

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ÉERICA SOUZA GOMES

Efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes em associação  
com ultrassom sobre o desenvolvimento inicial de plântulas avaliado por  
imagens multiespectrais

Piracicaba  
2022



ÉRICA SOUZA GOMES

Efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes em associação  
com ultrassom sobre o desenvolvimento inicial de plântulas avaliado por  
imagens multiespectrais

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Clíssia Barboza da Silva

Piracicaba

2022

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU 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**

Gomes, Érica Souza

Efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes em associação com ultrassom sobre o desenvolvimento inicial de plântulas avaliado por imagens multiespectrais / Érica Souza Gomes; Clíssia Barboza da Silva. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

72 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. *Glycine max* 2. Espectroscopia de raios X 3. Clorofila 4. Manganês 5. Zinco I. Título.

CDU 544.57 : 633.34

**Elaborada por:**

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais, Carlos e Otelina e às minhas irmãs Gabriella e Jéssica,  
pelo amor, compreensão e apoio durante a elaboração deste trabalho.

Dedico



## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho, mas apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto de vida.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me sustentou, não me deixou desanimar e permitiu que alcançasse os meus objetivos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Código de Financiamento 001, e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro, através da concessão de bolsa (Processo FAPESP nº 2021/01329-2).

À empresa Lagoa Bonita pela doação de sementes de soja utilizadas no meu trabalho e à empresa Geraquímica pelo fornecimento dos micronutrientes.

À minha orientadora, Profa. Dra. Clíssia Barboza, que acreditou em mim e me orientou com elevado rigoroso nível científico e dedicação, os quais contribuíram para a conclusão desta etapa.

Às minhas parceiras do Laboratório de Radiobiologia e Ambiente (LRA): Nielsen, Catharina, Ana e Júlia, pelo auxílio, trocas de conhecimento e momentos de descontração.

À técnica do LRA, Lúcia Cristina, pelo suporte nas metodologias e conselhos.

Aos colaboradores do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN): Prof. Dr. Hudson Carvalho, ao técnico Eduardo e à aluna Camila pela assistência nas instalações, análises e esclarecimento dos testes de espectroscopia de microfluorescência de raios X.

Ao Prof. Dr. Arthur Almeida do Instituto Federal Goiano pelas análises microscópicas.

À minha grande amiga Talita, que desde a graduação tem sido uma motivadora, apoiadora e companheira.

À minha família, especialmente minha mãe Otelina, meu pai Carlos e minhas irmãs Gabriella e Jéssica, que foram essenciais nessa trajetória com palavras de encorajamento em momentos cruciais desta difícil jornada, orações, amor e incentivo.

A todos os amigos que conquistei em Piracicaba, que me trouxeram leveza e alegria.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

*“Ó Senhor, tu és o meu Deus; exaltar-te-ei, e louvarei o teu nome, porque fizestes maravilhas.” (Isaías 25:1)*

## RESUMO

GOMES, E. S. **Efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes em associação com ultrassom sobre o desenvolvimento inicial de plântulas avaliado por imagens multiespectrais.** 2022. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

A tecnologia óptica de imagens multiespectrais integrada com inteligência artificial tem possibilitado a detecção de alterações físicas, fisiológicas e químicas de sementes e plântulas de forma objetiva e não invasiva. O tratamento de sementes com micronutrientes como zinco, manganês e cobalto + molibdênio (CoMo) tem revelado efeitos promissores sobre o estabelecimento inicial de plântulas de diversas culturas. Quando associado com a técnica de ultrassom, a absorção desses elementos pelas sementes pode ser influenciada pelo fenômeno da cavitação acústica, que favorece a fluidez da parede celular promovendo aceleração na cinética de transporte intercelular. O objetivo principal deste trabalho consistiu em estudar os efeitos de tratamentos de sementes de soja com zinco, manganês e CoMo em associação com a técnica de ultrassom sobre o desenvolvimento inicial de plântulas utilizando tecnologias de imagens multiespectrais, para detecção de sinais precoces, não perceptíveis ao olho humano. Foram utilizadas sementes de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO, representadas por classes de alto e baixo vigor. Inicialmente, sementes submetidas ou não ao ultrassom foram analisadas quanto à assinatura espectral de autofluorescência, microscopia de fluorescência azul e de proteínas, com monitoramento da velocidade de hidratação das sementes. Posteriormente, as sementes foram tratadas com zinco, manganês e CoMo em associação com ultrassom, seguida da análise de imagem multiespectral para determinação da velocidade de germinação com base nos padrões espectrais da raiz primária e fluorescência de clorofila de cotilédones. Por fim, foram capturadas imagens multiespectrais das plântulas para o cálculo do conteúdo e fluorescência da clorofila *a*, índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI), índice de antocianinas e eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ). O micronutriente zinco (tratamento mais efetivo) foi mapeado e quantificado em sementes com e sem ultrassom, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência de raios X para melhor entendimento da cinética de absorção. Os resultados das análises de imagens multiespectrais mostraram que os efeitos dos tratamentos de sementes de soja com zinco, manganês ou CoMo associados com ultrassom são dependentes do genótipo e vigor das sementes, sendo que sementes de menor vigor são mais responsivas. O zinco se destacou dentre os demais

micronutrientes estudados, por demonstrar maior eficiência de translocação entre os tecidos internos das sementes quando combinado com o ultrassom, culminando com melhor germinação, níveis mais elevados de clorofila *a* e de antocianinas nas plântulas resultantes. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento de estratégias relacionadas ao tratamento mais eficiente de sementes de soja e oferece alternativas mais sustentáveis para o melhor estabelecimento das plântulas em campo.

Palavras-chave: *Glycine max*. Espectroscopia de raios X. Clorofila. Manganês. Zinco.

## ABSTRACT

GOMES, E. S. **Effect of treatment of soybean seeds with micronutrients in association with ultrasound on the initial development of seedlings evaluated by multispectral imaging.** 2022. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

Optical imaging technologies based on multispectral images integrated with artificial intelligence has been used to detect physical, physiological and chemical changes in seeds and seedlings in an objective and non-invasive way. Seed treatment with micronutrients such as zinc, manganese and cobalt + molybdenum (CoMo) has shown promising effects on the initial establishment of seedlings of several crops. When associated with the ultrasound technique, the absorption of these elements by the seeds can be influenced by the phenomenon of acoustic cavitation, which favors the fluidity of the cell wall, promoting acceleration in the kinetics of intercellular transport. The main objective of this work was to study the effects of treatments of soybean seeds with zinc, manganese and CoMo in association with the ultrasound technique on the initial development of seedlings using multispectral imaging technologies, detecting early signals, which are not perceptible to the human eye. Soybean seeds of 57H0123 TP IPRO and M5838 IPRO cultivars represented by classes of high and low vigor were used. Initially, seeds submitted or not to ultrasound were analyzed for autofluorescence spectral signature, blue fluorescence and protein microscopy, and seed hydration rate. Subsequently, the seeds were treated with zinc, manganese and CoMo in association with ultrasound followed by multispectral imaging to determine the germination speed based on the spectral patterns of the primary root and chlorophyll fluorescence of cotyledons. Finally, multispectral images of seedlings were captured to calculate chlorophyll *a* content and fluorescence, normalized difference vegetation index (NDVI), anthocyanin index and photochemical efficiency of photosystem II ( $F_v/F_M$ ). The micronutrient zinc (most effective treatment) was mapped and quantified in seeds with and without ultrasound using the X-ray fluorescence spectroscopy technique to better understand the absorption kinetics. The results of multispectral imaging showed that the effects of soybean seed treatments with zinc, manganese or CoMo associated with ultrasound are dependent on the genotype and vigor of the seeds, in which seeds with lower vigor are more responsive. Zinc showed better effects compared to the other micronutrients studied due to greater translocation efficiency between the internal tissues of the seeds when combined with ultrasound, culminating in better germination, higher levels of chlorophyll *a* and anthocyanins in the resulting seedlings.

These results contribute to the development of strategies related to a more efficient treatment of soybean seeds, with more sustainable alternatives for better establishment of seedlings in the field.

Keywords: *Glycine max.* X-ray spectroscopy. Chlorophyll. Manganese. Zinc.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Assinatura espectral de autofluorescência em diferentes combinações de excitação/emissão.....	37
<b>Figura 2 -</b>	Plântulas de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO aos oito dias de idade.....	38
<b>Figura 3 -</b>	Imagens multiespectrais de fluorescência azul de sementes.....	38
<b>Figura 4 -</b>	Imagens de microscopia de fluorescência azul.....	39
<b>Figura 5 -</b>	Imagens de microscopia de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes.....	40
<b>Figura 6 -</b>	Curva de hidratação de sementes .....	40
<b>Figura 7 -</b>	Área, comprimento e largura de raízes primárias.....	41
<b>Figura 8 -</b>	Fluorescência de clorofila de cotilédones .....	42
<b>Figura 9 -</b>	Imagens de fluorescência de clorofila de um cotilédone representativo.....	43
<b>Figura 10 -</b>	Índice de clorofila <i>a</i> , índice de antocianinas e índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) de plântulas .....	46
<b>Figura 11 -</b>	Imagens de índice de clorofila <i>a</i> de uma plântula representativa.....	47
<b>Figura 12 -</b>	Imagens de índice de antocianinas de uma plântula representativa.....	47
<b>Figura 13 -</b>	Fluorescência de clorofila <i>a</i> e rendimento quântico máximo do fotossistema II com base na razão $F_V/F_M$ de plântulas.....	48
<b>Figura 14 -</b>	(A) Intensidade de zinco (Zn) (cps – contagens por segundo) medida por microfluorescência de raios X.....	49
<b>Figura 15 -</b>	(A) Intensidade de zinco (Zn) (cps – contagens por segundo) medida por microfluorescência de raios X.....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
BLOB	<i>Binary Large Object</i>
CC	Células cotiledonares
CCD	Dispositivo de carga acoplado
CoMo	Cobalto + Molibdênio
CP	Comprimento de plântulas
CP	Células parenquimatosas
EA	Envelhecimento acelerado tradicional
EASS	Envelhecimento acelerado com solução saturada de sal
EP	Emergência de plântulas
EP	Epiderme
F <sub>0</sub>	Fluorescência inicial
F <sub>M</sub>	Fluorescência máxima
F <sub>V</sub>	Fluorescência variável
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	Eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
HP	Hipoderme
IA	Índice de antocianinas
IC	Índice de clorofila <i>a</i>
IVE	Índice de velocidade de emergência de plântulas
LED	Diodo emissor de luz
LP	Filtro <i>Long Pass</i>
Mn	Manganês
nCDA	Algoritmo de discriminação canônica normalizada
NDVI	Índice de vegetação por diferença normalizada
NIR	Infravermelho próximo
RGB	Canais no vermelho, verde e azul ( <i>Red-Green-Blue</i> )
Rh	Ródio
ROI	Região de interesse
SiLi	Lítio e silício

TG	Tegumento
UR	Umidade relativa do ar
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco
$\mu$ -XRF	Espectroscopia de microfluorescência de raios X

## LISTA DE SÍMBOLOS

± - Mais ou menos

μA – Microampère

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> – Micromoles por metro quadrado por segundo

°C – Celsius

cm – Centímetro

et al. – e outros

g – Grama

g L<sup>-1</sup> – Gramas por litro

h – Hora

kHz – Quilohertz

kV – Kilovolt

M – Mol

máx – Máximo

mg – Miligrama

mg kg<sup>-1</sup> – Miligrama por quilograma

min – Minuto

mín – Mínimo

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm<sup>2</sup> – Milímetro quadrado

nm – Nanômetro

s – Segundo

W – Watt



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
2.1	A importância da cultura da soja	21
2.2	Tratamento de sementes com micronutrientes	22
2.3	Ultrassom no tratamento de sementes com micronutrientes	23
2.4	Potencialidades das imagens multiespectrais na análise de sementes e plantas	25
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
3.1	Local da pesquisa e sementes utilizadas	27
3.2	Caracterização inicial das sementes e estabelecimento de classes de alto e baixo vigor	27
3.3	Tratamentos de ultrassom	29
3.4	Microscopia de fluorescência azul e de proteínas da região tegumento-cotilédone das sementes após tratamento de ultrassom	29
3.5	Curva de hidratação das sementes após ultrassom	30
3.6	Tratamentos com micronutrientes em associação com ultrassom	30
3.7	Análise de imagens multiespectrais durante a germinação	31
3.8	Testes de germinação e vigor	32
3.9	Pigmentos e índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) durante o desenvolvimento inicial das plântulas	32
3.10	Fluorescência de clorofila <i>a</i> e eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II de plântulas	33
3.11	Espectroscopia e microfluorescência de raios X ( $\mu$ -XRF)	33
3.12	Procedimentos estatísticos	34

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
5.1	Ondas ultrassônicas, autofluorescência espectral e velocidade de hidratação de sementes .....	51
5.2	Ondas ultrassônicas em associação com micronutrientes e desempenho germinativo de sementes .....	52
5.3	Genótipo, vigor e efeito do tratamento de sementes com ultrassom e micronutrientes ....	53
5.4	Imagens multiespectrais na avaliação do efeito do tratamento de ultrassom em associação com micronutrientes .....	53
5.5	Absorção de micronutrientes em sementes avaliada por espectroscopia de microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF) .....	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
	<b>APÊNDICES</b> .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais fontes de proteína vegetal do mundo. O complexo soja é constituído por grãos, farelo e óleo, e representa uma das principais *commodities* no cenário internacional, podendo originar diversos produtos, como manteiga, doces, remédios, cosméticos, plásticos, biodiesel, dentre outros (GAZZONI; DALLÁGNOL, 2018).

A semente é o insumo que contém as características genéticas do cultivar, e que permite a transferência dos avanços da genética para o campo. Portanto, a utilização de sementes de alta qualidade é um fator decisivo em sistemas agrícolas, assegurando um estabelecimento rápido e adequado de plantas em diferentes condições edafoclimáticas (KRZYZANOWSKI; FRANÇA-NETO; HENNING, 2018), contribuindo assim, para que altos níveis de produtividade sejam alcançados (FRANÇA-NETO et al., 2016; SZARESKI et al., 2016; KRZYZANOWSKI; FRANÇA-NETO; HENNING, 2018).

Dentre alguns dos micronutrientes encontrados nas sementes e plantas, incluem o zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto (Co) e molibdênio (Mo). O Zn atua principalmente na manutenção da integridade de membranas, atividade de enzimas, expressão de genes, metabolismo de carboidratos, respiração anaeróbica de raízes e síntese de proteínas (WELCH, 1995; MASCARENHAS et al., 2014). O Mn desempenha papel fundamental nas atividades enzimáticas, reações de transporte de elétrons durante a fotossíntese, redução de radicais livres, e atua diretamente no processo de síntese de clorofilas, além de participar na ativação de diversas reações metabólicas associadas à fotossíntese (ALEJANDRO et al., 2020). Dentre as principais funções do Co, destaca-se a fixação de nitrogênio em leguminosas, metabolismo e crescimento de plantas, além de ser um componente essencial de várias enzimas e coenzimas (PALIT; SHARMA; TALUKDER, 1994). O Mo está envolvido na fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias (*Rhizobium* sp.) em nódulos radiculares (CAMPO; ALBINO; HUNGRIA, 2000).

A técnica de ultrassom se trata de um método físico baseado em ondas ultrassônicas, e no setor agrícola tem sido empregada utilizando energias de frequência entre 20 e 100 kHz, não detectáveis pela audição humana (GORDON, 1963; GORDON, 1971; LÓPEZ-RIBERA; VICIENT, 2017). As ondas ultrassônicas induzem a cavitação acústica, que consiste na geração de pressão mecânica na parede celular das sementes (HU et al., 2007), promovendo maior fluidez (YALDAGARD; MORTAZAVI; TABATABAIE, 2008) pela formação de microporos e microfissuras na parede (LÓPEZ-RIBERA; VICIENT, 2017; PORTO et al., 2018).

A combinação da tecnologia de ultrassom com tratamentos de micronutrientes pode acelerar a cinética do processo de absorção desses elementos pelas sementes em função da energia vibracional gerada pelo ultrassom, que permite que as partículas sejam mantidas em suspensão e continuem se movendo, facilitando sua passagem pelos poros da parede celular, além de melhorar o fluxo no interior dos tecidos (MILLER, 1976).

Métodos de análise de imagens que possibilitem a detecção precisa dos efeitos de tratamentos em sementes podem contribuir para melhor compreensão da eficiência do método empregado. Neste sentido, destaca-se a técnica de imagens multiespectrais que vem ganhando espaço pela capacidade de obtenção de dados espaciais e espectrais por meio da integralização da visão convencional e da técnica espectroscópica. A análise multiespectral se baseia no fato de que materiais podem refletir e absorver energia eletromagnética em distintos comprimentos de onda dependendo da sua constituição química e física. Se trata de uma medida não invasiva, oferecendo aferições precisas de toda a amostra com obtenção simultânea de informações de diversos componentes, incluindo componentes fluorescentes com papel importante na fisiologia de sementes e plantas, conteúdo de pigmentos, além de índices de vegetação associados com o vigor das plantas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de tratamentos de sementes de soja com micronutrientes (Zn, Mn e Co + Mo) em associação com tecnologia de ultrassom sobre o desenvolvimento inicial das plântulas utilizando tecnologias de imagens multiespectrais, visando oferecer novas alternativas que possam contribuir para o melhor estabelecimento das plântulas em campo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A importância da cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é pertencente à família Fabaceae e subfamília Papilionaceae nativa do leste da Ásia que hoje é cultivada mundialmente em razão do seu alto teor de proteína e óleo. Dentre as principais oleaginosas, a soja se destaca com 53% da produção global, seguida pela canola (15%), caroço de algodão (10%) e amendoim (9%) (SCHAEFER et al., 2021). Mundialmente, a produção de soja alcançou 362,947 milhões de toneladas na safra 2020/2021 e esse alto valor de produção se deve principalmente ao aumento do rendimento da cultura e da sua procura para comportar as necessidades de alimentos e combustíveis frente ao crescimento populacional (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2020; CONAB, 2022).

Dentre os grandes produtores mundiais de soja (Brasil, Estados Unidos e Argentina), o Brasil é o país que possui maior potencialidade de expansão de área cultivada, sendo capaz de multiplicar a sua atual produção e suprir uma considerável parte da esperada demanda adicional pelo grão (GAZZONI; DALL'AGNOL, 2018). Na safra 2021/2022 finalizada em junho de 2022, o País alcançou produção estimada de 125.552,3 milhões de toneladas (CONAB, 2022).

Os avanços científicos e a integração de novas tecnologias de produção têm sido determinantes para a expansão do cultivo da soja em todo o território nacional e para que o Brasil ocupasse hoje posição de destaque no mercado internacional, contribuindo para a crescente demanda global por alimentos (COLUSSI et al., 2016). Como leguminosa, a soja tem a capacidade de fazer uso do nitrogênio atmosférico por meio da fixação biológica, se tornando menos condicionada ao uso de fertilizantes sintéticos de nitrogênio. Apesar da sua utilidade para uso comercial ter sido primeiramente para o óleo, atualmente também é considerada como uma importante proteaginoso, visto que além das sementes de soja possuem de 18 a 23% de óleo, apresentam alto teor de proteína (25-45%), intensificando a importância dessa cultura comestível e oleaginoso (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2020).

Na Ásia, assim como em outras partes do mundo, a soja tem sido utilizada no preparo de vários alimentos frescos, secos e fermentados, como o leite de soja, tofu, molho de soja e missô (PROBST; JUDD, 1973). Da mesma forma, diversos alimentos saudáveis, energéticos e cereais também são preparados com base na soja, ao passo que seus demais usos compreendem brotos e nozes de soja. O subproduto farelo de soja pode ser utilizado na fabricação de ração animal, constituindo em matéria prima essencial para a indústria de alimentos e de rações, de modo que, dentre os principais farelos, a participação da soja no mercado internacional tem

sido em média de 70%, tornando a soja a maior fonte de ração animal do mundo (GAZZONI; DALLÁGNOL, 2018). Quase toda a produção de frango de corte e de postura depende do farelo da soja, e uma parcela considerável de suínos e bovinos de corte e de leite também é dependente.

O óleo de soja tem sido utilizado para diversas finalidades industriais, incluindo na produção de plásticos, tintas, papéis, produtos farmacêuticos, vernizes, cosméticos e pesticidas. Dentre os óleos comestíveis no Brasil, o óleo de soja é o mais expressivo, representando mais de 90% do consumo total. E a sua utilização como biodiesel estabeleceu uma nova perspectiva de fonte de energia renovável para uso industrial (PRATAP et al., 2012).

## **2.2. Tratamento de sementes com micronutrientes**

Os micronutrientes desempenham diversas funções essenciais para o crescimento e desenvolvimento adequado das plantas, agindo diretamente em processos fisiológicos da fotossíntese e respiração, além disso, atuam como cofatores em sistemas enzimáticos e participam em reações redox, assim como em outras funções vitais (MARSCHNER, 1995; MENGEL et al., 2001). Dessa forma, em situações de deficiência de micronutriente, pode haver a supressão do crescimento das plantas, ou a completa inibição (MENGEL et al., 2001), pois quando os micronutrientes são limitados, diversos processos fisiológicos importantes são prejudicados. Por exemplo, na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.), a deficiência de Zn é uma condição limitante de rendimento (WISSUWA; KRETZSCHMAR; ROSE, 2016; REHMAN et al., 2013).

O fornecimento de micronutrientes às plantas pode ser feito via solo, por pulverização foliar ou por meio do tratamento de sementes. Embora os micronutrientes sejam eficientemente fornecidos por qualquer um desses meios, a pulverização foliar tem mostrado maiores benefícios sobre a produtividade, porém, além do alto custo, a aplicação foliar é feita apenas após o estabelecimento do estande, ou seja, em estádios de crescimento avançado (JOHNSON et al., 2005). Logo, na perspectiva econômica, o tratamento de sementes ainda é considerado uma opção mais viável, uma vez que requer menor quantidade de produto e pelos benefícios no desenvolvimento inicial das plântulas (SINGH et al., 2005). Normalmente, sementes com maiores quantidades de micronutrientes disponíveis possuem relação direta com a formação de plântulas mais vigorosas e resistentes a estresses abióticos (alta temperatura, seca, salinidade e disponibilidade hídrica) e bióticos (pragas e doenças), com maior eficiência no uso da água, produção de biomassa, dentre outros fatores (WELCH, 2000; SERVIN et al., 2015; DIMKPA; BINDRABAN, 2016; ANGLE et al., 2017).

O tratamento de sementes com micronutrientes é feito principalmente a partir do condicionamento, o qual consiste na imersão das sementes em solução nutritiva (*priming*), ou por revestimento. No método de condicionamento as sementes são pré-hidratadas, permitindo que as atividades metabólicas ocorram sem que o processo germinativo seja concluído, e após secagem (retornando ao grau de umidade inicial) permite o seu manuseio de modo habitual (BRADFORD 1986). Como consequência, a germinação das sementes condicionadas ocorre mais rapidamente comparadas àquelas não condicionadas (FAROOQ et al., 2006; 2009) por apresentarem estado metabólico mais avançado (McDONALD, 2000; BROCK-LEHURST; DEARMAN, 2008).

Sementes de trigo condicionadas com solução de sulfato de manganês ( $MnSO_4$ ) originaram plântulas de melhor crescimento, rendimento e grãos com maior conteúdo de Mn (KHALID; MALIK, 1982). A melhoria no rendimento e conteúdo de Mn em grãos de trigo após o condicionamento de sementes com  $MnSO_4$  também foi constatada por Marcar e Graham (1986). Adicionalmente, em estudos conduzidos por Babaeva et al. (1999), foi possível observar um aumento de 36% na germinação e de 27% na emergência em campo após o condicionamento de sementes de *Echinacea purpurea* com  $MnSO_4$ .

O revestimento de sementes é um método no qual ocorre a aplicação de líquidos ou sólidos moídos dissolvidos ou suspensos para que seja formada uma camada contínua cobrindo o revestimento natural das sementes (SCOTT, 1989). A eficácia do revestimento com micronutrientes em sementes é dependente do material de revestimento, umidade, micronutriente, dentre outros (HALMER, 2008). Este método tem sido utilizado com sucesso quando associado com Mo (RAMESH; THIRUMURU-GAN, 2001; BISCARO et al., 2009). Por exemplo, Biscaro et al. (2009) verificaram que as plantas de feijão provenientes de sementes revestidas com Mo tinham maior índice de clorofila, número de vagens, peso de sementes e rendimento. Já Ramesh e Thirumurugan (2001), trabalhando com sementes de soja revestidas com molibdato de amônio + sulfato ferroso, observaram aumento na massa seca, altura das plantas e índice de área foliar.

### **2.3. Ultrassom no tratamento de sementes com micronutrientes**

Na indústria agrícola, tem havido o crescente interesse pelo uso de técnicas avançadas que possibilitem o fornecimento de micronutrientes às sementes. A combinação da tecnologia de ultrassom com micronutrientes, por exemplo, pode favorecer a cinética do processo de absorção desses elementos pelas sementes, pois as ondas ultrassônicas induzem a cavitação

acústica que auxilia na melhoria da transferência de componentes entre células, bem como do meio externo para o interior dos tecidos (FENG; LEE, 2011; MIANO; AUGUSTO, 2018; JANSRIMANEE; LERTWORASIRIKUL, 2020), conforme verificado em sementes de feijão testadas com soluções de ferro (MIANO; AUGUSTO, 2018); alterações na seletividade química da membrana semipermeável também acontece devido a ação do ultrassom (LOZA, 1950). Em humanos, esta propriedade do ultrassom em facilitar o transporte de componentes entre células, inclusive, tem contribuído para o direcionamento de medicações em tecidos doentes (SEDAGHATKISH et al., 2020), e “entrega” de moléculas, como proteínas, por exemplo (MASON et al., 2005). Em comparação com outros métodos químicos e físicos, esta técnica possui como principais vantagens a não geração de resíduos químicos, facilidade de operação e rapidez (GOUSSOUS et al.; 2010; SHARIFIFAR; NAZARI; ASGHARI, 2015).

No setor agrícola, a técnica do ultrassom tem sido empregada a partir de energias de frequência entre 20 e 100 kHz, ou seja, não detectáveis pela audição humana (LÓPEZ-RIBERA; VICIENT, 2017), e embora seu uso já seja bastante conhecido em diversos campos da Medicina, com equipamentos de detecção de órgãos, massas tumorais, deficiências pré-natais, dentre outros, ainda é relativamente em outros segmentos. Entretanto, tem despertado cada vez mais interesse, uma vez que oferece uma opção mais ecológica pelo baixo consumo de energia de operação, custo competitivo, baixa manutenção, aliados à aceleração do processo (MASON et al., 2005).

Os efeitos do tratamento de ultrassom em sementes dependem do tempo de exposição, os quais podem variar amplamente entre diferentes espécies e cultivares (POVEY; MASON, 1998; BENEDITO et al., 2002; GABA et al., 2008), com ativação ou desativação de enzimas (MASON et al., 2005; HUANG et al., 2017); em altas intensidades, entretanto, o ultrassom pode degradar células e/ou enzimas (NYBORG, 2001). Comumente, a água tem sido utilizada como meio líquido para o tratamento de sementes (NAZARI; SHARIFIFAR; ASGHARI, 2014).

Os tratamentos ultrassônicos têm favorecido o processo de hidratação das sementes, com melhorias na germinação (MIANO et al., 2016) pela aceleração de reações metabólicas importantes (LIU et al., 2016), como por exemplo, a maior atividade da enzima alfa-amilase (YALDAGARD; MORTAZAVI; TABATABAIE, 2008). A aceleração do processo de germinação também foi verificada em sementes de *Arabidopsis* (LÓPEZ-RIBERA; VICIENT, 2017), soja (PORTO et al., 2018), feijão (GHAFOOR et al., 2014), grão de bico, trigo e melancia (GOUSSOUS et al., 2010), milho (HEBLING; SILVA, 1995), *Picea abies* (RÎȘCA; FĂRTĂIȘ; ȘTIUCĂ, 2007), manjeriço (ONAC et al., 2016), *Lotus corniculatus* (TOTH;

DRAGOMIR; NEAGU, 2012), amendoim (YU et al., 2016), *Panicum virgatum* (WANG et al., 2012) e cevada (YALDAGARD; MORTAZAVI; TABATABAIE, 2008). Trabalhos têm revelado, ainda, efeitos promissores na superação de dormência de sementes (SHARIFIFAR; NAZARI; ASGHARI, 2015; BABAEI-GHAGHELESTANY et al., 2020), incremento na altura de plantas (LIU et al., 2016) e crescimento de raízes (LOZA, 1950; FISCHNICH; HEILIGER, 1958; POPOV; KARABASCHEV; KARABACHEV, 1960). Em soja, esta técnica melhorou o conteúdo do aminoácido GABA e o desenvolvimento dos brotos produzidos (YANG et al., 2015).

As reações metabólicas em tecidos submetidos a ultrassom podem ocorrer mais rapidamente quando comparadas com tecidos sem ultrassom (FINDLEY; CAMPBELL, 1953; BUSNEL; OBOLENSKY, 1995). O estado metabólico da semente reflete sobre a uniformidade e velocidade de estabelecimento das plântulas em campo, neste sentido, tratamentos que contribuam para acelerar reações metabólicas importantes nas sementes, em geral, possuem impactos positivos sobre o vigor das plantas produzidas (ARAÚJO et al., 2016).

#### **2.4. Potencialidades das imagens multiespectrais na análise de sementes e plantas**

A análise de imagem multiespectral integrada com inteligência artificial é uma técnica recente que integra imagens convencionais e espectroscopia para adquirir simultaneamente informações espaciais e espectrais da amostra (OLESEN et al., 2015). Este método permite capturar imagens de alta resolução espacial não apenas na faixa do visível do espectro eletromagnético, mas também utilizando comprimentos de onda do ultravioleta (UV) e infravermelho próximo (NIR), com o emprego de diodos emissores de luz (LEDs) e dispositivos de carga acoplados (CCD), que possibilitam a extração de informações adicionais que o olho humano não consegue capturar (LLEÓ et al., 2009). A imagem multiespectral não exige pré-tratamento das amostras, e o mais importante é que essa técnica tem um vasto potencial para medir diversos componentes associados a atributos fisiológicos, genéticos, químicos e físicos de sementes e plântulas. A relação desses parâmetros com dados obtidos por métodos tradicionais também pode indicar o potencial desses sistemas de imagem computadorizados para gerar novos marcadores de germinação e vigor, para fins de classificação (DELL'AQUILA, 2007).

A qualidade de sementes e grãos, incluindo milho, trigo, cevada, soja e arroz, além de carnes, peixes, frutas têm sido eficientemente classificada por meio da aplicação de imagens multiespectrais, pela integração de dados espectrais e informações espaciais. Devido à essa

capacidade de integração, este método tem sido utilizado como uma ferramenta eficaz para a detecção precisa de efeitos de tratamentos de sementes (KANDPAL et al., 2016; ELMASRY et al., 2019). A tecnologia de imagens multiespectrais também tem sido empregada com sucesso na avaliação do vigor de plântulas. Por exemplo, considerando que as clorofilas e antocianinas apresentam picos de absorbância de luz em comprimentos de onda específicos, utilizando dados de reflectância é possível monitorar os índices de clorofilas (GITELSON; GRITZ; MERZLYAK, 2003), antocianinas (GITELSON; MERZLYAK; CHIVKUNOVA, 2001), bem como índices de vegetação, como o índice de vegetação da diferença normalizada (NDVI) (BEISEL et al., 2018). O NDVI, em particular, se tornou um método padrão na avaliação de sinais de estresse em plantas de diversas culturas, antes da detecção visual (YENGOH et al., 2015; BEISEL et al., 2018). Embora as concentrações de antocianinas e de clorofilas também sejam detectadas por espectroscopia de absorção e reflectância, as imagens multiespectrais possuem a vantagem de fornecer informações espaciais de forma rápida e não destrutiva.

Utilizando equipamentos que possibilitam a captura simultânea de imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila, pode-se obter ainda, dados adicionais sobre a atividade do fotossistema II das plantas em um curto período de tempo (BAKER; ROSENQVIST, 2004; FURBANK et al., 2009; MURCHIE; LAWSON, 2013). A tecnologia de imagens de fluorescência de clorofila possibilita a medição da fluorescência inicial ( $F_0$ ), que equivale à fluorescência emitida após um período de adaptação da planta no escuro (centros de reação do fotossistema II fechados) seguida pela iluminação com pulso de luz actínica (BAKER, 2008). Esse pulso de saturação de luz aplicado às folhas induz uma fluorescência máxima ( $F_M$ ). A diferença entre o  $F_M$  e  $F_0$  corresponde à fluorescência variável ( $F_V$ ), que possibilita calcular o rendimento quântico máximo do fotossistema II (BUTLER, 1978; GENTY et al., 1992) com base na relação  $F_V/F_M$ .

Métodos de análise de imagens que possibilitem a detecção precisa dos efeitos de técnicas de aplicação de micronutrientes em tecidos vegetais podem auxiliar na compreensão da eficiência do método empregado e da dinâmica desses elementos nas sementes e plântulas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Local da pesquisa e sementes utilizadas**

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Radiobiologia e Ambiente e no Laboratório de Instrumentação Nuclear, ambos pertencentes ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP, Brasil. Foram estudadas sementes do cultivar 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO colhidas na safra 2019/2020 e doadas pela empresa Lagoa Bonita Sementes, localizada em Itaberá, SP, Brasil. As sementes foram mantidas em sacos de papel Kraft, a 10° C e 40% de umidade relativa do ar (UR) durante todo o período experimental.

#### **3.2. Caracterização inicial das sementes e estabelecimento de classes de alto e baixo vigor**

Para obtenção de classes de sementes de alto e baixo vigor, as sementes de cada cultivar foram artificialmente envelhecidas. Para identificação do tempo mais adequado para o envelhecimento artificial das sementes, foram testados os períodos de 0, 16, 24 e 48 h. As sementes foram distribuídas em camada única sobre tela de aço inox no interior de caixas de plástico transparentes (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram fechadas e mantidas a 42 °C. Após o envelhecimento artificial, as sementes foram submetidas à secagem a 20 °C e 60% de UR durante 24 h. A caracterização das sementes de cada classe se deu determinando-se o teor de água, a germinação e o vigor (primeira contagem, envelhecimento acelerado tradicional – EA, envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl – EASS, emergência de plântulas, IVE e comprimento de plântulas determinado pelo *software* SeedReporter®).

Os teores de água das sementes após a secagem foram determinados adotando o método de estufa a  $105 \pm 3$  °C durante 24 h (BRASIL, 2009), os quais variaram de 8,3 a 9,0% para as sementes do cultivar 57H0123 TP IPRO e de 7,1 a 8,3% para as sementes do cultivar M5838 IPRO. Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada classe. As sementes foram pré-condicionadas a fim de minimizar danos por embebição durante o teste de germinação. Para isto, as sementes foram distribuídas sobre tela de aço inox suspensa em caixa de plástico transparente (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) contendo 40 mL de água destilada, e mantida a temperatura de 25 °C por 16 h. Em seguida, as sementes foram semeadas em rolos

de papel toalha umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos a 25 °C e fotoperíodo de oito horas. A primeira contagem de germinação se deu no 5º dia e a última contagem no 8º dia após a instalação do teste, registrando a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Para o EA foram utilizadas 300 sementes por classe distribuídas em camada única sobre tela de aço inox no interior de caixas de plástico transparente (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram fechadas e mantidas a 42 °C por 48 h (MARCOS FILHO; NOVENBRE; CHAMMA, 2001; DUTRA; VIERA, 2004). Após o envelhecimento, duas repetições de 50 sementes foram utilizadas para determinação do teor de água, e quatro repetições de 50 sementes submetidas ao teste de germinação, seguindo a metodologia descrita anteriormente, sendo a avaliação realizada no quarto dia após a semeadura (YAGUSHI; COSTA; FRANÇA-NETO, 2014), registrando-se a porcentagem de plântulas normais. O EASS foi executado de modo similar ao envelhecimento acelerado tradicional, entretanto, os 40 mL de água destilada foram substituídos por solução saturada de cloreto de sódio – NaCl (40 g NaCl/100 mL de água) a fim de manter a UR de aproximadamente 76% no interior das caixas contendo as sementes. A avaliação foi realizada no quarto dia após a semeadura (YAGUSHI; COSTA; FRANÇA-NETO, 2014).

Para a emergência de plântulas foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por classe. As sementes foram semeadas em caixas de plástico contendo areia umedecida com 60% da capacidade de retenção de água (BRASIL, 2009). No oitavo dia após a semeadura, determinou-se a porcentagem de plântulas emergidas. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi conduzido em conjunto com a emergência das plântulas, registrando diariamente o número de plântulas emergidas. Em seguida, empregou-se a fórmula proposta por Maguire (1962):  $IVE = N1/D1 + N2/D2 + \dots + Nn/Dn$ , onde:  $Nn$  = números de plântulas emergidas no dia da contagem;  $D$  = números de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

Para determinação do comprimento de plântulas pelo *software* SeedReporter<sup>®</sup>, foram semeadas cinco repetições de 20 sementes por classe em rolos de papel toalha, similarmente aos procedimentos adotados no teste de germinação, posicionando as sementes no terço superior da folha de papel toalha para permitir crescimento adequado das plântulas. No 6º dia após a instalação do teste, as plântulas foram transferidas para papel cartonado preto (30,0 x 23,0 cm), e em seguida, foram capturadas imagens RGB (*Red-Green-Blue channels*) (resolução de 2.448 x 2.448 pixels; 3,69 µm/pixel) com o equipamento SeedReporter<sup>®</sup> (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda). Após a captura das imagens, as plântulas foram identificadas como uma região de interesse (ROI) e segmentadas, separando-as do fundo,

permitindo o cálculo do comprimento médio das plântulas (região folha cotiledonar-hipocótilo-raiz primária).

### **3.3. Tratamentos de ultrassom**

Para definição do melhor tempo de tratamento de ultrassom, as sementes foram embaladas à vácuo (procedimento considerado mais adequado em testes preliminares) e submetidas a ondas ultrassônicas por 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, com frequência de 42 kHz, utilizando uma cuba de ultrassom (Cristófoli Biossegurança, Brasil). O tempo de exposição e a frequência das ondas ultrassônicas foram estipulados conforme testes preliminares e trabalhos disponíveis na literatura (SCOUTEN; BEUCHAT, 2002; GOUSSOUS et al., 2010; WANG et al., 2012; LAHIJANIAN; NAZARI, 2017; AZEVEDO, 2020; KALITA et al., 2020). Para cada tempo de ultrassom, as sementes foram analisadas quanto à assinatura espectral de autofluorescência a partir de imagens multiespectrais capturadas em 11 diferentes combinações de excitação/emissão (365/400 nm, 405/500 nm, 430/500 nm, 450/500 nm, 470/500nm, 515/600 nm, 540/600 nm, 570/600 nm, 630/700 nm, 645/700 nm e 660/700 nm) utilizando o equipamento VideometerLab4® (Videometer A/S, Herlev, Dinamarca), além de imagens RGB para avaliação do desenvolvimento das plântulas aos oito dias de idade, e imagens de microscopia de fluorescência azul com caracterização morfoanatômica da região cotilédone-tegumento das sementes.

### **3.4. Microscopia de fluorescência azul e de proteínas da região tegumento-cotilédone das sementes após tratamento de ultrassom**

Foram analisadas imagens de microscopia de fluorescência azul e de proteínas das sementes antes (0 minutos) e após o ultrassom (30 minutos; tempo considerado mais adequado) (cinco sementes/tratamento). Inicialmente, as amostras foram armazenadas em solução fixadora de Karnovsky (1965) por 24 h. Após este período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e desidratado em série etílica crescente (30% a 100%), pré-infiltrado e infiltrado em historresina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 6 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). Para as avaliações de fluorescência azul, as imagens foram registradas em

microscópio Olympus, modelo BX61, com câmera DP-72, e cubo de excitação UV 330-385 utilizando filtro U-25ND6 Olympus T2 JAPAN, permitindo a avaliação da intensidade de fluorescência azul e análises morfoatómicas da região cotilédone-tegumento.

Para a microscopia de proteínas, utilizou-se o reagente Xylidine Ponceau (XP) (O'BRIEN; MCCULLY, 1981), o qual revela o conteúdo de proteínas totais. As imagens, foram obtidas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão) acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de campo claro.

### **3.5. Curva de hidratação das sementes após ultrassom**

A curva de hidratação das sementes foi determinada para análise da velocidade de absorção de água pelas sementes com e sem o emprego do ultrassom. Quatro repetições de 10 sementes pré-condicionadas (procedimentos descritos na seção 3.2) foram distribuídas sobre duas folhas de papel toalha previamente umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, colocada no interior de caixa de plástico transparente (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) e mantidas a 25 °C. O teor de água foi calculado de forma indireta, baseando-se no teor de água inicial e o peso úmido das sementes após o pré-condicionamento e embebição nos períodos de 1, 2, 4, 6 e 8 h.

### **3.6. Tratamentos com micronutrientes em associação com ultrassom**

Após definição do melhor tempo de ultrassom para o tratamento das sementes, foram estudadas diferentes concentrações de Zn, Mn e CoMo, a partir de fontes comerciais (empresa Geraquímica), de cloreto de zinco (322,5 g de  $ZnCl_2 L^{-1}$ ), cloreto de manganês (190,4 g de  $MnCl_2 L^{-1}$ ), e reagentes P.A a base de sulfato de cobalto (20% de  $CoSO_4$ ) e molibdato de sódio (39% de  $Na_2MoO_4$ ), respectivamente. Para verificar o possível efeito de aditivos, as fontes comerciais de  $ZnCl_2$  e  $MnCl_2$  foram previamente comparadas a controles positivos a base de reagentes P.A., medindo-se o índice de clorofila *a*, índice de antocianinas e de índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) das plântulas aos seis dias de idade, utilizando o *software* SeedReporter<sup>®</sup>, não tendo sido detectado diferença significativa entre os tratamentos. Para definição das concentrações mais adequadas de  $ZnCl_2$  e  $MnCl_2$ , foram realizados testes preliminares com base na diluição de 0,0, 0,2, 0,5 e 1,0 mL das fontes comerciais em 100 mL de água, estabelecendo-se 1,0 mL para a fonte comercial de  $ZnCl_2$  e 0,2 mL para a fonte comercial de  $MnCl_2$ . Para o CoMo, foi testado o reagente a base de  $CoSO_4$  P.A. (20%) nas

concentrações de 0, 1,0, 1,5 e 2,0% e o reagente a base de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  P.A. nas concentrações de 0, 10, 12 e 15%, estabelecendo-se 1% de  $\text{CoSO}_4$  (ou seja, 2,5 g de  $\text{CoSO}_4$  P.A. em 47,5 mL de água) e 10% de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (ou seja, 12,82 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  P.A. em 37,12 mL de água).

A aplicação dos micronutrientes foi realizada pelo método a seco, colocando as sementes no interior de saco de plástico e distribuindo 200  $\mu\text{L}$  da solução sobre as sementes. O saco foi agitado por 2 minutos. Imediatamente, as sementes foram transferidas para outro saco de plástico, o qual foi selado à vácuo e mantido na cuba de ultrassom (Cristófoli Biossegurança, Brasil) por 30 minutos. Sementes sem ultrassom e sem aplicação de micronutrientes também foram avaliadas (controles negativos), bem como sementes submetidas apenas ao efeito do ultrassom e apenas à aplicação de micronutriente (controles positivos).

### **3.7. Análise de imagens multiespectrais durante a germinação**

Foram conduzidas análises de imagens multiespectrais (resolução de 2.192 x 2.192 pixels; 40  $\mu\text{m}$ /pixel) após 48 h da semeadura do teste de germinação utilizando o equipamento VideometerLab4<sup>®</sup> (Videometer A/S, Herlev, Dinamarca) para determinação da velocidade de germinação com base nos padrões espectrais da raiz primária, sendo calculada a área, comprimento e largura da raiz primária de cada semente da amostra. Durante esse período, também foram capturadas imagens de fluorescência de clorofila dos cotilédones com o mesmo sensor utilizando LEDs de excitação de 660 nm e filtro *Long Pass* (LP) de 700 nm. Antes da aquisição das imagens, foi realizado o ajuste individual e automatizado da intensidade da luz em cada comprimento de onda para otimizar a iluminação para o tipo de amostra específico e melhorar a relação sinal-ruído. A configuração da intensidade de luz foi feita utilizando uma amostra representativa.

As imagens foram analisadas pelo *software* VideometerLab<sup>®</sup> versão 3.14.9. Cada raiz primária e cotilédone foi extraído da imagem utilizando a ferramenta *Binary Large Object* (BLOB), onde cada BLOB foi a representação de um objeto. As imagens de fluorescência de clorofila dos cotilédones foram transformadas pelo algoritmo de discriminação canônica normalizada (nCDA), sendo que cada pixel da imagem foi representado por um valor de fluorescência.

### 3.8. Testes de germinação e vigor

Após cada tratamento, as sementes foram analisadas por meio dos testes convencionais de germinação e vigor para verificar se os tratamentos afetariam o potencial fisiológico das sementes, e para isto, foram empregados os mesmos testes e procedimentos descritos na seção 3.2.

### 3.9. Pigmentos e índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) durante o desenvolvimento inicial das plântulas

Foram obtidas imagens multiespectrais de resolução de 2.448 x 2.448 pixels (3,69  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) para o cálculo do índice de clorofila *a* (IC), índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) e índice de antocianinas (IA) das plântulas aos seis dias de idade. Cinco repetições de 20 sementes foram distribuídas em rolos de papel toalha, similarmente aos procedimentos adotados no teste de germinação (seção 3.2), posicionando as sementes no terço superior da folha de papel para permitir crescimento adequado das plântulas. Os rolos foram mantidos a 25 °C e fotoperíodo de oito horas. Aos seis dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para papel cartonado preto (30,0 x 23,0 cm), o qual foi colocado no interior da cabine do equipamento SeedReporter® (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda) para captura das imagens. Para calcular o IC, NDVI e o IA foram utilizados LEDs de luz branca de 3000 K na faixa de 450 a 780 nm. O IC foi calculado a partir da reflectância a 710 e 770 nm (GITELSON; GRITZ; MERZLYAK, 2003), o NDVI com base nos padrões de reflectância a 640 e 770 nm (YENGOH et al., 2015), e o IA a partir da reflectância a 540, 710 e 770 nm (GITELSON; MERZLYAK; CHIVKUNOVA, 2001). Os cálculos foram realizados pelo *Software* CFTI – Analysis (versão 5.4.7), utilizando as fórmulas a seguir, onde  $\rho$  representa a reflectância espectral para cada comprimento de onda:

$$IC = \left( \frac{\rho_{770}}{\rho_{710}} \right) - 1 \quad (\text{I})$$

$$NDVI = \frac{\rho_{770} - \rho_{640}}{\rho_{770} + \rho_{640}} \quad (\text{II})$$

$$IA = \rho_{770} * \left( \frac{1}{\rho_{540}} \right) - \left( \frac{1}{\rho_{710}} \right) \quad (\text{III})$$

### 3.10. Fluorescência de clorofila *a* e eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II de plântulas

Foram obtidas imagens de fluorescência de clorofila *a* e eficiência quântica máxima fotoquímica do fotossistema II das plântulas com base na relação  $F_v/F_M$ . As imagens foram capturadas no equipamento SeedReporter® (PhenoVation Life Sciences, Wageningen, Holanda). As sementes foram semeadas em oito recipientes de poliestireno de 500 mL (5 sementes/recipientes) para cada tratamento, preenchidos com substrato contendo uma mistura de casca de pinus, turfa e vermiculita. Os recipientes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada a 25 °C, UR de 50-70% e fotoperíodo de oito horas, utilizando lâmpadas LED de 13 W. No 8º dia foi realizado o desbaste para evitar a sobreposição das folhas, mantendo-se uma plântula por vaso, e as análises ocorreram no 10º dia após a instalação do teste.

A fluorescência da clorofila *a* foi detectada a 730 nm por um CCD, obtendo-se imagens de resolução de 2.448 x 2.448 pixels (3,69 µm/pixel). Para medir a curva de indução da fluorescência da clorofila *a*, os LEDs foram mantidos ligados por 0,8 segundos. Os dados foram extraídos por meio do *Software* CFTI – Analysis (versão 5.4.7), sendo obtidos valores de fluorescência de clorofila *a* e  $F_v/F_M (= F_M - F_0/F_M)$ . Para obtenção de dados de  $F_v/F_M$ , as plântulas foram adaptadas no escuro por 30 minutos (BAKER, 2008). Foram utilizados LEDs de 620 nm e fluxo de fótons de 6.320 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para saturação do aparato fotossintético, segundo curva de indução de Kautsky (STRASSERF; SRIVASTAVA 1995).

### 3.11. Espectroscopia de microfluorescência de raios X (µ-XRF)

Foi realizada a análise qualitativa do micronutriente com resultados mais expressivos (Zn) a partir do mapeamento de tecidos do tegumento e cotilédones de sementes de baixo vigor, utilizando um sistema de espectroscopia de microfluorescência de raios X (µ-XRF) (Orbis PC EDAX, EUA). As sementes foram seccionadas longitudinalmente com uma lâmina de barbear de aço inoxidável para obter uma superfície plana, e em seguida, colocadas em porta-amostras de 6,3 mm (nº 3577 – Spex Ind. Inc., EUA) vedados com filme de polipropileno de 5 µm (nº 3520 - Spex Ind. Inc., EUA) de espessura com o lado interno dos cotilédones voltado para cima.

Para verificar a intensidade de Zn, utilizou-se tubo de raios X de Rh operado a 40 kV e 70 µA, usando um filtro de Al de 250 µm sem vácuo. As sementes foram investigadas

empregando um feixe de raios X policapilar de 30  $\mu\text{m}$  focado através de um elemento óptico policapilar. Os espectros de raios X foram adquiridos em 10 s por ponto nas sementes, utilizando um detector de desvio de silício (SDD) de 30  $\text{mm}^2$ , com tempo morto de análise entre 2 a 3%. Diferentes regiões das sementes foram avaliadas usando um *linescan* em que 32 pontos consecutivos foram analisados ao longo do tegumento da semente (oposto ao hilo), cotilédone e hilo. Quatro repetições (sementes) por tratamento foram medidas. Os resultados de intensidade dos elementos foram expressos em contagem por segundo (cps), e os dados foram processados pela ferramenta do *software* gráfico OriginLab®.

A análise quantitativa foi realizada por meio da espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF, Shimadzu modelo EDX-720, Japão). Para isto, 10 g de sementes foram colocadas em estufa a 105 °C por 24 h, e posteriormente as amostras foram moídas em moedor de café elétrico (Philco, modelo Grano Aroma) por 2 minutos a fim de se obter uma amostra homogênea. Em seguida, 100 mg da amostra moída foi adicionada em cubeta para análise por EDXRF (Spex SamplePrep nº 3577, EUA), selada com filme de polipropileno de 6  $\mu\text{m}$  de espessura (VHG, FPP25-R3, EUA). As amostras foram irradiadas por um tubo de raios X com alvo de Rh, operado a 50 kV com uma corrente autoajustável para um valor máximo do tempo morto do detector de 20%. Um colimador de 3 mm e atmosfera de vácuo foram empregados. Os espectros de raios X foram adquiridos durante 200 s usando um detector de Si(Li). O Zn foi determinado através de uma curva de calibração externa com padrões de celulose, com os correspondentes sinais analíticos normalizados pela radiação de fundo (*background*), abaixo do fotopico.

### **3.12. Procedimentos estatísticos**

Os testes foram analisados separadamente por meio da análise de variância em delineamento inteiramente casualizado, e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o *software* R 4.0.0 (R core Team, 2019).

#### 4. RESULTADOS

Nos testes fisiológicos, tanto para as sementes do cultivar 57H0123 TP IPRO (Tabela 1) como do cultivar M5838 IPRO (Tabela 2), os resultados revelaram que o EASS e o comprimento de plântulas determinado pelo *software* SeedReporter® apresentam maior sensibilidade no ranqueamento das classes de sementes submetidas aos diferentes tempos de envelhecimento artificial, com decréscimo progressivo no vigor das sementes. Para todos os demais testes, os tempos de 0 e 16 h foram semelhantes, e por esta razão, o tempo de 24 h foi adotado para representar a classe de sementes de baixo vigor.

Tabela 1 – Testes para caracterização inicial e estabelecimento de classes de sementes de soja (cultivar 57H0123 TP IPRO) de alto e baixo vigor, após envelhecimento artificial por 0, 16, 24 e 48 h: germinação aos 5 e 8 dias, envelhecimento acelerado tradicional (EA), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (EASS), emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) e comprimento de plântulas (CP) determinado pelo *software* SeedReporter®. Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Tratamento	Germ. 5 dias (%)	Germ. 8 dias (%)	EA (%)	EASS (%)	EP (%)	IVE	CP (cm)
0 h	91 $\pm$ 1,07 a	98 $\pm$ 1,10 a	87 $\pm$ 3,05 a	89 $\pm$ 3,82 a	90,0 $\pm$ 2,49 a	11,0 $\pm$ 0,43 a	30,0 $\pm$ 0,71 a
16 h	94 $\pm$ 2,05 a	99 $\pm$ 1,63 a	78 $\pm$ 2,75 ab	83 $\pm$ 4,0 b	87 $\pm$ 2,76 ab	11,0 $\pm$ 0,22 a	25,0 $\pm$ 1,46 b
24 h	86 $\pm$ 1,80 ab	92 $\pm$ 0,94 ab	67 $\pm$ 4,0 b	78 $\pm$ 4,30 c	76 $\pm$ 4,15 abc	10,0 $\pm$ 0,30 ab	21,0 $\pm$ 2,03 c
48 h	85 $\pm$ 2,03 b	85 $\pm$ 1,80 b	51 $\pm$ 4,13 c	51 $\pm$ 5,12 d	63 $\pm$ 4,27 bc	7,0 $\pm$ 0,50 bc	12,0 $\pm$ 3,75 d
<b>ANOVA</b>	F <sub>3,12</sub> =12,34; p=0,00*; C.V.=9,68	F <sub>3,12</sub> =12,46; p=0,00*; C.V.=4,13	F <sub>3,12</sub> =19,35; p=0,00*; C.V.=9,96	F <sub>3,12</sub> =13,54; p=0,00*; C.V.=12,28	F <sub>3,12</sub> =6,20; p=0,00*; C.V.=12,38	F <sub>3,12</sub> =9,48; p=0,00*; C.V.=13,60	F <sub>3,12</sub> =14,60; p=0,00*; C.V.=14,13

\* significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Testes para caracterização inicial e estabelecimento de classes de sementes de soja (cultivar M5838 IPRO) de alto e baixo vigor após envelhecimento artificial por 0, 16, 24 e 48 h: germinação aos 5 e 8 dias, envelhecimento acelerado tradicional (EA), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (EASS), emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) e comprimento de plântulas (CP) determinado pelo *software* SeedReporter®. Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Tratamento	Germ. 5 dias (%)	Germ. 8 dias (%)	EA (%)	EASS (%)	EP (%)	IVE	CP (cm)
0 h	98 $\pm$ 0,94 a	98 $\pm$ 0,96 a	83 $\pm$ 2,75 a	87 $\pm$ 3,05 a	95 $\pm$ 1,15 a	13,0 $\pm$ 0,22 a	32,0 $\pm$ 1,46 a
16 h	91 $\pm$ 2,87 ab	93 $\pm$ 2,90 ab	72 $\pm$ 3,47 ab	83 $\pm$ 3,18 b	92 $\pm$ 3,56 ab	12,0 $\pm$ 0,14 a	27,0 $\pm$ 2,78 b
24 h	89 $\pm$ 3,04 b	90 $\pm$ 3,70 ab	64 $\pm$ 5,76 b	75 $\pm$ 3,45 c	83 $\pm$ 5,52 ab	11,0 $\pm$ 0,78 ab	21,0 $\pm$ 4,26 c
48 h	84 $\pm$ 3,17 b	85 $\pm$ 3,97 b	50 $\pm$ 5,98 c	53 $\pm$ 6,03 d	73 $\pm$ 7,14 bc	8,0 $\pm$ 0,94 bc	17,0 $\pm$ 5,02 d
<b>ANOVA</b>	F <sub>3,12</sub> =7,94; p=0,00*; C.V.=4,59	F <sub>3,12</sub> =7,14; p=0,00*; C.V.=4,67	F <sub>3,12</sub> =18,06; p=0,00*; C.V.=11,24	F <sub>3,12</sub> =14,47; p=0,00*; C.V.=7,64	F <sub>3,12</sub> =8,70; p=0,00*; C.V.=12,18	F <sub>3,12</sub> =9,81; p=0,00*; C.V.=12,29	F <sub>3,12</sub> =15,02 p=0,00*; C.V.=14,30

\* significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de autofluorescência espectral (Figura 1) de sementes do cultivar 57H0123 TP IPRO nas diferentes combinações de excitação/emissão indicaram que a resposta aos diferentes tempos de ultrassom foi melhor evidenciada na combinação de 365/400 nm (fluorescência azul), para ambas as classes de sementes (alto e baixo vigor) (Figura 1 A, B). Na comparação das médias a 365/400 nm (Figura 1 C, D), constatou-se que os tempos de ultrassom de 15, 30 e 45 minutos proporcionaram maior incremento na fluorescência dos componentes das sementes de alto vigor (Figura 1 C), enquanto que para a classe de sementes de menor vigor, destacaram-se os tempos de 15 e 30 minutos (Figura 1 D).

Para as sementes do cultivar M5838 IPRO, também se verificou maior efeito dos diferentes tempos de ultrassom utilizando a combinação de 365/400 nm, tanto para as classes de alto (Figura 1 E) como de baixo vigor (Figura 1 F). Na comparação das médias a 365/400 nm, as sementes de alto vigor (Figura 1 G) apresentaram decréscimo mais significativo nos sinais de autofluorescência com o avanço do tempo de ultrassom comparadas às sementes de baixo vigor (Figura 1 H).

É importante destacar que o desenvolvimento das plântulas de ambos os cultivares não foi afetado, independente do vigor, mesmo para os tempos mais longos de ultrassom (Figura 2), porém, houve uma tendência no aumento do comprimento do hipocótilo e redução da raiz primária das plântulas da classe de baixo vigor do cultivar M5838 IPRO (Figura 2 D). Curiosamente, antes do ultrassom (0 min), as plântulas do cultivar M5838 IPRO (Figura 2 C, D) apresentavam crescimento mais expressivo comparadas às do cultivar 57H0123 TP IPRO (Figura 2 A,B). Devido as respostas observadas em ambos os cultivares, o tempo de 30 minutos de ultrassom foi padronizado para os testes subsequentes.

Após a identificação da melhor combinação de excitação/emissão para captura dos sinais de autofluorescência das sementes (365/400 nm) e do tempo de ultrassom (30 minutos), foi feita a análise microscópica de fluorescência azul da região de transição tegumento-cotilédone, antes e após ultrassom, para verificação da origem dos sinais de fluorescência azul em sementes de alto e baixo vigor (Figura 3). As sementes do cultivar 57H0123 TP IPRO após 15, 30, 45 minutos apresentaram maior fluorescência azul (pixels azuis), independente do vigor (Figura 3 A, C). Na análise microscópica de fluorescência azul (Figura 3 B, D), constatou-se que os maiores sinais de fluorescência que haviam sido detectados nas imagens (Figura 3 A, C) eram predominantemente de células cotiledonares das sementes, com menor influência do tegumento.

As imagens de fluorescência azul de sementes de alto (Figura 3 E) e baixo vigor (Figura 3 G) do cultivar M5838 IPRO não revelaram diferenças nos padrões de fluorescência

das sementes antes e após ultrassom, todavia, verificou-se nas imagens de microscopia que, após o ultrassom, também havia maiores sinais de fluorescência na região das células cotiledonares em sementes de alto (Figura 3 F) e baixo vigor (Figura 3 H).

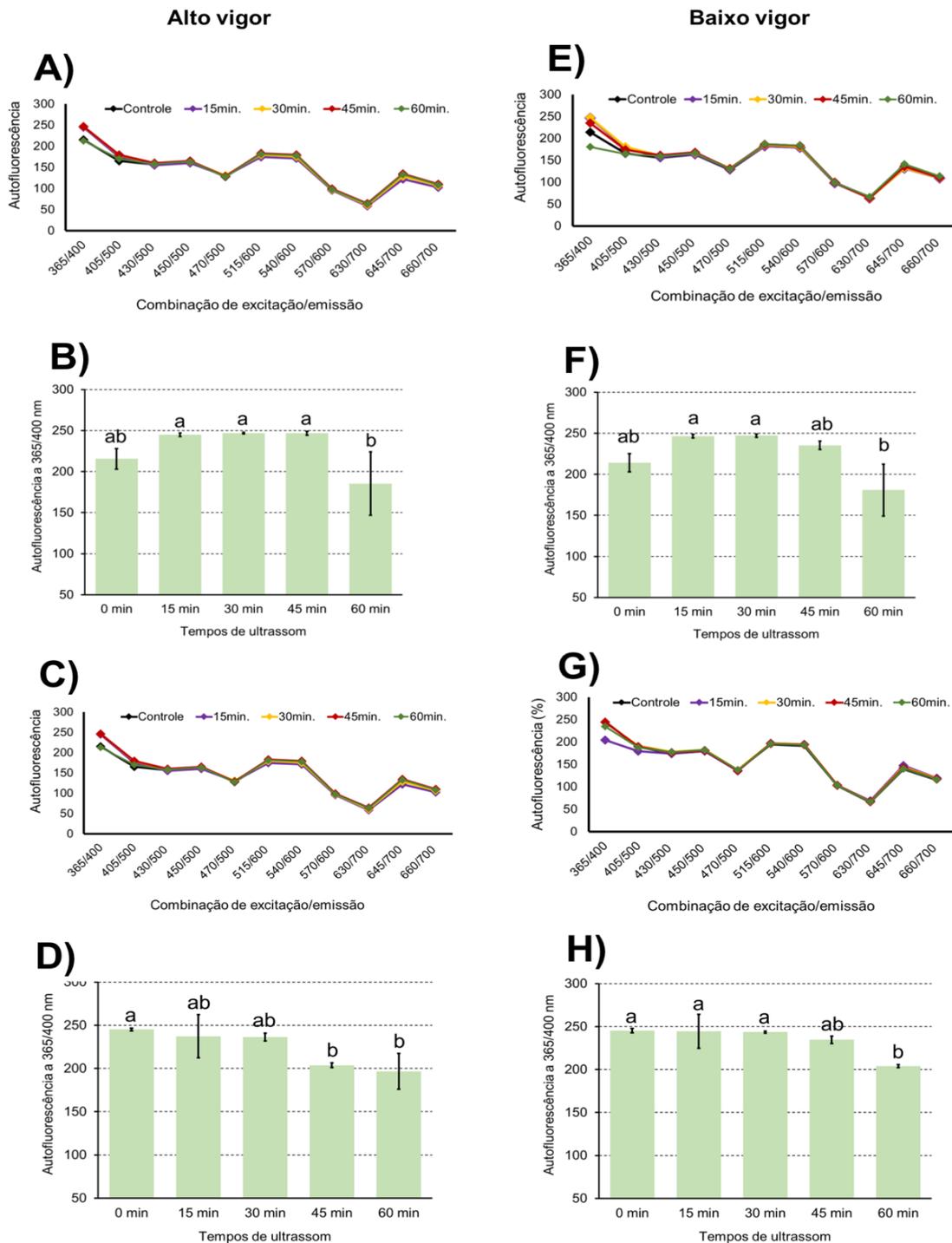


Figura 1 – Assinatura espectral de autofluorescência em diferentes combinações de excitação/emissão (365/400 a 660/700 nm) em sementes de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO (A, E) e M5838 IPRO (C, G) para classes de alto e baixo vigor sob efeito de diferentes tempos de ondas ultrassônicas (0, 15, 30, 45 e 60 minutos), e médias de autofluorescência espectral na combinação de excitação/emissão de 365/400 nm em sementes de alto e baixo vigor dos cultivares 57H0123 TP IPRO (B, F) e M5838 IPRO (D, H). Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n=200$  sementes).

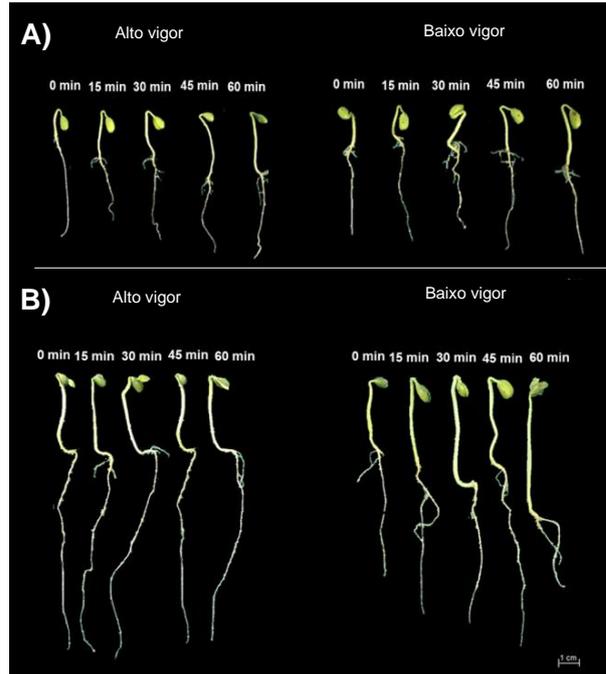


Figura 2 – Plântulas de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO (A) e M5838 IPRO (B) aos oito dias de idade, originadas de sementes de alto e baixo vigor submetidas a diferentes tempos de sonicação: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

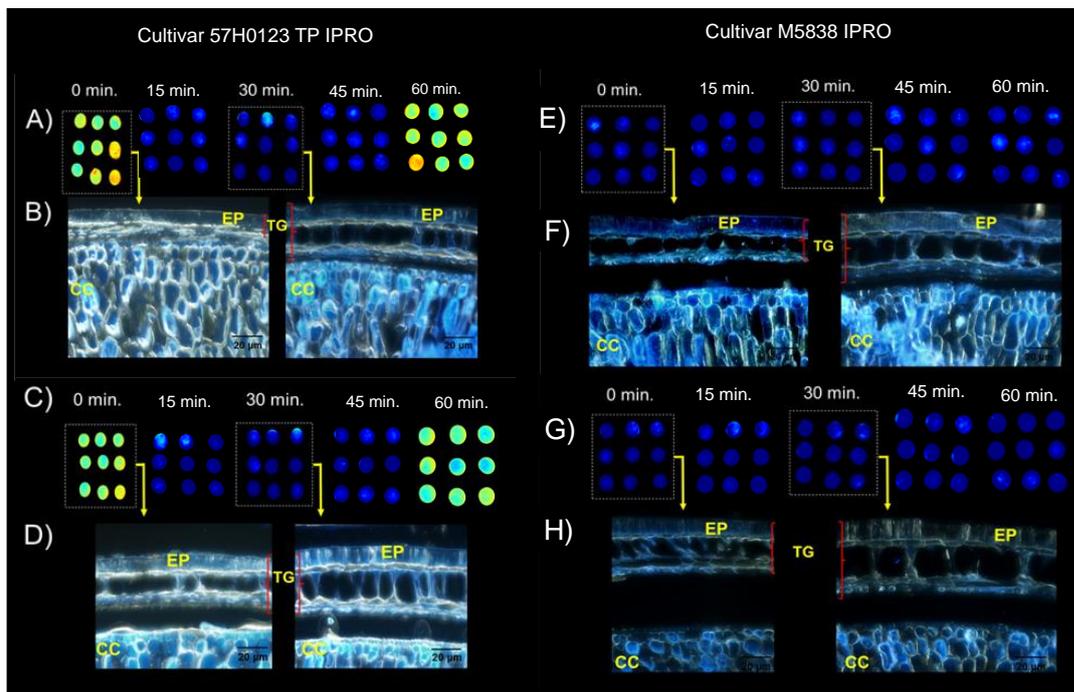


Figura 3 – Imagens multiespectrais de fluorescência azul de sementes de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO capturadas na combinação de excitação/emissão de 365/400 nm após diferentes tempos de ultrassom (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) para classes de sementes de alto (A, E) e baixo vigor (C, G), e imagens de microscopia de fluorescência azul (excitação de 330-385 nm) de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO, antes (0 min) e após o ultrassom (30 minutos). Nas imagens multiespectrais de fluorescência azul, cada pixel é representado por um único valor que corresponde à intensidade de fluorescência, sendo que pixels vermelhos e azuis representam as menores e maiores intensidades de fluorescência, respectivamente, enquanto que os pixels de cores amarelo-verde representam intensidade de fluorescência intermediária. TG = Tegumento; EP = epiderme; CC = células cotiledonares.

Ainda com relação às imagens de microscopia de fluorescência azul (Figura 4), foi possível observar um leve afrouxamento entre as regiões da epiderme – hipoderme – células parenquimatosas das sementes após o ultrassom de ambos os cultivares. Nas sementes de baixo vigor de ambos os cultivares esse afrouxamento foi ainda mais pronunciado conforme constatado pelo maior espaço intracelular na região das células do parênquima.

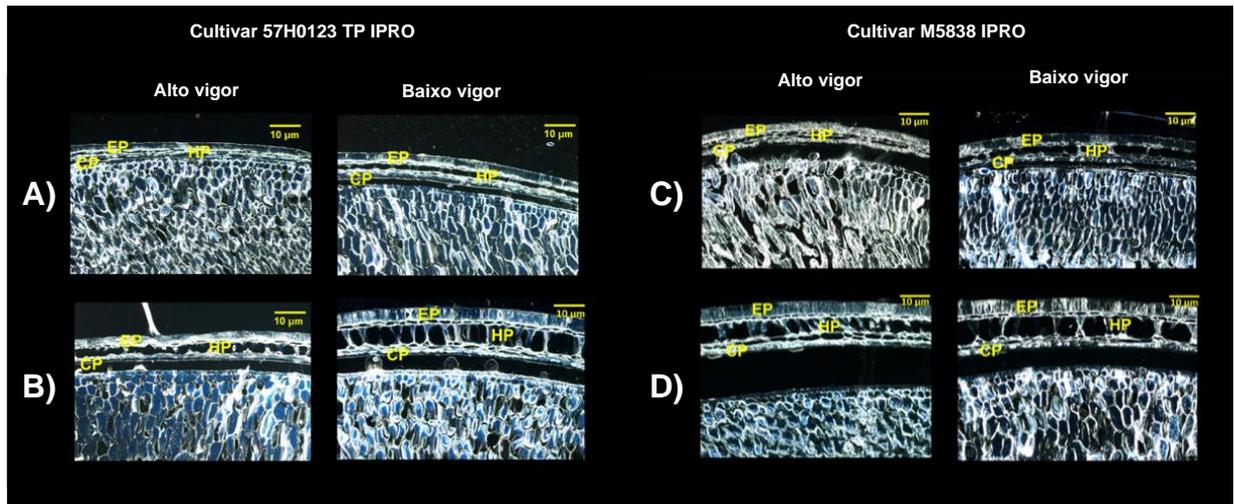


Figura 4 – Imagens de microscopia de fluorescência azul (excitação de 330-385 nm) de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO, antes (A, C) e após (B, D) ultrassom por 30 minutos, para classes de alto e baixo vigor. EP = epiderme; HP = hipoderme; CP = células parenquimatosas.

No que se refere ao conteúdo de proteínas do tegumento e das células cotiledonares, foi possível observar que as sementes de alto e baixo vigor do cultivar 57H0123 TP IPRO apresentaram incremento no conteúdo de proteínas após o ultrassom (Figura 5 B). Já nas sementes do cultivar M5838 IPRO, isso aconteceu somente para a classe de sementes de alto vigor (Figura 5 D).

Na avaliação da curva de hidratação (Figura 6), as sementes de alto vigor do cultivar 57H0123 TP, tratadas previamente com ultrassom, apresentaram maior teor de água após o pré-condicionamento e após todos os períodos testados (Figura 6 A). Além disso, apesar das sementes de baixo vigor pré-condicionadas deste cultivar terem apresentado teor de água similar, independente do emprego do ultrassom, a velocidade de absorção de água pelas sementes submetidas ao ultrassom foi maior com o avanço do período de embebição, exceto para os tempos de 4 e 6 h (Figura 6 B). Em sementes de alto vigor do cultivar M5838 IPRO, foi observado comportamento similar, exceto para o tempo de 6 h (Figura 6 C), todavia, nenhuma diferença foi observada nas sementes de baixo vigor (Figura 6 D).

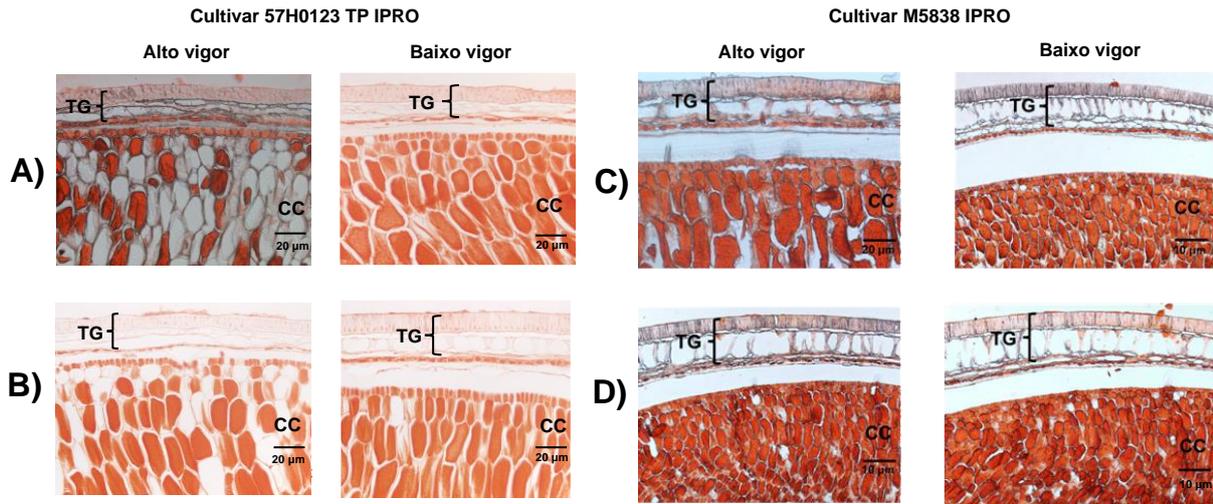


Figura 5 – Imagens de microscopia de cortes do tegumento e do cotilédone de semente de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO, antes (A, C) e após ultrassom por 30 min (B, D), para classes de sementes de alto e baixo vigor. As imagens de microscopia foram obtidas empregando o corante Xylidine Ponceau (XP) que revela o conteúdo de proteínas do tegumento e das células cotiledonares. TG = Tegumento; CC = células cotiledonares.

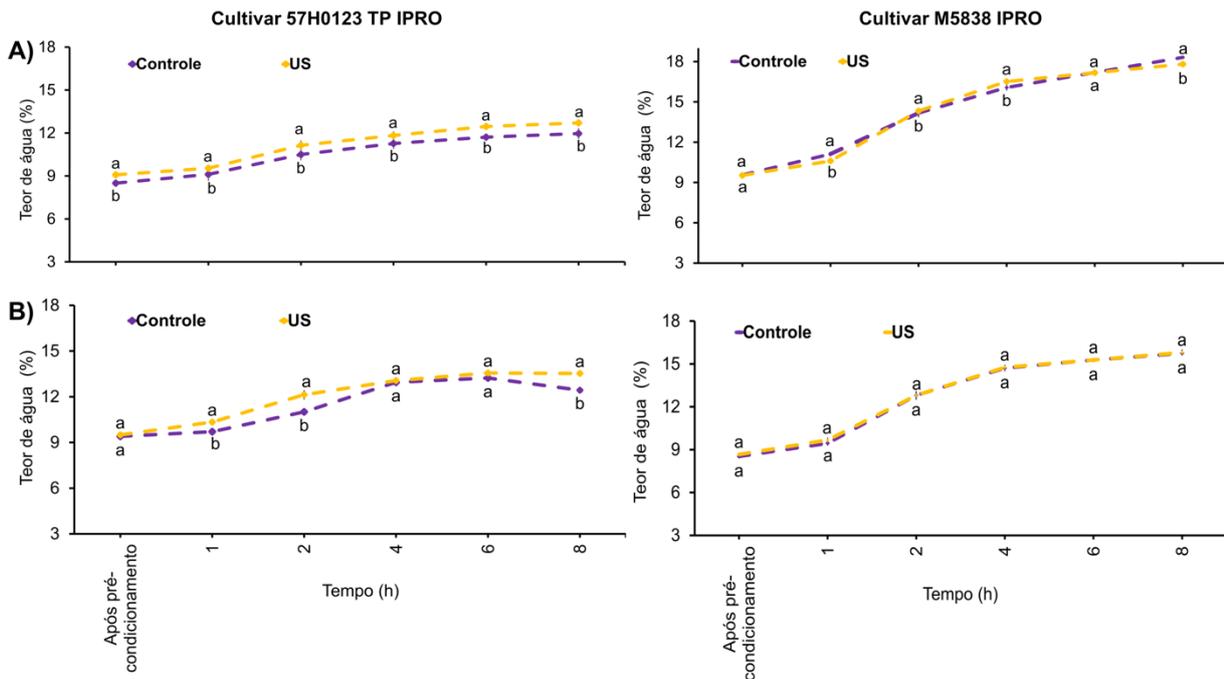


Figura 6 - Curva de hidratação de sementes de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO para classes de alto (A, C) e baixo vigor (B, D), após pré-condicionamento por 16 horas + hidratação por 1, 2, 4, 6 e 8 horas, antes (controle) e após ultrassom por 30 minutos (US). ( $n= 10$  sementes)

Quando foi feito o tratamento das sementes com os micronutrientes Zn, Mn e CoMo em associação com ultrassom, utilizando sementes de alto vigor do cultivar 57H0123 TP IPRO, verificou-se que as raízes primárias com maiores valores de área eram provenientes de sementes tratadas apenas com CoMo ou ultrassom + Zn (Figura 7 A), enquanto que para os parâmetros

comprimento (Figura 7 B) e largura (Figura 7 C) se destacou a combinação de ultrassom + Zn. Quando os tratamentos foram empregados em sementes de baixo vigor do cultivar 57H0123 TP IPRO, o efeito não foi efetivo, independente do parâmetro analisado (Figura 7 D,F). Em relação à reposta do cultivar M5838 IPRO, para as sementes de alto vigor, apenas o tratamento de ultrassom + Zn se destacou para a área (Figura 7 G) e comprimento (Figura 7 H) da raiz primária, porém o tratamento contendo apenas Zn foi mais efetivo para o parâmetro largura (Figura 7 I). Similarmente ao cultivar 57H0123 TP IPRO, não se verificou efeito efetivo dos tratamentos em sementes de baixo vigor (Figura 7 J, K, L).

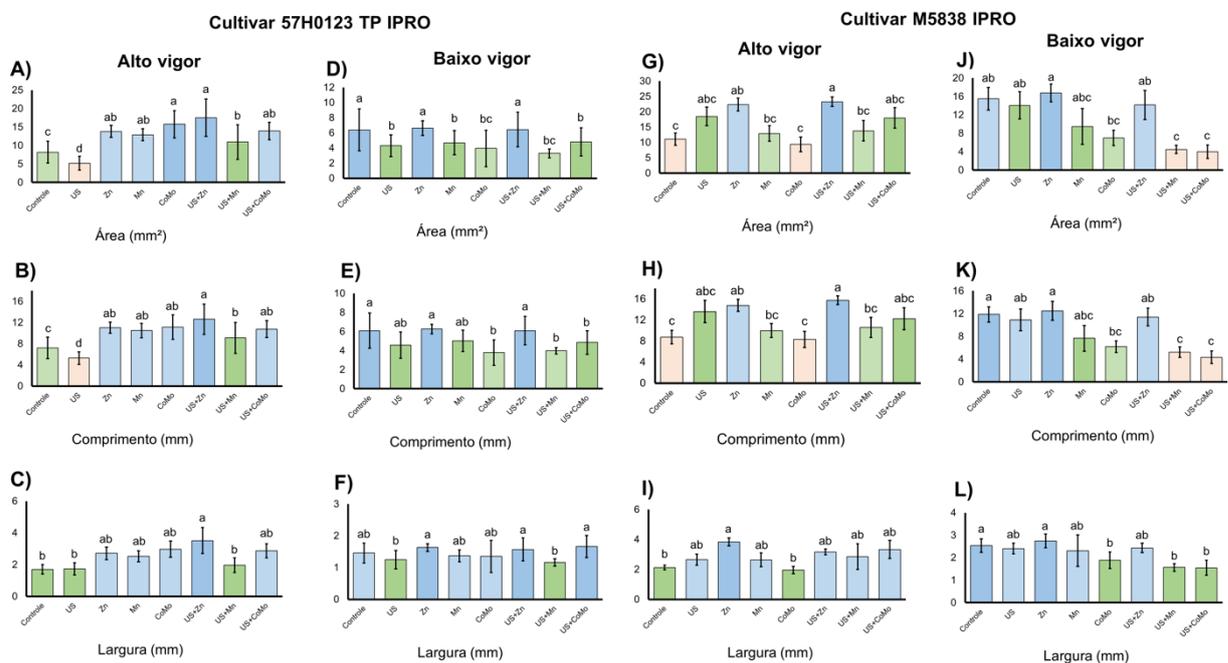


Figura 7 – Área, comprimento e largura de raízes primárias de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO (A-F) e M5838 IPRO (G-L), após 48 h de semeadura de sementes de alto (A-C e G-I) e baixo vigor (D-F, J-L) não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (US+Mn) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo). Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n=50$  sementes).

Para a fluorescência de clorofila dos cotilédones (Figura 8) do cultivar 57H0123 TP IPRO, utilizando sementes de alto vigor (Figura 8 A), verificou-se maior fluorescência nos cotilédones provenientes de sementes tratadas com ultrassom + Zn, indicando, portanto, um maior incremento na síntese de clorofilas para este tratamento. Menor sinal de fluorescência de clorofila foi verificado nos cotilédones sem tratamento (controle) ou tratando apenas com ultrassom (Figura 8 A). Em sementes de baixo vigor deste cultivar (Figura 8 B), destacou-se o tratamento utilizando apenas Zn. Em relação ao cultivar M5838IPRO, para a classe de alto vigor (Figura 8 C), destacaram-se os tratamentos de ultrassom + Mn e o uso de apenas Zn, e

novamente, pior resposta foi verificada para as sementes do controle. Em sementes de baixo vigor (Figuras 8 D), não houve efeito expressivo dos tratamentos com os micronutrientes isolados, ou associado com ultrassom.

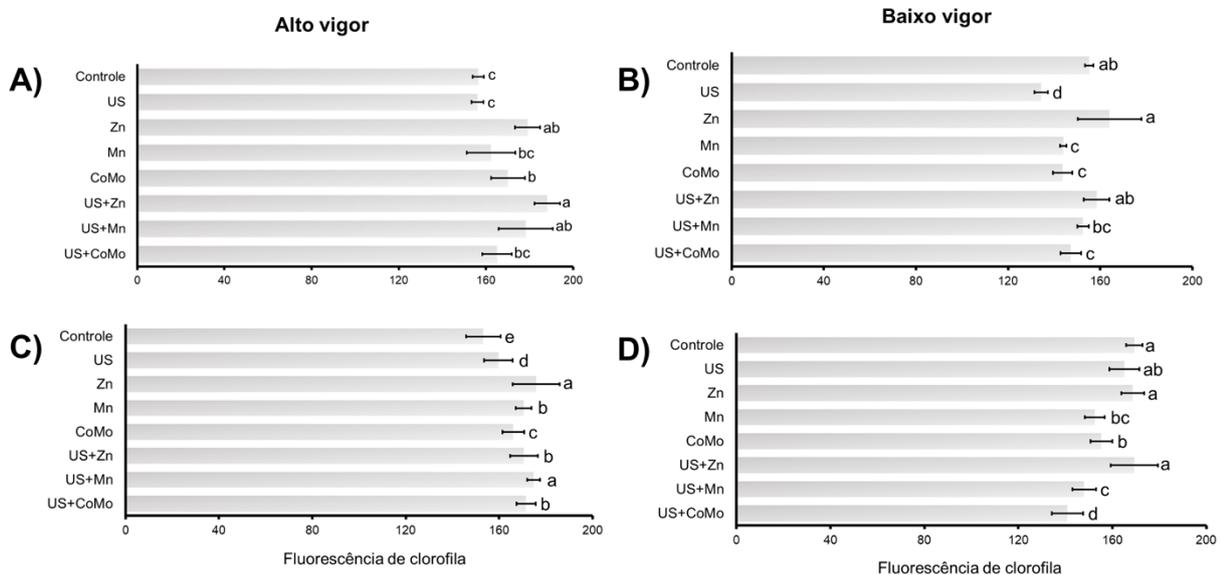


Figura 8 – Fluorescência de clorofila de cotilédones de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO (A, B) e M5838 IPRO (C, D), após 48 h da semeadura de sementes de alto e baixo vigor, não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (Mn+US) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo) ( $n=50$  sementes).

Os valores de pixel das imagens de fluorescência de clorofila dos cotilédones foram calculados pelo algoritmo de transformação nCDA, técnica que possibilita a eliminação da influência de *outliers* que podem interferir na média, permitindo assim a obtenção de imagens realísticas. A partir do mapeamento das imagens pixel a pixel, utilizando códigos de cores que variam do vermelho (0) ao azul (256), a intensidade de fluorescência de clorofila foi calculada em cada parte do tecido cotiledonar, após 48 h da semeadura das sementes (Figura 9).

Houve efeito marcante dos diferentes tratamentos com micronutrientes no aumento dos valores de pixels dos cotilédones da classe de alto vigor, para ambos os cultivares, particularmente quando foi adotado o tratamento de ultrassom + Zn no cultivar 57H0123 TP IPRO, e os tratamentos usando apenas Zn ou ultrassom + Mn no cultivar M5838 IPRO, o que não aconteceu com cotilédones de baixo vigor, os quais já apresentavam valores de fluorescência iniciais elevados antes dos tratamentos (Figura 9 A, B). Adicionalmente, na classe de sementes de baixo vigor do cultivar M5838 IPRO, houve decréscimo acentuado na fluorescência de cotilédones provenientes de sementes tratadas com ultrassom + CoMo (Figura 9 B).

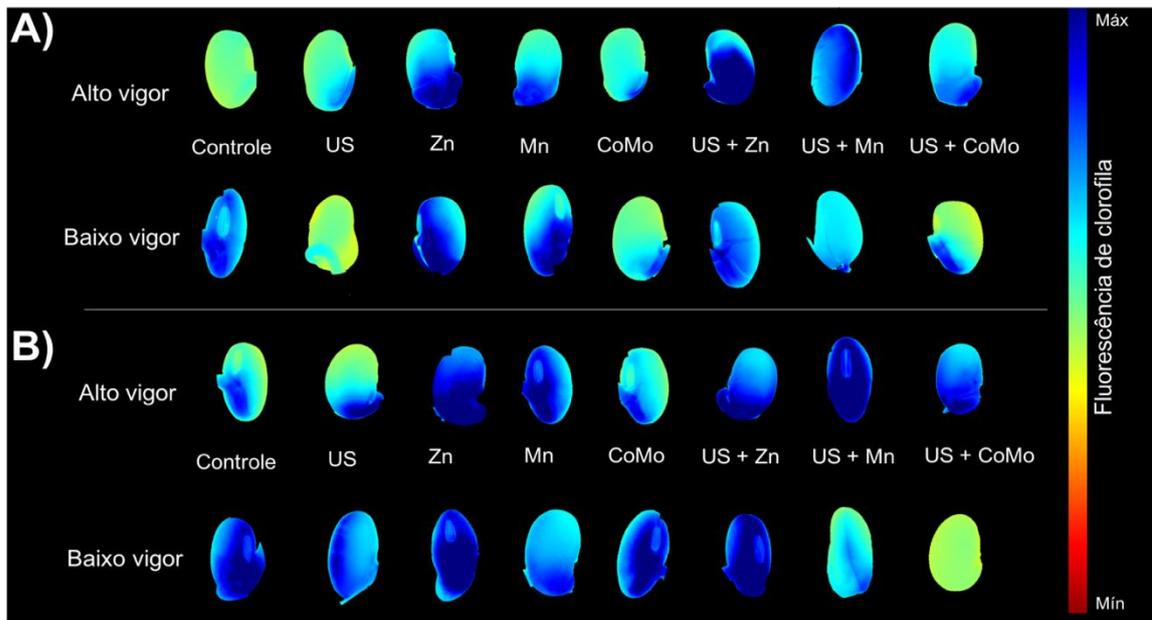


Figura 9 – Imagens de fluorescência de clorofila de um cotilédone representativo de soja do cultivares 57H0123 TP IPRO (A) e M5838 IPRO (B), após 48 h da semeadura de sementes de alto vigor e baixo vigor, não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (Mn+US) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo).

Em geral, os testes convencionais de germinação e vigor apresentaram menor sensibilidade na detecção de diferenças entre os tratamentos (Tabelas 3 e 4). No caso de sementes da classe de alto vigor do cultivar 57H0123 TP IPRO (Tabela 3), apenas a germinação no 5º dia e o parâmetro comprimento de plântulas conseguiram separar os tratamentos, tendo havido redução na germinação das sementes tratadas com Zn, CoMo e ultrassom + CoMo, e redução no comprimento de plântulas originadas de sementes tratadas com ultrassom + Zn e ultrassom + CoMo; é importante destacar que o tratamento de US + Mn se manteve em todos testes. Na classe de sementes de baixo vigor deste cultivar (Tabela 3), os tratamentos de CoMo e ultrassom + CoMo promoveram redução na germinação aos cinco dias. Por outro lado, no 8º dia, a menor germinação do tratamento de CoMo foi superada, mas continuou inferior nas sementes tratadas com ultrassom + CoMo, além de ter havido menor germinação nas sementes após tratamento apenas com ultrassom. Apesar disto, o comprimento de plântulas foi mantido após o emprego apenas de ultrassom, bem como usando Mn ou CoMo isolados. Em sementes do cultivar M5838 IPRO (Tabela 4) da classe de alto vigor, nenhum teste fisiológico indicou diferença significativa entre os tratamentos. Já na classe de baixo vigor, a germinação aos cinco dias reduziu novamente no tratamento de ultrassom + CoMo. O comprimento das plântulas também foi reduzido, com decréscimo semelhante nos tratamentos de ultrassom + Zn e usando somente CoMo; novamente, o tratamento de US + Mn se manteve em todos testes.

Tabela 3 – Testes de germinação e vigor para avaliação de classes de sementes de soja (cultivar 57H0123 TP IPRO) categorizadas como alto e baixo vigor sem tratamento (controle), após tratamento apenas com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn) cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (US+Mn) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo). Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Germ.= germinação; EA = envelhecimento acelerado; EASS; envelhecimento acelerado com solução saturada de sal; EP = emergência de plântulas; IVE = índice de velocidade de emergência; CP = comprimento de plântulas determinado pelo *software* SeedReporter®.

Vigor	Tratamento	Germ. 5 dias (%)	Germ. 8 dias (%)	EA (%)	EASS (%)	EP (%)	IVE	CP (cm)
Alto	Controle	98 $\pm$ 1,03 a	98 $\pm$ 1,10 a	87 $\pm$ 3,05 a	89 $\pm$ 3,82 a	90 $\pm$ 2,49 a	11,0 $\pm$ 0,43 a	31,0 $\pm$ 0,71 a
	US	96 $\pm$ 0,76 a	95 $\pm$ 1,18 a	82 $\pm$ 3,20 a	85 $\pm$ 3,76 a	84 $\pm$ 2,78 a	11,0 $\pm$ 0,20 a	29,0 $\pm$ 1,02 a
	Zn	83 $\pm$ 0,45 b	95 $\pm$ 1,03 a	82 $\pm$ 2,34 a	85 $\pm$ 3,05 a	87 $\pm$ 2,87 a	10,0 $\pm$ 0,12 a	24,0 $\pm$ 0,96 ab
	Mn	95 $\pm$ 1,10 a	98 $\pm$ 0,87 a	83 $\pm$ 2,06 a	86 $\pm$ 2,12 a	85 $\pm$ 2,15 a	10,0 $\pm$ 0,78 a	27,0 $\pm$ 1,78 ab
	CoMo	76 $\pm$ 1,14 c	95 $\pm$ 0,94 ab	80 $\pm$ 1,69 a	85 $\pm$ 3,45 a	81 $\pm$ 1,96 a	10,0 $\pm$ 1,12 a	24,0 $\pm$ 0,88 ab
	US+Zn	95 $\pm$ 1,02 a	98 $\pm$ 0,90 a	81 $\pm$ 1,87 a	85 $\pm$ 3,16 a	77 $\pm$ 1,93 a	10,0 $\pm$ 0,98 a	20,0 $\pm$ 1,09 b
	US+Mn	96 $\pm$ 0,67 a	98 $\pm$ 1,13 a	82 $\pm$ 2,89 a	87 $\pm$ 2,77 a	85 $\pm$ 1,85 a	10,0 $\pm$ 1,09 a	29,0 $\pm$ 1,17 a
	US+CoMo	84 $\pm$ 0,54 b	95 $\pm$ 1,12 ab	79 $\pm$ 3,17 ab	86 $\pm$ 3,56 a	85 $\pm$ 2,51 a	10,0 $\pm$ 1,13 a	20,0 $\pm$ 0,98 b
<b>ANOVA</b>	F <sub>4,68</sub> =7,34; p=0,00*; C.V.=9,68	F <sub>4,68</sub> =5,46; p=0,02*; C.V.=4,13	F <sub>4,68</sub> =5,35; p=0,02*; C.V.=9,96	F <sub>4,68</sub> =0,11; p=0,22 <sup>ns</sup> ; C.V.=6,28	F <sub>4,68</sub> =1,70; p=0,15 <sup>ns</sup> ; C.V.=7,02	F <sub>4,68</sub> =1,16; p=0,18 <sup>ns</sup> ; C.V.=8,60	F <sub>4,68</sub> =6,93; p=0,00*; C.V.=12,74	
Baixo	Controle	89 $\pm$ 1,80 a	92 $\pm$ 0,94 a	67 $\pm$ 4,0 a	78 $\pm$ 4,30 a	76 $\pm$ 4,15 a	10,0 $\pm$ 0,30 a	21,0 $\pm$ 2,03 a
	US	82 $\pm$ 2,01 ab	83 $\pm$ 1,97 b	62 $\pm$ 3,03 a	73 $\pm$ 2,79 a	63 $\pm$ 3,81 a	10,0 $\pm$ 1,23 a	21,0 $\pm$ 2,09 ab
	Zn	88 $\pm$ 1,56 a	88 $\pm$ 1,23 a	62 $\pm$ 2,44 a	72 $\pm$ 3,89 a	56 $\pm$ 4,11 a	9,0 $\pm$ 1,16 a	11,0 $\pm$ 3,78 cd
	Mn	84 $\pm$ 0,89 a	89 $\pm$ 0,85 a	63 $\pm$ 2,35 a	72 $\pm$ 4,12 a	67 $\pm$ 3,98 a	9,0 $\pm$ 0,78 a	18,0 $\pm$ 2,06 abc
	CoMo	76 $\pm$ 0,21 b	89 $\pm$ 0,13 a	61 $\pm$ 0,18 a	71 $\pm$ 0,22 a	61 $\pm$ 0,10 a	9,0 $\pm$ 0,37 a	15,0 $\pm$ 0,29 abcd
	US+Zn	87 $\pm$ 0,16 a	88 $\pm$ 0,061 a	62 $\pm$ 0,067 a	73 $\pm$ 0,20 a	60 $\pm$ 0,27 a	9,0 $\pm$ 0,070 a	13,0 $\pm$ 1,91 bcd
	US+Mn	85 $\pm$ 0,085 a	89 $\pm$ 0,45 a	64 $\pm$ 0,18 a	74 $\pm$ 0,37 a	66 $\pm$ 0,43 a	9,0 $\pm$ 0,11 a	9,0 $\pm$ 1,76 cd
	US+CoMo	54 $\pm$ 0,15 c	79 $\pm$ 0,078 b	65 $\pm$ 1,18 a	74 $\pm$ 0,70 a	59 $\pm$ 0,65 a	9,0 $\pm$ 0,076 a	8,0 $\pm$ 3,14 d
<b>ANOVA</b>	F <sub>4,68</sub> =10,02; p=0,00*; C.V.=5,76	F <sub>4,68</sub> =8,78; p=0,00*; C.V.=3,22	F <sub>4,68</sub> =0,10; p=0,16 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,32	F <sub>4,68</sub> =0,07; p=0,17 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,21	F <sub>4,68</sub> =1,90; p=0,11 <sup>ns</sup> ; C.V.=13,86	F <sub>4,68</sub> =1,15; p=0,18 <sup>ns</sup> ; C.V.=6,54	F <sub>4,68</sub> =8,39; p=0,00*; C.V.=24,06	

\* significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Testes de germinação e vigor para avaliação de classes de sementes de soja (cultivar M5838 IPRO) categorizadas como alto e baixo vigor sem tratamento (controle), após tratamento apenas com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn) cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (US+Mn) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo). Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Germ.= germinação; EA = envelhecimento acelerado; EASS; envelhecimento acelerado com solução saturada de sal; EP = emergência de plântulas; IVE = índice de velocidade de emergência; CP = comprimento de plântulas determinado pelo *software* SeedReporter®.

Vigor	Tratamento	Germ. 5 dias (%)	Germ. 8 dias (%)	EA (%)	EASS (%)	EP (%)	IVE	CP (cm)
Alto	Controle	98 $\pm$ 0,94 a	98 $\pm$ 0,96 a	83 $\pm$ 2,75 a	87 $\pm$ 3,05 a	95 $\pm$ 1,15 a	13,0 $\pm$ 0,22 a	32,0 $\pm$ 1,46 a
	US	97 $\pm$ 0,087 a	98 $\pm$ 0,061 a	82 $\pm$ 0,14 a	85 $\pm$ 0,19 a	96 $\pm$ 0,11 a	13,0 $\pm$ 0,76 a	32,0 $\pm$ 1,13 a
	Zn	96 $\pm$ 0,054 a	98 $\pm$ 0,088 a	83 $\pm$ 0,98 a	85 $\pm$ 1,01 a	96 $\pm$ 1,23 a	13,0 $\pm$ 0,86 a	28,0 $\pm$ 1,87 ab
	Mn	96 $\pm$ 0,54 a	98 $\pm$ 0,67 a	83 $\pm$ 0,78 a	84 $\pm$ 0,98 a	97 $\pm$ 0,096 a	12,0 $\pm$ 0,075 a	28,0 $\pm$ 1,09 ab
	CoMo	93 $\pm$ 0,097 ab	97 $\pm$ 0,76 a	80 $\pm$ 0,043 a	83 $\pm$ 0,66 a	94 $\pm$ 0,22 a	13,0 $\pm$ 0,98 a	23,0 $\pm$ 1,15 ab
	US+Zn	97 $\pm$ 0,10 a	98 $\pm$ 0,08 a	81 $\pm$ 0,45 a	86 $\pm$ 0,18 a	93 $\pm$ 0,42 a	13,0 $\pm$ 0,35 a	26,0 $\pm$ 1,17 ab
	US+Mn	98 $\pm$ 0,23 a	99 $\pm$ 0,19 a	84 $\pm$ 0,38 a	88 $\pm$ 0,08 a	93 $\pm$ 0,18 a	13,0 $\pm$ 0,42 a	31,0 $\pm$ 1,35 a
	US+CoMo	92 $\pm$ 0,37 ab	98 $\pm$ 0,29 a	79 $\pm$ 0,23 a	82 $\pm$ 0,19 ab	94 $\pm$ 0,38 a	12,0 $\pm$ 0,22 a	25,0 $\pm$ 1,24 ab
<b>ANOVA</b>		F <sub>4,68</sub> =6,23; p=0,02*; C.V.=3,01	F <sub>4,68</sub> =0,08; p=0,19 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,89	F <sub>4,68</sub> =1,20; p=0,17 <sup>ns</sup> ; C.V.=3,03	F <sub>4,68</sub> = 1,07; p=0,15 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,42	F <sub>4,68</sub> =0,06; p=0,20 <sup>ns</sup> ; C.V.=3,45	F <sub>4,68</sub> =0,03; p=0,30 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,54	F <sub>4,68</sub> =6,39; p=0,03*; C.V.=13,62
Baixo	Controle	89 $\pm$ 3,04 a	90 $\pm$ 3,70 a	64 $\pm$ 5,76 a	75 $\pm$ 3,45 a	83 $\pm$ 5,52 a	11,0 $\pm$ 0,78 a	21,0 $\pm$ 4,26 a
	US	88 $\pm$ 1,23 a	89 $\pm$ 1,67 a	64 $\pm$ 1,54 a	73 $\pm$ 1,76 a	83 $\pm$ 1,12 a	11,0 $\pm$ 2,24 a	22,0 $\pm$ 2,76 a
	Zn	86 $\pm$ 0,89 a	88 $\pm$ 1,12 a	62 $\pm$ 3,01 a	74 $\pm$ 2,02 a	83 $\pm$ 3,16 a	10,0 $\pm$ 1,13 a	21,0 $\pm$ 3,21 a
	Mn	87 $\pm$ 1,45 a	90 $\pm$ 2,20 a	64 $\pm$ 2,78 a	74 $\pm$ 2,21 a	83 $\pm$ 4,01 a	10,0 $\pm$ 1,24 a	19,0 $\pm$ 3,17 ab
	CoMo	79 $\pm$ 2,01 ab	91 $\pm$ 1,65 a	63 $\pm$ 1,67 a	74 $\pm$ 2,03 a	83 $\pm$ 4,16 a	10,0 $\pm$ 2,19 a	13,0 $\pm$ 2,97 b
	US+Zn	90 $\pm$ 0,076 a	88 $\pm$ 1,04 a	62 $\pm$ 2,10 a	75 $\pm$ 2,11 a	83 $\pm$ 3,92 a	10,0 $\pm$ 2,25 a	10,0 $\pm$ 4,03 b
	US+Mn	91 $\pm$ 0,98 a	90 $\pm$ 2,13 a	64 $\pm$ 1,21 a	75 $\pm$ 1,41 a	83 $\pm$ 3,44 a	10,0 $\pm$ 1,07 a	20,0 $\pm$ 3,88 ab
	US+CoMo	71 $\pm$ 0,088 b	89 $\pm$ 1,91 a	63 $\pm$ 2,82 a	75 $\pm$ 1,35 a	83 $\pm$ 4,05 a	10,0 $\pm$ 2,00 a	13,0 $\pm$ 3,00 b
<b>ANOVA</b>		F <sub>4,68</sub> =6,21; p=0,02*; C.V.=4,88	F <sub>4,68</sub> =0,89; p=0,12 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,12	F <sub>4,68</sub> =0,75; p=0,14 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,20	F <sub>4,68</sub> =0,80; p=0,16 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,17	F <sub>4,68</sub> =1,07; p=0,12 <sup>ns</sup> ; C.V.=3,67	F <sub>4,68</sub> =0,47; p=0,52 <sup>ns</sup> ; C.V.=2,15	F <sub>4,68</sub> =9,24; p=0,03*; C.V.=24,20

\* significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise da dinâmica dos pigmentos das plântulas produzidas (Figura 10), para a classe de sementes de alto vigor do cultivar 57H0123 TP IPRO, revelou que o índice de clorofila *a* (Figura 10 A) e de antocianinas (Figura 10 C) foi reduzido para a maioria dos tratamentos, exceto para o emprego de apenas ultrassom ou US + Zn. O NDVI, que se baseia na reflectância das clorofilas *a* e *b*, indicou um maior incremento nos tratamentos de ultrassom + Zn e ultrassom + Mn, embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento utilizando apenas ultrassom (Figura 10 B). Na classe de sementes de baixo vigor do cultivar 57H0123 TP IPRO, os índices de clorofila *a* (Figuras 10 D e 11 A) e de antocianinas (Figuras 10 F e 12 A) foram consideravelmente superiores nas plântulas originadas de sementes submetidas ao ultrassom + Zn, enquanto o NDVI foi semelhante para a maioria dos tratamentos (Figura 10 E).

No cultivar M5838 IPRO, na classe de sementes de alto vigor, os efeitos dos tratamentos não foram expressivos (Figura 10 G, H, I). Já na classe de sementes de baixo vigor, o tratamento de ultrassom + Zn foi significativamente superior aos demais tratamentos (Figura 10 J, K, L), em especial para o índice de clorofila *a* (Figuras 10 J e 11 B) e de antocianinas (Figuras 10 L e 12 B).

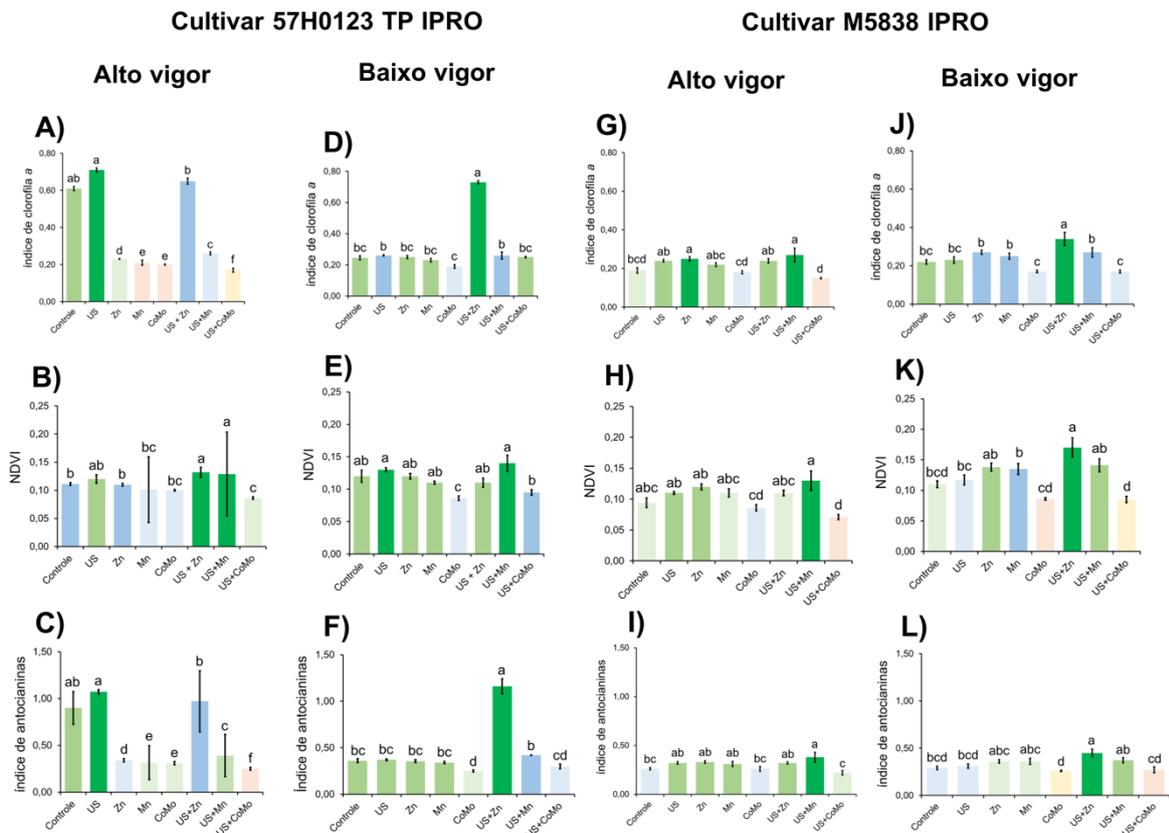


Figura 10 – Índice de clorofila *a*, índice de antocianinas e índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) de plântulas de soja do cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO aos seis dias de idade, originadas de sementes de alto e baixo vigor, não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (US+Mn) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo). Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

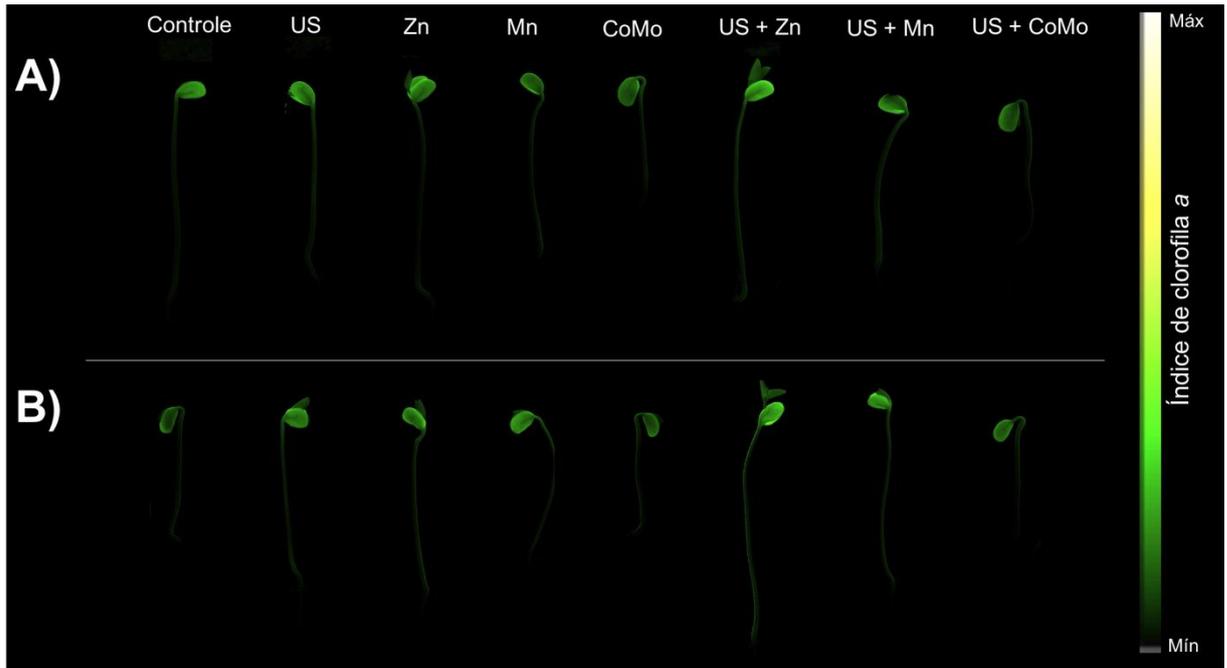


Figura 11 – Imagens de índice de clorofila *a* de uma plântula representativa de soja do cultivares 57H0123 TP IPRO (A) e M5838 IPRO (B) aos seis dias de idade provenientes de sementes de baixo vigor, não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (Mn+US) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo).

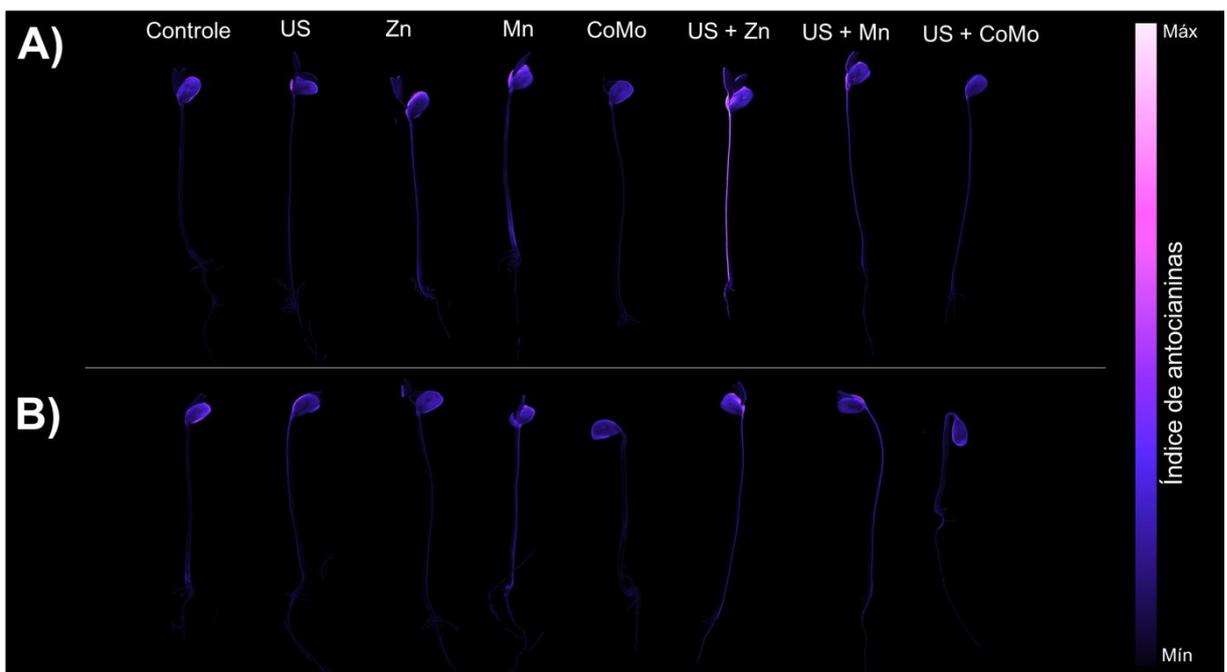


Figura 12 – Imagens de índice de antocianinas de uma plântula representativa de soja do cultivares 57H0123 TP IPRO (A) e M5838 IPRO (B) aos seis dias de idade provenientes de sementes de baixo vigor, não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (Mn+US) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo).

No que se refere aos valores de fluorescência de clorofila *a* das plântulas (Figura 13), se destacou o tratamento de ultrassom + Zn (Figura 13 C, G) e ultrassom + Mn (Figura 13 C) nas sementes de baixo vigor. No parâmetro  $F_v/F_M$  os efeitos dos tratamentos não foram tão expressivos (Figura 13). É importante destacar que dentre os micronutrientes estudados, o CoMo apresentou o menor efeito nos parâmetros de clorofila *a* e  $F_v/F_M$  nas plântulas produzidas, especialmente quando foi aplicado de forma isolada, ou seja, sem a combinação do ultrassom (Figura 13 A, E, F, H).

Portanto, em geral, o tratamento de US+Zn se destacou dentre os demais, e isso ocorreu particularmente na classe de sementes de baixo vigor de ambos os cultivares (Figuras 10 D, F, J, L e 13 C,G). Dessa forma, na etapa seguinte, utilizando a técnica de  $\mu$ -XRF, foi verificada a distribuição espacial de Zn nas classes de sementes de baixo vigor, com e sem a combinação de ultrassom, sendo determinada ainda, a concentração média de Zn nas sementes (Figuras 14 e 15), por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A fluorescência de raios X é diretamente proporcional à concentração do elemento na amostra (VAN GRIEKEN; MARKOWICZ, 1993; MONTANHA et al., 2020). A distribuição espacial do Zn foi determinada na região tegumento (oposta ao hilo) – cotilédono - hilo.

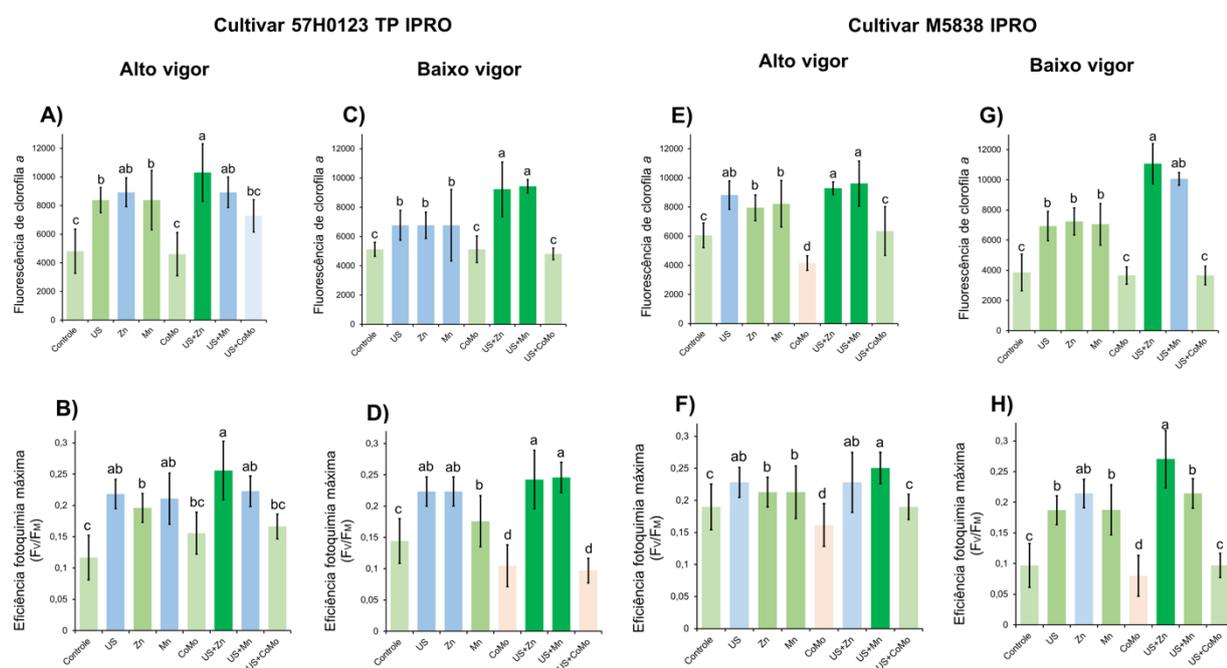


Figura 13 – Fluorescência de clorofila *a* e rendimento quântico máximo do fotossistema II com base na razão  $F_v/F_M$  de plântulas de soja dos cultivares 57H0123 TP IPRO e M5838 IPRO aos 10 dias de idade, originadas de sementes de alto e baixo vigor, não tratadas (controle), tratadas somente com ultrassom (US), zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto e molibdênio (CoMo), ultrassom + zinco (US+Zn), ultrassom + manganês (US+Mn) e ultrassom + cobalto e molibdênio (US+CoMo). Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Nas sementes do cultivar 57H0123 TP IPRO, houve maior intensidade de Zn no tegumento após o tratamento de ultrassom + Zn, podendo-se verificar ainda, aumento expressivo na região do cotilédone (Figura 13 A), apesar de não ter sido verificadas diferenças significativas na concentração total de Zn entre os tratamentos de Zn e ultrassom + Zn (Figura 13 B). No cultivar M5838 IPRO, o tratamento empregando apenas Zn, ou seja, sem ultrassom, teve maior intensidade de Zn nas regiões superficiais no tegumento, enquanto que nas regiões mais internas, maior intensidade de Zn foi verificada no tratamento de ultrassom + Zn (Figura 14 A), evidenciando, portanto, a maior eficiência de translocação entre os tecidos quando foi feita a combinação deste micronutriente com o ultrassom. Adicionalmente, as sementes tratadas com ultrassom + Zn tinham concentrações maiores de Zn comparadas às sementes tratadas apenas com Zn (Figura 15 B).

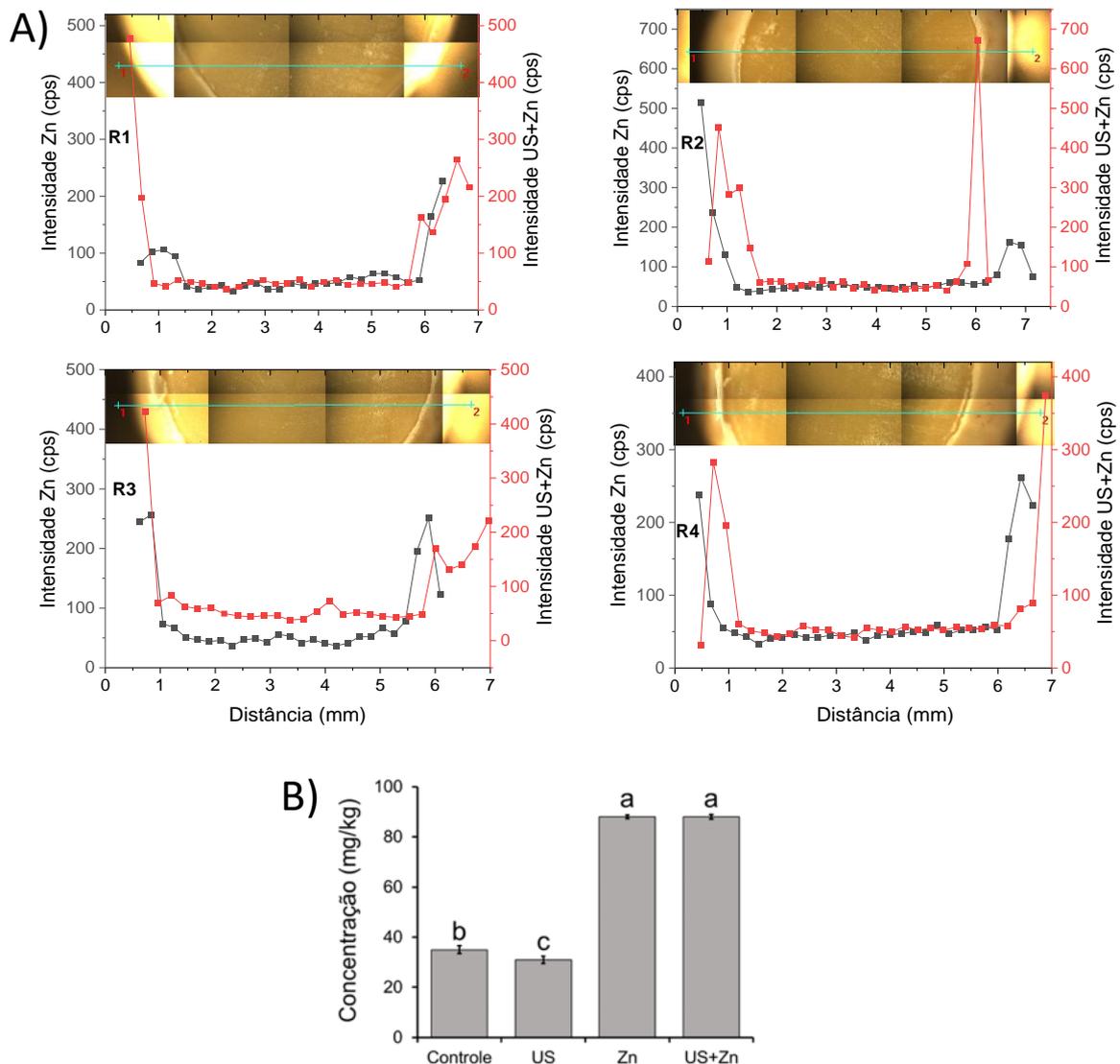


Figura 14 – (A) Intensidade de zinco (Zn) (cps – contagens por segundo) medida por microfluorescência de raios X entre as regiões do tegumento (oposta ao hilo), cotilédone e hilo de quatro sementes de soja (R1, R2, R3 e R4; cultivar 57H0123 TP IPRO) classificadas como baixo vigor, tratadas com Zn e com ultrassom + Zn (US+Zn), e (B) concentração média de Zn nas sementes.

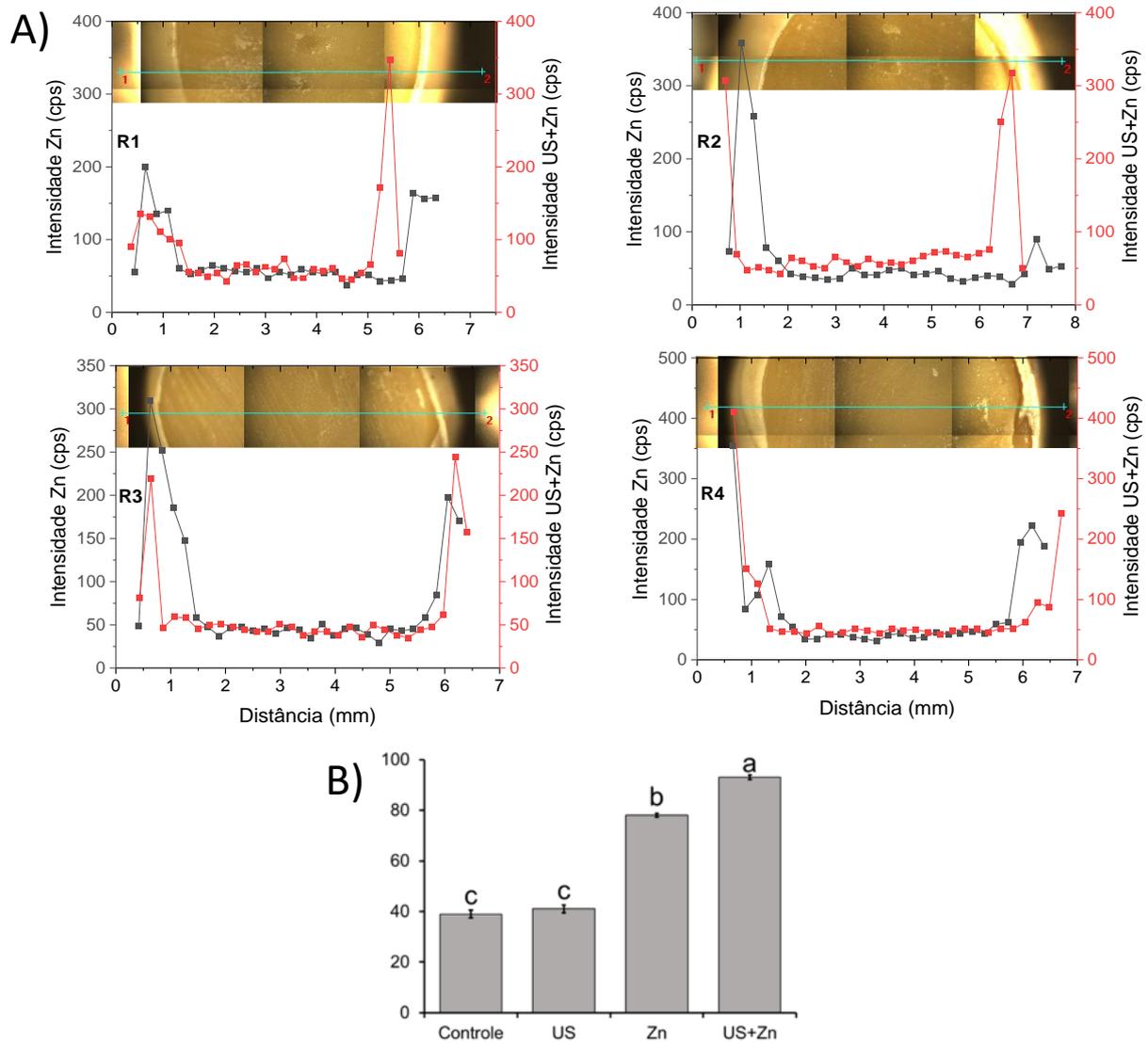


Figura 15 – (A) Intensidade de zinco (Zn) (cps – contagens por segundo) medida por microfluorescência de raios X entre as regiões do tegumento (oposta ao hilo), cotilédono e hilo de quatro sementes de soja (R1, R2, R3 e R4; cultivar M5838 IPRO) classificadas como baixo vigor, tratadas com Zn e com ultrassom + Zn (US+Zn), e (B) concentração média de Zn nas sementes.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Ondas ultrassônicas, autofluorescência espectral e velocidade de hidratação de sementes

Uma vez excitadas por meio de radiação ultravioleta/visível (UV/Vis) de comprimentos de onda específicos, moléculas fluorescentes (fluoróforos) presentes em tecidos vivos emitem fluorescência. Essa emissão conhecida por autofluorescência, é uma propriedade específica de diversas moléculas. As moléculas autofluorescentes podem ser utilizadas em estudos fisiológicos, bioquímicos ou de imagem, sendo a clorofila (fluorescência laranja/vermelho) e a lignina (fluorescência azul/verde) as mais estudadas, por apresentarem maior capacidade fluorescente (ZIMMERMANN et al., 2003).

Os mecanismos comumente envolvidos no processo de ultrassom estão associados à aplicação de frequências sonoras para interagir com os materiais, induzindo a cavitação acústica, que pode provocar a ruptura das paredes celulares e alterar a estrutura de ligninas, aumentando assim, os sinais de fluorescência (HAFRÉN, 2007), mas sem afetar a viabilidade das sementes (Figura 2). Este fato pode explicar o aumento da fluorescência azul (combinação de 356/400 nm) nos tecidos das sementes após o ultrassom (Figuras 1 e 3).

A cavitação acústica reage com as paredes celulares, causando afrouxamento e intensificando o processo de absorção de água pelas sementes, conforme constatado nas Figuras 3 e 4. Um outro efeito marcante da cavitação é a indução de calor e de reações químicas (GOUSSOUS et al., 2010). Adicionalmente, no presente trabalho, constatou-se um maior acúmulo de proteínas (alta afinidade por água) nos cotilédones após o tratamento de ultrassom (Figura 5), e este fato também pode ter contribuído para a maior velocidade de absorção de água pelas sementes (Figura 6).

A maior velocidade de hidratação das sementes após tratamentos de ultrassom também foi observada em outras culturas, como grão de bico (YILDIRIM; ÖNER; BAYRAM, 2013), *Phaseolus vulgaris* (GHAFOOR et al., 2014; ULLOA et al., 2015), sorgo (PATERO; AUGUSTO, 2015) e milho (MIANO; IBARZ; AUGUSTO, 2017). Dois mecanismos principais foram atribuídos nestes trabalhos: (i) efeitos diretos, os quais estão relacionados com o “efeito esponja” e ao fluxo inercial, que decorrem em razão do movimento de contração e expansão alternado provocado pelas ondas ultrassônicas, facilitando assim, o bombeamento do fluido; (ii) efeitos indiretos, os quais estão associados com a formação de microcanais devido à cavitação acústica que ocorre dentro e fora das células, sendo fundamentais em processos de

transferência de massa (MIANO; IBARZ; AUGUSTO, 2017). A veracidade de ambos os efeitos foi demonstrada por Miano et al. (2016) em grãos de sorgo.

Em sementes de soja, tem sido verificado que as ondas ultrassônicas provocam mudanças na estruturação e crescimento celular, estabilidade enzimática e permeabilidade de membranas celulares, favorecendo a atividade de enzimas da parede celular e o metabolismo bioquímico (YANG et al., 2015). Sendo assim, acredita-se que essas alterações, juntamente com o acúmulo de proteínas (Figura 5) e o afrouxamento entre a região da epiderme e as células parenquimatosas de sementes tratadas com ultrassom (Figura 4), poderiam ser favoráveis ao transporte de micronutrientes, uma vez que facilitam a entrada de elementos no interior das sementes, particularmente em sementes de baixo vigor, onde o afrouxamento é mais acentuado (Figura 4), provavelmente, devido à deterioração provocada pelo processo do envelhecimento artificial, que gera alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas, e esses fatores pode ter sido intensificado pelo ultrassom.

## **5.2. Ondas ultrassônicas em associação com micronutrientes e desempenho germinativo de sementes**

O estado metabólico da semente reflete sobre a uniformidade e velocidade de germinação e estabelecimento das plântulas em campo. Neste sentido, tratamentos que contribuam para acelerar reações metabólicas importantes nas sementes, em geral, possuem impactos positivos sobre o vigor das plantas produzidas (ARAÚJO et al., 2016). Foi verificado que o desenvolvimento da raiz primária durante o processo de germinação é favorecido após o tratamento das sementes com os micronutrientes Zn, Mn e CoMo, com efeitos marcantes para o micronutriente Zn em combinação com o ultrassom (Figura 7 C, G, H). O destaque para o elemento Zn em relação a parâmetros de área, comprimento e largura das raízes primárias pode estar associada à sua função na síntese do aminoácido triptofano, que age como precursor do AIA (ácido indol acético), hormônio promotor do crescimento (EPSTEIN; BLOOM, 2004), além de atuar na manutenção da integridade de membranas, atividade de enzimas, expressão de genes, síntese de proteínas, dentre outros (WELCH, 1995; MASCARENHAS et al., 2014). Em sementes de cevada, por exemplo, o tratamento com Zn potencializou a germinação e o desenvolvimento de plântulas (AJOURI et al., 2004). Em sementes de trigo, a aplicação deste micronutriente induziu o crescimento das raízes primárias (OZTURK et al., 2006).

Durante a germinação das sementes, os efeitos dos micronutrientes na fluorescência de clorofila dos cotilédones foram mais efetivos para classes de sementes de alto vigor (Figuras 8 e 9), com destaque para o Zn em combinação com ultrassom para o cultivar 57H0123 TP IPRO (Figura 8 A e 9 A). No cultivar M5838 IPRO, o efeito expressivo do Zn ocorreu independentemente do emprego de ultrassom (Figura 8 C). Em trabalhos realizados por Mohammed e PekSen (2020), o enriquecimento de sementes de trigo com Zn também aumentou o teor de clorofilas, as quais influenciam diretamente a fotoquímica do fotossistema II, que pode melhorar as funções fotossintéticas em diferentes níveis (KALAJI et al.; 2014; OSÓRIO et al., 2014).

### **5.3. Genótipo, vigor e efeito do tratamento de sementes com ultrassom e micronutrientes**

Nesta pesquisa, os efeitos dos tratamentos de sementes de soja com micronutrientes em associação com ultrassom foram dependentes genótipo e do vigor, com melhor resposta para o cultivar 57H0123 TP IPRO; o vigor teve influência dependendo do parâmetro avaliado. Tem sido relatado que as sementes de maior vigor tendem a apresentar respostas mais favoráveis a tratamentos químicos, enquanto as sementes de menor vigor respondem até certo ponto (BRZEZINSKI et al., 2017). Por exemplo, utilizando a técnica de  $\mu$ -XRF, Rohr et al. (2022) constataram que sementes de soja de alto vigor tinham maior intensidade de Zn no eixo embrionário nas primeiras 16 h, enquanto sementes de baixo vigor apresentaram maior intensidade após 24 h.

Ademais, determinados tratamentos físicos e químicos podem reduzir a qualidade fisiológica de sementes de baixo vigor. Todavia, na presente pesquisa, não foi verificada redução na germinação e vigor das sementes de soja para a maioria dos tratamentos empregados, utilizando o ultrassom ou micronutrientes isolados ou combinados, independente do vigor inicial das sementes e do genótipo estudado (Tabelas 3 e 4).

### **5.4. Imagens multiespectrais na avaliação do efeito do tratamento de ultrassom em associação com micronutrientes**

Comparando os testes convencionalmente utilizados para análise do desempenho de sementes após os tratamentos (Tabelas 3 e 4) com as análises de imagens multiespectrais (Figuras 7, 8, 9, 10 e 13), verificou-se maior sensibilidade de diagnóstico para as metodologias

de imagens utilizadas. Esta vantagem se deve ao fato desta tecnologia não destrutiva integrar a visão convencional e a técnica de espectroscopia, tornando possível a obtenção de informações espaciais e espectrais de determinado objetivo ao mesmo tempo. Diversos componentes podem ser mensurados simultaneamente por reflexão de comprimento de ondas visuais (espectro do visível) e não visuais (ultravioleta e NIR) (OLESEN et al., 2015).

Na análise multiespectral das plântulas provenientes de sementes tratadas, foi constatado que a técnica de ultrassom combinada com o aplicação de micronutrientes nas sementes foi vantajosa na maior síntese de clorofila *a* (Figura 10 D,J) e de antocianinas (Figura 10 F,L), e na fluorescência de clorofila *a* (Figura 13 C,G) da classe de sementes de baixo vigor empregando o micronutriente Zn; para a fluorescência de clorofila *a*, também se destacou a combinação de ultrassom + Mn (Figura 13 C). Quando o tratamento com micronutrientes é associado com a técnica de ultrassom, a absorção desses elementos pelas sementes pode ser influenciada pelo fenômeno da cavitação acústica, que favorece a fluidez da parede celular promovendo aceleração na cinética de transporte intercelular (MIANO; AUGUSTO, 2018). Portanto, a melhor resposta do tratamento de ultrassom + Zn para o índice de clorofila *a*, antocianinas e fluorescência de clorofila *a* pode estar associada à absorção mais eficiente do Zn pelas sementes e seu papel fundamental na manutenção da integridade de membranas e processos bioquímicos (WELCH, 1995; MASCARENHAS et al., 2014).

### **5.5. Absorção de micronutrientes em sementes avaliada por espectroscopia de microfluorescência de raios X ( $\mu$ -XRF)**

A  $\mu$ -XRF é um recurso analítico empregado em análises multielementares quantitativas e qualitativas com variadas fontes de amostras (MARGUI; VAN GRIEKEN, 2013; MONTANHA et al., 2020). Essa técnica tem se revelado vantajosa na avaliação de diversos elementos, incluindo a absorção e translocação de níquel (Ni) pelas raízes e sementes de soja (OLIVEIRA et al., 2022), no mapeamento de Mn, ferro e Zn em raízes de soja, e a distribuição de fósforo, sulfato, potássio e cálcio em sementes de soja durante a germinação (ROMEU et al., 2021). Além disso, sua eficácia foi demonstrada em sementes de soja e milho tratadas com a combinação de cobre, Zn e Mo, na qual a técnica revelou a concentração destes elementos que ficou aderida na superfície do tegumento ou pericarpo e que foi transferida para os tecidos das plântulas durante seu desenvolvimento inicial (MONTANHA et al., 2021).

Neste trabalho, apesar das sementes de soja do cultivar 57H0123 TP IPRO não terem apresentado diferenças nas concentrações de Zn entre os tratamentos de Zn e ultrassom + Zn

(Figura 14 B), em relação à localização deste micronutriente na semente, a técnica de  $\mu$ -XRF revelou que empregando o ultrassom, havia mais Zn nos cotilédones comparados com o tegumento, enquanto no tratamento sem ultrassom, havia mais Zn retido no tegumento das sementes (Figura 14 A). A camada mais externa do tegumento da semente é composta por células e cutículas altamente lignificadas e impermeáveis (BEVILACQUA; FOSSATI; DONDERO, 1987; GRAVEN et al., 1996; SOUZA; MARCOS-FILHO 2001), e elas podem agir como barreira física, dificultando a absorção do micronutriente ali depositado. Porém, o tratamento associado ao ultrassom apresentou maiores níveis de Zn, provavelmente pelo fato de o ultrassom favorecer a redução da resistência externa (MIANO; IBARZ; AUGUSTO, 2017).

O aumento de Zn nos cotilédones após o ultrassom também foi observado nas sementes do cultivar M5838 IPRO (Figura 15 A), com aumento significativo na concentração total de Zn nas sementes tratadas com ultrassom + Zn (Figura 15 B). O aumento da intensidade do Zn no interior das sementes também pode ser explicado pelo “efeito esponja” ocasionado pelas ondas ultrassônicas, devido às diferenças de pressão no interior das sementes em virtude do deslocamento das ondas acústicas (MIANO; IBARZ; AUGUSTO, 2016).

Os resultados alcançados com a presente pesquisa, portanto, fornecem uma melhor compreensão dos efeitos de tratamentos de sementes de soja com micronutrientes integrados com ultrassom a partir do emprego de sensores multiespectrais robustos, contribuindo na identificação precisa de micronutrientes potenciais que estimulam parâmetros de crescimento das plântulas. No entanto, mais estudos devem ser realizados buscando avaliar os efeitos dos tratamentos de ultrassom combinados com diferentes micronutrientes e doses em sementes com diferentes potenciais fisiológicos e genótipos.

## 6. CONCLUSÕES

- A técnica de imagem multiespectral é promissora no diagnóstico dos reais efeitos dos tratamentos de sementes de soja com zinco, manganês, cobalto + molibdênio em associação com ultrassom sobre o desenvolvimento inicial de plântulas;
- Os efeitos dos tratamentos são dependentes do genótipo e vigor das sementes, e em geral sementes de menor vigor apresentam melhor resposta aos tratamentos;
- As ondas ultrassônicas promovem excitação de compostos que possuem fluorescência azul em sementes de soja, além de provocarem afrouxamento da parede celular, acúmulo de proteínas nas células cotiledonares e maior velocidade de hidratação pelas sementes;
- O desenvolvimento inicial da raiz primária e a síntese de clorofilas nos cotilédones durante o processo de germinação é favorecido no tratamento de sementes de soja com zinco, manganês ou cobalto + molibdênio em combinação com a técnica de ultrassom, com efeitos marcantes do micronutriente zinco;
- No tratamento com zinco sem ultrassom, o zinco fica concentrado principalmente no tegumento da semente, e as ondas ultrassônicas favorecem sua absorção pelos tecidos mais internos. Como consequência, há maior síntese de clorofila *a* e antocianinas nas plântulas resultantes.

## REFERÊNCIAS

- AJOURI, A., ASGEDOM, H., BECKER, M. Seed priming enhances germination and seedling growth of barley under conditions of P and Zn deficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 167, n. 5, p. 630-636, 2004.
- ALEJANDRO, S. et al. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 300, 2020.
- AMARA, A. M.; NASR, S. A. Impact of foliar application with biofertilizers a micronutrient on the growth and yield of *Bradyrhizobium* inoculated soybean plants. **Annals of Agricultural Science**, v. 40, n. 2, p. 567-578, 1995.
- ANGLE, J. S. et al. **Role of fertilizers for climate-resilient agriculture**. Colchester, UK: IFS, 2917. 44 p. (Proceedings, 802).
- ARAÚJO, S. S. et al. Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, art. 646, 2016.
- AZEVEDO, G. A. et al. Effect of using ultrasound to break dormancy and germination of *Xylopia emarginata* mart seeds. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, e789997840, 2020.
- BABAEI-GHAGHELESTANY, A. et al. Evaluation of ultrasound technology to break seed dormancy of common lambsquarters (*Chenopodium album*). **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 2662–2669, 2020.
- BABAEVA, E. Y. et al. Sowing quality and productivity of *Echinacea purpurea* in relation to soaking the seed in manganese and zinc solutions. **News of the Timiryazev Sel'Agro Academy**, v. 4, p. 73-80, 1999.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89–113, 2008.
- BAUDET, L.; PERES, W. Recobrimento de sementes. **Seed News**, v. 8, p. 20-23, 2004.
- BEISEL, N. S. et al. Utilization of single-image normalized difference vegetation index (SI-NDVI) for early plant stress detection. **Applications in Plant Sciences**, v. 6, n. 10, e01186, 2018.
- BENEDITO, J. et al. Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. **Ultrasonics**, v. 40, p. 19–23, 2002.

BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N.; BORGHI, B. Effect of iron deficiency induced changes on photosynthetic pigments, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase, and photosystem activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. **Photosynthetica**, v. 39, n. 1, p. 59-65, 2001.

BEVILACQUA, L. R.; FOSSATI, F.; DONDERO, G. 'Callose' in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. **Annals of Botany**, v. 59, n. 3, p. 335-341, 1987.

BISCARO, G. A. et al. Molybdenum applied to seeds and sidedressing nitrogen on irrigated common bean in cerrado soil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1280-1287, 2009.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress. **HortScience**, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p.

BROCK-LEHURST, P. A.; DEARMAN, J. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. I. Laboratory germination. **Annals of Applied Biology**, v. 102, n. 3, p. 577-584, 2008.

BRZEZINSKI, C. R. et al. Spray volumes in the industrial treatment on the physiological quality of soybean seeds with different levels of vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 174-181, 2017.

BUSNEL, R. G.; OBOLENSKY, G. Etude microcalorimetrique de l'acceleration de la germination des graines traitees aux ultrasons. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, v. 240, n. 12, p. 1358-1360, 1955.

BUTLER, W. L. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, 457-478, 1978.

CAMPO, R. J.; ALBINO, U. B.; HUNGRIA, M. Importance of molybdenum and cobalt to the biological nitrogen fixation. In: PEDROSA, Fabio O. et al. (eds.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Springer, 2000. p. 597-598.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHEN, Y. P. et al. Ultrasonic vibration seeds showed improved resistance to cadmium and lead in wheat seedling. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 7, p. 4807-4816, 2013.

COLUSSI, J. et al. The soy agribusiness: an analysis of profitability of soybean cultivation in Brazil. **Revista Espacios**, v. 37, p. 1-4, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2021/22**. Brasília, DF, 2022. 88 p. (Décimo Segundo Levantamento, v. 9).

DELL'AQUILA, A. Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. **Seed Science and Technology**, v. 35, p. 519–538, 2007.

DIMKPA, C. O.; BINDRABAN, P. S. Micronutrients fortification for efficient agronomic production: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, p. 1-26, 2016.

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

ELMASRY, G. et al. Recent applications of multispectral imaging in seed phenotyping and quality monitoring - An overview. **Sensors**, v. 19, art. 1090, 2019.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 400 p.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.

FAROOQ, M. et al. Nutrient homeostasis, metabolism of reserves, and seedling vigor as affected by seed priming in coarse rice. **Botany**, v. 84, n. 8, p. 1196-1202, 2006.

FAROOQ, M. et al. Rice seed invigoration: a review. In: LICHTFOUSE, E. (ed.). **Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 137-175.

FENG, H.; LEE, H. Effect of Power Ultrasound on Food Quality. In: FENG, H.; BARBOSA-CANOVAS, G.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. New York, NY: Springer, 2011. p. 599-582.

FINDLEY, W. R.; CAMPBELL, L. E. Ultrasonic treatments of dormant hybrid corn seed. **Agronomy Journal**, v. 45, n. 8, p. 357-358, 1953.

FISCHNICH, O.; HEILIGER, F. Applications of ultrasonics in biology and agriculture. **Nature abt**, n. 29, p. 94-99, 1958

FRANÇA-NETO, J. de B. et al. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p. (Documentos, 380).

FURBANK, R. T. et al. C4 rice: a challenge for plant phenomics. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 11, p. 845-856, 2009.

GABA, V. et al. The uses of ultrasound in plant tissue culture. In Focus on Biotechnology. **Plant Tissue Culture Engineering**, v. 6, p. 417-426, 2008.

GAZZONI, D. L.; DALLÁGNOL, A. **A saga da soja: de 1050 a.C. a 2050 d.C.** Brasília, DF: Embrapa, 2018. 199 p.

GENTY, B. et al. Modulation of efficiency of primary conversion in leaves, mechanisms involved at PS2. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS, 9., 1992, Nagoya; Japan. **Research in Photosynthesis**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. p. 603-610.

GHAFOOR, M. et al. Ultrasound assisted hydration of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 409-414, 2014.

GITELSON, A. A.; MERZLYAK, M. N.; CHIVKUNOVA, O. B. Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 38-45, 2001.

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**, v. 160, p. 271-282, 2003.

GORDON, A. The use of ultrasound in agriculture. **Ultrasonics**, v. 1, n. 2, p. 70-77, 1963.

GORDON, A. Beneficial effects of ultrasound on plants-a review. **Ultrasonics**, v. 9, n. 2, p. 88-94, 1971.

GOUSSOUS, S. J. et al. Enhancing seed germination of four crop species using an ultrasonic technique. **Experimental Agriculture**, v. 46, p. 231-242, 2010.

GRAVEN, P. et al. Structure and macromolecular composition of the seed coat of the Musaceae. **Annals of Botany**, v. 77, n. 2, p. 105-122, 1996.

HAFRÉN, J. Excitation wavelength-specific changes in lignocellulosic autofluorescence. **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 4, p. 358-360, 2007.

HALMER, P. Seed technology and seed enhancement. *Acta Horticulturae*, v. 771, p. 17-26, 2008. Apresentado ao 27º International Horticultural Congress, Seoul, Korea.

HEBLING, S. A.; SILVA, W. R. da. Efeitos do ultrassom de baixa intensidade na germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.) sob diferentes condições de disponibilidade hídrica. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 3, p. 514-520, 1995.

HU, A. et al. Ultrasound assisted supercritical fluid extraction of oil and coixenolide from adlay seed. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 219-224, 2007.

HUANG, G. et al. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 144-149, 2017.

JANSRIMANEE, S.; LERTWORASIRIKUL, S. Synergetic effects of ultrasound and sodium alginate coating on mass transfer and qualities of osmotic dehydrated pumpkin. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 69, p. 1-8, 2020.

JOHNSON, S. E. et al. A comparison of the effects of micronutrient seed priming and soil fertilization on the mineral nutrition of chickpea (*Cicer arietinum*), lentil (*Lens culinaris*), rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) in Nepal. **Experimental Agriculture**, v. 41, n. 4, p. 427-448, 2005.

KALAJI, H. M. et al. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 16-25, 2014.

- KALITA, D. et al. Sono-hydro priming process (ultrasound modulated hydration): Modelling hydration kinetic during paddy germination. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 70, art. 105321, 2020.
- KANDPAL, L. M. et al. Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 534-544, 2016.
- KARNOVSKAYA, M. J. A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KHALID, B. Y.; MALIK, N. S. A. Presowing soaking of wheat seeds in copper and manganese solutions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 13, n. 11, p. 981-986, 1982.
- KOŁODZIEJEK, J. Effect of seed position and soil nutrients on seed mass, germination and seedling growth in *Peucedanum oreoselinum* (Apiaceae). **Scientific Reports**, v. 7, p. 1959-1969, 2017.
- KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. A. **A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 24 p. (Circular Técnica, 136).
- LAHIJANIAN, S.; NAZARI, M. Increasing germination speed of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds by ultrasound treatments. **Seed Technology**, v. 38, p. 49-55, 2017.
- LLEÓ, L. et al. Multispectral images of peach related to firmness and maturity at harvest. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 229-235, 2009.
- LIU, J. et al. Effects of ultrasonication on increased germination and improved seedling growth of aged grass seeds of tall fescue and Russian wildrye. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-6, 2016.
- LÓPEZ-RIBERA, I.; VICIENT, C. M. Use of ultrasonication to increase germination rates of *Arabidopsis* seeds. **Plant Methods**, v. 13, p. 1-6, 2017.
- LOZA, J. Recherches physiologiques et histologiques sur les effets provoqués par les ultrasons chez les végétaux. **Revue Generale de Botanique**, n. 57, p. 594, 1950.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCAR, N. E.; GRAHAM, R. D. Effect of seed manganese content on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) under manganese deficiency. **Plant and Soil**, v. 96, n. 2, p. 165-173, 1986.
- MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, 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**, v. 58, p. 421-426, 2001.
- MARGUI, E.; VAN GRIEKEN, R. **X-ray fluorescence spectrometry and related techniques: an introduction**. New York: Momentum Press, 2013.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York, NY: Academic Press, 1995.

MASCARENHAS, H. A. A. et al. Micronutrientes em soja no estado de São Paulo. **Nucleus**, v. 11, p. 179-197, 2014.

MASON, T. J. Power ultrasound in food processing – the way forward. In: POVEY, M. J. W.; MASON, T. J. (eds.). **Ultrasound in Food Processing**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 105-126.

MASON T. J. et al. Application of ultrasound. In: SUN, D. W. (ed.). **Emerging technologies for food processing**. London: Academic Press, 2005. p. 323-351.

McDONALD, M. B. Seed priming. In: BLACK, M.; BEWLEY, J. D. **Seed technology and its biological basis**. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 2000. p. 287-325.

MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363-384, 2020.

MENGEL, K. et al. Further elements of importance. In: MENGEL, K. et al. (eds.). **Principles of plant nutrition**. Dordrecht: Springer, 2001. p. 639-655.

MIANO, A. C.; AUGUSTO, P. E. D. The ultrasound assisted hydration as an opportunity to incorporate nutrients into grains. **Food Research International**, v. 106, p. 928-935, 2018.

MIANO, A. C.; IBARZ, A.; AUGUSTO, P. E. D. Mechanisms for improving mass transfer in food with ultrasound technology: Describing the phenomena in two model cases. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 413-419, 2016.

MIANO, A. C.; IBARZ, A.; AUGUSTO, P. E. D. Ultrasound technology enhances the hydration of corn kernels without affecting their starch properties. **Journal of Food Engineering**, v. 197, p. 34-43, 2017.

MIANO, A. C. et al. Enhancing mung bean hydration using the ultrasound technology: description of mechanisms and impact on its germination and main components. **Scientific Reports**, v. 6, p. 388-996, 2016.

MILLER, D. L. Instrument for microscopical observation of the biophysical effects of ultrasound. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 60, p. 1203-1212, 1976.

MOHAMMED, M. M. A.; PEKŞEN, E. Impact of different zinc application strategies on yield, yield component, and chlorophyll content of wheat under drought and zinc-deficiency stress conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 10, p.1468-1485, 2020.

MOÏSE, J. A. et al. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, p. 620-644, 2005.

MONTANHA, G. S. et al. X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) applied to plant science: challenges towards in vivo analysis of plants. **Metallomics**, v. 12, n. 2, p. 183-192, 2020.

MONTANHA, G. S. et al. Unfolding the fate and effects of micronutrients supplied to soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and maize (*Zea mays* L.) through seed treatment. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 4, p. 3194-3202, 2021.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 13, p. 3983-3998, 2013.

NAZARI, M., SHARIFIFAR, A., ASGHARI, H. R. *Medicago scutellata* seed dormancy breaking by ultrasonic waves. **Plant Breeding and Seed Science**, v. 69, p. 15-24, 2014.

NYBORG, W. L. Biological effects of ultrasound: Development of safety guidelines. Part II: General Review. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 27, p. 301-333, 2001.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Ann Arbor, MI: University of Michigan, 1981. 357 p.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLESEN, M. H. et al. Viability prediction of *Ricinus cummunis* L. seeds using multispectral imaging. **Sensors**, v. 15, n. 2, p. 4592-4604, 2015.

OLIVEIRA, J. B. D. et al. Fate of nickel in soybean seeds dressed with different forms of nickel. **Rhizosphere**, v. 21, p. 1-10, 2022.

ONAC, I. et al. High frequency pulsatile electromagnetic fields and ultrasound pulsatile fields impact on germination dynamic at *Ocimum basilicum* L. and *O. basilicum* var. purpurascens benth., observed with open source software. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 1, p. 41-47, 2016. <https://doi.org/10.15835/nbha44110328>

OSÓRIO, J. et al. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 148-155, 2014.

OZTURK, L. et al. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. **Physiologia Plantarum**, v. 128, n. 1, p. 144-152, 2006.

PALIT, S.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Effects of cobalt on plants. **The Botanical Review**, v. 60, n. 2, p. 149-181, 1994.

PATERO, T., AUGUSTO, P. ED. Ultrasound (US) enhances the hydration of sorghum (*Sorghum bicolor*) grains. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 11-15, 2015.

POPOV, I.; KARABASCHEV, L. N.; KARABACHEV, T. Changes in enzymatic chemical activity of seed subjected to ultrasonic vibrations, **Chemical Abstracts**, p. 22864, 1960.

PORTO, C. L. et al. Plasma activated water and airborne ultrasound treatments for enhanced germination and growth of soybean. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 49, p. 13-19, 2018.

PRATAP, A. et al. Soybean. In: GUPTA, S. K. (ed.). **Technological Innovations in Major World Oil Crops**. New York, NY: Springer, 2012. p. 293-321.

PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origin, US history and development, and world distribution. **Agronomy**, v. 16, p. 1-15, 1973.

RAMESH, K.; THIRUMURUGAN, V. Effect of seed pelleting and foliar nutrition on growth of soybean. **Madras Agricultural Journal**, v. 88, n. 7, p. 465-468, 2001.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<http://www.r-project.org/index.html>>. Acesso em: 10 maio 2022.

REHMAN, A. et al. Role of boron in leaf elongation and tillering dynamics in fine-grain aromatic rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 42-54, 2013.

ROHR, L. A. et al. Soybean seeds treated with zinc evaluated by X-ray micro-fluorescence spectroscopy. **Scientia Agricola**, v. 80, e20210131, 2022.

ROMEU, S. L. Z. et al. Chemometrics unraveling nutrient dynamics during soybean seed germination. **Microchemical Journal**, v. 164, art. 106045, 2021.

RÎȘCA, I. M.; FĂRTĂIȘ, L.; ȘTIUCĂ, P. Ultrasounds effects contributions on the norway spruce seeds germination (*Picea abies* (L.) Karsten). **Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară**, v. 8, p. 1-2, 2007.

SAMPAIO, T.; SAMPAIO, N. Recobrimento de Sementes. **Informativo Abrates**, v. 4, p. 20-52, 1994.

SEDAGHATKISH, A. et al. Acoustic streaming and thermosensitive liposomes for drug delivery into hepatocellular carcinoma tumor adjacent to major hepatic veins; an acoustics–thermal–fluid–mass transport coupling model. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 158, p. 1-14, 2020.

SCHAEFER, K. A. et al. How have oilseed relative price relationships changed over time? **AgBioForum**, v. 23, n. 1, p. 72-83, 2021.

SCOTT, J. M. Seed coatings and treatments and their effects on plant establishment. **Advances in Agronomy**, v. 42, p. 43-83, 1989.

SCOUTEN, A. J.; BEUCHAT, L. R. Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa seeds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 668-674, 2002.

SERVIN, A. et al. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, p. 1-21, 2015.

SHARIFIFAR, A.; NAZARI, M.; ASGHARI, H. R. Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Atriplex lentiformis*, *Cuminum cyminum*, and *Zygophyllum eurypterum*. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 102-104, 2015.

SINGH, B. et al. Improving zinc efficiency of cereals under zinc deficiency. **Current Science**, v. 88, n. 1, p. 36-44, 2005.

SOUZA, F. H.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, p. 365-375, 2001.

STRASSERF, R. J.; SRIVASTAVA, A. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32-42, 1995.

SZARESKI, V. et al. Pre-harvest desiccation and seed production in soybean crops. **International Journal of Current Research**, v. 8, p. 41534-41537, 2016.

TAO, Y.; SUN, D.W. Enhancement of food processes by ultrasound: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 570–594, 2015.

TOTH, L.; DRAGOMIR, N.; NEAGU, A. On the Effect of Ultrasound and Thermal Treatment on Seed Germination in Bird's-foot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.). **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca - Animal Science and Biotechnologies**, v. 69, n. 1-2, p. 216-219, 2012.

ULLOA, J. A. et al. Effect of ultrasound treatment on the hydration kinetics and cooking times of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **CyTA - Journal of Food**, v. 13, n. 4, p. 588-596, 2015.

VAN GRIEKEN, R.; MARKOWICZ, A. (eds.). **Handbook of X-ray Spectrometry**. Boca Raton: CRC Press, 2001.

VAN DONGEN, J. T. et al. Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. **Annals of Botany**, v. 91, p. 729-737, 2003.

WANG, Q. et al. Modeling analysis on germination and seedling growth using ultrasound seed pretreatment in switchgrass. **PloS One**, v. 7, n. 20, p.1-10, 2012.

WELCH, R. M. Micronutrient nutrition of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p. 49-82, 1995.

WELCH, R. M. Importance of seed mineral nutrient reserves in crop growth and development. In: RENGEL, Z. (ed.). **Mineral nutrition of crops: Fundamental mechanisms and implications**. Binghamton, NY: Food Products Press, 2000. p. 205-226.

WISSUWA, M.; KRETZSCHMAR, T.; ROSE, T. J. From promise to application: root traits for enhanced nutrient capture in rice breeding. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 12, p. 3605-3615, 2016.

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

YALDAGARD, M.; MORTAZAVI, S. A.; TABATABAIE, F. Application of ultrasonic waves as a priming technique for accelerating and enhancing the germination of barley seed:

optimization of method by the Taguchi approach. **Journal of Institute of Brewing**, v. 114, p. 14-21, 2008.

YANG, H. et al. The ultrasound-treated soybean seeds improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. **Food Research International**, v. 77, p. 704-710, 2015.

YENGOH, G. T. et al. **Use of the Normalized difference vegetation index (NDVI) to assess land degradation at multiple scales: Current status, future trends, and practical considerations**. Cham: Springer, 2015.

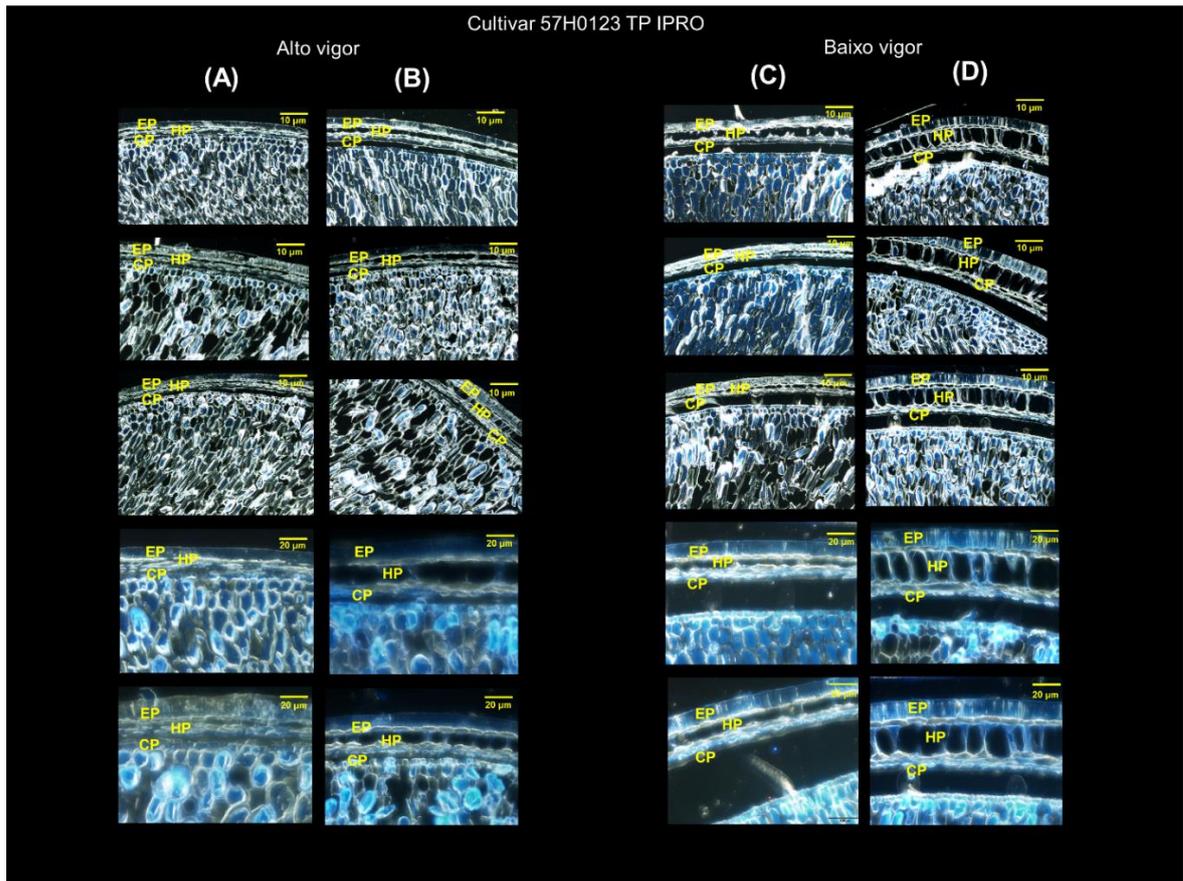
YILDIRIM, A.; ÖNER, M. D.; BAYRAM, M. Effect of soaking and ultrasound treatments on texture of chickpea. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 455-465, 2013.

YU, M. et al. Preparation of resveratrol-enriched and poor allergic protein peanut sprout from ultrasound treated peanut seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 28, p. 334-340, 2016.

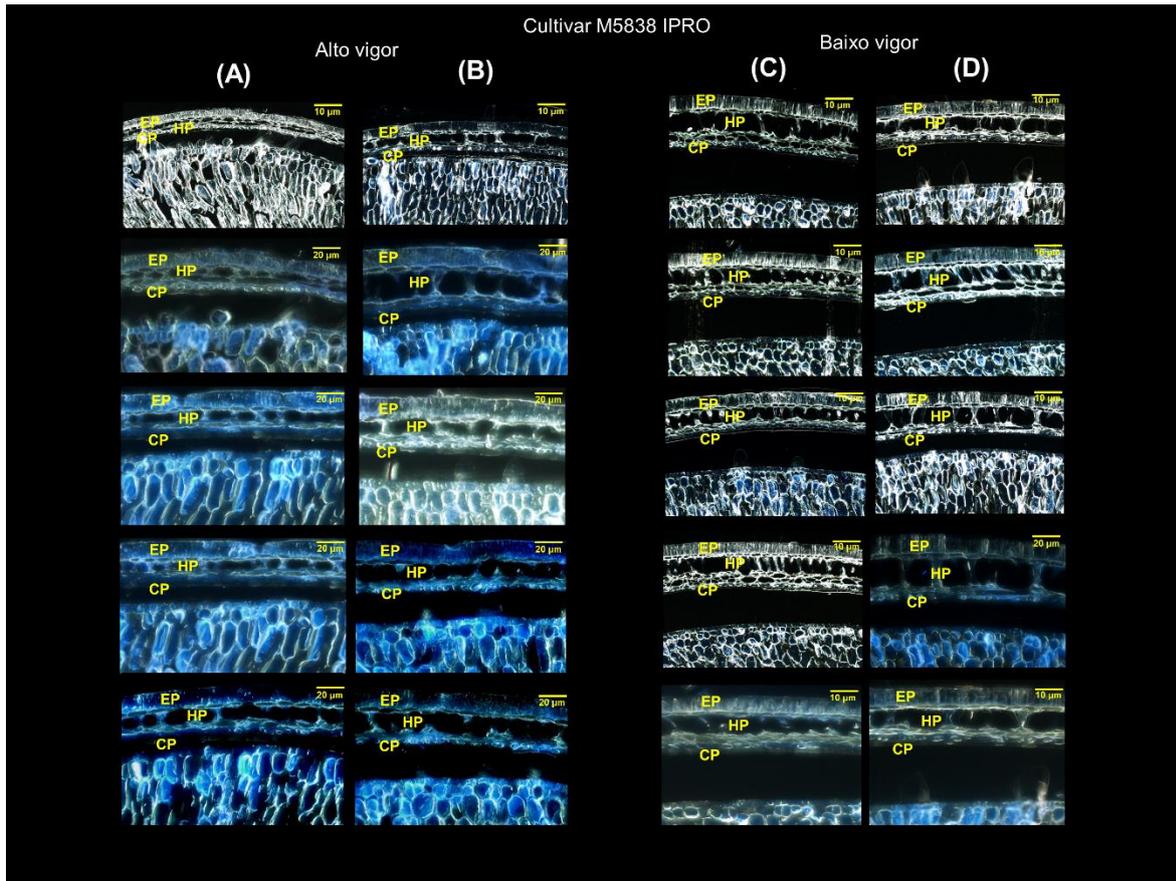
ZIMMERMANN, T.; RIETDORF, J.; PEPPERKOK, R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. **FEBS Letters**, v. 546, n. 1, p. 87-92, 2003.

## APÊNDICES



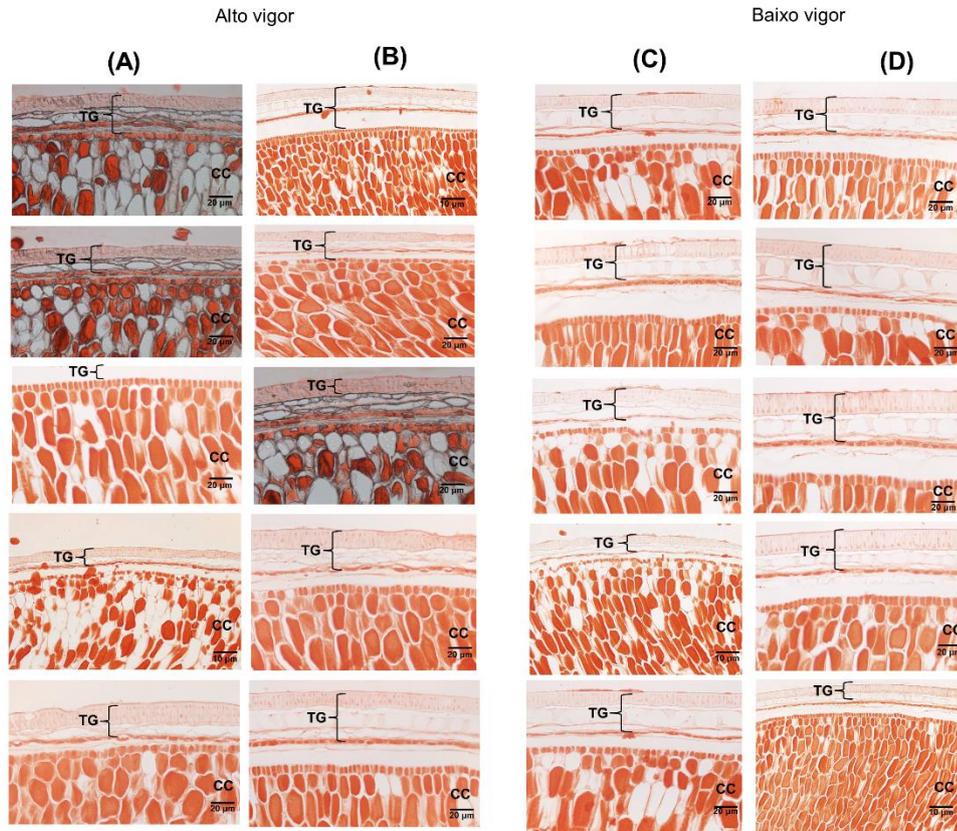


Apêndice A – Imagens de microscopia de fluorescência azul (excitação de 330-385 nm) de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes de soja (cinco sementes/tratamento) do cultivar 57H0123 TP IPRO antes (A, C) e após (B, D) ultrassom por 30 minutos, para classes de alto e baixo vigor. EP = epiderme; HP = hipoderme; CP = células parenquimatosas.

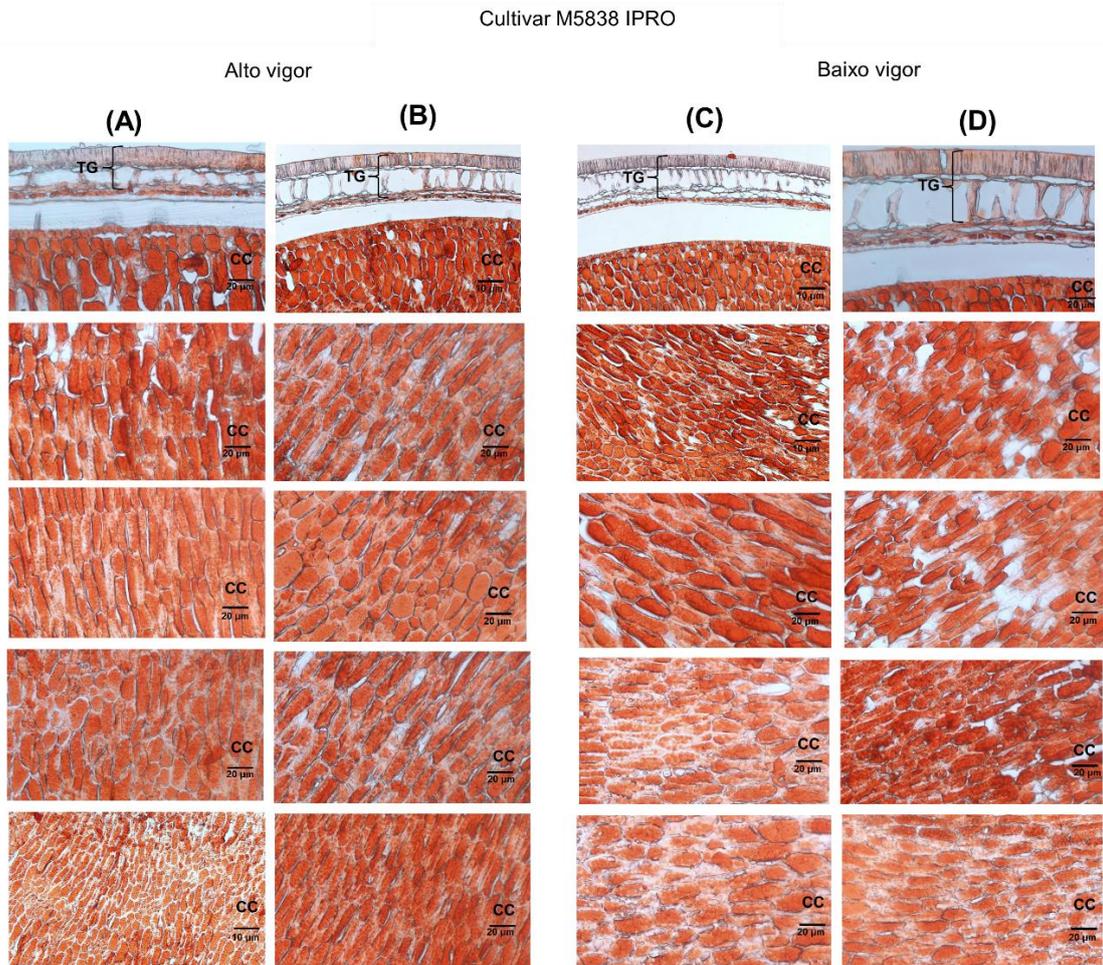


Apêndice B – Imagens de microscopia de fluorescência azul (excitação de 330-385 nm) de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes de soja (cinco sementes/tratamento) do cultivar M5838 IPRO antes (A, C) e após (B, D) ultrassom por 30 minutos, para classes de alto e baixo vigor. EP = epiderme; HP = hipoderme; CP = células parenquimatosas.

## Cultivar 57H0123 TP IPRO



Apêndice C – Imagens de microscopia de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes de soja (cinco sementes/tratamento) do cultivar 57H0123 TP IPRO antes (A, C) e após (B, D) ultrassom por 30 minutos, para classes de alto e baixo vigor. As imagens de microscopia foram obtidas empregando o corante Xylidine Ponceau (XP) que revela o conteúdo de proteínas do tegumento e das células cotiledonares. TG = Tegumento; CC = Células cotiledonares.



Apêndice D – Imagens de microscopia de cortes do tegumento e do cotilédone de sementes de soja (cinco sementes/tratamento) do cultivar M5838 IPRO antes (A, C) e após (B, D) ultrassom por 30 minutos, para classes de alto e baixo vigor. As imagens de microscopia foram obtidas empregando o corante Xylidine Ponceau (XP) que revela o conteúdo de proteínas do tegumento e das células cotiledonares. TG = Tegumento; CC = Células cotiledonares.