colour-fluorescence-imaging-of-photosynthetic-activity-and-plant-stress.php. Acesso em: 15 abr. 2021.

LOBO, A. L. A. **Crescimento e desempenho fisiológico de cultivares de soja submetidas ao déficit hídrico severo**. 2021. 51 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

LOVELL, P. H.; MOORE, K. G. A comparative study of cotyledons as assimilatory organs. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 1017–1030, 1970.

- MA, T.; TSUCHIKAWA, S.; INAGAKI, T. Rapid and non-destructive seed viability prediction using near-infrared hyperspectral imaging coupled with a deep learning approach. **Computer and Electronics in Agriculture**, Amsterdam, v. 177, 2020. doi: 10.1016/j.compag.2020.105683.
- McCORMAC, A. C.; KEFFE, P. D.; DRAPER, R. S. Automated vigour testing of field vegetables using image analysis. **Seed Science and Technology**, v. 18, p. 103-112, 1990.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor 1. **Crop science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MAHJABIN, S. B.; BILAL, S.; ABIDI, A. B. Physiological and biochemical changes during seed deterioration: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 6, n. 4, p. 3416-3422, 2015.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia das plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015.
- MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 3, p. 1-24.
- MARCOS-FILHO, J.; KIKUTI, A. L. P.; LIMA, L. B. De. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo a análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 102–112, 2009.
- MARCOS-FILHO, J.; NOVEMBRE, A. D. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 421–426, 2001.
- MAREK, L. F.; STEWART, C. R. Photosynthesis and photorespiration in presenescent, senescent, and rejuvenated soybean cotyledons. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 2, p. 694–699, 1992.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 659–668, 2000. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659.
- MONTAÑA, L. A. et al. Effect of NaCl salinity on seed germination and seedling emergence of purple passion fruit (*Passiflora edulis Sims*). **Agronomia Colombiana**, Bogotá, v. 32, n. 2, p. 188–195, 2014.
- MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 3983-3998, 2013. doi: 10.1093/jxb/ert208.
- OLIVEIRA, N. M. et al. Hormetic effects of low-dose gamma rays in soybean seeds and seedlings: a detection technique using optical sensors. **Computer and Electronics in Agriculture**, Amsterdam, v. 187, art. 106251, 2021.
- OZGA, J. A. et al. Characterization of the loss of seedling vigor in pea (*Pisum sativum L.*). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 84, n. 2, p. 443-451, 2004.
- PÁDUA, G. P. et al. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 128–138, 2007.

- PANTHEE, D. et al. Quantitative trait loci for β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 81, p. 1005-1012, 2004.
- PRADO, J. P. et al. Physiological potential of soybean seeds and its relationship to electrical conductivity. **Journal of Seed Science**, Brasília, v. 41 n. 4, 2019.
- POWELL, A. A. Seed vigour in the 21 st century. **Seed Science and Technology**, Wallisellen, v.50, n. 1, Suppl., p. 45-73, 2022.
- QUICK, W. P.; HORTON, P. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts. II. Resolution of fluorescence quenching by redox state and the transthylakoid pH gradient. **Proceedings of the Royal Society. Serie B**, London, v. 220, p. 371–382, 1984.
- RAJJOU, L. et al. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiology**, Oxford, v. 148, p. 620–641, 2008.
- RAHMAN, A.; CHO, B.K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 26, p. 285–305, 2008.
- SABOYA, P.; BORGHETTI, F. Germination, initial growth, and biomass allocation in three native Cerrado species. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 129–135, 2012.
- SAKO, Y. **Systems for seed vigor assessment and seed classification**. 2000. Dissertation (Master of Science) – Computer Science and Engineering, Ohio State University, Ohio, 2000. 66 f. Disponível em: http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1251222207. Acesso em: 15 mar. 2022.
- SAKO, Y. et al. Computer applications in seed technology. **Acta Horticulturae**, Hague, v. 631, p. 15-29, 2004. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.631.1.
- SANTOS, H. P.; BUCKERIDGE, M. S. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 6, p. 819–830, 2004.
- SASAKI, S.; KOZLOWSKI, T. T. The role of cotyledons in early development of pine seedlings. **Canadian Journal of Botany**, Madison, v. 46, n. 10, p. 1173–1183, 1968.
- SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, San Francisco, v. 126 n. 5, p. 1763-1768, 2018.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 10, p. 51–62, 1986. doi: 10.1007/BF00024185.
- SENGE, M. O. et al. Chlorophylls, symmetry, chirality, and photosynthesis. **Symmetry**, Basel, v. 6, p. 781-843, 2014.
- SINGH, B.; AMRITPHALE, D. Effect of seed ageing on chlorophyll (ide) accumulation and Hill activity in greening soybean seedling cotyledons. **Photosynthetica**, Praha, v. 26, n. 3, p. 455-459, 1992.
- SONG, J. et al. Strategies for adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a saline environment during seed-germination stage. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 399–405, 2005.

SRINIVASAN, R.; OLIVER, D. J. Light-dependent and tissue-specific expression of the H-protein of the glycine decarboxylase complex. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 1, p. 161–168, 1995.

STEPIEN, P.; JOHNSON, G. N. Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte arabidopsis and the halophyte thellungiella: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. **Plant Physiology**, Manchester, v. 149, n. 2, p. 1154–1165, 2009.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. The glassy state and accelerated aging of soybeans. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 89, n. 4, p. 767-774, 1993.

TAKAYAMA, K.; KONISHI, A.; OMASA, K. Diagnosis of invisible photosynthetic injury caused by a herbicide (Basta) with chlorophyll fluorescence imaging system. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, Bonn, 2003.

THOENES, P. The role of soybean in fighting world hunger. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE; 7., INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstracts of contributed papers and posters**. Foz do Iguaçu: Embrapa Soja, 2004.

USDA. Foreign Agricultural Service. **Global Market Analysis**. Grain production. Washington, DC, 2022a. 40 p.

USDA. Foreign Agricultural Service. **Global Market Analysis**. Oilseeds: World Markets and Trade. Washington, DC, 2022b. 40 p.

VALLADARES, F. et al. The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. **Trees**, Dordrecht, v. 16, n. 6, p. 395-403, 2002.

VAN DER BURG, J. et al. Raising seed quality: what is in the pipeline? In: WORLD SEED CONFERENCE, 2., 2009, Rome. **Proceedings...** Geneve: UPOV, 2010. p. 177-185.

VIDAK, M. et al. Chlorophyll fluorescence as a method for the prediction of germination success in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: CROATIAN, 55.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AGRICULTURE, 15., 2020, Zagreb. **Proceedings...** Zagreb: University of Zagreb, Faculty of Agriculture, 2020, p. 187-191.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M.; SADER, R. **Teste de vigor em sementes**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994, p. 103-132.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 1. ed. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-26.

VILLANUEVA-MEJIA, D.; ALVAREZ, J. C. Genetic improvement of oilseed crops using modern biotechnology. In: JIMENEZ-LOPES, J. C. **Advances in seed biology**. 1. ed. London: Intech Open, 2017. cap. 15, p. 295-317.

VRATARIĆ, M.; SUDARIĆ, A. **Soja *Glycine max* (L.) Merr.** Osijek: Poljoprivredni Institut Osijek, 2008.

XIN, X. et al. Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 171, p. 140–147, 2014. doi: 10.1016/j.jplph.2013.09.016.

WANG, H. et al. Detecting crop population growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Applied Optics**, Washington v. 56, n. 35, p. 9762-9769, 2017.

YAGUSHI, J. T.; COSTA, D. S.; FRANÇA-NETO, J. B. Saturated salt accelerated aging and computerized analysis of seedling images to evaluate soybean seed performance. **Journal of Seed Science**. Londrina, v. 36, n. 2, p. 213-221, 2014.

ZHANG, H. et al. Contribution of cotyledons to seedling dry weight and development in *Medicago falcata* L. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 51, n. 2, p. 107–114, 2008.

ZHANG, H. et al. Photosynthetic contribution of cotyledons to early seedling development in *Cynoglossum divaricatum* and *Amaranthus retroflexus*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 46, p. 35-48, 2010a. doi: 10.1080/00288250809509752.

ZHANG, S. et al. Effect of salinity on seed germination, ion content and photosynthesis of cotyledons in halophytes or xerophyte growing in Central Asia. **Journal of Plant Ecology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 259-267, 2010b.

ZHENG, W. et al. Photosynthetic Characteristics of the Cotyledon and First True Leaf of Castor (*Ricinus communis* L.). **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 5, n. 6. p. 702-708, 2011.

ZHONG, S. et al. Ethylene is crucial for cotyledon greening and seedling survival during de-etiolation. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p. 739-742, 2010.