

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes**



**TESE**

**Expressão relativa de genes, caracterização química e estrutural de tegumentos e desempenho de sementes de soja com características contrastantes**

**Carlos André Bahry**

**Pelotas, 2014**

**Carlos André Bahry**

**Expressão relativa de genes, caracterização química e estrutural de tegumentos e desempenho de sementes de soja com características contrastantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Paulo Dejalma Zimmer

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B151e Bahry, Carlos André

Expressão relativa de genes, caracterização química e estrutural de tegumentos e desempenho de sementes de soja com características contrastantes / Carlos André Bahry ; Paulo Dejalma Zimmer, orientador. — Pelotas, 2014.

130 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Tegumentos contrastantes. 2. Genes alvos. 3. Lignina. 4. Camada paliçádica. 5. Qualidade fisiológica. I. Zimmer, Paulo Dejalma, orient. II. Título.

CDD : 633.34

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer (Presidente)

Prof. Dr. Luis Osmar Braga Schuch

Prof. Dr. Tiago Zanatta Aumonde

Dr. Paulo Ricardo Reis Fagundes

Dr<sup>a</sup>. Andréia da Silva Almeida

Dedico este trabalho aos meus pais, minhas irmãs e minha namorada Anelise, pelo amor, carinho e incentivo ao longo dessa trajetória.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a São Francisco de Assis acima de tudo.

Aos meus pais, Carlos Bahry e Marlene Maria Bahry; minhas irmãs, Thaíza Regina Bahry e Carla Patrícia Bahry, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me confortando em todos os momentos.

À minha namorada, Anelise Tessari Perboni, pelo amor, amizade, paciência, companheirismo e auxílio ao longo dessa trajetória.

À minha avó Edna Speroni (*in memoriam*).

Ao professor Paulo Dejalma Zimmer, pela amizade, orientação e confiança no meu trabalho durante esses anos de convivência.

Aos colegas e amigos Eduardo Venske e Maicon Nardino pela amizade e comprometimento com os trabalhos realizados ao longo desses anos.

Às colegas Tanize Acunha e Thaize Debatin Wehrmeister, pela colaboração e empenho na execução desse trabalho.

Aos professores Juliana Fernando e Fabio Clasen Chaves pela atenção e colaboração.

Ao professor Tiago Zanatta Aumonde, pela amizade e apoio ao longo desses anos.

À Pós-Doutoranda Andréia da Silva Almeida pelo auxílio na revisão desse trabalho e pela amizade.

Ao pesquisador Paulo Ricardo Reis Fagundes e à Embrapa Clima Temperado - Estação Terras Baixas pelo apoio na execução desse trabalho.

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da UFPel que colaboraram de alguma forma, para com este trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal da ESALQ/USP e aos Laboratórios de Anatomia Vegetal, Nutrição Animal e de Metabolismo Secundário da UFPel pela concessão de espaço para a realização de parte dessa pesquisa.

Ao CNPq, FAPERGS, CAPES e FAU, pela concessão de bolsa de estudos e demais auxílios financeiros.

## Resumo

BAHRY, Carlos André. **Expressão relativa de genes, caracterização química e estrutural de tegumentos e desempenho de sementes de soja com características contrastantes**. 2014. 130f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

O tegumento da soja atua como modulador das interações entre as estruturas internas das sementes e o meio externo, sendo vital para a qualidade destas. Para tanto, buscou-se estudar melhor essa relação através da realização de quatro ensaios. No Ensaio 1 se avaliou a expressão de oito genes possivelmente relacionados com a qualidade das sementes e expressos nos tegumentos; no Ensaio 2 determinou-se composição química dos tegumentos; no Ensaio 3 se analisou a estrutura interna dos tegumentos; e, no Ensaio 4 avaliaram-se as características físicas e fisiológicas das sementes. Foram utilizados quatro genótipos de soja contrastantes para as características de tegumento, dois de tegumentos amarelos, BMX Potência RR e CD 202, e dois de tegumentos pretos, TP e IAC. A expressão relativa dos genes VINV1, SCB1, SCS1, SBP, LEGINSULIN, CHIA1, SGF14c e CHS8\* foi avaliada pela técnica qPCR, em sete fases de desenvolvimento dos tegumentos, aos 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 dias após a antese. Quanto à composição química dos tegumentos determinou-se a concentração de compostos fenólicos, potencial antioxidante, antocianinas, carotenóides e lignina. Para a caracterização estrutural dos tegumentos realizaram-se cortes anatômicos destes em micrótomo, sendo a documentação dos resultados realizada pela captura de imagens em microscópio. A qualidade das sementes foi avaliada pelos testes de germinação e primeira contagem, com e sem imersão das sementes; comprimento de plântula, com e sem imersão; emergência em solo; índice de velocidade de germinação e emergência; velocidade de emergência; condutividade elétrica; massa de mil sementes; massa dos tegumentos; razão entre a massa dos tegumentos e a massa das sementes; tamanho das sementes; embebição; e, protrusão radicular. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey nos Ensaios 1, 2 e 4. No Ensaio 4, em relação à embebição das sementes aplicou-se análise de regressão. Os genes VINV1, SCS1, SBP e LEGINSULIN expressam-se mais nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos de BMX Potência RR e, o gene CHS8\*, nas fases finais deste mesmo genótipo. Os genes SCB1 e SGF14c expressam-se mais nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos de CD 202 e, o gene CHIA1, nas fases finais. As concentrações de fenóis, antioxidantes, antocianinas, carotenóides e lignina são maiores nos genótipos de tegumentos pretos. Estes também possuem a camada paliçádica e as células em ampulheta mais espessas que os tegumentos amarelos. Genótipos de tegumentos pretos, em especial o IAC, apresentam maior qualidade fisiológica. BMX Potência RR possui maior hidratação de suas sementes em relação aos outros genótipos nas primeiras horas de embebição e TP, a menor; contudo, este último e IAC apresentam protrusão radicular mais rápida. A concentração de lignina nos tegumentos não influencia a hidratação das sementes de soja.

**Palavras-chave:** tegumentos contrastantes, genes alvos, lignina, camada paliçádica, qualidade fisiológica.

## Abstract

BAHRY, Carlos André. **Relative genes expression, chemical and structural characterization of seed coats and soybean seeds performance with contrasting traits.** 2014. 130p. Thesis (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Soybean seed coats perform as a modulator of the interactions between internal structures of seeds and the external environment, which are vital for its quality. In order to perform a deeper study, four tests were performed. In Test 1, the expression of eight genes was evaluated, possibly related to the quality of the seeds, and express on the seed coats; on Test 2, the seed coats chemical composition was determined; on Test 3, the internal structure of seed coats was analyzed and on Test 4, physical and physiological traits of seeds were evaluated. Four contrasting soybean genotypes were used for the seed coat traits, two yellow seed coats, BMX Potência RR and CD 202, and two black seed coats, TP and IAC. The relative expression of the genes VINV1, SCB1, SCS1, SBP, LEGINSULIN, CHIA1, SGF14c e CHS8\* was evaluated through the qPCR technique in seven phases of seed coat development, on the 25, 30, 35, 40, 45, 50 and 55 days after anthesis. Concerning the chemical composition of the seed coats, the phenolic compounds concentration, antioxidant potential, anthocyanin, carotenoids and lignin were determined. For the structural characterization of the seed coats, two anatomic cuts of these in microtome and the documentation of the results were performed by the capture of images on the microscope. Seed quality was evaluated by the germination test and first counting, with and without immersion of the seeds; seedlings length, with and without immersion; emergence in soil; germination and emergence speed index, emergence speed; electric conductivity; a thousand seeds mass; seed coats mass; seed coats mass and seed mass ratio; size of the seeds; imbibitions; and radicle protrusion. Data were subjected to variance analysis and the means compared by the Tukey test on Tests 1, 2 and 4. On Test 4, concerning seed imbibition, a regression analysis was performed. Genes VINV1, SCS1, SBP and LEGINSULIN are more expressed in the early stages of development of the seed coats BMX Potência RR and the gene CHS8\* in the final stages of the same genotype. The SCB1 and SGF14c genes are more expressed in early stages of development of the seed coats CD 202 and the CHIA1 gene in the final stages. The phenol concentration, antioxidants, anthocyanin, carotenoids and lignin are higher in the black seed coat genotypes. These also have a palisade layer and thicker hourglass cells than the yellow seed coats. Black seed coats genotypes, specially the IAC presented a higher physiological quality. BMX Power RR has higher seed hydration in comparison to the other genotypes on the first imbibition hours while TP has the lower; however, the latter and the IAC show radicle protrusion more fast. The lignin concentration in seed coats does not influence soybean seeds hydration.

**Keywords:** contrasting seed coats, target genes, lignin, palisade layer, physiological quality.

## Lista de figuras

- Figura 1 Expressão relativa do gene VINV1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento..... 47
- Figura 2 Expressão relativa do gene SCB1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento..... 50
- Figura 3 Expressão relativa do gene SCS1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento..... 53
- Figura 4 Expressão relativa do gene SBP em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento..... 57
- Figura 5 Expressão relativa do gene LEGINSULIN em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento..... 61
- Figura 6 Expressão relativa do gene CHIA1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento..... 64

Figura 7	Expressão relativa do gene SGF14c em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento.....	67
Figura 8	Expressão relativa do gene CHS8* em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento.....	72
Figura 9	Cortes transversais do tegumento de soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill) capturados em câmera Leica DC 300F 40x acoplada ao microscópio Leica DM LB .....	79
Figura 10	Dados médios da percentagem de sementes dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR, retidas nas peneiras de furo redondo com diâmetro de 3,5mm a 7,0mm, com intervalo entre peneiras de 0,5mm.....	89
Figura 11	Dados médios do ganho de água das sementes dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR, em função do tempo de embebição.....	94

## Lista de tabelas

Tabela 1	Relação dos genes alvos, acessos e sequências dos iniciadores usados para a qPCR.....	32
Tabela 2	Mistura de reação utilizada para determinar a concentração final de cada conjunto de iniciadores.....	34
Tabela 3	Concentração de compostos fenólicos (fenóis), em mg eq. Ácido gálico.g <sup>-1</sup> ; potencial antioxidante, em μmol eq.Trolox.g <sup>-1</sup> ; antocianinas totais, em mg eq. Cianidina 3 glicosídeo.g <sup>-1</sup> ; carotenóides, em μg eq. β- caroteno.g <sup>-1</sup> ; e, lignina, em percentagem, nos tegumentos dos genótipos IAC e TP (tegumento preto) e nos tegumentos das cultivares CD 202 e BMX Potência RR (tegumento amarelo).....	74
Tabela 4	Dados médios de germinação (G), primeira contagem da germinação (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e comprimento total de plântula (CT) dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR .....	83
Tabela 5	Dados médios de germinação (G), primeira contagem da germinação (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e comprimento total de plântula (CT), obtidos de sementes expostas à imersão em água por 24 horas dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR.....	85
Tabela 6	Dados médios de emergência (E); índice de velocidade de emergência (IVE); velocidade de emergência (VE); índice de velocidade de germinação (IVG); e, condutividade elétrica (CE)	

dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de  
tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR  
..... 86

Tabela 7 Dados médios da massa de mil sementes (MMS), da massa dos  
tegumentos (MT) e da razão da massa dos tegumentos (MT) pela  
massa de sementes (MS) dos genótipos de tegumento preto, IAC  
e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX  
Potência RR..... 88

Tabela 8 Análise do ganho de água entre genótipos para cada período de  
embebição das sementes de soja..... 91

## Sumário

1. Introdução geral .....	14
2. Revisão de literatura .....	17
2.1. Características dos tegumentos e a qualidade das sementes de soja .....	17
2.1.1. Permeabilidade dos tegumentos de sementes de soja .....	17
2.1.2. Coloração dos tegumentos de sementes de soja .....	22
2.2. Biotecnologia aplicada à ciência e tecnologia de sementes .....	23
3. Material e métodos .....	27
3.1. Ensaio I – Expressão relativa dos genes alvos .....	27
3.1.1. Obtenção do material vegetal .....	27
3.1.2. Extração de RNA .....	28
3.1.3. Síntese de cDNA .....	30
3.1.4. Seleção dos genes alvos .....	31
3.1.5. Seleção dos genes normalizadores .....	31
3.1.6. Desenho dos iniciadores .....	31
3.1.7. Otimização dos sistemas de amplificação .....	32
3.1.7.1. Gradiente de temperatura de anelamento .....	32
3.1.7.2. Parâmetros de ciclagem .....	33
3.1.7.3. Determinação da concentração ótima dos iniciadores .....	33
3.1.8. Avaliação de desempenho dos sistemas de amplificação .....	34
3.1.8.1. Curvas de dissociação .....	34
3.1.8.2. Eficiência dos sistemas de amplificação .....	34
3.1.9. Cálculo da expressão relativa (R) .....	35
3.1.10. Procedimento estatístico .....	36
3.2. Ensaio II – Caracterização química dos tegumentos .....	36
3.2.1. Obtenção do material vegetal .....	36
3.2.2. Determinação de compostos fenólicos totais dos tegumentos.....	37
3.2.3. Determinação do potencial antioxidante dos tegumentos .....	37
3.2.4. Determinação de antocianinas totais dos tegumentos .....	37

3.2.5. Determinação de carotenóides totais dos tegumentos .....	37
3.2.6. Determinação de lignina dos tegumentos .....	38
3.2.7. Procedimento estatístico .....	38
3.3. Ensaio III – Caracterização estrutural dos tegumentos .....	38
3.3.1. Análise comparativa da estrutura interna dos tegumentos .....	38
3.4. Ensaio IV – Avaliação das características físicas e fisiológicas das sementes .....	39
3.4.1. Obtenção do material vegetal .....	39
3.4.2. Teste de germinação e primeira contagem .....	39
3.4.3. Comprimento de plântula .....	40
3.4.4. Teste de germinação e primeira contagem de sementes submetidas à imersão em água .....	40
3.4.5. Comprimento de plântula com imersão das sementes .....	41
3.4.6. Emergência em solo .....	41
3.4.7. Índice de velocidade de emergência e velocidade de emergência.....	41
3.4.8. Índice de velocidade de germinação .....	42
3.4.9. Condutividade elétrica .....	42
3.4.10. Massa de mil sementes .....	42
3.4.11. Massa dos tegumentos .....	43
3.4.12. Razão entre a massa dos tegumentos e a massa das sementes .....	43
3.4.13. Tamanho das sementes .....	43
3.4.14. Embebição das sementes .....	43
3.4.15. Protrusão radicular .....	44
3.4.16. Procedimento estatístico .....	44
4. Resultados e discussão .....	45
4.1. Ensaio I – Expressão relativa dos genes .....	45
4.1.1. VINV1 .....	45
4.1.2. SCB1 .....	48
4.1.3. SCS1 .....	51
4.1.4. SBP .....	55
4.1.5. LEGINSULIN .....	59

4.1.6. CHIA1 .....	62
4.1.7. SGF14c .....	66
4.1.8. CHS8* .....	69
4.2. Ensaio II – Caracterização química dos tegumentos .....	73
4.3. Ensaio III – Caracterização estrutural dos tegumentos .....	77
4.4. Ensaio IV – Avaliação das características físicas e fisiológicas das sementes .....	82
5. Conclusões .....	97
Referências bibliográficas .....	98
Anexos .....	121
Anexo A - Características das cultivares de soja CD 202 e BMX Potência RR. ....	122
Anexo B – Variância dos dados de <i>Quantification Cycle</i> para os cinco genes normalizadores selecionados para avaliação .....	123
Anexo C – Concentração ótima de iniciadores para genes alvos e genes normalizadores .....	124
Anexo D – Curvas de dissociação dos genes alvos e dos genes normalizadores .....	125
Anexo E – Eficiência de amplificação dos iniciadores .....	127
Anexo F – Resumo da análise de variância dos resultados .....	128

## **1. Introdução geral**

No Brasil, a área explorada comercialmente com a cultura da soja na safra 2013/2014 foi de aproximadamente 30 milhões de hectares, com uma produção de mais de 86 milhões de toneladas (CONAB, 2014).

Os dados divulgados pela Conab (2014) refletem o excelente momento em que se encontra a cadeia produtiva brasileira da soja: com aumento de área em relação às safras anteriores; incremento de produtividade, pelo emprego de tecnologias adequadas; e, melhor remuneração aos agricultores, motivada pelo câmbio e pelo preço pago pelo grão.

Diante desse cenário promissor, observado no Brasil, o setor de sementes merece ser lembrado como um dos pilares desse sucesso da cadeia produtiva da soja, sendo um dos pré-requisitos para se iniciar uma lavoura com qualidade e com potencial produtivo elevado, a utilização de sementes comerciais e de procedência garantida, pois é através destas que as inovações tecnológicas e os ganhos genéticos devido ao melhoramento chegam aos agricultores (FRANÇA-NETO et al., 2000; SANTOS et al., 2007).

Apesar dos avanços obtidos ao longo dos anos na área de ciência e tecnologia de sementes, alguns estudos têm mostrado que a qualidade fisiológica das sementes de soja, provenientes de determinadas regiões, tem sido comprometida pelos elevados índices de deterioração por umidade e ruptura do tegumento associada aos danos mecânicos na colheita e pós-colheita (COSTA et al., 2001; CARRARO & PESKE, 2005).

Estes danos por deterioração estão relacionados ao período de armazenamento a campo que as sementes de soja ficam submetidas após a maturidade fisiológica, estando expostas às flutuações de umidade do ambiente

(CARRARO & PESKE, 2005); sendo considerado um dos principais fatores que promove a redução da qualidade das sementes (FRANÇA-NETO et al., 2000). Já os danos mecânicos se devem, além de fatores intrínsecos da semente, aos diferentes fatores que atuam durante todo o processo de produção, beneficiamento e armazenamento, como a colheita das sementes muito secas, colhedoras e máquinas de beneficiamento mal reguladas, dentre outros (FLOR et al., 2004; HENNING, 2007). Trabalhos desenvolvidos no sentido de melhorar a qualidade das sementes de soja têm encontrado no tegumento algumas respostas que podem contribuir para minimizar os problemas relacionados a essa questão (MA et al., 2004; SANTOS et al., 2007; SHAO et al., 2007; MENEZES et al., 2009; MERTZ et al., 2009; RANATHUNGE et al., 2010).

O tegumento atua como uma proteção contra fatores bióticos e abióticos após a maturidade fisiológica, contribuindo para a manutenção da qualidade fisiológica e para a longevidade das sementes de muitas espécies, dentre as quais a soja. A maior ou menor suscetibilidade do tegumento da soja aos danos mecânicos pode estar associada ao seu teor de lignina, enquanto que sua longevidade e o grau de deterioração no campo têm sido relacionados à permeabilidade do tegumento (ALVAREZ et al., 1997; SOUSA & MARCOS-FILHO, 2001; FLOR et al., 2004; CAPELETI et al., 2005).

Alguns pesquisadores têm constatado que os tegumentos de coloração escura (marrom e preta) apresentam semi-permeabilidade, maior espessura da epiderme, taxas menores de embebição, maior resistência à deterioração e maior conteúdo de lignina em comparação às cultivares tradicionalmente cultivadas, de tegumentos amarelos e permeáveis (PESKE & PEREIRA, 1983; TAVARES et al., 1987; SANTOS et al., 2007; MERTZ et al., 2009), sendo assim, de interesse para a pesquisa (ANDRADE, 2012).

Diante dos resultados promissores obtidos até então, fica evidente a necessidade de aproximação dos programas de melhoramento genético da soja com os pesquisadores da área de ciência e tecnologia de sementes, visando desenvolver cultivares, além de mais produtivas, com melhor qualidade de sementes, por meio da utilização de técnicas de biologia molecular aliadas à bioinformática. Essas ferramentas permitem a identificação de genes específicos que atuam nas diversas

funções exercidas pelos tegumentos de sementes de soja, bem como a avaliação do nível de expressão de diferentes genes quanto às características de interesse de cada programa (HENNING et al., 2009; MERTZ et al., 2009; MERTZ, 2010; RANATHUNGE et al., 2010; MONZÓN, 2012).

Assim, a característica de semi-permeabilidade dos tegumentos pode ser utilizada nos programas de melhoramento de soja sendo incorporada às cultivares de alta produtividade, visando à qualidade das sementes (HENNING et al., 2009).

Baseado no exposto, o presente estudo teve como objetivos:

Avaliar a expressão relativa de oito genes alvos, possivelmente envolvidos com a qualidade das sementes, em quatro genótipos de soja contrastantes para as características de tegumento.

Determinar a concentração de compostos fenólicos, potencial antioxidante, antocianinas, carotenóides e lignina nos tegumentos dos genótipos contrastantes.

Analisar a estrutura interna dos tegumentos de quatro genótipos contrastantes para verificar a distribuição das camadas de células que os compõem.

Avaliar as características físicas e fisiológicas das sementes dos genótipos contrastantes para as características dos tegumentos, por meio de diferentes testes.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Características dos tegumentos e a qualidade das sementes de soja**

Os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que conferem a qualidade das sementes (KRZYZANOWSKI, 1998) podem ser considerados, em grande parte, dependentes dos tegumentos (SILVA, 2003).

O tegumento da soja é o modulador das interações entre as estruturas internas da semente e o meio externo. Ele atua na preservação da integridade da semente, protegendo o embrião e tecidos de reserva contra o ataque de pragas, incidência de doenças, danos mecânicos, deterioração e, também, modulando as trocas gasosas com o ambiente e a absorção de água, em especial durante o processo de germinação (PESKE & PEREIRA, 1983; POPINIGS, 1985; BASKIN et al., 2000; SOUSA & MARCOS-FILHO, 2001; BASKIN, 2003). O tegumento também exerce função especial quanto ao fornecimento de nutrientes para o embrião, durante o desenvolvimento da semente (WEBER et al., 2005).

#### **2.1.1. Permeabilidade dos tegumentos de sementes de soja**

As sementes de soja podem apresentar três tipos de tegumentos quanto à sua permeabilidade; o permeável, o semi-permeável e o impermeável, prevalecendo os dois primeiros. O tegumento permeável apresenta, normalmente, coloração amarela e tem como característica principal a facilidade de embebição, enquanto

que, o tegumento semi-permeável é, normalmente, de coloração preta, e tem como característica a restrição, em diferentes níveis, da embebição de água pela semente (HENNING et al., 2009). Segundo Ranathunge et al. (2010), o grau de permeabilidade do tegumento pode variar dentro do mesmo genótipo, independente de sua coloração.

A permeabilidade do tegumento é uma característica controlada por QTL's (*Quantitative trait loci*), sofrendo ação direta dos fatores do ambiente de produção (LIU et al., 2007). O cruzamento entre soja doméstica (tegumento permeável) e soja selvagem (tegumento impermeável) demonstrou que um pequeno número de grandes QTL's representa a maior parte da variação relacionada à permeabilidade do tegumento (SAKAMOTO et al., 2004; LIU et al., 2007).

Na soja, a perda de água pela semente é controlada por uma fina cutícula externa, formada principalmente por polímeros de cutina, composta de uma variedade de ceras, ácidos graxos, terpenos, compostos fenólicos e proteínas (MA et al., 2004; SHAO et al., 2007). Quando intacta, a cutícula funciona como uma barreira para as trocas líquidas da semente (HEREDIA, 2003). Porém, a presença de fissuras nesta camada permite a passagem imediata de água, o que pode ser comumente verificado em sementes de soja com tegumentos permeáveis (RANATHUNGE et al., 2010); podendo comprometer, dessa forma, a sua qualidade (SOUSA & MARCOS-FILHO, 2001; CARRARO & PESKE, 2005).

O estudo de Ranathunge et al. (2010), desenvolvido com o objetivo de avaliar a origem da permeabilidade do tegumento de sementes de soja, mostrou que esta se deve à presença de fissuras na cutícula, localizadas na região oposta ao hilo da semente. Esse resultado vem ao encontro do observado por Ma et al. (2004) e Meyer et al. (2007), os quais verificaram que a semente de soja embebe água principalmente através de fissuras (1-5 $\mu$ m de largura e 20-200 $\mu$ m de comprimento) na região oposta ao hilo e não pelo próprio hilo ou pela micrópila. Ainda segundo Meyer et al. (2007), foi verificado que sementes com tegumento duro apresentam uma redução de cinco vezes na permeabilidade à água quando comparadas às sementes com tegumentos permeáveis.

Além disso, Ranathunge et al. (2010) verificaram que todo o processo de formação da cutícula é semelhante para a semente de soja com tegumento permeável e não permeável, assim como o hilo e a micrópila são permeáveis até determinada fase de desenvolvimento da semente, tornando-se após, impermeáveis à água.

Para verificar essa característica do hilo, os autores (RANATHUNGE et al., 2010) avaliaram a permeabilidade dessa estrutura em diferentes fases de formação das sementes de soja após a antese, utilizando-se para isso uma solução com o corante PTS (Trisodium, 3-hydroxy-5,8,10-pyrene trisulfonate). Segundo os resultados, a entrada de água através do hilo apresentou uma diminuição ao longo do tempo, cessando aos 75 dias após a antese, verificando-se, nessa fase, a formação de uma zona de abscisão. Desde então, esse passou a ser impermeável à água.

Ainda, verificou-se que a cutícula está completamente formada antes de a semente terminar a sua expansão, o que provoca fissuras na região dorsal da semente em função de pressões hidrostáticas internas da mesma, promovendo assim, a permeabilidade do tegumento. Já nas sementes consideradas não permeáveis, verificou-se ausência dessas fissuras na cutícula externa, atribuindo-se tal resultado, à maior flexibilidade da cutícula do tegumento impermeável quando comparado ao tegumento permeável, no período em que a semente ainda está em expansão. No entanto, este processo não está completamente elucidado (RANATHUNGE et al., 2010).

Segundo Shao et al. (2007), a cutícula dos tegumentos semi-permeáveis contém maiores quantidades de ácidos graxos hidroxilados, quando comparado aos tegumentos permeáveis. Essa diferença na composição da cutícula pode alterar a sua resistência mecânica ou a integridade bioquímica, proporcionando uma justificativa para as diferenças fenotípicas entre rachaduras cuticulares e a permeabilidade à água. A evidência experimental para tal explicação foi obtida pela remoção destes ácidos graxos presentes na cutícula, através da aplicação de álcali quente. Como resultado, verificou-se maior permeabilidade dos tegumentos semi-permeáveis quando comparado ao próprio tegumento naturalmente permeável. Como a cutícula é um produto sintetizado e secretado pelas células da camada

paliçádica do tegumento, revela-se, neste caso, a importância destas duas estruturas para a permeabilidade dos tegumentos da soja.

Esse resultado vem ao encontro do que Qutob et al. (2008) constataram. Segundo os pesquisadores, além da cutícula (MA et al., 2004), a permeabilidade do tegumento da soja pode estar relacionada, também, à camada paliçádica subjacente. Neste caso, a referência foi em relação aos danos que a camada paliçádica sofreria pela formação de fissuras, no caso de sementes permeáveis.

Além de conferir a permeabilidade às sementes, a camada paliçádica, também conhecida como epiderme, é responsável pela resistência mecânica dos tegumentos, estando esta característica relacionada à concentração de lignina (ALVAREZ et al., 1997).

Algumas evidências quanto à flexibilidade da cutícula foram apresentadas por López-Casado et al. (2007) e Shao et al. (2007) em frutos de tomate e em sementes de soja, respectivamente. Segundo os pesquisadores, a flexibilidade ou não, da cutícula externa do tegumento, está relacionada à complexidade dos carboidratos que compõem a cutina, durante o processo de formação do tegumento. Tudo indica que a cutina, constituinte da cutícula e composta de carboidratos complexos (ramificados) garante ao tegumento maior resistência à expansão interna da semente ou fruto. Já, quando a cutina é composta, na sua maior parte, por carboidratos que não formam ramificações, a resistência da cutícula é menor, levando à formação de fissuras do tegumento na região dorsal da semente com o processo de expansão desta. Tais resultados ainda precisam ser mais bem explorados, através de novas pesquisas, para se obter o total esclarecimento do funcionamento desse processo.

Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a permeabilidade do tegumento da semente tem sido atribuída às mutações dos genes LAC15 (LIANG et al., 2006) e GPAT5 (BEISSON et al., 2007). O gene LAC15 está, provavelmente, envolvido na biossíntese de lignina, resposta aos estresses (LIANG et al., 2006) e à manutenção da estrutura da parede celular e sua integridade (RANOCHA et al., 2002). Por sua vez, o gene GPAT5 atua na biossíntese de suberina. Segundo Santos et al. (2007), o processo de lignificação do tegumento é importante, conferindo resistência mecânica ao tecido e protegendo a parede celular do ataque de microrganismos.

Para Alvarez et al. (1997), um bom indicativo da resistência mecânica do tegumento de soja é este apresentar valores superiores à 5% de lignina.

Estudo desenvolvido por Mertz (2007) evidenciou que existem outras características que conferem a permeabilidade dos tegumentos além da cutícula, como apontado por Ma et al. (2004). Segundo a autora, características como a espessura das camadas da epiderme e hipoderme, a presença de pigmentos e o formato e organização das células, também influenciariam na permeabilidade dos tegumentos de soja. Esse resultado é importante, visto que a pesquisa bastante detalhada realizada por Ranathunge et al. (2010), considerou três genótipos com níveis distintos de permeabilidade, mas não distintos em coloração, sendo os mesmos de coloração amarela.

O tegumento semi-permeável é uma característica muito importante no que concerne à suscetibilidade da semente à deterioração de campo, devido ao fato de que esta tende a sofrer menos com o processo de flutuação de umidade do ar após a maturidade fisiológica, proporcionando com isso, maiores chances de sobrevivência às condições adversas do ambiente, com reduzida perda de qualidade (PESKE & PEREIRA, 1983). O processo de deterioração por umidade é irreversível e inexorável, sofrendo variação em função da espécie, das cultivares e, até mesmo, entre sementes de um mesmo lote (ZIMMER, 2012).

Por serem higroscópicas, as sementes estão sujeitas às flutuações de umidade do ambiente, podendo ocorrer expansões e contrações sucessivas do seu volume, as quais ocasionarão a formação de rugas no tegumento, na região oposta ao hilo. Esse processo pode culminar com o rompimento do tegumento, assim como dos tecidos embrionários, prejudicando as membranas celulares, e comprometendo a qualidade fisiológica da semente. Além disso, essa deterioração torna as sementes mais suscetíveis aos danos mecânicos e à infecção por microrganismos (FRANÇA-NETO et al., 2000).

Outro ponto positivo dos tegumentos semi-permeáveis é a sua menor porosidade e a maior quantidade de cera, que entre outros fatores, têm influência direta no tempo de armazenamento, maior resistência ao ataque de pragas e doenças e menores danos por embebição, o que confere maior vigor às sementes (SOUSA & MARCOS-FILHO, 2001).

### 2.1.2. Coloração dos tegumentos de sementes de soja

A coloração dos tegumentos também tem sido associada com diversas funções junto às sementes. Segundo Webb et al. (1995), a coloração escura dos tegumentos de soja tem contribuído para a tolerância aos nematóides formadores de galhas. Mansur et al. (1998) também verificaram efeito positivo associado à tolerância à seca, quando a coloração escura se manifestava nas sementes de soja. Contudo, a sua genética é bastante complexa, envolvendo vários genes que controlam o acúmulo de produtos como antocianinas e proantocianidinas (PALMER et al., 2004).

Genes que controlam a cor da flor podem também influenciar a coloração do tegumento da soja (ZABALA & VODKIN, 2005; BHARTIYA et al., 2011). Por exemplo, o locus que confere a cor púrpura nas flores de soja codifica uma flavona-3-hidroxilase que afeta a pigmentação das sementes com tegumento preto (ZABALA & VODKIN, 2007). Porém, outros genes têm efeitos distintos sobre a flor e a coloração do tegumento das sementes de soja, pois o ramo delphinidina da antocianina predomina na flor, enquanto o ramo cianidina parece estar relacionado com a cor do tegumento (ZABALA & VODKIN, 2007).

Os três mais importantes *loci* que conferem a pigmentação dos tegumentos e do hilo das sementes de soja são *I*, *R* e *T*. O locus *I* controla a distribuição do pigmento no tegumento, enquanto que os *loci* *R* e *T* influenciam a sua cor (CHANDLEE & VODKIN, 1989). Segundo Clough et al. (2004) e Tuteja et al. (2004), o locus *I* é responsável por codificar um grupo de genes da chalcona sintase, determinando a distribuição espacial da pigmentação do tegumento, sendo que o gene *I* dominante é responsável pela coloração amarela da soja, havendo, nesse caso, diminuição significativa dos níveis de mRNA dos genes da chalcona sintase no tegumento.

Outro gene que influencia a pigmentação de sementes e também a pubescência das plantas tem sido isolado e atribuído ao locus *T*. O alelo *T* dominante codifica uma enzima funcional citocromo P450 correspondente a um flavonóide-3-hidroxilase (TODA et al., 2002; ZABALA & VODKIN, 2003). A relação

entre a cor da pubescência e a do tegumento também foi observada por Vernetti & Vernetti Júnior (2009). Os autores mencionam que os alelos que controlam a cor da pubescência (*T*), também influenciam a cor do tegumento.

A alteração do padrão de hidroxilação do anel B do flavonóide não só pode mudar a cor do tegumento como também a sua integridade. Uma combinação dos alelos recessivos *i* e *t* resultam em defeitos no tegumento, como fissuras e fendas profundas (ZABALA & VODKIN, 2003), que podem também ser causadas pelo nível de enchimento da semente, temperatura, dentre outros fatores (NAKAMURA et al., 2003; BENITEZ et al., 2004; GITHIRI et al., 2007).

As respostas biológicas atribuídas aos organismos vivos, neste caso as sementes de soja com tegumentos contrastantes, são controladas por genes ou conjunto de genes que apresentam expressão diferencial em determinada condição ou tecido (HENNING, 2010). E, para obter a compreensão necessária deste processo que ocorre em nível de DNA, as ferramentas biotecnológicas são indispensáveis.

## **2.2. Biotecnologia aplicada à ciência e tecnologia de sementes**

A contribuição da biotecnologia na área de sementes é inquestionável. Através dos estudos em nível de DNA, com a aplicação de técnicas específicas, tem sido possível a geração de informações relevantes para o entendimento de muitos processos envolvidos com a qualidade das sementes, especialmente os relacionados com tegumentos de sementes de soja contrastantes (CLOUGH et al., 2004; TUTEJA et al., 2004; LIU et al., 2007; ZABALA & VODKIN, 2007; RANATHUNGE et al., 2010).

Uma dessas contribuições veio da pesquisa realizada por Mertz (2010). No estudo em questão foi avaliada a expressão diferencial de fragmentos de genes de dois genótipos de soja com tegumentos contrastantes quanto à permeabilidade e à coloração, através da técnica AFLP (ZABEAU, 1993; VOS et al., 1995). A pesquisadora prospectou sete fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os tegumentos e comparou os mesmos com sequências de bancos de dados

públicos de DNA e proteínas e a literatura disponível. Como resultado, observou-se funções diversas das proteínas identificadas. Uma delas é um flavonóide 3'-hidroxilase, relacionada com a coloração do tegumento da semente e sua integridade estrutural (MOÏSE et al., 2005). Também identificou-se uma arabinogalactana (FLA14 – *fasciclin-like arabinogalactan proteins* - FLAs), que provavelmente participa da regeneração da parede celular secundária (FRIEDMANN et al., 2007; HUANG et al., 2008; YANG et al., 2008). Além destas, outras proteínas relacionadas à defesa contra patógenos, estresses bióticos e abióticos, divisão celular e crescimento de órgãos de plantas e fatores de transcrição, foram identificadas (GODOY et al., 2000; HE & GAN, 2004; TIAN et al., 2004; LI et al., 2005; HU et al., 2009).

Monzón (2012) também realizou estudo com tegumentos de soja contrastantes quanto à permeabilidade e à coloração. Com base nas descobertas realizadas por Mertz (2010), a pesquisa em questão teve foco na proteína FLA14, que de acordo como descrito anteriormente, provavelmente participa da síntese de parede celular secundária (FRIEDMANN et al., 2007; YANG et al., 2008). O trabalho objetivou gerar e validar iniciadores capazes de quantificar a expressão gênica da referida proteína em quatro genótipos de soja, sendo dois de tegumentos pretos e dois de tegumentos amarelos, aos 50 dias da sua formação após a antese. A técnica utilizada foi a qPCR. Como resultado, verificou-se que a expressão do gene FLA14 foi quantitativamente superior nos genótipos de soja de tegumentos pretos em relação aos de tegumentos amarelos. Essa informação vai além da simples expressão diferencial de um gene. A mesma vai ao encontro de diversas pesquisas que identificam na parede celular e na presença de lignina uma forma de maximizar a qualidade das sementes.

A qualidade das sementes está relacionada à suscetibilidade do tegumento e consequentemente à fragilidade da própria semente. Sementes com tegumentos mais resistentes, os quais podem ser atribuídos ao maior conteúdo de lignina, menor porosidade e coloração preta, resistem mais aos danos mecânicos provocados pela colheita e processos pós-colheita, apresentam menor deterioração de campo, maior tolerância ao ataque de pragas e doenças e maior longevidade (PESKE & PEREIRA, 1983; TAVARES et al., 1987; ALVAREZ et al., 1997; SOUSA &

MARCOS-FILHO, 2001; FLOR et al., 2004; TUTEJA et al., 2004; CAPELETI et al., 2005; SANTOS et al., 2007; RANATHUNGE et al., 2010).

Com base nesses conhecimentos, a aplicação de técnicas de biologia molecular aliadas às estratégias para modificação e entendimento do controle genético do desenvolvimento do tegumento, propriedades e características, podem contribuir para a geração de constituições superiores, refletindo na qualidade das sementes produzidas (MIRANDA, 2008).

Seguindo essa linha, Henning (2007) realizou o cruzamento da cultivar de soja CD 202 (tegumento amarelo e permeável) com o genótipo TP (tegumento preto e semi-permeável). Na população gerada pelo cruzamento, o pesquisador construiu um mapa genético do tegumento utilizando marcadores microssatélites (600 iniciadores), RAPD (50) e AFLP (64) e buscou comparar os marcadores microssatélites utilizados na construção do mapa com proteínas codificadas pelas sequências ancoradas por estes marcadores no banco de ESTs da soja. Para a construção do mapa foram utilizados 20 marcadores microssatélites, 2 RAPD e 11 AFLP, os quais formaram 13 grupos de ligação. Dos marcadores microssatélites selecionados, quatro deles apresentaram homologia com o banco de ESTs (sequências expressas marcadas) da soja, estando relacionados de forma indireta com a qualidade das sementes.

Por exemplo, o marcador *Satt070* apresentou homologia com o complexo F-box, que de acordo com Kipreos & Pagano (2000), atuam na regulação do crescimento do citoesqueleto, estando relacionado com a parede celular que confere resistência ou suscetibilidade ao tegumento. O marcador *Satt094* obteve homologia com a enzima *Phytoene synthase*, a qual está envolvida com a pigmentação do tegumento (LICHTENTHALER et al., 1997). Já o marcador *Satt424* apresentou homologia com duas enzimas, a *Isoflavone reductase*, que atua na síntese de flavonóides e a *Pinoresinol-lariciresinol reductase*, que está envolvida com a síntese de lignina (HENNING, 2007).

Essa pesquisa revela a importância, para o sistema produtivo como um todo, da melhor relação que deve existir entre os programas de melhoramento da soja e pesquisadores da área de sementes, buscando desenvolver cultivares com

constituições genéticas superiores, relacionadas à produtividade, resistência à pragas e doenças e também, à qualidade das sementes.

Como se pode observar, a pesquisa na área da biologia molecular associada ao controle da qualidade das sementes tem evoluído rapidamente e, novas técnicas têm-se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares (VASCONCELOS et al., 2010). Estes auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, a identificação e a preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo o processo produtivo. Contudo, é necessário avançar nas pesquisas para se obter mais respostas quanto à expressão de genes que atuam no tegumento das sementes, com reflexo direto na qualidade destas.

Assim, o uso de técnicas como a da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) é uma alternativa, uma vez que as quantidades de mRNA convertidos em cDNA e amplificados na reação podem ser monitoradas a cada ciclo pela fluorescência emitida durante a reação (LOGAN et al., 2009). Com a finalização de cada ciclo, cada par de iniciadores sintetizam a sequência complementar, aumentando de forma exponencial, enquanto as sequências mais longas acumulam-se de uma forma linear, desde que as quantidades de DNA de partida estejam apropriadas (ARGYROPOULOS et al., 2006).

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Ensaio I - Expressão relativa dos genes alvos**

##### **3.1.1. Obtenção do material vegetal**

O experimento foi instalado em casa de vegetação junto à Embrapa Clima Temperado - Estação Terras Baixas (CPACT/ETB), localizada no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul.

Quatro genótipos de soja contrastantes para as características de tegumento foram utilizados, as cultivares CD 202 (convencional) e BMX Potência RR (transgênica) (Anexo A), ambas de tegumentos amarelos, permeáveis e consideradas suscetíveis à deterioração, e os genótipos TP e IAC, ambos de tegumentos pretos, semi-permeáveis e mais resistentes à deterioração (MERTZ, 2007).

As plantas foram cultivadas em baldes plásticos de 8,5 litros, tendo como substrato solo de lavoura peneirado. Previamente à semeadura, misturou-se ao solo uma formulação NPK 05-20-20. Além disso, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, na forma de inoculante turfoso. Para cada genótipo foram semeadas seis sementes por vaso. Após a emergência procedeu-se o desbaste, deixando apenas duas plântulas por vaso.

O controle da umidade do solo foi realizado através de monitoramento diário, aplicando-se água quando necessário. Nos estádios vegetativos V4 e V8 (FEHR &

CAVINESS, 1977) foram realizadas aplicações foliares de micronutrientes à base de manganês, cobre e zinco (Mancozin, 250mL por hectare em cada aplicação). Além de uma aplicação de enxofre em V8 (Thiotrac, 2L por hectare).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado sendo que, para cada genótipo, foram utilizadas cinco repetições de duas plantas, totalizando 20 unidades experimentais.

A semeadura foi sincronizada de forma que o florescimento dos genótipos fosse concomitante. Por serem cultivadas em casa de vegetação, a interferência de fatores ambientais sobre a expressão gênica nas plantas foi minimizada, quando comparada ao cultivo em ambiente aberto (condição de campo), onde há a exposição a maiores oscilações do ambiente edafoclimático. Mesmo assim, a partir da antese, realizou-se a marcação de flores, para que todas as sementes amostradas estivessem na mesma fase de desenvolvimento. Foram realizadas sete coletas de legumes em intervalos de cinco dias (25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 dias após a antese) para cada genótipo.

Imediatamente após a coleta, as sementes, ainda nos legumes, foram acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas ao Laboratório de Sementes e Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, onde os tegumentos foram separados das sementes com o auxílio de lâminas esterilizadas, tomando-se o cuidado de manter o tecido vegetal livre de impurezas, sem nenhum resquício de cotilédones ou qualquer outro tecido que não fosse tegumento. Depois de separados das sementes, os tegumentos de cada genótipo foram armazenados em ultrafreezer, a - 80°C, até o procedimento de obtenção de RNA.

### **3.1.2. Extração de RNA**

Previamente ao procedimento de extração e obtenção do RNA dos tegumentos de soja, realizou-se a esterilização de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos e demais utensílios em autoclave, por 45 minutos à temperatura de 130°C.

A extração foi realizada em um mesmo momento para todos os tratamentos (épocas de amostragem e genótipos), em triplicata. Para tanto, procedeu-se primeiramente a maceração das amostras de tegumento com nitrogênio líquido até se obter 0,08 a 0,1g de tecido finamente moído, transferindo-o para microtubo com volume de 1,5 mL e adicionando-se na sequência 500 µL de *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen™).

A solução foi homogeneizada com movimentos circulares leves e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente em posição horizontal para maximizar a área de contato. Posteriormente procedeu-se a centrifugação, também em temperatura ambiente, à rotação de 12.000 giros, por cinco minutos. O sobrenadante, então, foi transferido para um novo microtubo, acrescentando-se 100 µL de NaCl (5M) e 300 µL de clorofórmio, realizando-se uma nova centrifugação, esta com 12.000 giros por 15 minutos, à temperatura de 4°C. A fase aquosa (superior), em torno de 450 µL, foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, acrescentando-se igual volume de isopropanol, deixando a solução, após leve homogeneização, em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Logo após, nova centrifugação foi realizada, com 12.000 giros de rotação, por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, o sobrenadante foi vertido, tomando-se o cuidado de manter o *pellet* no microtubo. Adicionado 1 mL de etanol 75%, centrifugou-se esta solução por três minutos a 12.000 giros e à temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, manteve-se apenas o *pellet* no microtubo, acrescentando 25 µL de água RNase-free para solubilizar o RNA. Por fim, a solução contendo RNA permaneceu por 30 minutos a -20°C para a diluição completa do *pellet*.

Após este procedimento, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (*Kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* -Invitrogen™) e tiveram sua pureza e integridade mensuradas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, e através de análises de absorbância (260/280 nm), utilizando-se espectrofotômetro NanoVue (*Plus Spectrophotometer*). Depois de analisadas, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer à temperatura de - 80°C para conservação até a próxima etapa.

### 3.1.3. Síntese de cDNA

Antes da obtenção do cDNA, as amostras de mRNA foram tratadas com a enzima DNase I (Invitrogen<sup>TM</sup>), sendo estas padronizadas visando uniformizar sua concentração, com base no cálculo  $1000/\text{concentração de mRNA}$ . Depois de padronizadas as amostras de mRNA, estas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL, onde acrescentou-se 1  $\mu\text{L}$  de DNase, 1  $\mu\text{L}$  de *10 x DNase I Reaction Buffer* e água DEPC (*Diethylpyrocarbonate*) até completar o volume de 10  $\mu\text{L}$ . Em seguida, a solução foi mantida em repouso à 25°C durante 15 minutos. Para inativar a DNase adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de EDTA à solução, levando esta ao termociclador Techne, modelo TC-412, por um período de 10 minutos à temperatura de 65°C.

Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa utilizando a enzima *SuperScript III*<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>), conforme recomendações do fabricante. Para tanto, adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de OligoDT e 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados), retornando a solução ao termociclador por 5 minutos a 65°C. Logo após, acrescentou-se 2  $\mu\text{L}$  de RT Buffer, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu\text{L}$  de DTT, 1  $\mu\text{L}$  de RNA out e 1  $\mu\text{L}$  de *Superscript III*<sup>®</sup>, levando esta solução ao termociclador por 50 minutos a 50°C. Ao término desta etapa, as amostras foram mantidas por 10 minutos a 25°C e, em seguida, foram incubadas novamente por 50 minutos a 50°C, finalizando com extensão de cinco minutos a 85°C.

Para avaliar a qualidade do cDNA obtido, foi realizada uma PCR semi-quantitativa utilizando-se 6,25  $\mu\text{L}$  de *GoTaq® Green Master Mix*; 2  $\mu\text{L}$  de cDNA de cada amostra; 2,75  $\mu\text{L}$  de água DEPC; e 2,50  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -actina (10  $\mu\text{M}$ ) como normalizador; realizando-se a visualização em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio. A pureza e a integridade do cDNA também foram mensuradas para garantir a qualidade do material utilizado.

#### **3.1.4. Seleção dos genes alvos**

A seleção dos genes alvos do estudo baseou-se na ampla revisão sobre formação de sementes e tegumentos realizada por Moïse et al. (2005) e, também, no trabalho realizado por Mertz (2007), que identificou fragmentos de genes em sementes de soja com tegumentos contrastantes quanto à sua qualidade. Além disso, se buscou junto aos bancos públicos de dados, como NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), outros genes possivelmente envolvidos com a qualidade das sementes de soja.

Com base nessa pesquisa, selecionaram-se para o estudo oito genes alvos, apresentados na Tabela 1.

#### **3.1.5. Seleção dos genes normalizadores**

A escolha dos genes normalizadores baseou-se no trabalho de Hu et al. (2009). A partir dos resultados obtidos pelos pesquisadores, quanto aos genes normalizadores mais apropriados para a soja, optou-se pela escolha de cinco normalizadores para serem testados preliminarmente, ACT11, SKIP16, UKN1, UKN2 e  $\beta$  ACTINA. Para a avaliação da estabilidade dos normalizadores, oito amostras aleatórias de cDNA foram utilizadas, optando-se pelos dois normalizadores que apresentaram menor variação de expressão nas mesmas (Anexo B).

#### **3.1.6. Desenho dos iniciadores**

Para o desenho dos iniciadores realizou-se uma busca pelas sequências de ESTs das proteínas correspondentes aos genes indicados na Tabela 1 junto ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os iniciadores (Tabela 1) foram desenhados com auxílio do programa Vector NTI Advance 11.0 (INVITROGEN<sup>TM</sup>, 2008), observando os parâmetros de temperatura de anelamento,

tamanho do iniciador, percentagem de GC (40-60%), tamanho do fragmento amplificado, ausência de dimerização e a inexistência de sítios secundários de anelamento.

Tabela 1 - Relação dos genes alvos, acessos e sequências dos iniciadores usados para a qPCR.

Gene/Acesso		Sequência dos iniciadores
VINV1 (XM_003550543.1)	Ss	5' TGGGTCAATGTGCTAGGCCACTGAA 3'
	As	5' TGCTTGCAGGTTGCTGTGACCAAA 3'
SCB1 (AF467554.1)	Ss	5' GTTGATGACAGCCAATGCTGCGTT 3'
	As	5' GATTGCTTTCGGCAAGGGAGTTCTT 3'
SCS1 (NM_001251323)	Ss	5' TTCTCTGGGTTTCGCAGCTCGTCTAT 3'
	As	5' GAGCTTCAGAATGGGGTCAGGGAA 3'
SBP (L06038.1)	Ss	5' GGAAAGCCGTGAAAGGGAAGAAGAA 3'
	As	5' CCCGAATTCTGCCACCTTCAGTTT 3'
LEGINSULIN (D17396.1)	Ss	5' GCCACTTCCACCATAATGTTCCCAA 3'
	As	5' CCTCGAAAGGTGAACATGCACCATT 3'
CHIA1 (AF202731)	Ss	5' CCTTCTTGGGGCCACAGCAGAA 3'
	As	5' GGCTCTGGCAACCTTCTCCACAGTA 3'
SGF14c (HM004361.1)	Ss	5' CGAACGCTATGAAGAAATGGTGGGAAGCA 3'
	As	5' GAAAGAATCCTCCACGAAGCCCTACG 3'
CHS8* (AY237728.1)	Ss	5' TCATTGATAGCATATGGATACCGAAGTTGATGGG 3'
	As	5' CCACCGTCTACTACGACTGTTTGTAGTTTG 3'

\*Ss: senso; As: antissenso.

### 3.1.7. Otimização dos sistemas de amplificação

#### 3.1.7.1. Gradiente de temperatura de anelamento

Para verificar a temperatura de anelamento ótima para cada par de iniciadores foi realizado experimento utilizando gradiente de temperatura entre 50°C e 60°C para os genes alvos e genes normalizadores. Os resultados qualitativos para a presença ou a ausência de amplificação indicaram a temperatura de 60°C como a temperatura ótima.

### 3.1.7.2. Parâmetros de ciclagem

Com base nos resultados do experimento para determinação da temperatura ótima de anelamento, estabeleceram-se os seguintes parâmetros de ciclagem:

Pré-incubação:

1x 95°C por 5 minutos

Amplificação:

45x 95°C por 10 segundos

60°C por 20 segundos

72°C por 20 segundos

Curva de *Melting*:

1x 95°C por 5 segundos

50°C por 1 minuto

98°C contínuo (oito aquisições/grau)

Resfriamento:

1x 40°C por 10 segundos

### 3.1.7.3. Determinação da concentração ótima dos iniciadores

Para determinar a concentração final ótima de cada iniciador (Anexo C) foram realizadas análises utilizando as concentrações de 100, 200 e 400 nM e as recomendações de uso de *Master Mix* comercial, segundo informações detalhadas na Tabela 2. Foi utilizada uma mesma amostra de cDNA para todos os ensaios, a fim de permitir a comparação final dos resultados.

Tabela 2 - Mistura de reação utilizada para determinar a concentração final de cada conjunto de iniciadores.

		<b>100 nM</b>	<b>200 nM</b>	<b>400 nM</b>
	1X	1	1	1
<i>MasterMix 2x</i>	12,5	12,5	12,5	12,5
Água	6,5	6,5	5,5	3,5
DNA	5	5	5	5
Total	23	24	23	21
<i>Primer Mix</i> (2,5 µM)	1 (100 nM)	NA	NA*	NA
<i>Primer Mix</i> (2,5 µM)	2 (200 nM)	NA	NA	NA
<i>Primer Mix</i> (2,5 µM)	4 (400 nM)	NA	NA	NA

\*não se aplica.

### 3.1.8. Avaliação de desempenho dos sistemas de amplificação

#### 3.1.8.1. Curvas de dissociação

Depois da quantificação relativa, verificou-se a qualidade do produto amplificado por meio de curvas de dissociação no final da qPCR pelo aumento progressivo da temperatura na reação (Anexo D). Assim, procedeu-se o cálculo relacionado à emissão da fluorescência, avaliando-se a especificidade analítica dos iniciadores através da desnaturação do produto de PCR gerado.

#### 3.1.8.2. Eficiência dos sistemas de amplificação

A eficiência para cada gene foi determinada através da realização de uma curva, com diluições seriadas de 1:3; 1:30; 1:300; e, 1:3000. Após as diluições seriadas foi possível o cálculo da eficiência através do *Slope* de cada curva (Anexo E) seguindo a fórmula abaixo (ZHAO & FERNALD, 2005):

$$E = |10^{(-1/\text{slope})}|-1$$

### 3.1.9. Cálculo da expressão relativa (R)

A análise quantitativa de expressão gênica em tempo real dos genes alvos foi realizada em equipamento Light Cycler 480 Instrument II (96) (*Roche Applied Science*®) usando-se *SYBR*® *Green*. Para a reação de amplificação utilizou-se 12,5 µL de *PCR Master Mix SYBR*® *Green*, 2 µM de cada iniciador (10 mM), 5 µL de cDNA (0,2 µg) e água DEPC em quantidade suficiente para completar o volume final de 25 µL.

As amostras foram alocadas em placas ópticas com 96 poços (*Roche Applied Science*®) e cobertas com adesivos ópticos (*Roche Applied Science*®). As condições de amplificação foram: desnaturação a 50°C por 2 minutos e, 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de três etapas (95°C durante 0,5 minutos, 57°C durante 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e, extensão final a 72°C durante 5 minutos, seguida de curva padrão de dissociação.

No final dos ensaios de reação foi obtido o  $C_q$  (*Quantification Cycle*) (BUSTIN et al., 2009) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. Os dados ópticos foram posteriormente analisados com auxílio do programa Light Cycler® 480 *Gene Scanning Software*.

A expressão relativa (R) dos oito genes alvos foi calculada baseando-se na eficiência da amplificação (E) e no ciclo da PCR, em que se detectou o aumento da fluorescência acima do sinal basal (PFAFFL, 2001).

Depois de obtidos os valores de  $C_q$  (BUSTIN et al., 2009) dos genes alvos, estes foram normalizados a partir dos valores verificados no controle, adotando-se para tal, a coleta de tegumentos realizada aos 25 dias após a antese para o genótipo BMX Potência RR.

$$R = \frac{E_{\text{gene alvo}}^{\Delta C_q (\text{controle} - \text{amostra})}}{E_{\text{gene normalizador}}^{\Delta C_q (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

R: expressão relativa  
E: eficiência de amplificação dos iniciadores  
Cq: (*Quantification Cycle*) = ciclo de PCR no qual se detectou a fluorescência acima do sinal base do equipamento.

### **3.1.10. Procedimento estatístico**

Os resultados de expressão foram avaliados no programa estatístico WinStat, sendo os dados submetidos à análise de variância (Anexo F) e posteriormente comparados por teste de médias, aplicando-se Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## **3.2. Ensaio II - Caracterização química dos tegumentos**

### **3.2.1. Obtenção do material vegetal**

O material vegetal destinado à avaliação da composição química dos tegumentos foi obtido junto ao experimento realizado para obtenção de material vegetal para análise de expressão gênica (Ensaio I), seguindo assim, o mesmo delineamento experimental. No entanto, para essa etapa, foram colhidas as demais sementes que não foram utilizadas na etapa de expressão.

No momento da colheita, os legumes foram destacados manualmente e as sementes coletadas da mesma forma, para preservar a integridade dos tegumentos. Determinou-se a umidade das sementes obtidas, verificando-se não ser necessária a realização de secagem artificial, sendo então realizada a embalagem e armazenamento em câmara fria (15°C e 60% UR) por cinco meses.

Para a determinação da composição química das sementes, os tegumentos foram separados das sementes com auxílio de bisturi, até obter quinze gramas de tegumentos para cada genótipo. Com exceção da determinação de lignina, onde se utilizou cinco gramas de tegumentos puros, foram utilizados para os demais testes 2,5 gramas por genótipo, divididos em cinco repetições.

### **3.2.2. Determinação de compostos fenólicos totais dos tegumentos**

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método adaptado de Swain & Hillis (1959), em que a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 688nm e os resultados expressos em mg de ácido gálico.g<sup>-1</sup> de amostra.

### **3.2.3. Determinação do potencial antioxidante dos tegumentos**

O potencial antioxidante foi determinado através do método utilizado por Brand-Williams et al. (1995) que mede a capacidade de inibição do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$ , equivalente a Trolox.g<sup>-1</sup> de amostra.

### **3.2.4. Determinação de antocianinas totais dos tegumentos**

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método espectrofotométrico adaptado de Lees & Francis (1995), sendo a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm. O conteúdo de antocianinas no tegumento de cada genótipo foi expresso em mg de cianidina-3-glicosídeo.g<sup>-1</sup> de amostra.

### **3.2.5. Determinação de carotenóides totais dos tegumentos**

O teor de carotenóides totais foi determinado segundo método AOAC 970.64 (1990), sendo a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 460nm. O conteúdo de carotenóides foi expresso em  $\mu\text{g}$   $\beta$ -caroteno.g<sup>-1</sup> de amostra.

### **3.2.6. Determinação de lignina dos tegumentos**

A lignina foi determinada a partir da fibra dos tegumentos em detergente ácido, adotando-se o método lignina “Klason”, segundo Van Soest (1967). Para tanto foram utilizadas cinco gramas de tegumento puro para cada genótipo, divididas em cinco repetições de uma grama, sendo o resultado final expresso em percentagem de lignina em relação à massa seca inicial da amostra de tegumentos.

### **3.2.7. Procedimento estatístico**

Para análise dos resultados obtidos em cada teste desse ensaio, visando caracterizar quimicamente os tegumentos contrastantes, foi utilizado o programa estatístico WinStat, sendo os dados submetidos à análise de variância (Anexo F) e posteriormente comparados pelo teste de médias, aplicando-se Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## **3.3. Ensaio III - Caracterização estrutural dos tegumentos**

### **3.3.1. Análise comparativa da estrutura interna dos tegumentos**

Para verificação da distribuição de camadas de células pelo perfil dos tegumentos dos quatro genótipos de soja contrastantes, duas amostras de tegumentos inteiros de cada genótipo foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965 - modificado com a utilização de tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica ascendente e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (ANCAP) com navalha descartável (Feather). As secções com cinco micrômetros de espessura foram coradas com azul de toluidina a

0,05% (SAKAI, 1973), em tampão fosfato e citrato (MCILVAINE, 1921), pH 4,5 e montadas em resina sintética “Entellan” (Merck).

A documentação dos resultados foi realizada através da captura de imagens a partir de lâminas usando câmera Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DM LB.

### **3.4. Ensaio IV – Avaliação das características físicas e fisiológicas das sementes**

#### **3.4.1. Obtenção do material vegetal**

O material vegetal destinado à avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi obtido de plantas cultivadas em canteiros sob as mesmas condições edafoclimáticas para os quatro genótipos.

No momento de colheita, os legumes foram destacados manualmente e as sementes coletadas da mesma forma, para preservar a integridade das mesmas. Determinou-se a umidade das sementes obtidas verificando-se não ser necessária a realização de secagem artificial, sendo então realizada a embalagem e armazenamento em câmara fria (15°C e 60% UR) por cinco meses.

#### **3.4.2. Teste de germinação e primeira contagem**

Para o teste de germinação semearam-se oitocentas sementes de cada genótipo, divididas em cinco repetições e quatro sub-repetições, em rolos de papel filtro, umedecidos 2,5 vezes a sua massa com água destilada. Os rolos, contendo as sementes, foram acondicionados em germinador a 25°C durante oito dias, sendo realizada no final do teste, a contagem de plântulas normais, com resultado expresso em porcentagem (BRASIL, 2009). A primeira contagem foi realizada concomitantemente com o teste de germinação, realizando-se a contagem de

plântulas normais aos cinco dias da instalação do teste, sendo o resultado expresso em percentagem de plântulas normais.

### **3.4.3. Comprimento de plântula**

O comprimento das plântulas foi determinado a partir das plântulas normais provenientes da primeira contagem da germinação, fazendo-se a leitura do comprimento da parte aérea, da raiz e do total de cada plântula e realizando-se a média dos valores obtidos em cada repetição. O resultado foi expresso em centímetros.

### **3.4.4. Teste de germinação e primeira contagem de sementes submetidas à imersão em água**

Cinquenta sementes intactas de cada genótipo, com umidade em torno de 12%, foram divididas em cinco repetições e acondicionadas em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada e mantidas a 20°C por 24 horas. Depois desse período procedeu-se a semeadura das sementes em rolos de papel filtro umedecidos 2,5 vezes a sua massa com água destilada, sendo alocados em germinador a 25°C. Devido ao período de imersão de 24 horas, as sementes ficaram no germinador por sete dias. Ao término deste período avaliou-se a percentagem de plântulas normais para cada genótipo, expressando-se o resultado em percentagem.

A primeira contagem foi realizada concomitantemente com o teste de germinação, realizando-se a contagem de plântulas normais aos quatro dias da instalação do teste, sendo o resultado expresso em percentagem.

### **3.4.5. Comprimento de plântula com imersão das sementes**

O comprimento das plântulas foi determinado a partir das plântulas normais provenientes da primeira contagem da germinação das sementes submetidas à imersão prévia em água, por 24 horas, fazendo-se a leitura do comprimento da parte aérea, da raiz e do total de cada plântula e realizando-se a média dos valores mensurados em cada repetição. O resultado foi expresso em centímetros.

### **3.4.6. Emergência em solo**

Para a avaliação da emergência em solo foram semeadas 50 sementes de cada genótipo, divididas em cinco repetições, sendo cada repetição composta por dois recipientes plásticos de 500 mL, com cinco sementes em cada. A contagem das plântulas emergidas procedeu-se aos 14 dias da semeadura. O resultado foi expresso em percentagem de plântulas normais emergidas.

### **3.4.7. Índice de velocidade de emergência e velocidade de emergência**

O índice de velocidade de emergência das plântulas foi realizado juntamente com o teste de emergência em solo. As contagens das plântulas emergidas foram realizadas diariamente, até estabilização da emergência. Em função de não ser realizado descarte das plântulas em cada contagem, obteve-se valor cumulativo. Dessa maneira, o número de plântulas emergidas, referentes a cada contagem, foi obtido subtraindo-se do valor lido, o valor referente à leitura do dia anterior.

Consideraram-se como emergidas as plântulas que apresentavam os cotilédones não mais em contato com o solo. Com base no número de plântulas emergidas em cada leitura, calculou-se o índice de velocidade de emergência (IVE) (MAGUIRE, 1962) e a velocidade de emergência (VE), de acordo com Edmond & Drapala (1958).

#### **3.4.8. Índice de velocidade de germinação**

Para a determinação do índice de velocidade de germinação semeou-se dez sementes de cada genótipo por repetição, num total de cinco repetições, em caixas tipo gerbox, tendo como substrato papel mata-borrão umedecido 2,5 vezes a sua massa com água destilada. As sementes ficaram acondicionadas em germinador à temperatura de 25°C durante todo o período de avaliação. As leituras foram realizadas diariamente até estabilização da germinação. Os cálculos foram realizados de acordo com Maguire (1962), corrigindo os valores para 100% de viabilidade.

#### **3.4.9. Condutividade elétrica**

O teste de condutividade elétrica aplicado nas sementes foi o massal. Para tanto, dez sementes intactas de cada genótipo, para cada repetição (de um total de cinco), foram pesadas em balança de precisão de 0,0001g, colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada e mantidas a 20°C, por 24 horas. Após, a condutividade elétrica da solução foi medida em condutímetro Digimed CD-20 e os dados obtidos, expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes.

#### **3.4.10. Massa de mil sementes**

A massa de mil sementes foi determinada, para cada genótipo, a partir da contagem aleatória de mil sementes, divididas em cinco repetições de duzentas sementes, corrigindo o valor para 12% de umidade, sendo o resultado expresso em gramas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

#### **3.4.11. Massa dos tegumentos**

Determinada a partir da aferição da massa dos tegumentos retirados de quinhentas sementes de cada genótipo, divididos em cinco repetições de cem tegumentos, em balança de precisão de 0,0001 g, sendo o resultado expresso em gramas.

#### **3.4.12. Razão entre a massa dos tegumentos e a massa das sementes**

A partir da retirada dos tegumentos de quinhentas sementes, pesou-se em balança de precisão de 0,0001 g, as duas partes separadamente, procedendo-se então, a divisão das massas para se obter a relação de massa entre tegumentos e sementes.

#### **3.4.13. Tamanho das sementes**

O tamanho das sementes foi determinado a partir da retenção destas no conjunto de peneiras de diâmetro variando de 3,5mm a 8,0mm, com intervalo de 0,5mm entre peneiras. Para tanto, utilizou-se toda a amostra de sementes previamente pesada em balança de precisão (0,0001g), para cada genótipo, dividida em cinco repetições. Depois de agitar manualmente o conjunto de peneiras por trinta segundos, procedeu-se nova pesagem para cada repetição, a fim de verificar a quantidade de sementes retidas em cada peneira, convertendo o resultado final em percentagem.

#### **3.4.14. Embebição das sementes**

O ganho de água foi determinado em sementes dos quatro genótipos com tamanho padronizado, retidas em peneira 5,5-6,0. Utilizaram-se cinco repetições de

dez sementes para cada genótipo, colocadas em copos plásticos de 200 mL, sendo adicionados 65 mL de água destilada. A massa das sementes foi determinada em balança de precisão (0,0001g), com leituras nas primeiras doze horas, a cada 30 minutos; das 12 às 28 horas, de hora em hora; das 28 às 36 horas, a cada duas horas; e das 36 às 42 horas, a cada três horas.

#### **3.4.15. Protrusão radicular**

Avaliação realizada juntamente com o teste de embebição das sementes, em que se registrou o momento exato da protrusão da radícula das primeiras sementes de cada genótipo.

#### **3.4.16. Procedimento estatístico**

Para análise dos resultados obtidos nos testes desta etapa, visando avaliar a qualidade física e fisiológica das sementes de cada genótipo, foi utilizado o programa estatístico WinStat, sendo os dados submetidos à análise de variância (Anexo F) e posteriormente comparados por teste de médias, aplicando-se Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Exceção ao teste de embebição das sementes, ao qual se aplicou análise de regressão.

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Ensaio I - Expressão relativa dos genes alvos**

A análise de variância indicou que ocorreu interação entre genótipos contrastantes e fases de desenvolvimento dos tegumentos de sementes de soja (dias após a antese) para todos os genes avaliados (Anexo F). Dessa forma, os dados médios de expressão foram comparados entre os genótipos, para cada fase de desenvolvimento dos tegumentos e, entre fases de desenvolvimento para cada genótipo, sendo os resultados apresentados na sequência, de forma individual, para cada gene alvo.

#### **4.1.1. VINV1**

A enzima invertase (VINV1) catalisa a clivagem da sacarose em glicose e frutose, estando presente em diversos locais das plantas, incluindo parede celular, vacúolos e citoplasma (WEBER et al., 1995; RUAN et al., 2010; VARGAS & SALERNO, 2010; PATRICK et al., 2013).

Nas sementes, a invertase atua com maior intensidade, provavelmente, na fase em que o embrião está em intensa mitose, sendo expressa na área de descarga do tegumento da semente, elevando com isso, a concentração de solutos e conseqüentemente a entrada de água na semente, contribuindo assim, para o turgor e expansão celular (TURGEON, 2010).

Em relação à expressão da invertase em tegumentos de soja contrastantes, no presente estudo, foi possível verificar diferença entre os genótipos e também, entre as fases de desenvolvimento dos tegumentos, como pode ser visualizado na Figura 1.

#### Expressão relativa do gene VINV1 entre genótipos contrastantes

O nível de expressão do gene VINV1, aos 25 e 45 dias após a antese (DAA) foi maior no genótipo BMX Potência RR em relação aos demais. Já aos 30, 35, 40 e 55 DAA, houve maior expressão do respectivo gene no genótipo TP. Porém, não diferindo aos 35 e 55 DAA do genótipo BMX Potência RR, assim como de IAC aos 55 DAA.

Aos 50 DAA a expressão foi maior no genótipo CD 202, seguido de BMX Potência RR e IAC, que não diferiram entre si.

O gene VINV1 é homólogo à invertase estudada por Weber et al. (1995) em *Vicia faba* L.. Segundo o autor, esta contribuiu para a transformação de sacarose em hexoses, principalmente na etapa de pré-armazenamento. Logo, subentende-se maior expressão do gene VfVINV1 nos estádios iniciais de desenvolvimento das sementes, que se encontram em plena divisão celular (BORISJUK et al., 1998). Essa associação foi confirmada por Miller & Chourey (1992) em mutantes de milho deficientes nesta enzima, em que os pesquisadores constataram intensa degeneração embrionária precoce nestes materiais.

No entanto, segundo Elliott et al. (1993), as invertases também estão envolvidas na maturação dos frutos e, possivelmente, regulam os níveis de hexoses em tecidos maduros e a mobilização de sacarose armazenada nos vacúolos. Assim, os níveis de expressão variáveis verificados em algumas fases de desenvolvimento dos tegumentos, em alguns genótipos, podem ser devidamente explicados.

### Expressão relativa do gene VINV1 entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

No genótipo BMX Potência RR, os resultados de expressão do gene VINV1 foram maiores aos 25 DAA (dias após a antese). Já, os menores valores de expressão do gene, para o respectivo genótipo, foram verificados aos 30 e 50 DAA, observando-se, neste caso, um padrão de expressão maior no início do desenvolvimento dos tegumentos. O crescimento do embrião dentro dos limites do legume está correlacionado com o esmagamento das camadas de células internas do tegumento. Logo, esta compressão compromete o correto desenvolvimento das paredes celulares do tegumento, um dos locais de síntese de invertases, afetando assim, a plena função destas e consequentemente interrompendo o crescimento do embrião (Weber et al., 1995). Em virtude disso, a expressão do respectivo gene é menor, de uma maneira geral, na fase final de formação dos tegumentos.

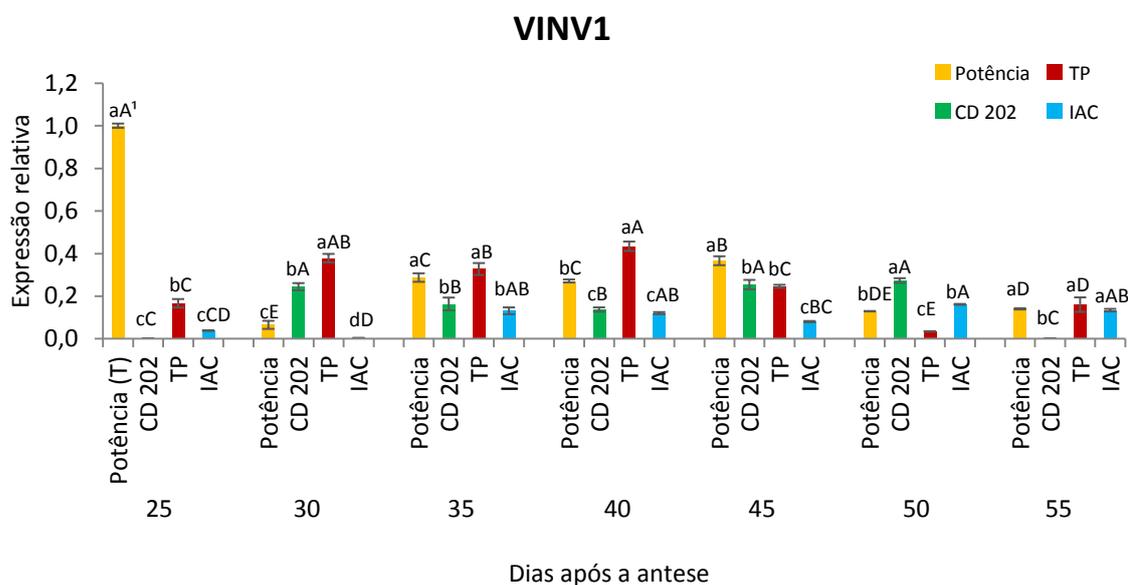


Figura 1 – Expressão relativa do gene VINV1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A fisiologia molecular de descarga de fotossintatos e particionamento destes durante o desenvolvimento de sementes de *Vicia faba* L. tem sido estudada por Weber et al. (1995). Os referidos pesquisadores têm observado que, durante a fase de pré-armazenamento, altos níveis de hexoses nos cotilédones e no espaço apoplástico estão correlacionados com a atividade da invertase ligada à parede do tegumento, atribuindo à mesma o papel de mediadora e força propulsora para a atividade de dreno das sementes. Além disso, estas invertases atuam junto ao ciclo celular, promovendo a divisão e expansão das células (CHOPRA et al., 2005; BIHMINE et al., 2013).

Em relação ao genótipo CD 202, a maior expressão do gene foi observada aos 30, 40 e 45 DAA, com reduzida expressão aos 25 e 55 DAA.

Para o genótipo TP, a maior expressão do gene ocorreu aos 30 e 40 DAA, não diferindo esta primeira época mencionada dos 35 DAA. Já, a menor expressão do gene, para este genótipo, ocorreu aos 50 DAA. Para IAC, o padrão de expressão superior do gene foi verificado mais ao final do desenvolvimento do tegumento, ou seja, aos 50 DAA, porém, sem diferir da expressão observada aos 35, 40 e 55 DAA. No caso específico deste genótipo, a menor expressão ocorreu na fase inicial de desenvolvimento dos tegumentos, ou seja, aos 30 DAA, não diferindo dos 25 DAA.

#### **4.1.2. SCB1**

Genes contendo domínio BURP, como o SCB1, compreendem uma grande família presente em organismos vegetais, porém, com funções não muito bem compreendidas até o momento (GAN et al., 2011). Muitas proteínas BURP têm sido isoladas, tendo apresentado padrões de expressão diversos, em função da espécie, dos tecidos estudados e das fases de desenvolvimento destes. SALI3-2 e SALI5-4a apresentaram expressão diferencial em plantas submetidas ao estresse por alumínio, enquanto BNM2, encontrada nos vacúolos das células de *Brassica napus* L., mostrou-se atuante no acúmulo de proteínas de reserva (DATTA et al., 1993; RAGLAND & SOLIMAN, 1997; TEERAWANICHPAN et al., 2009).

Dezessete genes com domínio BURP foram identificados por Ding et al. (2009). Segundo os pesquisadores, a maior parte destes genes apresentou expressão diferencial quando as plantas foram submetidas a estresses abióticos, como seca, frio, sal e fornecimento de ácido abscísico. Da mesma forma como constatado por Shao et al. (2011) em *Populus trichocarpa* Thorr & Gray.

No caso da soja, mais especificamente no tegumento das sementes, Batchelor et al. (2002) também identificou uma proteína com domínio BURP, sendo este gene prospectado e avaliado o seu nível de expressão no presente estudo, como pode ser verificado na sequência.

#### Expressão relativa do gene SCB1 entre genótipos contrastantes

A maior expressão do gene SCB1, aos 25 DAA, foi observada no genótipo CD 202, sendo significativamente superior em relação aos demais, que não apresentaram diferença entre si. Situação semelhante foi observada aos 30 DAA, em que houve superioridade da expressão do gene para o referido genótipo, porém, com elevação da expressão sendo observada, também, nos genótipos BMX Potência RR e IAC, que não diferiram entre si e, com menor expressão sendo constatada no genótipo IAC (Figura 2).

A partir dos 35 DAA a expressão do gene SCB1 foi reduzida em todos os genótipos, não se verificando diferença entre os mesmos.

A proteína SCB1 (*Seed Coat BURP domain protein 1*), segundo Batchelor et al. (2002), é expressa, especificamente, no tegumento de sementes de soja no início do seu desenvolvimento. O mRNA do gene se acumula, primeiramente, nas paredes internas do parênquima tegumentar e, posteriormente, nas paredes mais externas. Esse acúmulo ocorre antes da maturação desta estrutura e do enchimento da semente. Esse padrão de expressão se deve à possível função atribuída a este gene, que estaria atuando na formação, mais especificamente na diferenciação das células do parênquima do tegumento de sementes e também na alocação de proteínas na matriz da parede celular.

Além disso, a presença de espaços intercelulares na zona de descarga de nutrientes para o embrião tem evidenciado que estes chegam pela via apoplástica,

podendo estar o gene SCB1 diretamente envolvido no processo de diferenciação dessas células, formando aerênquimas (YAKLICH, 1995; MILLER et al. 1999).

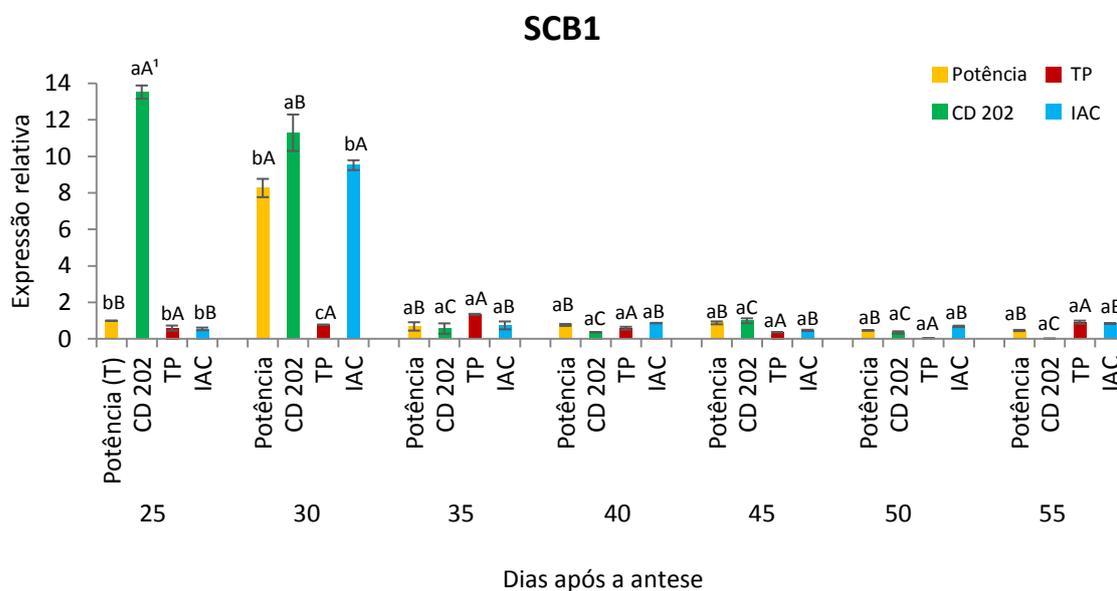


Figura 2 – Expressão relativa do gene SCB1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### Expressão relativa do gene SCB1 entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

Ao analisar a expressão do gene SCB1, no genótipo BMX Potência RR, observou-se que esta foi maior aos 30 DAA, não havendo diferença entre as demais fases de desenvolvimento do tegumento.

Diferentemente do observado para BMX Potência RR, no genótipo CD 202, a maior expressão ocorreu aos 25 DAA, seguida dos 30 DAA. Em relação às demais fases de desenvolvimento dos tegumentos, para este genótipo, não se verificou diferença de expressão para o gene em questão (Figura 2).

Apesar da maior expressão do gene SCB1 nos estádios iniciais de desenvolvimento dos tegumentos, ou seja, aos 25 e 30 DAA, no presente estudo, Batchelor et al. (2002), constatou maior expressão deste gene de forma ainda mais

precoce, aos nove e doze dias após a antese. Já aos 18 DAA, esta expressão foi praticamente nula.

Em relação ao genótipo TP, não se observou diferença de expressão deste gene em relação às fases de desenvolvimento dos tegumentos. Situação semelhante foi observada para IAC, com exceção da expressão superior verificada aos 30 DAA.

Apesar das possíveis funções atribuídas ao gene SCB1, ainda é prematuro afirmar a exata função deste gene, havendo a necessidade de novas pesquisas para elucidar com precisão qual o seu real papel na formação inicial dos tegumentos da soja.

#### **4.1.3. SCS1**

O gene SCS1 foi especificamente identificado na parede celular do parênquima derivado do integumento externo de sementes de soja, sendo integrante da superfamília subtilase. Em eucariotos, subtilisinas são moléculas reguladoras importantes, que regem o processamento e maturação de peptídeos ativos, tais como os hormônios vegetais (BARR, 1991).

Além disso, estudos têm atribuído às subtilisinas a função de um peptídeo sinal de defesa da planta, ativando genes relacionados à defesa contra estresses bióticos e abióticos (PEARCE et al., 2010) e também, exercendo papel importante na degradação de proteínas de armazenamento durante o processo de germinação de sementes de soja (TAN-WILSON et al., 2012). Porém, esta superfamília tem sido pouco estudada e, portanto, as funções específicas dos genes que a integram ainda não estão completamente esclarecidas, especialmente quando se trata de tegumentos de sementes (BEILINSON et al., 2002).

O gene SCS1, prospectado em sementes de soja por Batchelor et al. (2000), foi avaliado no presente estudo, sendo os resultados obtidos, apresentados a seguir.

### Expressão relativa do gene SCS1 entre genótipos contrastantes

A maior expressão do gene SCS1, aos 25 dias após a antese (DAA), foi observada no genótipo CD 202, sendo significativamente superior em relação aos demais, seguido de BMX Potência RR, que não diferiu do genótipo TP e, não tendo sido observada, também, diferença deste último, em relação ao genótipo IAC (Figura 3).

Padrão de expressão distinto ao anterior foi observado aos 30 DAA, com maior valor encontrado no genótipo BMX Potência RR, seguido de IAC, CD 202 e TP, tendo havido diferença entre todos os genótipos estudados.

Aos 35, 40 e 45 DAA não se observou diferença entre os genótipos para os níveis de expressão do gene SCS1. Situação diferente foi observada aos 50 e 55 DAA, em que houve maior expressão em IAC, porém, sem diferir de BMX Potência RR e CD 202 aos 50 DAA e, de BMX Potência RR e TP aos 55 DAA.

Fica evidente, com base nos dados da Figura 3, que este gene apresenta maior expressão nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos das sementes de soja, havendo redução de sua expressão a partir dos 35 DAA. Estes resultados possibilitam a expansão nas pesquisas relacionadas a este gene, visto que até o presente momento, o estudo realizado a respeito considerou fases de desenvolvimento mais precoces para avaliar a expressão deste gene. Batchelor et al. (2000) consideraram o período de avaliação de seis à 24 DAA, precedendo em um dia o período inicial de avaliação da expressão de SCS1 neste estudo.

Segundo os mesmos pesquisadores, o gene em questão atua, possivelmente, junto à formação e diferenciação das células espessas do parênquima do tegumento de sementes de soja, visto que o maior acúmulo de mRNA do mesmo foi verificado antes da máxima diferenciação desta estrutura, mais especificamente aos 12 DAA. Este período também precede, ligeiramente, a extensão completa dos tecidos vasculares da cobertura em torno do revestimento da semente e o enchimento do embrião com lipídeos e corpos proteicos (BATCHELOR et al., 2000).

As células espessas do parênquima são derivadas do tegumento interno, sendo este muito proeminente durante a primeira semana de formação. Estas células são importantes na rota de translocação apoplástica de nutrientes para o

embrião. Logo, o gene SCS1, pode estar contribuindo para a formação desta rede de tecidos vasculares responsáveis pela nutrição do embrião durante a sua formação (MOÏSE et al., 2005).

Os resultados observados por Batchelor et al. (2000) para o gene SCS1, bem como a possível função deste gene na diferenciação celular do parênquima do tegumento de sementes de soja associa-se, e muito, ao observado por Batchelor et al. (2002) em relação ao gene SCB1. Apesar de pertencerem a famílias diferentes, estes dois genes em particular podem atuar em conjunto durante o processo inicial de formação dos tegumentos das sementes. Essa informação deve ser considerada em futuras pesquisas, haja vista que a formação desta estrutura de proteção das sementes (tegumento) ocorre devido à expressão de um número amplo de genes, incluindo SCS1 e SCB1. Embora seus reais papéis neste processo não estejam completamente elucidados, ambos os genes podem desempenhar uma função muito relevante para que não ocorra formação anormal das células presentes no parênquima tegumentar.

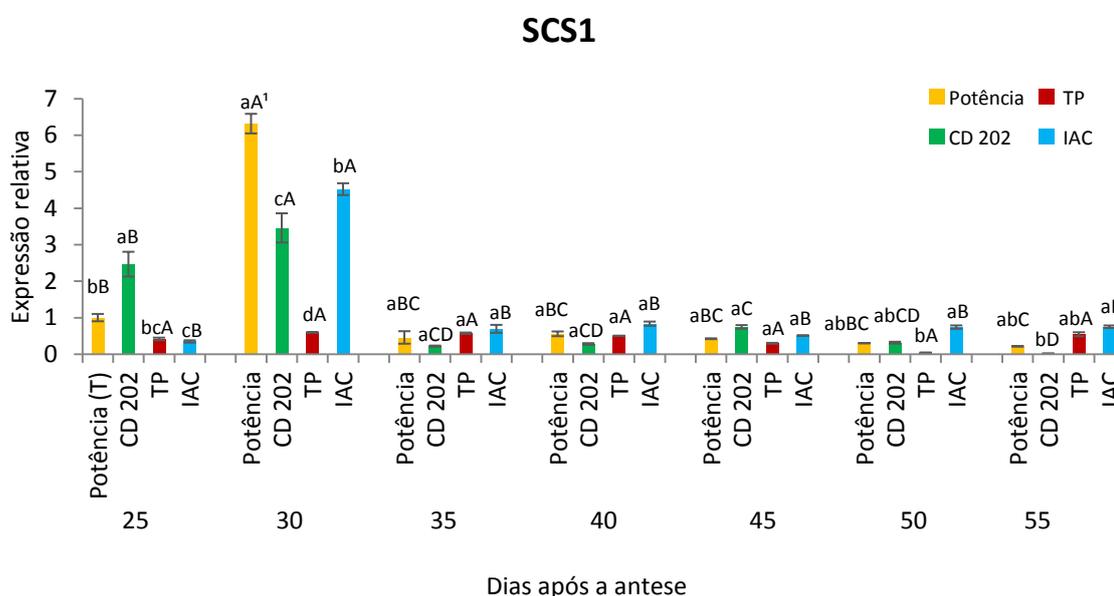


Figura 3 - Expressão relativa do gene SCS1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### Expressão relativa do gene SCS1 entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

O maior valor de expressão do gene SCS1, para o genótipo BMX Potência RR, foi observado aos 30 DAA, não havendo diferença de expressão aos 25, 35, 40, 45 e 50 DAA. A menor expressão foi verificada aos 55 DAA, porém, sem diferir dos 35, 40, 45 e 50 DAA (Figura 3).

Da mesma forma que para BMX Potência RR, no genótipo CD 202, o maior valor de expressão foi verificado aos 30 DAA, sendo superior em relação aos demais, seguido de 25 DAA e, com menor expressão sendo observada aos 55 DAA, sem diferir, no entanto, dos 50 DAA. Apesar da expressão precoce do gene no presente estudo, Batchelor et al. (2000) não evidenciaram sinais de expressão significativa para SCS1 a partir dos 18 DAA até aos 24 DAA.

As subtilisinas têm sido expressas principalmente nas fases de desenvolvimento dos tecidos em que ocorre divisão celular. Neuteboom et al. (1999) mencionam a expressão significativa do gene AIR3, também uma subtilisina, durante a formação de raízes laterais em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Também na mesma espécie, Rautengarten et al. (2008) constataram maior expressão de uma subtilisina, a AtSBT1.7, nas sementes entre oito e dez dias após a antese, reforçando a hipótese do envolvimento destes genes no processo de divisão celular em tegumentos. Além disso, os pesquisadores realizaram o silenciamento deste gene, apresentando os mutantes, uma deformação na ruptura do tegumento devido a não expansão e absorção correta de água pela camada de mucilagem localizada abaixo da camada externa do tegumento, que é responsável pela sua ruptura completa. Segundo os pesquisadores, esses resultados indicaram que AtSBT1.7 desencadeia o acúmulo e / ou a ativação de enzimas necessárias para o afrouxamento da parede primária mais externa do tegumento. Ou, ainda, este gene é responsável por facilitar o aumento de volume da mucilagem e com isso, realizar o pleno rompimento do tegumento para emergência da plântula associada à absorção de água.

A subtilisina SEP-1 foi identificada por Fontanini & Jones (2002) durante o processo de germinação de *Hordeum vulgare* L. cv. Morex, expressando-se em

todos os tecidos, com exceção do endosperma, sugerindo que, provavelmente esta não seja uma enzima envolvida na degradação de proteínas de reserva. No entanto, nesta fase, a semente encontra-se em intenso processo de divisão celular, podendo este gene atuar no controle e ordenação da formação de células nos mais variados tecidos.

Em relação ao genótipo TP, não se observou expressão diferencial para o gene SCS1 entre as diferentes fases de desenvolvimento dos tegumentos. Já, para IAC, a maior expressão ocorreu aos 30 DAA, semelhante ao observado nos genótipos BMX Potência RR e CD 202. Porém, não houve diferença de expressão para as demais fases (Figura 3).

#### 4.1.4. SBP

O gene SBP (proteína de ligação à sacarose) é um membro da superfamília *Cupin*. Esta família apresenta funções diversas, como proteínas de armazenamento, enzimas e proteínas de ligação à sacarose (DUNWELL et al., 2000).

O gene SBP em particular, codifica para uma proteína de ligação à sacarose, encontrada na membrana plasmática das células dos cotilédones, folhas e floema de legumes maduros (GRIMES et al., 1992). Além disso, tem-se atribuído ao SBP provável função de proteína de armazenamento em sementes, o que pode estar relacionada à sua clara similaridade estrutural com as proteínas *vicilin-like*, que desempenham essa função (BRAUN et al., 1996; CONTIM et al., 2003; WENZEL et al., 2005).

A Figura 4 traz os resultados de expressão do gene SBP, homólogo ao estudado por Grimes et al. (1992). Foi possível observar diferença entre os genótipos e também entre as fases de desenvolvimento dos tegumentos para cada genótipo.

### Expressão relativa do gene SBP entre genótipos contrastantes

O nível de expressão do gene, aos 25 e aos 30 DAA, foi maior no genótipo BMX Potência RR quando comparado aos demais, que não diferiram significativamente entre si. Porém, nas épocas subsequentes, aos 35, 40 e 45 DAA, esta diferença não foi verificada, havendo semelhança no nível de expressão entre os quatro genótipos estudados.

Esse resultado vem ao encontro do observado por Freitas et al. (2007), os quais verificaram que o gene GmSBP2 da soja apresentou maior expressão em tecidos jovens e raízes, que atuam como drenos durante a fase vegetativa, principalmente. No entanto, observou-se que a proteína codificada por este gene encontra-se no sistema vascular da planta de soja, atribuindo ao mesmo, a provável função de transporte da sacarose para atender os processos fisiológicos da planta (PIROVANI et al., 2002; CONTIM et al., 2003).

A proteína SBP pode atuar, possivelmente, no transporte de sacarose, segundo Overvoorde et al. (1997) e Pirovani et al. (2002). Segundo os primeiros pesquisadores, a caracterização da SBP purificada da membrana plasmática tem demonstrado que 25% dela se comporta como uma proteína de membrana tipo II, que atravessa a bicamada, e o restante, comportando-se como uma proteína periférica associada à membrana. Heim et al. (2001) verificaram, em *Vicia faba* L., que SBP (VfSBP) foi encontrada predominantemente nos vacúolos de armazenamento de proteínas, mas uma pequena fração da proteína também foi detectada na membrana plasmática das células cotiledonares, desempenhando papel de transporte, vindo ao encontro do observado por Overvoorde et al. (1997).

Aos 50 DAA, a maior expressão do gene ocorreu no genótipo IAC, não diferindo, porém, de BMX Potência RR. De forma semelhante, aos 55 DAA, o genótipo IAC apresentou maior expressão do gene SBP em seus tegumentos, em relação aos demais, tendo sido verificada a menor expressão, no genótipo CD 202 (Figura 4).

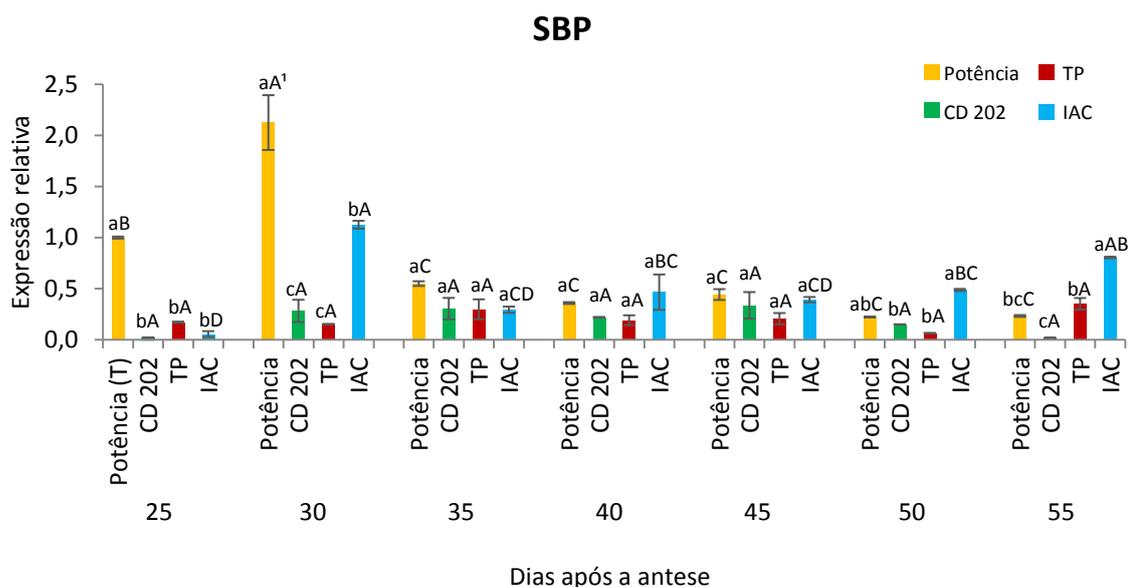


Figura 4 - Expressão relativa do gene SBP em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Rocha et al. (2007) atribuíram à proteína SBP uma função bastante importante para a área de sementes. Segundo o pesquisador, devido à sua alta estabilidade, a proteína pode atuar na tolerância à dessecação durante a maturação das sementes.

Para confirmar essa atribuição, Overvoorde et al. (1997) realizou estudo em duas etapas. As análises dos extratos proteicos totais das membranas de sementes desidratadas confirmaram a presença de SBP neste tecido desidratado, o que lhe confere o papel de proteína de reserva, já que todas as proteínas que não apresentam essa função são degradadas antes de o tecido se tornar quiescente. A outra etapa consistiu em isolar proteínas microssomais de sementes de soja dos dois aos sete dias após a embebição. Depois da embebição, o nível de SBP diminuiu semelhante às outras proteínas de armazenamento, atingindo níveis indetectáveis aos sete dias, o que comprovou sua função como substância de reserva para a semente durante o processo de germinação.

Baseado no exposto, ênfase deve ser dada ao genótipo IAC, visto que houve um padrão superior de expressão do respectivo gene, aos 55 DAA, ou seja, próximo

à maturidade fisiológica. Tal expressão não foi verificada nos demais genótipos para esta mesma fase de desenvolvimento.

#### Expressão relativa do gene SBP entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

No genótipo BMX Potência RR, os resultados de expressão variaram ao longo do desenvolvimento dos tegumentos, observando-se maior expressão do gene SBP aos 30 DAA, seguido de 25 DAA. Já aos 35, 40, 45, 50 e 55 DAA, a expressão foi semelhante, não havendo diferença em ambas para o mesmo genótipo. No entanto, nos genótipos CD 202 e TP, o nível de expressão do gene não variou entre as fases de desenvolvimento dos tegumentos (Figura 4).

Possivelmente esta maior expressão observada no genótipo BMX Potência RR, nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos, esteja relacionada com a função exercida pela proteína codificada pelo gene SBP, que é de transporte de sacarose, atuando mais especificamente nos drenos, de acordo como observado por Grimes et al. (1992). Segundo os pesquisadores, observou-se padrão de acúmulo superior da proteína de forma paralela à taxa de absorção de sacarose em cotilédones, assim como em folhas novas. Assim, pode-se inferir que este gene atua junto ao fornecimento de fotoassimilados para estruturas em fase inicial de desenvolvimento.

Em estudo realizado por Wang et al. (2009), identificou-se uma proteína SBP (VrSBP1) nos cotilédones em desenvolvimento de *Vigna radiata* L.. Verificou-se que se trata de uma proteína localizada no tonoplasto dos vacúolos de cotilédones, sendo mobilizada quando as sementes de feijão iniciam o processo de germinação. Portanto, a associação de VrSBP1 ao tonoplasto lhe credita o possível papel como transportador de açúcar do vacúolo durante o processo de germinação.

Da mesma forma que o observado para o genótipo BMX Potência, a maior expressão do gene SBP ocorreu, para o genótipo IAC, aos 30 DAA, porém, com menor expressão quando comparado ao primeiro. Na sequência, o maior valor de expressão ocorreu aos 55 DAA, não diferindo dos 30 DAA, assim como dos 40, 45 e

50 DAA. E, o menor nível de expressão do gene, para IAC, ocorreu aos 25 DAA, que também não diferiu de 35 e 45 DAA (Figura 4).

Ao se inferir a possível relação deste grupo gênico com os genes que codificam para proteínas de armazenamento, os dados aqui obtidos quanto ao padrão de expressão para o gene SBP vem ao encontro de alguns trabalhos realizados. Dhaubhadel et al. (2007), analisando o padrão de expressão de milhares de genes, através da técnica de microarranjo, no embrião de sementes de soja, observaram que, para os genes que codificam para proteínas de armazenamento, a expressão ocorreu durante todo o desenvolvimento da semente, sendo mais pronunciada nas fases iniciais e intermediárias e reduzida nas fases finais de formação desta.

Este padrão de expressão dos genes de proteínas de armazenamento também foi observado durante o enchimento de sementes de arroz por Duan & Sun (2005), indicando existir uma fase de desenvolvimento específica para a regulação pós-transcricional destes genes.

#### **4.1.5. LEGINSULIN**

Proteínas isoladas a partir do tegumento de sementes da fabacea *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. apresentaram, segundo Venâncio et al. (2003), a mesma massa molecular e a sequência de aminoácidos que a insulina, hormônio animal com funções diversas, como participação em vias de sinalização, transcrição de genes, síntese de proteínas, armazenamento de lipídeos e redução dos níveis de açúcares no sangue (ALPER, 2000; BAUMANN et al., 2000; BRÜNNING et al., 2000).

Aliado a esta descoberta, pesquisas realizadas com insulina mostraram que esta promoveu a germinação de sementes, acelerou a síntese de proteínas ribossomais em embriões de milho em processo de germinação e, aumentou a atividade de enzimas que catalisam a transformação de carboidratos em lipídeos de armazenamento em sementes (GOODMAN & DAVIS, 1992; SÁNCHEZ et al., 1999; DINKOVA et al., 2000).

Este gene relacionado à insulina, denominado de LEGINSULIN (proteína de ligação à insulina), foi prospectado com base no trabalho de Watanabe et al. (1994), sendo avaliado o seu nível de expressão nos tegumentos de genótipos contrastantes, como pode ser verificado na sequência.

#### Expressão relativa do gene LEGINSULIN entre genótipos contrastantes

A expressão do gene LEGINSULIN, aos 25 DAA, foi semelhante entre os diferentes genótipos avaliados. No entanto, aos 30 DAA, observou-se maior expressão do gene no genótipo BMX Potência RR, seguido de IAC, CD 202 e TP, com diferença entre todos os genótipos. Diferente do observado aos 25 DAA verificou-se maior expressão do gene, aos 35 DAA, para o genótipo TP, não havendo diferença entre os demais (Figura 5).

O gene LEGINSULIN foi prospectado por Watanabe et al. (1994) a partir de radículas de soja em desenvolvimento. Segundo os pesquisadores, a partir dos resultados obtidos, foi possível constatar importante papel deste gene como uma molécula sinalizadora. Yamazaki et al. (2003) atribuiu ao gene LEGINSULIN uma possível função hormonal, agindo através da interação com a proteína 43 - kDa, gerando, assim, uma transdução de sinal celular, através da atividade de fosforilação da respectiva proteína.

Aos 40, 45 e 50 DAA não se observou diferença na expressão do gene LEGINSULIN entre os genótipos estudados. Em contrapartida, aos 55 DAA, houve maior expressão no genótipo CD 202 em relação aos demais, que não diferiram entre si.

Bewley & Black (1994) constataram, em sementes em formação, que a proteína com constituição semelhante à insulina diminuiu com o desenvolvimento destas, estando a redução da sua expressão diretamente relacionada com a perda de água pelas sementes e frutos. Segundo os pesquisadores, a presença deste composto semelhante à insulina em quantidades maiores, quando a semente é metabolicamente ativa, é um indicativo de uma possível atuação desta em eventos de sinalização, sendo sugerido, também, por Silva et al. (2002), Ryan et al. (2002) e Venâncio et al. (2003).



Em relação ao genótipo TP, o maior nível de expressão do gene LEGINSULIN ocorreu aos 30 DAA, não sendo observada diferença entre as demais fases de desenvolvimento dos tegumentos.

Atualmente, além do gene LEGINSULIN da soja, alguns ortólogos tem sido bastante estudados, como o PA1b, em ervilha (LOUIS et al., 2007). Segundo Jouvensal et al. (2003), Yamazaki et al. (2003) e Gelly et al. (2004), estes genes pertencem à Família *Inhibitory Cystine - Knot*, que inclui os inibidores de proteases, assim como pequenas lectinas, que conferem defesa contra o ataque de pragas, em especial os de sementes de cereais armazenadas, como *Sitophilus* sp. (LOUIS et al., 2007), assim como algumas espécies de pulgões (GRESSENT et al., 2011), sendo um promissor bioinseticida (SILVA et al., 2009).

#### 4.1.6. CHIA1

O gene CHIA1 codifica para uma enzima quitinase pertencente ao grupo I, de acordo com sua estrutura primária, caracterizada pela presença de um domínio de ligação à quitina na região N-terminal, rica em cisteínas altamente conservadas. Esse grupo de enzimas catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina presentes na quitina. Esse polissacarídeo é o maior componente da parede celular dos fungos e do exoesqueleto dos artrópodes, estando ausente nos vegetais (KASPRZEWSKA, 2003). Logo, a presença deste grupo de enzimas nos tecidos das plantas é importante, pois colabora para a defesa desta contra os patógenos, de forma dependente ao seu nível de expressão no tecido (GIJZEN et al., 2001; KERN et al., 2010)

A indução de quitinases é frequentemente coordenada com a expressão de enzimas  $\beta$ -1,3 glucanases específicas e de outras proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR) em resposta ao ataque de patógenos, bem como em resposta a elicitores e fatores abióticos (TAKENAKA et al., 2009; PULLA et al., 2011). Além disso, outros processos de defesa podem ser incluídos, como a explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento da parede celular (DURRANT & DONG, 2004).

Os resultados apresentados na Figura 6, referente à expressão do gene que codifica a proteína CHIA1, evidenciaram diferenças entre os genótipos e fases de desenvolvimento dos tegumentos.

#### Expressão relativa do gene CHIA1 entre genótipos contrastantes

Aos 25 DAA a expressão do gene foi relativamente baixa em todos os genótipos. No entanto, verificaram-se maiores valores para os genótipos BMX Potência RR e TP, que diferiram dos genótipos CD 202 e IAC, tendo os dois últimos, apresentado expressão extremamente baixa.

Situação semelhante foi observada aos 30, 35, 40 e 45 DAA, em que a expressão do gene CHIA1 foi bastante reduzida. Porém, nestas fases de desenvolvimento do tegumento, a diferença entre os genótipos não se verificou. Já aos 50 DAA houve um padrão de expressão bastante elevado para o genótipo TP em relação aos demais, que não diferiram entre si.

Nos 55 dias de desenvolvimento do tegumento verificou-se o maior valor de expressão do gene, observado no genótipo CD 202, seguido de IAC e, não havendo diferença entre os genótipos TP e BMX Potência RR.

Diante dos resultados verificados na Figura 6 foi possível constatar que o gene que codifica para a proteína CHIA1 apresenta expressão pronunciada na fase final de desenvolvimento dos tegumentos das sementes, quando comparado ao período inicial e intermediário de formação desta estrutura de proteção, vindo ao encontro do observado por Gijzen et al. (2001). Segundo os pesquisadores, o gene que codifica a enzima quitinase, presente nos tegumentos de sementes de soja, apresenta maior expressão nos estádios finais de maturação destas, estando associada com a senescência dos tecidos e à resposta à infecção por patógenos.

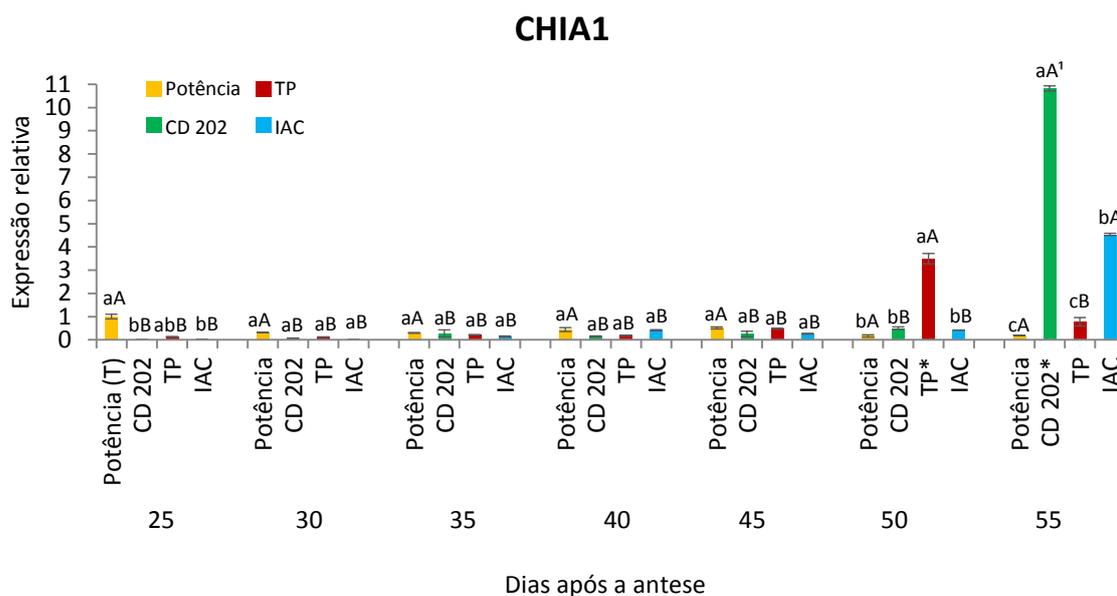


Figura 6 - Expressão relativa do gene CHIA1 em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Genótipos contendo (\*) tiveram a expressão do gene dividida em cinco vezes.

#### Expressão relativa do gene CHIA1 entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

Para o genótipo BMX Potência RR, os resultados de expressão do gene não variaram ao longo do desenvolvimento dos tegumentos, não havendo diferença entre as épocas de coleta após a antese.

No entanto, no genótipo CD 202, observou-se diferença entre as fases de desenvolvimento, em especial aos 55 DAA, em que o valor de expressão do gene foi significativamente superior às demais fases, que não diferiram entre si. Situação semelhante foi verificada para o genótipo IAC, assim como para TP. No entanto, neste último, o maior valor de expressão do gene ocorreu aos 50 DAA, diferindo das demais fases de desenvolvimento dos tegumentos (Figura 6).

Esses resultados indicam o potencial do genótipo CD 202 (tegumentos amarelos) para os programas de melhoramento que fazem uso de ferramentas moleculares, como forma de transferir genes de interesse, neste caso, o gene

CHIA1, que pode ser uma alternativa interessante visando o aumento da tolerância das plantas ao ataque de fungos.

Pelo fato de se expressar ao final do processo de formação dos tegumentos, em especial no genótipo CD 202, e, possivelmente, estar envolvido com a proteção do tecido contra o ataque de microrganismos patogênicos, CHIA1 pode ser considerado um gene de extrema importância para o setor de sementes. A partir da maturidade fisiológica, as sementes ficam expostas às condições desfavoráveis do ambiente, podendo sofrer o ataque de fungos de campo e de armazenamento, que irão provocar a deterioração acelerada das mesmas. Assim, se estas apresentarem tegumentos que expressem este gene na fase final de sua formação, há a probabilidade de desenvolverem maior resistência ao ataque de fungos nesta etapa.

No entanto, deve-se avançar nas pesquisas quanto ao efeito do gene em tecidos atacados, da mesma forma como realizado por Gijzen et al. (2001), que verificou maior expressão do gene que codifica a enzima quitinase no hipocótilo da soja, sob a infecção de *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann quando comparado ao mesmo tecido, sem ocorrência do patógeno. Ainda segundo os pesquisadores, os tegumentos de sementes de soja são ricos em proteínas de defesa (PR) e peptídeos. Essa característica é particularmente importante, pois as sementes estão sujeitas ao ataque de patógenos durante o armazenamento no campo, após a maturidade fisiológica e até mesmo durante o período de germinação - emergência.

Em tabaco transgênico, modificado para conferir resistência das plantas à *Rhizoctonia solani* Kühn, Kern et al. (2010) verificaram que as plantas geradas foram eficientes na redução do patógeno nas folhas, havendo relação direta entre a atividade enzimática da quitinase e a redução da área foliar afetada por lesões fúngicas.

Além do papel conferido à CHIA1 em relação à proteção ao ataque de fungos, pesquisas têm indicado outras funções possivelmente relacionadas a este gene, como por exemplo, contribuindo para o desenvolvimento dos rizóbios e atuando na especificidade da relação hospedeiro - bactéria fixadora de nitrogênio (STAEHELIN et al., 1994; GOORMACHTIG et al., 1998).

#### 4.1.7. SGF14c

As proteínas 14-3-3 são encontradas em eucariotos, sendo codificadas por uma família multigênica envolvida em vias de sinalização que regulam o desenvolvimento da planta e conferindo proteção contra estresses bióticos e abióticos, como tolerância à seca (SVENNELID et al., 1999; YAN et al., 2004; AKSAMIT et al., 2005; XU & SHI, 2006; LI & DHAUBHADEL, 2011). Segundo alguns trabalhos, têm sido atribuídas a esta família funções importantes como regulação gênica; síntese e estruturação de proteínas; atuação no metabolismo primário, junto à bomba de prótons ligada à membrana plasmática; remodelação da cromatina; e metabolismo hormonal (IGARASHI et al., 2001; HUBER et al., 2002; BAlet al., 2007; GAMPALA et al., 2007; RYU et al., 2007; PAUL et al., 2008; SCHOONHEIM et al., 2009).

A expressão do gene SGF14-3-3c foi verificada nos tegumentos contrastantes dos genótipos aqui estudados, sendo os resultados apresentados a seguir.

##### Expressão relativa do gene SGF14c entre genótipos contrastantes

A expressão do gene SGF14c, aos 25 DAA, foi maior no genótipo CD 202 quando comparado aos demais, seguido de TP e IAC, que não diferiram entre si e, com menor expressão do gene observada no genótipo BMX Potência RR.

Aos 30 DAA, a maior expressão também foi observada no genótipo CD 202, seguida de BMX Potência RR, não diferindo entre si e, a menor expressão para IAC, que não sofreu variação em relação à TP. A partir dos 35 DAA, a maior expressão do gene foi observada no genótipo BMX Potência RR, não diferindo, porém, de TP aos 35 e 55 DAA e de IAC aos 40 DAA (Figura 7).

A menor expressão do gene aos 35 DAA foi observada nos genótipos IAC e CD 202. Já aos 40 DAA, a menor expressão, além de ocorrer no genótipo CD 202, também foi verificada em TP, sendo observada semelhança, aos 45, 50 e 55 DAA, também para IAC.

Dezoito genes 14-3-3 (SGF14a - SGF14r) foram identificados em soja por Li & Dhaubhadel (2011), sendo dezesseis deles transcritos (SGF14a - SGF14p). Todos os dezesseis SGF14s apresentaram maior expressão no embrião, sugerindo seu papel potencial no desenvolvimento da semente, estando esta constatação de acordo com o observado por Hajduch et al. (2005). Ainda segundo os primeiros pesquisadores, o gene SGF14c, em particular, se expressou de forma elevada no embrião entre os 30 e 40 dias após a polinização (DAP) e, com menor expressão aos 50 DAP, porém ainda assim muito próxima dos outros períodos de avaliação. Já no tegumento das sementes, a expressão foi menor quando comparada a do embrião, no entanto, superior aos demais tecidos avaliados, como raiz, caule, folhas e flores.

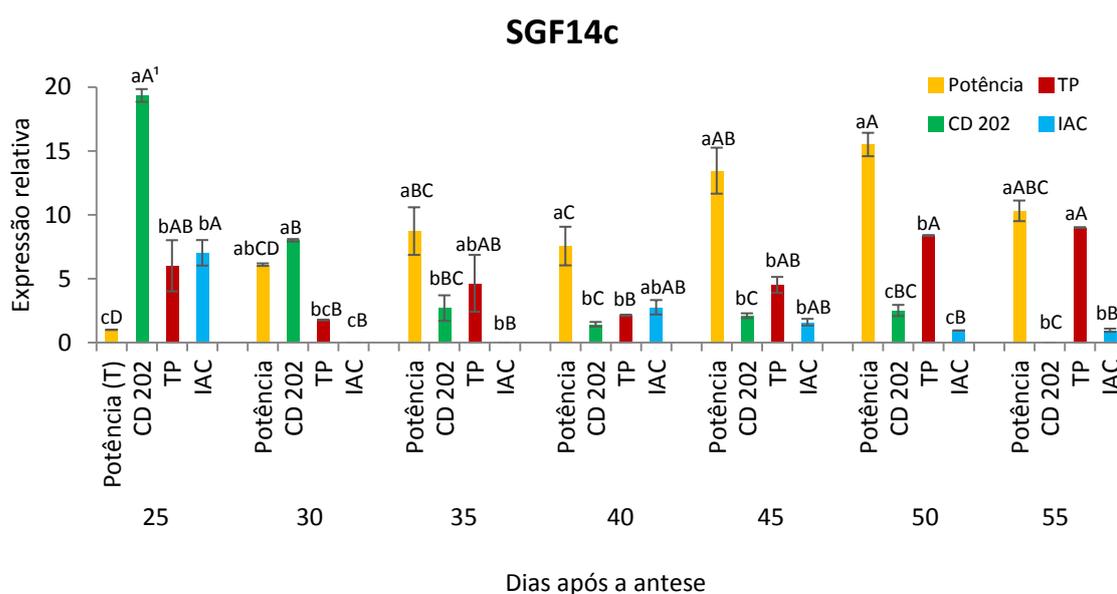


Figura 7 - Expressão relativa do gene SGF14c em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Recentemente descobriu-se uma importante função dos genes SGF14s, podendo os mesmos estarem envolvidos na passagem de GmMYB176 entre o citoplasma e o núcleo. GmMYB176 é um fator de transcrição que interage com a

proteína 14-3-3 da soja regulando a expressão do gene CHS8 e atuando na biossíntese de flavonóides (DHAUBHADEL & Li, 2010; YI et al., 2010).

#### Expressão relativa do gene SGF14c entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

A maior expressão do gene SGF14c, para o genótipo BMX Potência RR, ocorreu aos 50 DAA, não diferindo, no entanto, das expressões observadas aos 45 e 55 DAA. A menor expressão do respectivo gene, para o genótipo em questão, ocorreu aos 25 DAA, sem diferir da expressão aos 30 DAA.

Ao contrário do observado para BMX Potência RR, no genótipo CD 202, o maior nível de expressão do gene ocorreu nos estádios iniciais de desenvolvimento dos tegumentos, ou seja, aos 25 DAA, seguido dos 30 DAA, não diferindo este último da expressão ocorrida aos 35 DAA (Figura 7).

A expressão de genes SGF14s em embriões durante o início da sua formação sugere que estes podem atuar no desenvolvimento da semente de soja, sinalizando a síntese e transporte de aminoácidos e metabólitos, contribuindo, também, para a síntese de proteínas e triglicerídeos de reserva, assim como metabólitos secundários (LI & DHAUBHADEL, 2011). O processo como um todo envolve a transcrição e reprogramação fisiológica da expressão de genes que estão ligados por vias complexas envolvidas na maturação das sementes (WOBUS & WEBER, 1999). Considerando o fato de que muitas substâncias devem ser translocadas das fontes (folhas) para os drenos (sementes), e que esta passagem ocorre através dos tegumentos, pode-se constatar que esta estrutura de proteção tem papel importante na expressão de SGF14c para garantir o pleno desenvolvimento da semente.

Padrão distinto quanto à expressão do gene SGF14c foi observada para o genótipo TP, que apresentou maior expressão aos 50 e 55 DAA, porém, sem diferir das expressões ocorridas aos 25, 35 e 45 DAA.

O genótipo IAC apresentou expressão para o referido gene na mesma linha do observado para o genótipo CD 202, com maiores níveis de expressão nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos, sendo esta reduzida no decorrer da

avaliação, com exceção dos 30 e 35 DAA, onde não houve expressão deste gene (Figura 7).

O padrão diverso de expressão deste gene reflete o seu potencial papel multifuncional no desenvolvimento das sementes e das plantas de uma forma geral. Por pertencer a um grupo gênico envolvido com vias de sinalização e síntese de proteínas, não é incomum observar a sua expressão em níveis distintos (LI & DHAUBHADEL, 2011).

Ainda em relação ao gene SGF14c, e também ao SGF14l, Radwan et al. (2012) identificaram um importante papel destes no processo de nodulação inicial da soja. Através do seu silenciamento, verificou-se número reduzido de nódulos nas raízes de soja após a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e, muitos dos nódulos remanescentes apresentaram algum tipo de anormalidade, como falta de atividade e degradação celular, evidenciando o papel crítico destes genes para este processo tão importante para a cultura da soja. Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh foi verificado por Pignocchi & Doonan (2011), importante papel das proteínas 14-3-3 no processo de divisão celular, que coincide com a etapa de formação inicial dos nódulos nas raízes de soja.

Estes genes, além de, possivelmente, atuarem na divisão celular que ocorre no processo simbiótico, podem desempenhar o mesmo papel durante a formação das sementes. Assim, sementes que apresentam maior expressão destes genes podem de certa forma, ter maior divisão celular nas etapas iniciais de sua formação e assim melhor desenvolvimento, culminando com uma semente de melhor qualidade devido a maior quantidade de células para alocação de substâncias de reserva.

#### **4.1.8. CHS8\***

A chalcona sintase é uma enzima chave na biossíntese de flavonóides, codificada por uma família multigênica (TUTEJA & VODKIN, 2008), estando presente em todas as plantas; porém, podendo apresentar diferentes padrões de expressão. Além de fazer parte do programa de desenvolvimento da planta, os

genes CHS são expressos também, em condições de estresse, como a incidência de raios UV, infecção de bactérias e fungos, e ataque de pragas. Ainda, estes genes participam como moléculas sinalizadoras na interação planta - microrganismo, na síntese de pigmentos, de fitoalexinas, tendo, também, função antioxidante e atrativa para polinizadores (DAO et al., 2011).

Dentre os diversos genes que compõe essa família, avaliou-se, no presente estudo, a expressão relativa do gene CHS8\*, ainda não caracterizado, em diferentes genótipos contrastantes para as características de tegumentos, e em sete fases de desenvolvimento desta estrutura. Pelo fato deste gene não ter a sua função anotada até o momento optou-se, como nomenclatura, CHS8\*, para diferenciá-lo do gene CHS8 descrito no trabalho de Tuteja et al. (2004), e que está relacionado com a coloração escura dos tegumentos de sementes de soja.

#### Expressão relativa do gene CHS8\* entre genótipos contrastantes

Aos 25 DAA, a menor expressão do gene CHS8\* ocorreu no genótipo CD 202 em relação aos demais, que não diferiram entre si. Já aos 30 e 35 DAA, esta diferença não foi verificada. O contrário foi observado aos 40 DAA, em que CD 202 apresentou maior expressão do gene CHS8\* sem diferir, porém, do genótipo BMX Potência RR, tendo sido verificada a menor expressão nos genótipos de tegumentos pretos, TP e IAC (Figura 8).

Ao estudar o padrão de expressão de dois genes da chalcona sintase em embriões de sementes de soja em formação, Dhaubhadel et al. (2007) observaram maior acúmulo de transcritos próximo à maturidade da semente, vindo ao encontro do observado no presente estudo, contudo, nos tegumentos das sementes. Vale considerar que os pesquisadores verificaram esse padrão em sementes de soja de tegumentos amarelos. Além disso, constou-se relação direta entre o nível de expressão destes genes da chalcona sintase e o acúmulo de flavonóides nas sementes. Essa última verificação realizada por Dhaubhadel et al. (2007) não foi confirmada neste estudo, em que se constatou maior quantidade de flavonóides nos genótipos de tegumentos pretos (Tabela 3 - Ensaio II). No entanto, ainda segundo

os pesquisadores, o acúmulo de flavonóides em fabáceas não necessariamente resulta em níveis elevados de expressão de genes da chalcona sintase.

A partir dos 45 DAA, a maior expressão ocorreu no genótipo BMX Potência RR em detrimento dos demais, que não apresentaram diferença entre si quanto ao padrão de expressão para o gene CHS8\*, com exceção ao genótipo CD 202, aos 50 DAA, que apesar de ter apresentado menor expressão do gene que BMX Potência RR, foi superior aos genótipos de tegumentos pretos.

Em soja, a chalcona sintase é codificada por, pelo menos, nove genes (CHS1 a CHS9) (TUTEJA & VODKIN, 2008), sendo os membros classificados em duas subfamílias, uma correspondendo aos genes CHS7/CHS8 e a outra englobando os outros membros CHS (CHS1 - CHS6, CHS9) (KURAUCHI et al., 2009). No tegumento de sementes com coloração escura, as transcrições de mRNA de CHS7/CHS8 são abundantes (CHO et al., 2013) e constituem a sua maioria, enquanto que as de outros membros da CHS ocorrem em menor nível. Já em tegumentos amarelos de sementes de soja, os níveis de mRNA da maioria dos membros CHS são significativamente reduzidos, em particular os de CHS7/CHS8 (KASAI et al., 2004; TUTEJA et al., 2004). No entanto, ainda segundo Tuteja et al. (2004), o mesmo não ocorre em legumes, folhas, caules, raízes e cotilédones de soja, em que o alelo dominante predomina e os níveis de mRNA de CHS não diminuem.

Com base nos resultados de expressão para cada genótipo, em função das fases de desenvolvimento dos tegumentos e, também, no que foi verificado na literatura, pode-se mencionar que, talvez, este gene não esteja diretamente relacionado com a coloração do tegumento, merecendo novos estudos para validar essa possibilidade. Segundo Matsumura et al. (2005) e Senda et al. (2012), a coloração se define com base no locus *I* (inibidor), sendo que neste caso, quando em dominância, ocorre silenciamento pós-transcricional dos genes CHS envolvidos com a coloração (SENDA et al., 2004), culminando, desta forma, na formação de tegumentos amarelos. Já, quando se verifica o locus *i*, recessivo, a coloração do tegumento tende a ser marrom ou preta, devido à distribuição de antocianinas e proantocianidinas pela estrutura (CLOUGH et al., 2004; TUTEJA et al., 2004).

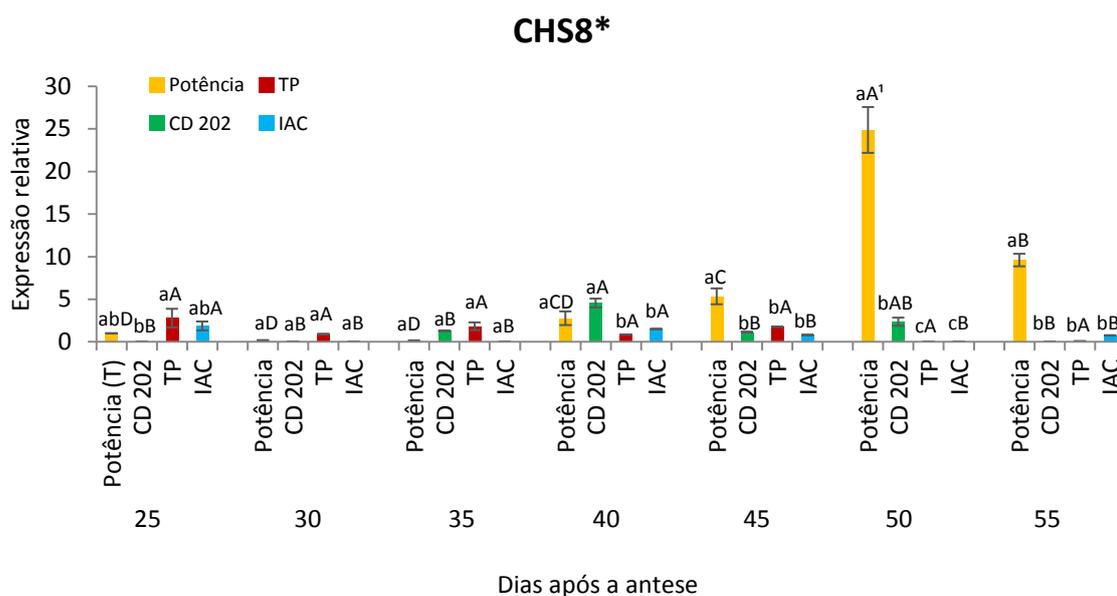


Figura 8 - Expressão relativa do gene CHS8\* em tegumentos de sementes de soja coletados em sete épocas após a antese, em quatro genótipos contrastantes quanto às características de tegumento. <sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas, minúsculas entre genótipos, dentro de cada época de coleta e, maiúsculas dentro de cada genótipo e entre épocas de coleta, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### Expressão relativa do gene CHS8\* entre fases de desenvolvimento dos tegumentos contrastantes

A maior expressão do gene CHS8\* ocorreu aos 50 DAA, seguido dos 55 DAA para o genótipo BMX Potência RR. Tendo sido observada a menor expressão para o referido gene nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos, ou seja, aos 25, 30, 35 e 40 DAA, sendo que este último não diferiu da expressão ocorrida aos 45 DAA (Figura 8).

Para o genótipo CD 202, o maior nível de expressão foi verificado aos 40 DAA, sem diferir, no entanto, da expressão aos 50 DAA. Porém, este último, apresentou padrão de expressão do gene CHS8\* semelhante ao observado nas demais fases de desenvolvimento dos tegumentos, não havendo diferença entre si.

Em relação ao genótipo TP, não se observou diferença na expressão do gene em função das diferentes fases de desenvolvimento dos tegumentos. Já, para o genótipo IAC, o maior nível de expressão ocorreu aos 25 e aos 40 DAA, não havendo diferença entre as demais fases de desenvolvimento dos tegumentos.

Algumas explicações podem ser sugeridas em função deste padrão de expressão observado, com base nos trabalhos de Voinnet (2005) e Senda et al. (2004). Segundo o primeiro autor, determinadas espécies utilizam como um sistema de defesa o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), que é responsável pela degradação de RNA, o qual pode ocorrer, por exemplo, quando há infecção por vírus em uma planta. Quando esse mecanismo está ativado, pode ocorrer o silenciamento de genes da chalcona sintase, que, de acordo com Senda et al. (2004) ocorre na soja de tegumento amarelo. Porém, no presente estudo, situação inversa foi verificada.

#### **4.2. Ensaio II - Caracterização química dos tegumentos**

A composição química dos tegumentos dos genótipos contrastantes é visualizada na Tabela 3.

A concentração de compostos fenólicos totais foi significativamente distinta, tendo os genótipos de tegumentos pretos, IAC e TP, apresentado os maiores valores destes constituintes, não diferindo entre si.

Nos tegumentos amarelos, CD 202 e BMX Potência RR, observou-se menor concentração de compostos fenólicos, sendo verificada nesta última cultivar a menor concentração, diferindo de CD 202 (Tabela 3). Outra constatação importante foi que os tegumentos pretos apresentaram concentração de fenóis de até 14,5 vezes maior quando comparado aos tegumentos amarelos, neste caso específico, em relação a cultivar BMX Potência RR. Esse resultado está bem acima do que foi mencionado por Zhang & Guo (2001). Segundo os autores, sementes de soja de coloração preta possuem teor de compostos fenólicos de cinco a sete vezes mais alto que a soja amarela.

Situação semelhante aos compostos fenólicos foi verificada para o potencial antioxidante dos tegumentos, em que os genótipos de tegumentos pretos apresentaram maiores valores comparados às cultivares de tegumentos amarelos, sendo esta diferença significativa. Entre os tegumentos de mesma coloração, não foi verificada diferença para essa variável.

Estes resultados obtidos para os compostos fenólicos totais e para o potencial antioxidante podem estar de certa forma, relacionados à maior concentração de antocianinas nos genótipos de soja com tegumentos pretos. Isso se deve ao fato de que antocianinas são constituintes dos compostos fenólicos, sendo estes reconhecidos cientificamente pela sua ação antioxidante (RIBOLI & NORAT, 2003; RHONE & BASU, 2008) havendo, neste caso, uma relação direta e positiva entre estes compostos avaliados.

No entanto, apesar de as pesquisas revelarem a ação antioxidante da soja com tegumento preto (XU et al., 2008; ZHANG et al., 2011), vale ressaltar que as concentrações de compostos fenólicos são variáveis de genótipo para genótipo, de acordo com a fase de desenvolvimento do tecido, podendo sofrer alterações, também, em função do ambiente (LEPINIEC et al., 2006). Os resultados obtidos no presente estudo não corroboram com as observações de Lepiniec et al. (2006), visto que não houve diferença, tanto para compostos fenólicos assim como para o potencial antioxidante entre os genótipos de tegumentos pretos, IAC e TP (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração de compostos fenólicos (fenóis), em mg eq. ácido gálico.g<sup>-1</sup>; potencial antioxidante, em μmol eq.Trolox.g<sup>-1</sup>; antocianinas totais, em mg eq. cianidina 3 glicosídeo.g<sup>-1</sup>; carotenóides, em μg eq. β- caroteno.g<sup>-1</sup>; e, lignina, em percentagem, nos tegumentos dos genótipos IAC e TP (tegumento preto) e nos tegumentos das cultivares CD 202 e BMX Potência RR (tegumento amarelo).

Genótipos	Variáveis				
	Fenóis	Antioxidantes	Antocianinas	Carotenóides	Lignina
IAC	1,61 a <sup>1</sup>	44,58 a	0,25 a	33,71 b	8,26 a
TP	1,61 a	44,23 a	0,18 b	42,51 a	4,99 b
CD 202	0,16 b	6,87 b	0,04 d	24,29 c	1,77 d
BMX Potência	0,11 c	6,88 b	0,06 c	21,79 c	3,33 c
CV (%)	1,41	2,80	7,68	6,91	7,59

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A concentração de antocianinas foi maior nos genótipos de tegumentos pretos. No entanto, houve diferença significativa, também, entre os genótipos de coloração semelhante, tendo o IAC apresentado maior valor em relação ao TP

(Tabela 3). Também, nas cultivares de tegumentos amarelos houve diferença, em que CD 202 apresentou menor concentração de antocianinas quando comparado à BMX Potência RR (Tabela 3), tendo ambas apresentado menor valor em relação aos genótipos de coloração preta.

De acordo com Palmer et al. (2004), a coloração escura do tegumento é determinada por vários genes, responsáveis por controlar o acúmulo de produtos como antocianinas e proantocianidinas. Logo, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com o referido autor, dado a maior concentração de antocianinas nos tegumentos de coloração preta.

Segundo Webb et al. (1995), a coloração escura do tegumento da soja tem contribuído com a tolerância à nematóides formadores de galhas. Mansur et al. (1998) também verificou efeito positivo associado à tolerância à seca, quando a coloração escura se manifestava nas sementes de soja. Além disso, tem-se atribuído às sementes com maior concentração de flavonóides, maior qualidade fisiológica e também maior longevidade (DEBEAUJON et al., 2000).

Os flavonóides são sintetizados durante a formação dos tegumentos. Porém, a coloração característica que confere a tonalidade escura nas sementes com maior quantidade destes compostos, como antocianinas, ocorre mais para o final da formação da semente. Isso se deve à sua oxidação, levando à coloração característica (MOÏSE et al., 2005). Já nos genótipos de tegumentos amarelos, os flavonóides também estão presentes, porém em menor concentração, conferindo coloração mais clara na maturidade das sementes. Segundo Ndakidemi & Dakora (2003) os flavonóides desempenham papel importante no processo de nodulação, sendo consideradas substâncias quimioatrativas aos rizóbios, promovendo também o seu crescimento durante o processo simbiote, através da transcrição de genes específicos para tal função.

No entanto, a alta concentração de compostos fenólicos não apresenta apenas vantagens. Tem sido relatado na literatura, que o acúmulo destas substâncias pode levar ao aumento de rachaduras do tegumento, que podem ser divididas em dois tipos: o tipo I, onde as rachaduras são irregulares; e o tipo II, onde as rachaduras apresentam-se ramificadas. Ambas resultam na separação de tecidos da epiderme e da hipoderme expondo o tecido parenquimatoso subjacente, sendo o

controle genético destas rachaduras bem caracterizado e intimamente relacionado aos tegumentos pigmentados que apresentam maior concentração de antocianinas nas células epidérmicas (YAKLICH & BARLA-SZABO, 1993; NAKAMURA et al., 2003; BENITEZ et al., 2004). Porém, no presente estudo, esta característica não foi observada nos tegumentos pretos de ambos os genótipos avaliados, TP e IAC.

Em relação aos carotenóides, apesar de haver diferença significativa entre os genótipos, a diferença, em valores absolutos, foi menor, em relação aos demais constituintes químicos avaliados nos tegumentos dos quatro genótipos. Porém, os genótipos de tegumentos pretos mantiveram os maiores valores, com diferença significativa entre si, tendo TP apresentado maior concentração de carotenóides em detrimento à IAC (Tabela 3). Não houve diferença de concentração de carotenóides entre os tegumentos amarelos das cultivares CD 202 e BMX Potência RR.

Para o constituinte lignina observou-se resultado bastante variável entre os genótipos, diferindo todos entre si. O IAC apresentou a maior concentração, com 8,26% de lignina presente nos tegumentos, seguido de TP, com 4,99%. A menor concentração de lignina foi verificada nos tegumentos da cultivar CD 202, com apenas 1,77%. Intermediário aos demais, BMX Potência RR, com 3,33% de lignina (Tabela 3).

Esse resultado vem ao encontro do observado por outros autores, que constataram em tegumentos de soja de coloração escura, maior quantidade de lignina, atribuindo a esta, maior resistência desses tegumentos à danificação mecânica (SOUSA & MARCOS-FILHO, 2001); conferindo essa característica, também, proteção da parede celular contra o ataque de microrganismos (SANTOS et al., 2007). Não corroborado por Dantas et al. (2012), em relação ao fungo *Aspergillus flavus* Link ex Fr.; contudo, a concentração de lignina nos tegumentos das cultivares estudadas não foi superior a 0,5%.

Um bom indicativo da resistência mecânica do tegumento de soja, segundo Alvarez et al. (1997), é este apresentar valores superiores à 5% de lignina. Resultado esse constatado no genótipo de tegumento preto IAC; e, também, muito próximo a esse valor, no outro genótipo de mesma coloração, o TP, com 4,99%.

Tem sido levantada a hipótese de que cultivares de soja geneticamente modificada para a resistência ao herbicida glifosato, têm apresentado maiores valores de lignina na planta, quando comparadas às cultivares convencionais (GRIS et al., 2010). Isso está baseado no fato de a alteração ter sido realizada no ciclo do ácido chiquímico, o mesmo utilizado pela planta para síntese de lignina. No entanto, a pesquisa nessa área é bastante restrita, não existindo relatos do contraste existente entre cultivares convencionais e suas respectivas versões RR. Diante disso, os autores realizaram um estudo com algumas cultivares transgênicas e suas derivadas, verificando distinção na concentração de lignina apenas em duas cultivares, tendo apresentado, a versão transgênica, maior quantidade de lignina. Contudo, os valores não foram superiores a 0,5%.

No presente estudo, também se constatou diferença na concentração de lignina nas cultivares de tegumentos amarelos, tendo a cultivar transgênica BMX Potência RR, apresentado maior valor em comparação a cultivar convencional, CD 202. Vale ressaltar, porém, que BMX Potência RR não é essencialmente derivada de CD 202, podendo ser uma característica intrínseca de cada cultivar, da mesma forma que o observado para os genótipos de tegumentos pretos.

#### **4.3. Ensaio III - Caracterização estrutural dos tegumentos**

As imagens capturadas dos tegumentos de soja permitiram observar três camadas distintas de células: a epiderme (camada paliçádica), a hipoderme (osteoesclereídes) e a camada parenquimatosa. Além disso, verificou-se a camada de aleurona, resquício do endosperma absorvido durante a formação da semente (Figura 9).

Segundo Swanson et al. (1985) e Glória & Carmello-Guerreiro (2006), em um corte transversal do tegumento de uma semente de soja podem ser distinguidas quatro camadas a partir da superfície: cutícula, epiderme (células paliçádicas), hipoderme (osteoesclereídes) e células parenquimatosas. Além disso, a espessura desse conjunto de camadas pode variar, de acordo com Caviness & Simpson Junior

(1974), entre 70 a 100  $\mu\text{m}$  sendo praticamente constante para cada cultivar e controlada geneticamente.

Por meio de eletromicrografias de varredura de cortes transversais do tegumento de sementes de soja das cultivares M-Soy 8400 e M-Soy 8411, Silva et al. (2008) observaram apenas três camadas de células, assim como Mertz et al. (2009), ao observar cortes transversais de tegumentos de soja preta e amarela, identificando-se a camada paliçádica, os osteoesclereídes e a camada parenquimatosa, vindo ao encontro do verificado no presente estudo.

De acordo com a Figura 9, na região mais externa do tegumento encontra-se a camada paliçádica, formada por células alongadas, justapostas perpendicularmente à superfície dos tegumentos e com paredes espessas (MOÏSE et al., 2005). Observa-se que as células desta camada, nas cultivares de tegumento amarelo, apresentam-se mais uniformes, sem divisões (Figura 9 – A e B) em comparação à camada paliçádica dos tegumentos pretos (Figura 9 – C e D), que se apresenta dividida parcialmente na região central. Isso pode estar relacionado ao fato de que tegumentos pretos apresentam maior quantidade de lignina na epiderme (ALVAREZ et al., 1997), conferindo a estes, maior resistência aos impactos mecânicos e, conseqüentemente, ao corte provocado pelo micrótomo, aparelho utilizado para realizar os cortes nos tegumentos.

Além disso, verificou-se que a camada paliçádica nos tegumentos pretos é mais espessa em relação aos tegumentos amarelos, em torno de 10% (44,0 $\mu\text{m}$  nos tegumentos de TP e IAC e 40,0 $\mu\text{m}$  nos de CD 202 e BMX Potência RR) (Figura 9). Essa é uma característica positiva, visto que esta região confere resistência mecânica à semente, sofrendo esta, nestas condições, menores danos mecânicos, comuns durante a colheita, beneficiamento, secagem e semeadura. Segundo Peske & Pereira (1983), a camada paliçádica é importante para absorção de água pela semente, pois, dependendo da sua constituição química, arranjo e substâncias intercelulares, a semente pode embeber água em níveis distintos de velocidade, ou até mesmo não embeber.

Imediatamente abaixo da camada paliçádica estão as osteoesclereídes (células em ampulheta) (Figura 9), constituindo a hipoderme, representadas por células com padrão variado de espaços intercelulares e, também, com espessura

distinta entre os genótipos. Para TP e IAC a espessura desta camada foi similar em ambos (Figura 9 – C e D), e mais espessa que nos genótipos de tegumentos amarelos. BMX Potência RR apresentou maior espessura da camada de células em ampulheta que CD 202 (Figura 9 – A e B), uma diferença de 25%, sendo esta última 35% menos espessa que esta mesma camada observada nos genótipos de tegumentos pretos. Esse resultado vem ao encontro do observado por Mertz et al. (2009). Os autores constataram que esta camada de células se apresentou mais espessa no genótipo de tegumento preto em detrimento ao genótipo de tegumento amarelo.

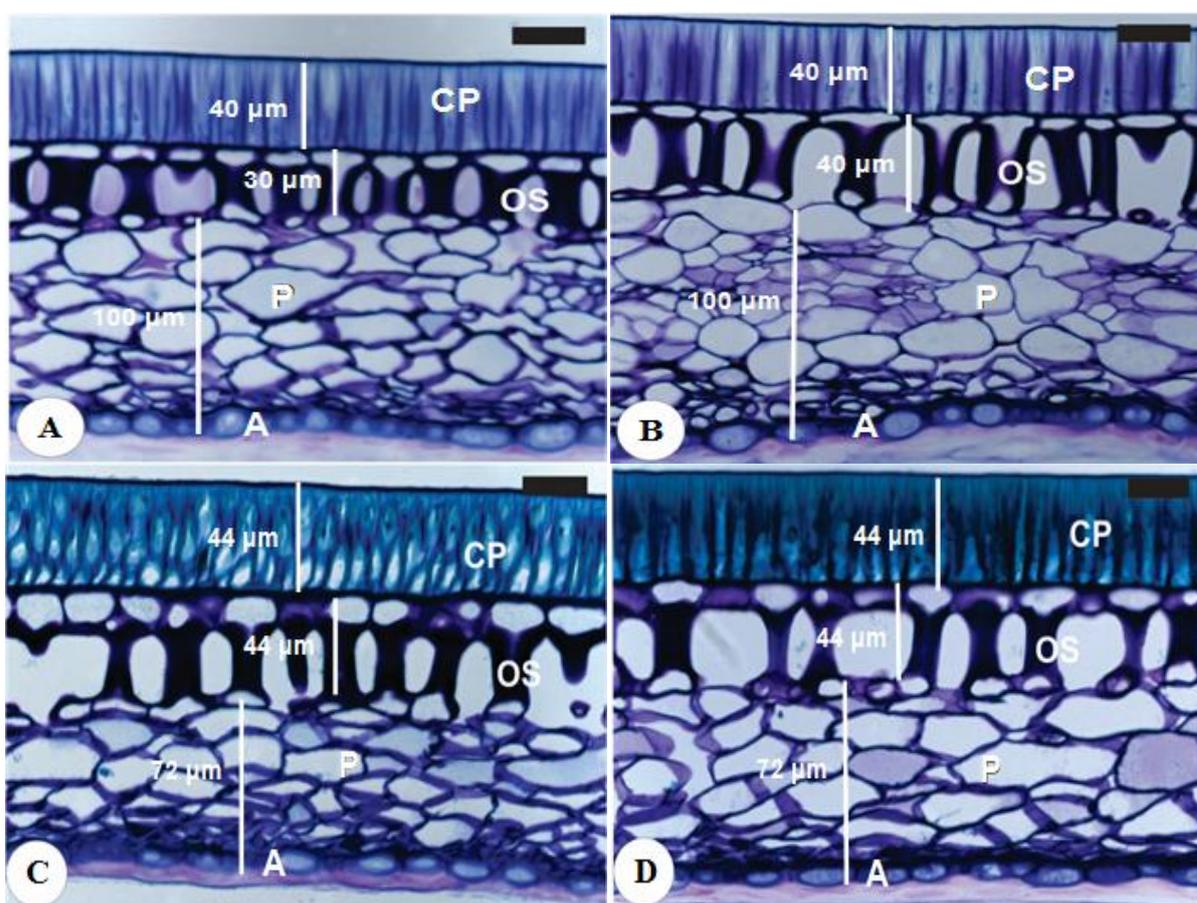


Figura 9 - Cortes transversais do tegumento de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) capturados em câmera Leica DC 300F 40x acoplada ao microscópio Leica DM LB. Figuras: A = CD 202; B = BMX Potência RR; C = TP; D = IAC. Barras pretas = 30 micrômetros; CP = Camada Paliçádica; OS = Osteoesclereídes; P = Parênquima, A = Camada de Aleurona.

As células em ampulheta se originam a partir da camada externa de células do tegumento interno (ZENG et al., 2004). Normalmente apresentam tamanho mais

pronunciado que as células adjacentes e são separadas por amplos espaços intercelulares (SOUZA & MARCOS-FILHO, 2001), estando de acordo com o observado na Figura 9.

A presença de numerosos grãos de amido nas células em ampulheta durante a embriogênese indica que o tegumento poderia sintetizar nutrientes para o embrião em desenvolvimento (ALGAN & BÜYÜKKARTAL, 2000; WANG & GRUSAK, 2005). Além disso, a hipoderme pode desempenhar, da mesma forma que as células da camada paliçádica, o papel de resistência mecânica do tegumento, servindo, também, como reservatório de proteínas (MOÏSE et al., 2005). Assim, pode-se inferir, com base na Figura 9, que os genótipos de tegumentos pretos conferem maior resistência às sementes e, conseqüentemente, estas tendem a sofrer menos com a deterioração de campo e danificação mecânica.

Mais internamente no tegumento está localizado o tecido parenquimático, constituído por células maiores, com formato mais ou menos cilíndrico e parede celular pouco espessa (Figura 9). Na região mais externa desta camada, as células se apresentam maiores quando comparadas às células localizadas mais internamente. Isso pode estar relacionado à compressão exercida pelo crescimento dos cotilédones durante a formação da semente (MOÏSE et al., 2005). Segundo os pesquisadores, estas células são naturalmente esmagadas com a maturidade das sementes. Os mesmos também creditam a esta camada o importante papel de translocação de nutrientes para o embrião em formação.

No caso desta camada de células, os genótipos de tegumentos amarelos apresentam a mesma, mais espessa, quando em comparação aos genótipos de tegumentos pretos, não havendo diferença de espessura entre genótipos com tegumentos de mesma cor (Figura 9). CD 202 e BMX Potência RR tiveram uma espessura 28% maior desta camada que os genótipos de tegumentos pretos. Porém, vale ressaltar que, por apresentar paredes mais delgadas, esta camada apresenta limitada função de resistência mecânica.

Em estudo realizado por Mertz et al. (2009), foi possível observar comportamento semelhante ao verificado no presente estudo em relação às três camadas de células que compõe o tegumento de sementes de soja, em especial na camada parenquimatosa, em que também foram observadas diferenças

significativas no formato e organização das células na região mais externa do tegumento em relação à região mais interna.

Abaixo do conjunto de células parenquimatosas foi possível visualizar as células de aleurona (Figura 9), sendo estas aparentemente maiores nos genótipos de tegumentos amarelos (Figura 9 – A e B), mas também, não diferindo muito do observado para o genótipo IAC (Figura 9 – D), que apresentou esta camada um pouco mais densa que os demais. Essa característica é essencial, considerando a qualidade do processo germinativo das sementes, sendo esta camada importante para fornecer substâncias ao embrião durante a retomada do seu desenvolvimento, juntamente com os cotilédones, que prevalecem.

Com o desenvolvimento da semente, as células do endosperma adjacentes ao embrião degeneram-se, mas a camada mais externa permanece intacta e se diferencia na camada de aleurona, única estrutura do endosperma visível (MILLER et al., 1999). A camada de aleurona em soja e em outras Fabaceas é conhecida pelo seu papel enzimático, mobilizando reservas, como carboidratos, durante a germinação (MA et al., 2004).

Yaklick et al. (1992) observaram que as células de aleurona em sementes de soja em desenvolvimento têm características secretoras, especulando-se que estas são capazes de converter fotoassimilados em substâncias para nutrir o embrião.

Observando o conjunto de células que compõe o tegumento, verificou-se que os genótipos de tegumentos amarelos apresentam maior espessura total, com 170 $\mu$ m para CD 202 (Figura 9 – A) e 180 $\mu$ m para BMX Potência RR (Figura 9 – B) e, 160 $\mu$ m para ambos os genótipos de tegumentos pretos, TP (Figura 9 – C) e IAC (Figura 9 – D). O resultado aqui verificado é importante visto que traz uma nova informação, tegumentos pretos não são mais espessos que tegumentos amarelos, especificamente neste caso. No entanto, as camadas que conferem resistência ao tegumento e, conseqüentemente, potencializam maior qualidade fisiológica às sementes, são mais espessas nos genótipos que apresentam tegumento de coloração preta.

O que também chama a atenção na Figura 9 é que há uma distinção quanto à coloração da camada paliçádica dos tegumentos de coloração amarela (A e B) e dos

tegumentos de coloração preta (C e D). Nestes últimos, a respectiva camada de células apresenta coloração verde. Entretanto, nas células dos tegumentos amarelos, essa coloração é azul. A explicação para isso é que as lâminas contendo os tegumentos foram coradas com azul de toluidina, um corante metacromático que exhibe coloração diferente de acordo com o substrato que reage; paredes ricas em pectina coram de roxo, paredes celulósicas coram de azul e paredes lignificadas coram de verde. Esse resultado vem ao encontro da quantificação de lignina realizada, também, no presente estudo (Tabela 3 – Ensaio II).

Fica evidente, nesse caso, que há maior concentração de lignina nos tegumentos dos genótipos de coloração preta em detrimento aos genótipos de coloração amarela, e que, esta maior concentração ocorre na epiderme (camada paliçádica). Esse resultado vem ao encontro do observado por Menezes et al. (2009), os quais constataram maior espessura de lignina na epiderme quando comparado à hipoderme (osteo esclereídes). Segundo Lewis & Yamamoto (1990), a lignina é um constituinte dos tegumentos de sementes de soja, variando de genótipo para genótipo, e está diretamente associada à qualidade das sementes.

#### **4.4. Ensaio IV - Avaliação das características físicas e fisiológicas das sementes**

A germinação das sementes dos genótipos contrastantes para as características de tegumento não apresentou significância estatística (Tabela 4), sendo a percentagem de germinação elevada para todos os genótipos, com o mínimo de 98%. Padrão semelhante foi constatado na primeira contagem da germinação, evidenciando que ambos os testes não foram sensíveis o suficiente para diferenciar os genótipos quanto às suas qualidades fisiológicas.

Os resultados verificados quanto ao padrão de germinação concordam parcialmente com os observados por Santos et al. (2007). Segundo estes, das três cultivares testadas, de coloração variando de amarelo a marrom, observou-se que uma delas, de coloração marrom, apresentou maior percentagem de germinação. O mesmo resultado não foi verificado, no entanto, para as demais cultivares e sua

variação de tonalidade. Porém, em valores absolutos, a percentagem média de germinação foi superior nas sementes de coloração marrom, atribuindo os autores, este resultado, provavelmente à maior quantidade de lignina do tegumento, que confere maior resistência do mesmo aos estresses bióticos e abióticos, conferindo assim, maior qualidade fisiológica às sementes.

Em relação ao comprimento de plântula observou-se maior valor para o comprimento da parte aérea e total no genótipo IAC, com diferença significativa em relação aos demais, com exceção do comprimento total, em que o respectivo genótipo não diferiu de TP. Este e as cultivares CD 202 e BMX Potência RR não apresentaram diferença entre si para as variáveis em questão. Andrade (2012) observou maior comprimento da parte aérea das plântulas da cultivar TMG 801, porém, sem diferença significativa em relação ao genótipo de tegumento preto UnB 1125.

Para o comprimento de raiz não houve significância entre os genótipos (Tabela 4). Segundo Vanzolini et al. (2007), o comprimento de raiz das plântulas de soja é um dos parâmetros mais sensíveis para separar lotes com níveis distintos de vigor, tendo este teste relação direta com o teste de emergência em solo. Essa constatação vem ao encontro do resultado verificado no presente estudo, pois não houve significância entre os genótipos avaliados na emergência em solo (Tabela 6).

Tabela 4 - Dados médios de germinação (G), primeira contagem da germinação (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e comprimento total de plântula (CT) dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR.

Genótipos	Variáveis				
	G(%)	PC (%)	CPA (cm)	CR (cm)	CT (cm)
IAC	98 <sup>2</sup>	98	10,58 a <sup>1</sup>	12,89	23,47 a
TP	98	97	8,95 b	12,92	21,87 ab
CD 202	99	97	7,97 b	12,85	20,82 b
BMX Potência	100	99	8,57 b	12,58	21,15 b
CV (%)	1,81	2,82	7,68	5,13	5,33

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. <sup>2</sup> não significativo.

Vale ressaltar que este maior vigor de plântula observado no genótipo IAC precisa ser analisado com critério, visto que o mesmo, por não ter passado por nenhum processo de melhoramento, apresenta comportamento fenotípico de plântula e planta com características agrônômicas indesejáveis no que tange à espessura da haste principal e ramificações, podendo levar ao acamamento.

As mesmas variáveis da Tabela 4 foram novamente analisadas submetendo as sementes previamente à imersão em água deionizada por 24 horas, à temperatura de 20°C. Este procedimento visou fornecer um estresse abiótico às sementes, para verificar o comportamento destas após a imersão em água por determinado período de tempo.

De acordo como o observado na Tabela 5, sob as circunstâncias de imersão em água, os genótipos apresentaram diferença entre si para a percentagem de germinação. As sementes do genótipo IAC, de tegumento preto, foram mais resistentes à imersão quando comparado ao genótipo CD 202. No entanto, IAC não diferiu de TP e BMX Potência RR, que também não diferiram de CD 202. Esse resultado vem ao encontro do observado por Gris et al. (2010). Segundo os autores, a imersão das sementes imediatamente anterior ao teste de germinação provoca redução desta em genótipos mais suscetíveis, reduzindo a percentagem de plântulas normais.

Andrade (2012) credita à lignina presente no tegumento preto de sementes de soja, a menor embebição destas. Sob o ponto de vista de vigor, essa característica reduz o índice de velocidade de germinação. Porém, se a embebição é reduzida nas sementes de soja com tegumento preto, os danos ao sistema de membranas que podem ocorrer devido à imersão, também devem ser reduzidos. Os resultados observados quanto à concentração de lignina nos tegumentos dos genótipos contrastantes (Tabela 3 – Ensaio II) e o padrão de hidratação das sementes (Figura 11) trazem resultados não concordantes com os constatados por Andrade (2012), visto que o genótipo IAC, com maior concentração de lignina, não foi o que apresentou a menor hidratação inicial das sementes.

Em relação à primeira contagem da germinação, o vigor acompanhou a germinação para o genótipo IAC e TP, com menor percentagem de plântulas normais verificadas neste último. Quanto às cultivares de tegumentos amarelos, CD

202, apesar de apresentar germinação inferior a BMX Potência RR, obteve maior vigor que esta última, de acordo com a primeira contagem após a imersão das sementes.

Deve-se salientar o fato de que a primeira contagem da germinação apresentou valores elevados, próximos à germinação das sementes (Tabela 4). No entanto, quando as sementes foram submetidas à imersão, a primeira contagem apresentou resultados inferiores, principalmente para as cultivares de tegumentos amarelos (Tabela 5). Assim, sugere-se cautela ao utilizar a primeira contagem da germinação padrão como único parâmetro de vigor de um lote de sementes.

O comprimento de plântulas diferiu entre os genótipos. Em relação à parte aérea, o genótipo IAC foi superior ao TP e este, apresentou maior valor que as cultivares de tegumentos amarelos, verificando-se diferença significativa. Resultado diferente foi observado para o comprimento de raiz, em que não se observou diferença de comprimento entre os genótipos de tegumentos pretos. Assim como não houve diferença entre TP e CD 202 (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados médios de germinação (G), primeira contagem da germinação (PC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e comprimento total de plântula (CT), obtidos de sementes expostas à imersão em água por 24 horas dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR.

Genótipos	Variáveis				
	G (%)	PC (%)	CPA (cm)	CR (cm)	CT (cm)
IAC	96 a <sup>1</sup>	96 a	9,04 a	11,85 a	20,49 a
TP	94 ab	87 ab	7,37 b	11,01 ab	18,37 b
CD 202	87 b	69 bc	5,39 c	10,26 b	15,66 c
BMX Potência	91 ab	54 c	5,66 c	7,49 c	13,16 d
CV (%)	4,45	13,53	6,36	6,65	5,35

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não ter sido verificada diferença entre alguns genótipos para a variável comprimento de raiz, no comprimento total esta ficou evidente, baseado no comprimento de parte aérea distinto entre os genótipos contrastantes. Neste caso, IAC apresentou maior tamanho de plântula em relação aos demais, sendo

novamente, as cultivares de tegumentos amarelos, inferiores aos genótipos de tegumentos pretos.

A emergência das plântulas em solo apresentou comportamento semelhante ao teste padrão de germinação (Tabela 3); ou seja, não houve significância entre os genótipos e, em valores absolutos, a percentagem de emergência foi bastante elevada (Tabela 6).

O índice de velocidade de emergência (IVE), ao contrário da emergência das plântulas, apresentou diferença entre os genótipos, tendo sido verificado os maiores valores nos genótipos IAC e CD 202. Porém, este último também não diferiu de TP e BMX Potência RR. Logo, subentende-se que IAC apresentou maior velocidade de emergência, e conseqüentemente, maior vigor em relação aos genótipos TP e BMX Potência RR (Tabela 6).

A velocidade de emergência (VE) evidenciou padrão um pouco diferente ao observado no IVE. Neste caso, o genótipo IAC emergiu em menor tempo, diferindo significativamente dos demais, não sendo observada diferença entre TP e CD 202 e, no caso da cultivar BMX Potência RR, esta demorou mais para emergir, em torno de um dia, comparado ao genótipo IAC (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados médios de emergência (E); índice de velocidade de emergência (IVE); velocidade de emergência (VE); índice de velocidade de germinação (IVG); e, condutividade elétrica (CE) dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR.

Genótipos	Variáveis				
	E (%)	IVE	VE (dias)	IVG	CE ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )
IAC	98 <sup>2</sup>	1,49 a <sup>1</sup>	6,65 a	13,80 a	67,09
TP	92	1,29 b	7,24 b	9,28 b	66,62
CD 202	100	1,38 ab	7,28 b	9,73 b	65,60
BMX Potência	94	1,24 b	7,70 c	9,90 b	67,83
CV (%)	6,79	6,40	2,62	4,66	2,76

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. <sup>2</sup> não significativo.

O índice de velocidade de germinação seguiu a tendência dos resultados observados para VE, apresentando o genótipo IAC maior vigor em relação aos demais (Tabela 6).

Ao estudar o comportamento do genótipo de tegumento preto UnB 1125 em relação a algumas cultivares comerciais, Andrade (2012) verificou menor IVG do genótipo de tegumento preto em detrimento às cultivares, de tegumentos amarelos, atribuindo tal característica ao maior conteúdo de lignina, estando de acordo com o observado por Menezes et al. (2009). Ainda de acordo com Andrade (2012), a lignina confere menor permeabilidade do tegumento, fazendo com que a embebição seja mais lenta. Essa afirmação merece ressalvas, visto que, no presente estudo, houve um genótipo de tegumento preto, o IAC, que, em alguns momentos, apresentou permeabilidade superior às cultivares, apresentando o mesmo, concentração de lignina superior aos demais, com 8,26%.

A condutividade elétrica está baseada na relação existente entre o vigor das sementes e a integridade do sistema de membranas celulares, sendo de maior vigor as sementes que liberam menos lixiviados para a solução em determinado período de tempo (TILLMANN & MENEZES, 2012). No presente estudo, o teste de condutividade elétrica não foi sensível o suficiente para estratificar as sementes dos genótipos. No entanto vale ressaltar que os valores observados estão melhores que os considerados apropriados para lotes de alto vigor, com valores entre 70 e 80  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de semente, segundo Vieira & Krzyzanowski (1999). Logo, as sementes de todos os genótipos utilizadas neste estudo são consideradas, com base nos valores de condutividade evidenciados, de alto vigor.

Esse resultado de condutividade elétrica obtido no presente estudo não está de acordo com o observado por Panobianco et al. (1999). Segundo os autores, o maior conteúdo de lignina reflete em menor troca de solutos entre as sementes e o ambiente externo; logo, sementes com maior quantidade de lignina lixiviam menos.

O estudo desenvolvido por Andrade (2012) mostrou maior sensibilidade do teste de condutividade elétrica para diferenciar níveis de vigor de diferentes cultivares nas primeiras quatro horas, tendo o genótipo de tegumento preto UnB 1125, apresentado a menor lixiviação. Já com doze horas de imersão, mesmo este padrão permanecendo, houve maior proximidade de valores entre o genótipo e as cultivares testadas.

Cavariani et al. (2009) observaram que, em sementes com absorção lenta de água, o tegumento inicialmente retarda a penetração, mas gradualmente facilita o

movimento de água até o embrião, permitindo que ambos os cotilédones se hidratem de maneira uniforme.

Os dados médios da massa de mil sementes revelaram um padrão distinto entre os genótipos, tendo apresentado maior massa as sementes da cultivar CD 202, seguida da BMX Potência RR. Essa tendência já era esperada, visto que em função do melhoramento genético, as cultivares de tegumentos amarelos carregam consigo características agrônômicas de interesse, neste caso, a massa de sementes maior, que se refletirá na produtividade da lavoura.

Os genótipos de tegumentos pretos apresentaram a menor massa de sementes, com destaque para o IAC, com menor valor observado entre os demais e, diferindo significativamente de TP (Tabela 7). Destaca-se o comportamento das sementes do genótipo TP, as quais apresentaram massa inferior quando comparada à massa das sementes de tegumentos amarelos, porém, com valores próximos, se analisar os valores obtidos em IAC. Esse menor valor verificado no genótipo IAC pode estar relacionado ao seu menor tamanho de sementes em relação aos demais genótipos (Figura 10). No entanto, esta característica física, segundo Peske & Baudet Labbé (2012), não tem influência na qualidade fisiológica das sementes quando a diferença de tamanho das sementes for próxima a um milímetro, proporção esta considerada na realização dos testes no presente estudo.

Tabela 7 - Dados médios da massa de mil sementes (MMS), da massa dos tegumentos (MT) e da razão da massa dos tegumentos (MT) pela massa sementes (MS) dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR.

Genótipos	Variáveis		
	MMS (g)	MT (g)	MT/MS
IAC	67,65 d <sup>1</sup>	0,007 c	0,010 b
TP	105,55 c	0,014 a	0,013 a
CD 202	149,23 a	0,011 b	0,007 c
BMX Potência	124,90 b	0,011 b	0,009 b
CV (%)	1,38	9,30	11,84

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à massa dos tegumentos observou-se que o genótipo TP apresentou maior valor, diferindo dos demais, seguido pelas cultivares de tegumentos amarelos, que não diferiram entre si e, por último, com a menor massa dos tegumentos, o genótipo IAC (Tabela 7). Esse resultado é reflexo, provavelmente, do tamanho das sementes de cada genótipo (Figura 10).

A razão entre a massa de tegumentos e a massa de sementes revelou maior valor para o genótipo TP, diferindo em relação aos demais; seguido de IAC e BMX Potência RR, que não diferiram entre si e, com menor valor, o genótipo CD 202 (Tabela 7). Esse resultado mostrou que os tegumentos do genótipo TP têm maior participação na massa final das sementes em comparação aos demais. Além disso, pode-se verificar que os tegumentos do genótipo IAC contribuíram para a massa total de suas sementes de forma semelhante à cultivar BMX Potência RR, nas condições deste estudo.

O tamanho das sementes de cada genótipo pode ser visualizado na Figura 10. De acordo com esta, as sementes de tegumentos amarelos, CD 202 e BMX Potência RR, assim como as do genótipo de tegumento preto TP ficaram retidas, em maior proporção, nas peneiras 5,5 e 6,0mm. Já o genótipo de tegumento preto IAC apresentou a maior porcentagem de sementes retidas nas peneiras 4,5 e 5,0mm.

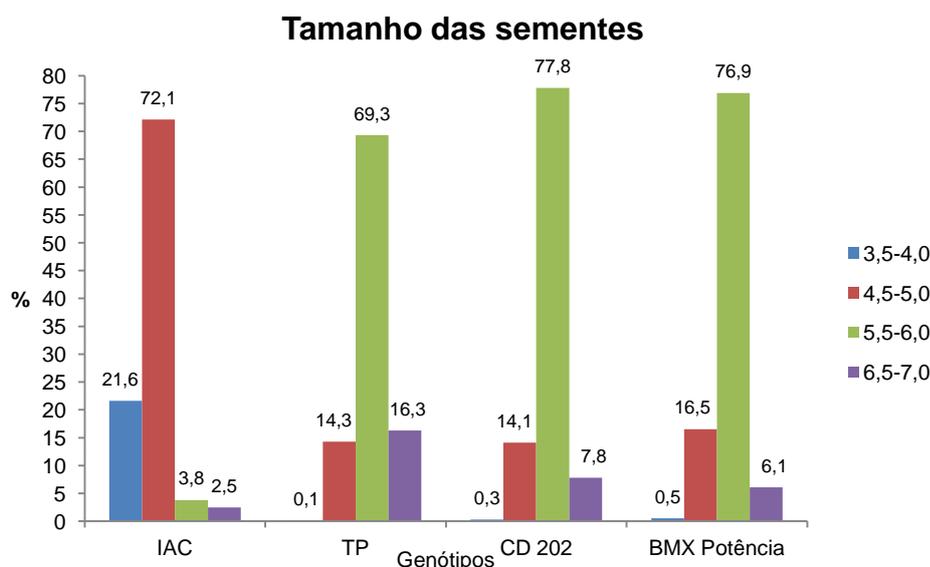


Figura 10 - Dados médios da porcentagem de sementes dos genótipos de tegumento preto, IAC e TP, e das cultivares de tegumento amarelo, CD 202 e BMX Potência RR, retidas nas peneiras de furo redondo com diâmetro de 3,5mm a 7,0mm, com intervalo entre peneiras de 0,5mm.

Para os demais tamanhos, houve uma distribuição semelhante entre os genótipos, com exceção de IAC, que apresentou 21,6% de suas sementes retidas nas peneiras 3,5 e 4,0 milímetros, valor bem acima do verificado para os demais genótipos neste conjunto, que não passou de 0,5% de retenção (Figura 10).

O padrão de hidratação das sementes apresentou interação entre genótipos e tempo de embebição das sementes. Na primeira meia hora, as sementes dos genótipos absorveram água de forma semelhante, no entanto, a partir deste período, verificou-se distinção entre os mesmos, sendo que as sementes de IAC mantiveram-se superiores às demais quanto ao ganho de água, porém sem diferir de BMX Potência RR, que por sua vez não diferiu dos outros genótipos.

Com duas horas de embebição o genótipo BMX Potência RR apresentou maior ganho, seguido de CD 202 e IAC, que não diferiram entre si até quatro horas e meia de embebição. Deste momento em diante os dois genótipos diferiram entre si, com ganhos menores para IAC até sete horas de embebição (Tabela 8). Estando o genótipo TP com ganho sempre inferior aos demais.

A partir de oito horas e meia de embebição, com exceção de TP, todos os genótipos apresentaram ganhos de água semelhante, até doze horas. A partir de então, houve superioridade de IAC, não diferindo, porém, de CD 202 até dezessete horas. Contudo, com dezoito horas, IAC apresentou ganho superior de forma isolada, não havendo diferença entre TP e BMX Potência RR até vinte e quatro horas, sendo que, este último, também não diferiu de CD 202. A partir de vinte e cinco horas até o final do período de embebição das sementes os genótipos BMX Potência RR, CD 202 e TP não diferiram entre si, apresentando menor ganho de água que as sementes do genótipo IAC (Tabela 8).

De acordo com Peske & Pereira (1983), Tavares et al. (1987) e Santos et al. (2007), genótipos de tegumentos pretos absorvem água de forma mais lenta, o que lhes permite reorganizar melhor o seu sistema de membranas e com isso, reduzir o estresse causado durante a absorção de água para o processo de germinação, potencializando um estande mais uniforme na lavoura e emergência mais rápida.

Tabela 8 – Análise do ganho de água entre genótipos para cada período de embebição das sementes de soja.

Tempo de embebição (horas)	Genótipos			
	BMX Potência	CD 202	TP	IAC
	Ganho de água (%)			
0,0	0,00 A	0,00 A	0,00 A	0,00 A
0,5	13,16 A	10,67 A	10,21 A	16,39 A
1,0	22,49 AB	17,53 B	17,22 B	24,70 A
1,5	31,93 AB	26,78 B	23,29 B	33,34 A
2,0	45,01 A	36,48 B	30,01 C	41,29 AB
2,5	56,77 A	46,89 B	36,99 C	49,00 B
3,0	68,65 A	55,12 B	42,75 C	54,75 B
3,5	79,44 A	64,23 B	50,06 C	61,34 B
4,0	88,69 A	72,37 B	55,34 C	67,59 B
4,5	96,89 A	79,50 B	63,25 C	74,65 B
5,0	104,70 A	88,46 B	69,81 D	80,96 C
5,5	108,42 A	93,10 B	75,82 D	86,92 C
6,0	111,31 A	101,17 B	80,78 D	93,09 C
6,5	115,41 A	106,05 B	87,49 D	98,24 C
7,0	116,84 A	109,49 B	91,78 C	104,10 B
7,5	118,14 A	113,23 AB	96,10 C	108,22 B
8,0	119,43 A	115,61 A	99,13 C	112,37 B
8,5	119,62 A	117,84 A	102,50 B	115,10 A
9,0	120,03 A	120,42 A	105,59 B	118,62 A
9,5	120,68 A	121,76 A	106,92 B	120,53 A
10,0	121,51 A	122,84 A	107,72 B	122,84 A
10,5	121,99 A	123,91 A	109,00 B	124,59 A
11,0	123,20 A	125,14 A	110,11 B	126,12 A
11,5	123,71 A	126,03 A	111,40 B	127,68 A
12,0	124,03 A	127,21 A	112,31 B	129,50 A
13,0	124,50 B	128,34 AB	114,95 C	131,84 A
14,0	124,50 B	129,10 AB	116,63 C	133,26 A

Continuação Tabela 8.

15,0	124,71 B	129,35 AB	117,33 C	134,22 A
16,0	124,73 B	129,58 AB	118,30 C	135,20 A
17,0	124,85 B	130,19 AB	119,19 B	135,89 A
18,0	124,98 BC	130,27 B	119,82 C	136,81 A
19,0	125,01 BC	130,48 B	120,57 C	137,34 A
20,0	125,07 BC	130,48 B	121,05 C	137,41 A
21,0	125,20 BC	130,59 B	121,95 C	138,04 A
22,0	125,36 BC	130,59 B	122,35 C	138,17 A
23,0	125,42 BC	130,97 B	123,82 C	138,66 A
24,0	125,42 BC	130,97 B	124,20 C	138,96 A
25,0	125,45 B	131,13 B	124,94 B	139,03 A
26,0	125,45 B	131,13 B	124,94 B	139,03 A
27,0	125,69 B	131,16 B	125,52 B	139,52 A
28,0	125,69 B	131,16 B	126,01 B	139,56 A
30,0	125,83 B	131,26 B	126,98 B	139,63 A
32,0	126,11 B	131,38 B	128,70 B	140,42 A
34,0	126,18 B	131,48 B	129,73 B	140,84 A
36,0	126,25 B	131,52 B	130,48 B	141,21 A
39,0	126,61 B	132,11 B	131,65 B	142,19 A
42,0	127,11 B	132,49 B	133,08 B	142,85 A
CV (%)	4,80			

\*médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

Com base na germinação mais rápida, considerando, neste caso, a protusão da radícula, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os verificados pelos referidos autores, no que tange à coloração dos tegumentos e protrusão radicular. Contudo, em relação à absorção mais lenta de água não, visto que IAC, de tegumento preto, apresentou ganho de água semelhante, e até superior a alguns genótipos em muitos momentos.

Além disso, essa semi-permeabilidade, creditada aos genótipos de tegumentos pretos, tem sido relacionada à maior concentração de lignina presente

nessa estrutura de proteção das sementes. Entretanto, reforça-se, mais uma vez, com base na quantidade de lignina verificada nesses genótipos, especialmente no IAC (Tabela 3 – Ensaio II) e, no padrão de hidratação (Tabela 8), que esta constatação mencionada por alguns autores (GRIS et al., 2010; SANTOS et al., 2007) não se confirmou plenamente, já que o IAC se manteve semelhante aos demais na primeira meia hora de hidratação de suas sementes e não diferindo, até duas horas de embebição de BMX Potência RR.

Outro fato relevante é que, o genótipo TP apresentou, a partir de duas horas até, aproximadamente, 18 horas de embebição, menor ganho de água em relação às sementes dos outros genótipos (Tabela 8, Figura 11). Contudo, a sua concentração de lignina foi de 4,99%; ou seja, inferior à verificada no genótipo IAC, 8,26% (Tabela 3).

Merece ser considerado também que, no período compreendido entre duas a quatro horas e meia de hidratação, o ganho de água das sementes dos genótipos IAC e CD 202 não diferiu. Ou seja, o IAC, com maior concentração de lignina nos seus tegumentos, embebeu água de forma semelhante ao CD 202, genótipo este, com a menor concentração de lignina, em torno de 1,77% apenas (Tabela 3 – Ensaio II); evidenciando que a lignina não foi o fator determinante para a semi-permeabilidade das sementes de soja com tegumentos contrastantes.

Ao analisar a embebição das sementes de cada genótipo de forma separada, em relação ao período de avaliação, verificou-se comportamento semelhante nos primeiros momentos de hidratação das sementes para todos os genótipos, até aproximadamente um ganho de água de 30% em relação à sua massa inicial (Figura 11). A partir de duas horas, o genótipo BMX Potência RR aumentou o ganho de água em relação aos demais genótipos até aproximadamente cinco horas, estabilizando desde então.

O genótipo CD 202 seguiu na sequência de BMX Potência RR, estabilizando o ganho de água em torno de dez horas do início do teste. IAC apresentou um ganho de água um pouco menor que CD 202 nos períodos iniciais de avaliação até, aproximadamente, 14 horas, estabilizando na sequência. Este padrão distinto de absorção entre cultivares corrobora com os resultados obtidos por Braccini et al. (1997).

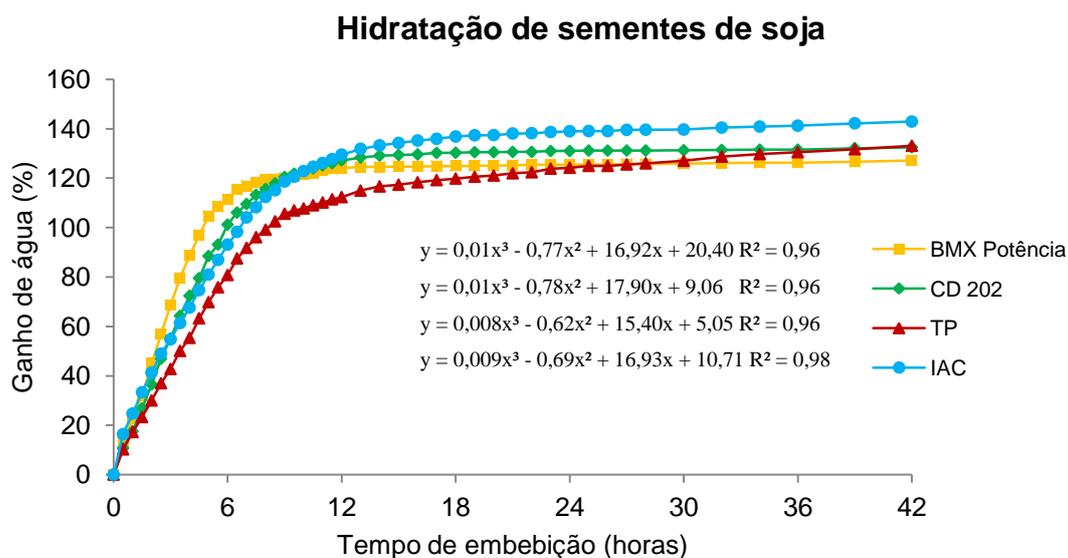


Figura 11 - Dados médios do ganho de água das sementes dos genótipos de tegumentos pretos, IAC e TP, e das cultivares de tegumentos amarelos, CD 202 e BMX Potência RR, em função do tempo de embebição.

O genótipo TP apresentou um ganho de água menor desde o início da avaliação em comparação aos demais genótipos. Contudo, com 25 horas de embebição, o TP foi capaz de atingir o mesmo nível de hidratação que CD 202. Genótipos de tegumentos pretos absorvem água de forma mais lenta, o que lhes permite reorganizar melhor o seu sistema de membranas e, com isso, reduzir o estresse causado em relação à absorção de água durante o processo de germinação, potencializando um estande mais uniforme na lavoura e emergência mais rápida das plântulas (PESKE & PEREIRA, 1983; SANTOS et al., 2007; TAVARES et al., 1987).

Marwanto (2004) sugeriu que genótipos que embebem água lentamente apresentam valores de germinação elevados e de condutividade elétrica mais baixos. No entanto, com base nos resultados de germinação e de condutividade elétrica observados (Tabelas 4 e 6), essa afirmativa não se aplica no presente estudo.

Uma questão que pode estar diretamente relacionada ao padrão de embebição observado no genótipo TP é a sua relação massa de tegumentos / massa de sementes (Tabela 7). Essa maior quantidade de massa de tegumento

pode ter limitado a velocidade do processo de germinação e emergência das sementes do genótipo TP, visto que o mesmo apresentou-se similar e, muitas vezes, inferior na maior parte dos testes, em relação ao seu semelhante, o genótipo IAC, que por sua vez, por apresentar menor massa de tegumentos e menor relação deste, obteve maior velocidade nos processos de germinação e emergência.

Apesar de não avaliarem a relação de massa dos tegumentos Andrade (2012) e Menezes et al. (2009) também verificaram menor índice de velocidade de germinação dos genótipos de tegumentos pretos em detrimento às cultivares de tegumentos amarelos, vindo ao encontro do observado neste estudo (Tabela 6).

No caso dos genótipos de tegumentos amarelos, especial atenção deve ser dada à cultivar BMX Potência RR. Esta, de uma maneira geral, apresentou resultados inferiores aos demais genótipos avaliados em muitos testes realizados, como o comprimento de raiz e comprimento total com imersão das sementes (Tabela 5) e velocidade de emergência (Tabela 6).

Apesar de não diferir da cultivar CD 202 em alguns testes, seus valores de vigor foram menores em determinados casos. Isso pode estar relacionado à maior velocidade de hidratação das sementes deste genótipo em relação aos demais, o que pode ter prejudicado a adequada reorganização do sistema de membranas devido ao estresse causado pelo excesso de água que chega ao interior da semente nesta etapa inicial do processo germinativo. Esse resultado reforça que a concentração de lignina não foi o fator condicionante à maior qualidade fisiológica das sementes, no caso das cultivares de tegumentos amarelos, visto que BMX Potência RR apresentou maior concentração desse constituinte em relação a CD 202.

Em relação à protrusão da radícula observou-se, para BMX Potência RR e CD 202, que esta estrutura emergiu com 39 horas de embebição, aproximadamente. Este resultado vem ao encontro do observado por Carvalho et al. (2012), que constatou protrusão da radícula das sementes de soja de tegumentos amarelos com 38 e 39 horas de embebição, para as cultivares CD 206 RR e CD 206 convencional, respectivamente.

Para os genótipos de tegumentos pretos a radícula apareceu precocemente em relação aos de tegumentos amarelos. No IAC a protusão da radícula ocorreu com 28 horas e, para TP, com 30 horas de embebição. Este resultado é importante, uma vez que a maior rapidez na germinação das sementes e emergência das plântulas a campo resulta na redução da exposição das sementes ao ataque de microrganismos patogênicos, considerando, entretanto, que nesta fase, o estresse hídrico pode comprometer o estabelecimento inicial das plântulas na lavoura.

## 5. Conclusões

Os genes VINV1, SCS1, SBP e LEGINSULIN apresentam maior expressão nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos de BMX Potência RR e, o gene CHS8\*, nas fases finais de desenvolvimento dos tegumentos deste mesmo genótipo.

Os genes SCB1 e SGF14c apresentam maior expressão nas fases iniciais de desenvolvimento dos tegumentos de CD 202 e, o gene CHIA1, nas fases finais deste mesmo genótipo.

As concentrações de compostos fenólicos, potencial antioxidante, antocianinas, carotenóides e lignina são maiores nos genótipos de tegumentos pretos.

Tegumentos pretos de sementes de soja possuem a camada paliçádica e as células em ampulheta mais espessas em comparação aos genótipos de tegumentos amarelos, sendo a camada paliçádica também mais lignificada nos tegumentos pretos.

Genótipos de tegumentos pretos, em especial o IAC, apresentam qualidade fisiológica superior em relação aos de tegumentos amarelos;

O genótipo de tegumento amarelo BMX Potência RR possui hidratação maior de suas sementes que os outros genótipos nas primeiras horas de embebição e TP, de tegumento preto, a menor; contudo, este último e IAC emitem a radícula mais rápido que genótipos de tegumentos amarelos.

A concentração de lignina nos tegumentos não influencia a hidratação das sementes de soja.

### Referências bibliográficas

AKSAMIT, A.; KOROBCEZAK, A.; SKALA, J.; LUKASZEWICZ, M.; SZOPA, J. The 14-3-3 gene expression specificity in response to stress is promoter-dependent. **Plant and Cell Physiology**, v.46, n.10, p.1635–1645, 2005.

ALPER, J. New insights into type 2 diabetes. **Science**, v.289, n.5476, p.37-39, 2000.

ALVAREZ, P. J. C.; KRZYZANOWSKI, F. C.; MANDARINO, J. M.; FRANÇA-NETO, J. B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v.25, n.2, p.209-214, 1997.

ANDRADE, E. R. de. **Caracterização e comparação da linhagem de soja UNB 1125 de tegumento preto com genótipos comerciais**. 2012. 40f. Monografia (TCC de Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Nacional de Brasília, Brasília, 2012.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 17.ed. Gaithersburg, MD, **USA**: Official Method 900.02, 920.36 C, 970.64, 979.09, 1990.

APPLIED BIOSYSTEMS. Disponível em: <suporte@appliedbiosystems.com>. Acesso em: 20 ago. 2012.

ARGYROPOULOS, D.; PSALLIDA, C.; SPYROPOULOS, C. G. Generic normalization method for real-time PCR application for the analysis of the mannanase gene expressed in germinating tomato seed. **FEBS Journal**, v.273, n.4, p.770-777, 2006.

BAI, M. Y.; ZHANG, L. Y.; GAMPALA, S. S.; ZHU, S. W.; SONG, W. Y.; CHONG, K.; WANG, Z. Y. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling

in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.104, n.34, p.13839–13844, 2007.

BARR, J. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. **Cell**, v.66, n.1, p.1-3, 1991.

BASKIN, C. C. Breaking physical dormancy in seeds — focussing on the lens. **New Phytologist**, v.158, n.2, p.229–232, 2003.

BATCHELOR, A. K.; BOUTILIER, K.; MILLER, S. S.; HATTORI, J.; BOWMAN, L. A.; HU, M.; LANTIN, S.; JOHNSON, D. A.; MIKI, B. L. A. SCB1, a BURP-domain protein gene from developing soybean seed coats. **Planta**, v.215, n.4, p.523–532, 2002.

BATCHELOR, A. K.; BOUTILIER, K.; MILLER, S. S.; LABBE´, H.; BOWMAN, L. A.; HU, M.; JOHNSON, D. A.; GIJZEN, M.; MIKI, B. L. A. The seed coat-specific expression of a subtilisin-like gene, SCS1, from soybean. **Planta**, v.211, n.4, p.484–492, 2000.

BAUMANN, C. A.; RIBON, V.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; MORA, S.; SHIGEMATSU, S.; BICKEL, P. E.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v.407, n.407, p.202-207, 2000.

BEILINSON, V.; MOSKALENKO, O. V.; LIVINGSTONE, D. S.; REVERDATTO, S. V.; JUNG, R.; NIELSEN, N. C. Two subtilisin-like proteases from soybean. **Physiologia Plantarum**, v.115, n.4, p.585-597, 2002.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; LI, X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, v.15, n.2, p.139–152, 2000.

BEISSON, F.; LI, Y.; BONAVENTURE, G.; POLLARD, M.; OHLROGGE, J. B. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.19, n.1, p.351–368, 2007.

BENITEZ, E. R.; FUNATSUKI, H.; KANEKO, Y.; MATSUZAWA, Y.; BANG, S. W.; TAKAHASHI, R. Soybean maturity gene effects on seed coat pigmentation and cracking in response to low temperatures. **Crop Science**, v.44, n.6, p.2038–2042, 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination.** New York, USA: Plenum Press, 1994.

BHARTIYA, A.; ADITYA, J. P.; SINGH, G.; GUPTA, A.; AGARWAL, P. K.; BHAT, J. C. Assessment of genetic diversity in indigenous and exotic collections of black soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**, v.43, n.1, p.81-90, 2011.

BIHMIDINE, S.; HUNTER, C. T.; JOHNS, C. E.; KOCH, K. E.; BRAUN, D. M. Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.177, p.1-15, 2013.

BORISJUK, L.; WALENTA, S.; WEBER, H.; MUELLER-KLIESER, W.; WOBUS, U. High resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. **The Plant Journal**, v.15, n.5, p.583–591, 1998.

BRACCINI, A. de L.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, C. S.; ROCHA, V. S.; SEDIYAMA, T. Condicionamento osmótico de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, n.1, p.71-79, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. **Regras para análise de sementes.** 1ª.ed. Brasília: MAPA. 2009. 398 p.

BRAUN, H.; CZIHAL, A.; SHUTOV, A. D.; BAÜMLEIN, H. A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose-binding proteins. **Plant Molecular Biology**, v.31, n.1, p.35–44, 1996.

BRÜNING, J. C.; GAUTMAM, D.; BURKS, D. J.; GILLETTE, J.; SCHUBERT, M.; ORBAN, P. C.; KLEIN, R.; KRONE, W.; MÜLLER-WIELAND, D.; KAHN, C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, v.289, n.5487, p.2122-2125, 2000.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information

for publication of quantitative real time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p.611-622, 2009.

CAPELETI, I.; FERRARESE, M. L. L.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FERRARESE-FILHO, O. A new procedure for the quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with the resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v.33, n.2, p.511–515, 2005.

CARRARO, I. M.; PESKE, S. T. Uso de sementes de soja no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.2, p.75-80, 2005.

CARVALHO, T. C. de; GRZYBOWSKI, C. R. de S.; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Comparação da qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e de sua derivada transgênica. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.1, p.164-170, 2012.

CAVARIANI, C.; TOLEDO, M. Z.; RODELLA, R. A.; FRANÇA NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.30-39, 2009.

CAVINESS, C. E.; SIMPSON JUNIOR, A. M. Influence of variety and location on seed coat thickness of mature soybean seed. **Proceedings of the Associations of Seed Analysis**, v.64, p.102-108, 1974.

CHANDLEE, J. M.; VODKIN, L. O. Unstable expression of a soybean gene during seed coat development. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, n.4, p.587–594, 1989.

CHO, Y. B.; JONES, S. I.; VODKIN, L. The transition from primary siRNAs to amplified secondary siRNAs that regulate chalcone synthase during development of *Glycine max* seed coats. **Plos One**, v.8, n.10, p.1-10, 2013.

CHOPRA, J.; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Activities of sucrolytic enzymes in developing pods of lentil genotypes differing in seed size. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, n.1, p.89–93, 2005.

CLOUGH, S. J.; TUTEJA, J. H.; LI, M.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; VODKIN, L. O. Features of a 103-kb gene-rich region in soybean include an inverted

perfect repeat cluster of *CHS* genes comprising the *I* locus. **Genome**, v.47, n.5, p.819–831, 2004.

CONAB. Safras: comparativo de área, produção e produtividade. Acessado em junho de 2013. On-line. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_04\\_14\\_11\\_56\\_28\\_boletim\\_graos\\_abril\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_14_11_56_28_boletim_graos_abril_2014.pdf)>. Acesso em: 22 abr. 2014.

CONTIM, L. A. S.; WACKLAWOVSKY, A. J.; DELÚ-FILHO, N.; PIROVANI, C. P.; CLARINDO, W. R.; LOUREIRO, M. E.; CARVALHO, C. R.; FONTES, E. P. B. The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression of the SBP2 promoter. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.393, p.2643-2653, 2003.

COSTA, N. P. da; MESQUITA, C. de M.; MAURINA, A. C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; PEREIRA, J. E.; BORDINGNON, J. R.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Efeito da colheita mecânica da soja nas características físicas, fisiológicas e químicas das sementes em três estados do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.140-145, 2001.

DANTAS, I. B.; OLIVEIRA, J. A. de; SANTOS, H. O. dos; VON PINHO, E. V. R.; ROSA, S. D. V. F. da. Influence of lignin content in soybean seed coat on the incidence of the storage fungus *Aspergillus flavus*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n.4, p.541-548, 2012.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v.10, n.3, p.397–412, 2011.

DATTA, N.; LAFAYETTE, P. R.; KRONER, P. A.; NAGAO, R. T.; KEY, J. L. Isolation and characterization of three families of auxin down regulated cDNA clones. **Plant Molecular Biology**, v.21, n.5, p.859–869, 1993.

DEBEAUJON, I.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.122, n.2, p.403–413, 2000.

DHAUBHADEL, S.; LI, X. A new client for 14-3-3 proteins: GmMYB176, an R1 MYB transcription factor. **Plant Signaling and Behavior**, v.5, n.3, p.921-923, 2010.

DHAUBHADEL, S.; GIJZEN, M.; MOY, P.; FARHANGKHOEE, M. Transcriptome analysis reveals a critical role of CHS7 and CHS8 genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds. **Plant Physiology**, v.143, n.1, p.326–338, 2007.

DING, X.; HOU, X.; XIE, K.; XIONG, L. Genome-wide identification of BURP domain-containing genes in rice reveals a gene family with diverse structures and responses to abiotic stresses. **Planta**, v.230, n.1, p.149–163, 2009.

DINKOVA, T. D.; AGUILAR, R.; SÁNCHEZ, de J. E. Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. **Biochemical Journal**, v.351, n.3, p.825-831, 2000.

DUAN, M.; SUN, S. S. M. Profiling the expression of genes controlling rice grain quality. **Plant Molecular Biology**, v.59, n.1, p.165–178, 2005.

DUNWELL, J. M.; KHURI, S.; GANE, P. J. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.1, p.153–179, 2000.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.185-209, 2004.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.71, p.428-434, 1958.

ELLIOT, K. J.; BUTLER, W. O.; DICKINSON, C. D.; KONNO, Y.; VEDVICK, T. S.; FITZMAURICE, L.; MIRKOV, E. T. Isolation of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. **Plant Molecular Biology**, v.21, n.3, p.515-524, 1993.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11p. (Special report, 80).

FLOR, E. P. O.; CICERO, S. M.; FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.68-76, 2004.

FONTANINI, D.; JONES, B. L. SEP-1 - a subtilisin-like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Morex. **Planta**, v.215, n.6, p.885-893, 2002.

FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: **A cultura da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000. CD-ROM.

FREITAS, R. L.; CARVALHO, C. M.; FIETTO, L. G.; LOUREIRO, M. E.; ALMEIDA, A. M.; FONTES, E.P.B. Distinct repressing modules on the distal region of the SBP2 promoter contribute to its vascular tissue-specific expression in different vegetative organs. **Plant Molecular Biology**, v.65, n.5, p.603–614, 2007.

FRIEDMANN, M.; RALPH, S. G.; AESCHLIMAN, D.; ZHUANG, J.; RITLAND, K.; ELLIS, B. E.; BOHLMANN, J.; DOUGLAS, C. J. Microarray gene expression profiling of developmental transitions in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) apical shoots. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.3, p.593-614, 2007.

GAMPALA, S. S.; KIM, T. W.; HE, J. X.; TANG, W.; DENG, Z.; BAI, M. Y.; GUAN, S.; LALONDE, S.; SUN, Y.; GENDRON, J. M.; CHEN, H.; SHIBAGAKI, N.; FERL, R. J.; EHRHARDT, D.; CHONG, K.; BURLINGAME, A. L.; WANG, Z. Y. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**, v.13, n.2, p.177–189, 2007.

GAN, D.; JIANG, H.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; ZHU, S.; CHENG, B. Genome-wide analysis of BURP domain-containing genes in Maize and Sorghum. **Molecular Biology Reports**, v.38, n.7, p.4553–4563, 2011.

GELLY, J. C.; GRACY, J.; KAAS, Q.; LE-NGUYEN, D.; HEITZ, A.; CHICHE, L. The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.1, p.D156–D159, 2004.

GIJZEN, M.; KUFLU, K.; QUTOB, D.; CHERNYS, J. T. A class I chitinase from soybean seed coat. **Journal Experimental Botany**, v.52, n.365, p.2283–2289, 2001.

GITHIRI, S. M.; YANG, D.; KHAN, N. A.; XU, D.; KOMATSUDA, T.; TAKAHASHI, R. QTL analysis of low temperature induced browning in soybean seed coats. **Journal of Heredity**, v.98, n.4, p.360–366, 2007.

GLORIA, B. A.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2ª ed. Viçosa, MG:UFV, 2006.

GODOY, A. V.; LAZZARO, A. S.; CASALONGUE, C. A.; SAN SEGUNDO, B. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. **Plant Science**, v.152, n.2, p.123-134, 2000.

GOODMAN, D. B. P.; DAVIS, W. L. Insulin accelerates the post germinative development of several fat storing seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.190, n.2, p.440-446, 1992.

GOORMACHTIG, S.; LIEVENS, S.; VAN DE WELDE, W.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. S. rchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata* related to acidic class III chitinases. **The Plant Cell**, v.10, n.6, p.905–915, 1998.

GRESSENT, F.; SILVA, P. da; EYRAUD, V.; KARAKI, L.; ROYER, C. Pea Albumin 1 Subunit b (PA1b), a promising bioinsecticide of plant origin. **Toxins**, v.3, n.1, p.1502-1517, 2011.

GRIMES, H. D.; OVERVOORDE, P. J.; RIPP, K.; FRANCESCHI, V. R.; HITZ, W. D. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **The Plant Cell**, v.4, n.12, p.1561–1574, 1992.

GRIS, C. F.; VON PINHO, E. V. de R.; ANDRADE, T.; BALDONI, A.; CARVALHO, M. L. de M. Qualidade fisiológica e teor de lignina no tegumento de sementes de soja convencional e transgênica RR submetidas a diferentes épocas de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.2, p.374-381, 2010.

HAJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J. W.; THELEN, J. J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, v.137, n.4, p.1397–1419, 2005.

HE, Y.; GAN, S. A novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v.54, n.1, p.1-9, 2004.

HEIM, U.; WANG, Q.; KURZ, T.; BORISJUK, L.; GOLOMBEK, S.; NEUBOHN, B.; ADLER, K.; GAHRTZ, M.; SAUER, N.; WEBER, H.; WOBUS, U. Expression patterns and subcellular localization of a 52 kDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia*

*fab* (VfSBPL) suggest different functions during development. **Plant Molecular Biology**, v.47, n.4, p.461–474, 2001.

HENNING, F. A. **Expressão de genes em plantas de soja sob infecção pela ferrugem asiática e efeito do controle químico na qualidade de sementes**. 2010. 75f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

HENNING, F. A.; MAIA, L. C. da; MERTZ, L. M.; ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C. de. Predição *in silico* de marcadores microssatélites relacionados ao tegumento de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.49-56, 2009.

HENNING, F. A. **Mapeamento de caracteres do tegumento da semente de soja e análise *in silico* dos marcadores microssatélites**. 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências)– Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

HEREDIA, A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v.1620, n.1-3, p.1-7, 2003.

HU, R.; FAN, C.; LI, H.; ZHANG, Q.; FU, Y-F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v.10, n.93, p.1-12, 2009.

HU, T.; HU, Z.; QU, X.; REN, Y.; CHEN, G. Advances in plant lipoxygenases research. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v.25, n.1, p.1-9, 2009.

HUANG, G. Q.; XU, W. L.; GONG, S. Y.; LI, B.; WANG, X. L.; XU, D.; BAO LI, X. Characterization of 19 novel cotton FLA genes and their expression profiling in fiber development and in response to phytohormones and salt stress. **Physiologia Plantarum**, v.134, n.2, p.348-359, 2008.

HUBER, S. C.; MACKINTOSH, C.; KAISER, W. M. Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. **Plant Molecular Biology**, v.50, n.6, p.1053–1063, 2002.

IGARASHI, D.; ISHIDA, S.; FUKAZAWA, J.; TAKAHASHI, Y. 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. **The Plant Cell**, v.13, n.11, p.2483–2497, 2001.

INVITROGEN CORPORATION <sup>TM</sup>. **Vector NTI Advance 11.0**, 2008.

JOUVENSAL, L.; QUILLIEN, L.; FERRASSON, E.; RAHBE, Y.; GUEGUEN, J.; VOVELLE, F. PA1b, an insecticidal protein extracted from pea seeds (*Pisum sativum*): (1) H-2D-NMR study and molecular modeling. **Biochemistry**, v.42, n.41, p.11915–11923, 2003.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

KASAI, A.; WATARAI, M.; YUMOTO, S.; AKADA, S.; ISHIKAWA, R.; HARADA, T.; NIIZEKI, M.; SENDA, M. Influence of PTGS on chalcone synthase gene family in yellow soybean seed coat. **Breeding Science**, v.54, n.4, p.355–360, 2004.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases—regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.8, n.3, p.809–824, 2003.

KERN, M. F.; MRASCHIN, S. de F.; ENDT, D. V.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; PASQUALI, G. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.160, n.7, p.1933–1946, 2010.

KIPREOS, E. T.; PAGANO, M. The F-box protein family. **Genome Biology**, v.1, n.5, p.25-30, 2000.

KRZYZANOWSKI, F. C. Relationship between seed technology research and federal plant breeding programs. **Scientia Agrícola**, v.55, n. special, p.83-87, 1998.

KURAUCHI, T.; MATSUMOTO, T.; TANEDA, A.; SANO T.; SENDA, M. Endogenous short interfering RNAs of chalcone synthase genes associated with inhibition of seed coat pigmentation in soybean. **Breeding Science**, v.59, n.4, p.419–426, 2009.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analysis in Cranberries. **Hortscience**, v.7, p.83-84, 1972.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.405–430, 2006.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.455-496, 1990.

LI, X.; DHAUBHADEL, S. Soybean 14-3-3 gene family: identification and molecular characterization. **Planta**, v.233, n.3, p.569-582, 2011.

LI, C.; PTUSCHAK, T.; COLON-CARMONA, A.; GUTIERREZ, R. A.; DOERNER, P. *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.36, p.12.978-12.983, 2005.

LIANG, M.; DAVIS, E.; GARDNER, D.; CAI, X.; WU, Y. Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. **Planta**, v.224, n.5, p.1185–1196, 2006.

LIANG, M.; HAROLDSEN, V.; CAI, X.; WU, Y. Expression of a putative laccase gene, *ZmLAC1*, in maize primary roots under stress. **Plant, Cell and Environment**, v.29, n.5, p.746–753, 2006.

LICHTENTHALER, H. K.; SCHWENDER, J.; DISCH, A.; ROHMER, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. **FEBS Letters**, v.400, n.3, p.271-274, 1997.

LIU, B.; FUJITA, T.; YAN, Z. E.; SAKAMOTO, S.; XU, D.; ABE, J. QTL Mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*). **Annals of Botany**, v.100, n.5, p.1027–1038, 2007.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. **Real-time PCR: current technology and applications**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. 284p.

LÓPEZ-CASADO, G.; MATAS, A. J.; DOMINGUEZ, E.; CUARTERO, J.; HEREDIA, A. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.14, p.3875–3883, 2007.

LOUIS, S.; DELOBEL, B.; GRESSENT, F.; DUPORT, G.; DIOL, O.; RAHIOUI, I.; CHARLES, H.; RAHBE, Y. Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the A1b-like knottin peptide entomotoxins. **Phytochemistry**, v.68, n.4, p.521–535, 2007.

MA, E.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C. A.; GIJZEN, M. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. **Annals of Botany**, v.94, n.2, p.213-228, 2004.

MA, F.; PETERSON, C. A.; GIJZEN, M. Reassessment of the pits and antipits in soybean seeds. **Canadian Journal of Botany**, v.82, n.5, p.654–662, 2004.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MANSUR, L. K. LARK, G.; ORF, J. Results of seven years of QTL mapping using three sets of recombinant inbred lines of soybean (*Glycine max* L.). In: SYMPOSIUM OF MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF THE SOYBEAN, 1998, Knoxville, TN. **Proceedings...** University of Tennessee, 1998. p.F7.

MARWANTO. Soybean seed coat characteristics and its quality losses during incubator aging and storage. **Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia**, v.6, n.2, p.57-65, 2004.

MATSUMURA, H.; WATANABE, S.; HARADA, K.; SENDA, M.; AKADA, S.; KAWASAKI, S.; DUDOZET, E. G.; MINAKA, N.; TAKAHASHI, R. Molecular linkage mapping and phylogeny of the chalcone synthase multigene family in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, n.7, p.1203-1209, 2005.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v.49, n.1, p.183-186, 1921.

MENEZES, M. de; VON PINHO, E. V. de R.; ROVERI JOSÉ, S. C. B.; BALDONI, A.; MENDES, F. F. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p.1716-1723, 2009.

MERTZ, L. M. **Identificação de genes diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com caracteres contrastantes**. 2010. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia

de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; CRUZ, H. L. da; MENEGHELLO, G. E.; FERRARI, C. dos S.; ZIMMER, P. D. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.23-29, 2009.

MERTZ, L. M. **Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante**. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MEYER, C. J.; STEUDLE, E.; PETERSON, C. A. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.3, p.717–732, 2007.

MILLER, S. S.; BOWMAN, L. A.; GIJZEN, M.; MIKI, B. L. A. Early development of the testa of soybean (*Glycine max*). **Annals of Botany**, v.84, n.3, p.297–304, 1999.

MILLER, M. E.; CHOUREY, P. S. The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. **The Plant Cell**, v.4, n.3, p.297-305, 1992.

MIRANDA, H. L. da C. **Geração de cDNAs, primers e caracterização estrutural do tegumento de sementes de soja**. 2008. 53f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MOÏSE, J. A.; HAN, S.; GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D. A.; MIKI, B. L. A. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.41, n.5, p.620-644, 2005.

MONZÓN, D. L. R. **Expressão diferencial do gene FLA14 em tegumento de sementes de soja**. 2012. 29f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

NAKAMURA, T.; YANG, D.; KALAISELVI, S.; UEMATSU, Y.; TAKAHASHI, R. Genetic analysis of net-like cracking in soybean seed coats. **Euphytica**, v.133, n.2, p.179–184, 2003.

NDAKIDEMI, P. A.; DAKORA, F. D. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. **Functional Plant Biology**, v.30, n.7, p.729–745, 2003.

NEUTEBOOM, L. W.; NG, J. M. Y.; KUYPER, M.; CLIJDESDALE, O. R.; HOOYKASS, P. J.; VAN DER ZAAL, B. J. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. **Plant Molecular Biology**, v.39, n.2, p.273–287, 1999.

OVERVOORDE, P. J.; CHAO, W. S.; GRIMES, H. D. A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.25, p.15.898–15.904, 1997.

PALMER, R. G.; PFEIFFER, T. W.; BUSS, G. R.; KILEN, T. C. Quantitative genetics. In: BOERMA, H. R.; SPECHT, J. E. (Eds.). **Soybeans: improvement, production, and uses**. **American Society of Agronomy**, Madison, 3.ed., 2004. p.137–233.

PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B. Electrical conductivity of soybean seed and correlation with seed coat lignin content. **Seed Science and Technology**, v.27, n.3, p.945–949, 1999.

PATRICK, J. W.; BOTHA, F. C.; ANDBIRCH, R. G. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.11, n.2, p.142–156, 2013.

PAUL, A. L.; FOLTA, K. M.; FERL, R. J. 14-3-3 proteins, red light and photoperiodic flowering: A point of connection? **Plant Signal and Behavior**, v.3, n.8, p.511–515, 2008.

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; BARONA, G.; RYAN, C. A. A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.107, n.33, p.14.921–14.925, 2010.

PESKE, S. T.; BAUDET LABBÉ, L. M. Beneficiamento de sementes. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. 3ªed. 2012. 573p.

PESKE, S. T.; PEREIRA, L. A. G. Tegumento da semente de soja. **Tecnologia de Sementes**, v.6, n.1-2, p.23-34, 1983.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT – PRC. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2003-2007, 2001.

PIGNOCCHI, C.; DOONAN, J. H. Interaction of a 14-3-3 protein with the plant microtubule - associated protein EDE1. **Annals of Botany**, v.107, n. Special, p.1103-1109, 2011.

PIROVANI, C. P.; MACEDO, J. N. A.; CONTIM, L. A. S.; MATRANGOLO, F. S. V.; LOUREIRO, M. E.; FONTES, E. P. B. A sucrose - binding protein homologue from soybean exhibits GTP-binding activity that functions independently of sucrose transport activity. **European Journal of Biochemistry**, v.269, n.16, p.3998–4008, 2002.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, AGIPLAN. 1985. 289 p.

PULLA, R. K.; LEE, O. R.; IN, J-G.; PARVIN, S.; KIM, Y.J.; SHIM, J-S.; SUN, H.; KIM, Y-J.; SENTHIL, K.; YANG, D. C. Identification and characterization of class I chitinase in *Panax ginseng* C. A. Meyer. **Molecular Biology Reports**, v.38, n.1, p.95–102, 2011.

QUTOB, D.; MA, F.; PETERSON, C. A.; BERNARDS, M. A.; GIJZEN, M. Structural and permeability properties of the soybean seed coat. **Botany**, v.86, n.3, p.219–227, 2008.

RADWAN, O.; WU, X.; GOVINDARAJULU, M.; LIBAULT, M.; NEECE, D. J.; OH, M-H.; BERG, H.; STACEY, G.; TAYLOR, C. G.; HUBER, S. C.; CLOUGH, S. J. 14-3-3 proteins SGF14c and SGF14l play critical roles during soybean nodulation. **Plant Physiology**, v.160, n.4, p.2125-2136, 2012.

RAGLAND, M.; SOLIMAN, K. M. Sali5–4a and Sali3–2, two genes induced by aluminum in soybean roots. **Plant Physiology**, v.114, p.395–396, 1997.

RANATHUNGE, K.; SHAO, S.; QUTOB, D.; GIJZEN, M.; PETERSON, C. A.; BERNARDS, M. A. Properties of the soybean seed coat cuticle change during development. **Planta**, v.231, n.5, p.1171–1188, 2010.

RANOCHA, P.; CHABANNES, M.; CHAMAYOU, S.; DANOUN, S.; JAUNEAU, A.; BOUDET, A. M.; GOVNER, D. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiology**, v.129, n.1, p.145–155, 2002.

RAUTENGARTEN, C.; USADEL, B; NEUMETZLER, L.; HARTMANN, J.; BÜSSIS, D.; ALTMANN, T. A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from *Arabidopsis* seed coats. **The Plant Journal**, v.54, n.3, p.466–480, 2008.

RHONE, M.; BASU, A. Phytochemicals and age-related eye diseases. **Nutrition Reviews**, v.66, n.8, p.465-472, 2008.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, n.3, p.559S-569S, 2003.

ROCHA, C. S.; LUZ, D. F.; OLIVEIRA, M. L.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; MEDRANO, F. J.; FONTES, E. P. B. Expression of the sucrose binding protein from soybean: renaturation and stability of the recombinant protein. **Phytochemistry**, v.68, n.6, p.802–810, 2007.

RUAN, Y. L.; JIN, Y.; YANG, Y. J.; LI, G. J.; BOYER, J. S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, v.3, n.6, p.942–955, 2010.

RYAN, C. A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.; MOURA, D. S. Polypeptide hormones. **The Plant Cell**, v.14, n.1, p.S251-S264. 2002.

RYU, H.; KIM, K.; CHO, H.; PARK, J.; CHOE, S.; HWANG, I. Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. **The Plant Cell**, v.19, n.9, p.2749–2762, 2007.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Biotechnic and Histochemistry**, v.48, n.5, p.247-249, 1973.

SAKAMOTO, S.; ABE, J.; KANAZAWA, A.; SHIMAMOTO, Y. Marker-assisted analysis for soybean hard seededness with isozyme and simple sequence repeat loci. **Breeding Science**, v.54, n.2, p.133–139, 2004.

SÁNCHEZ de JIMÉNEZ, E.; BELTRÁN-PENÃ, E.; ORTÍZ-LÓPEZ, A. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axis during germination. **Physiologia Plantarum**, v.105, n.1, p.148-154, 1999.

SANTOS, E. L. dos; PÓLA, J. N.; BARROS, A. S. do R.; PRETE, C. E. C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.20-26, 2007.

SCHOONHEIM, P. J.; PEREIRA, D. da C.; BOER, A. H. de. Dual role for 14-3-3 proteins and ABF transcription factors in gibberellic acid and abscisic acid signalling in barley (*Hordeum vulgare*) aleurone cells. **Plant, Cell and Environmental**, v.32, n.5, p.439–447, 2009.

SENDA, M.; KURAUCHI, T.; KASAI, A.; OHNISHI, S. Suppressive mechanism of seed coat pigmentation in yellow soybean. **Breeding Science**, v.61, n.5, p.523–530, 2012.

SENDA, M.; MASUTA, C.; OHNISHI, S.; GOTO, K.; KASAI, A.; SANO, T.; HONG, J. S.; MACFARLANE, S. Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes. **The Plant Cell**, v.16, n.4, p.807–818, 2004.

SHAO, Y.; WEI, G.; WANG, L.; DONG, Q.; ZHAO, Y.; CHEN, B.; XIANG, Y. Genome-wide analysis of burp domain-containing genes in *Populus trichocarpa*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.53, n.9, p.743–755, 2011.

SHAO, S.; MEYER, C. J.; MA, F.; PETERSON, C. A.; BERNARDS, M. A. The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.5, p.1071–1082, 2007.

SILVA, P. da; STRZEPA, A.; JOUVENSAL, L.; RAHIOUI, I.; GRESSENT, F.; DELMAS, A. F. A folded and functional synthetic PA1b: an interlocked entomotoxic miniprotein. **Peptide Science**, v.92, n.5, p.436-444, 2009.

SILVA, M. A. D. da; VIEIRA, R. D.; SANTOS, J. M. dos. Influência do envelhecimento acelerado na anatomia da testa de sementes de soja, cv. Monsoy 8400. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.91-99, 2008.

SILVA, M. A. D. **Morfologia da testa e potencial fisiológico de sementes de soja**. 2003. 95f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2003.

SILVA, L. B.; SANTOS, S. S. S.; AZEVEDO, C. R.; CRUZ, M. A. L.; VENÂNCIO, T. M.; CAVALCANTE, C. P.; UCHÔA, A. F.; ASTOLFI FILHO, S.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. The leaves of greenplants as well as a cyanobacterium, red alga, and fungi contain insulin-like antigens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.3, p.297-303, 2002.

SVENNELID, F.; OLSSON, A.; PIOTROWSKI, M.; ROSENQUIST, M.; OTTMAN, C.; LARSSON, C.; OECKING, C.; SOMMARIN, M. Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H(+)-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. **The Plant Cell**, v.11, n.12, p.2379–2391, 1999.

SOUZA, F. H. D. de; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed - environment relationships in Fabaceae. **Brazilian Journal of Botany**, v.24, n.4, p.365-375, 2001.

STAEHELIN, C.; GRANADO, J.; MULLER, J.; WEIMKEN, A.; MELLOR, R. B.; FELIX, G.; REGENASS, M.; BROUGHTON, W. J.; BOLLER, T. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.91, n.6, p.2196–2200, 1994.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.

SWANSON, B. G.; HUGHES, J. S.; RASMUSSEN, H. P. Seed microstructure: review of water inhibition in legumes. **Food Microstructure**, v.4, p.115-124, 1985.

TAKENAKA, Y.; NAKANO, S.; TAMOI, M.; SAKUDA, S.; FUKAMIZO, T. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, n.5, p.1066-1071, 2009.

TAN-WILSON, A.; BANDAK, B.; PRABU-JEYABALAN, M. The PA domain is crucial for determining optimum substrate length for soybean protease C1: Structure and kinetics correlate with molecular function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.53, n.6, p.27-32, 2012.

TAVARES, D. Q.; MIRANDA, M. A. C.; UMINO, C. Y.; DIAS, G. M. Características estruturais do tegumento de sementes permeáveis e impermeáveis de linhagens de soja. **Brazilian Journal of Botany**, v.10, n.2, p.147-153, 1987.

TEERAWANICHPAN, P.; XIA, Q.; CALDWELL, S. J.; DATLA, R.; SELVARAJ, G. Protein storage vacuoles of *Brassica napus* zygotic embryos accumulate a BURP domain protein and perturbation of its production distorts the PSV. **Plant Molecular Biology**, v.71, n.4-5, p.331–343, 2009.

TIAN, A. G.; WANG, J.; CUI, P.; HAN, Y. J.; XU, H.; CONG, L. J.; HUANG, X. G.; WANG, X. L.; JIAO, Y. Z.; WANG, B. J.; WANG, Y. J.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Characterization of soybean genomic features by analysis of its expressed sequence tags. **Theoretical Applied Genetics**, v.108, n.5, p.903-913, 2004.

TILLMANN, M. A. A.; MENEZES, N. L. de. Análise de sementes. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. (Orgs.). **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. 3ªed. 2012. p.161-272.

TODA, K.; YANG, D.; YAMANAKA, N.; WATANABE, S.; HARADA, K.; TAKAHASHI, R. A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. **Plant Molecular Biology**, v.50, n.2, p.187–196. 2002.

TURGEON, R. The puzzle of phloem pressure. **Plant Physiology**, v.154, n.2, p.578–581, 2010.

TUTEJA, J. H.; VODKIN, L. O. Structural features of the endogenous CHS silencing and target loci in the soybean genome. **Crop Science**, v.48, n.1, p.S49–S68, 2008.

TUTEJA, J. H.; CLOUGH, S. J.; CHAN, W. C.; VODKIN, L. O. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. **The Plant Cell**, v.16, n.4, p.819–835, 2004.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. **Journal of Animal Science**, v.26, n.1, p.119-128, 1967.

VANZOLINI, S.; ARAKI, C. A. S.; SILVA, A. C. T. M.; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.90-96, 2007.

VARGAS, W. A.; SALERNO, G. L. The Cinderella story of sucrose hydrolysis: alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. **Plant Science**, v.178, n.1, p.1–8, 2010.

VASCONCELOS, M.; GONDIM, D. C.; GOMES, L. J.; SILVA-MANN, R. Expressão gênica diferencial de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. submetidas ao estresse combinado de temperatura e restrição hídrica. **Scientia Plena**, v.6, n.12, p.1-5, 2010.

VENÂNCIO, T. M.; OLIVEIRA, A. E. A.; SILVA, L. B.; MACHADO, O. L. T.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (Cowpea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.9, p.1167-1173, 2003.

VERNETTI, F. J.; VERNETTI JUNIOR, F. J. **Genética da soja**: caracteres qualitativos e diversidade genética. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 221 p.

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

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, v.6, n.3, p.206–220, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.18, p.8365–8373, 2008.

XU, W. F.; SHI, W. M. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR. **Annals of Botany**, v.98, n.5, p.965–974, 2006.

WANG, J.; SUEN, P. K.; XU, Z. F.; JIANG, L. A 64 kDa sucrose binding protein is membrane-associated and tonoplast-localized in developing mung bean seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.2, p.629–639, 2009.

WANG, H. L.; GRUSAK, M. A. Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. **Annals of Botany**, v.95, n.5, p.737–747, 2005.

WATANABE, Y.; BARBASHOV, S. F.; KOMATSU, S.; HEMMING, A. M.; TSUNASAWA, S.; HIRANO, H. A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein isolation, primary structure and cDNA cloning. **European Journal of Biochemistry**, v.224, n.1, p.167-172, 1994.

WEBB, D. M.; BALTAZAR, B. M.; RAO ARELLI, A. P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIMW, P.; BEAVIS, D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, n.4, p.574–581, 1995.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.253–279, 2005.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; HEIM, U.; BUCHNER, P.; WOBUS, U. Seed coat-associated Invertases of *Fava bean* control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. **The Plant Cell**, v.7, n.11, p.1835-1846, 1995.

WENZEL, D.; SCHAUERMANN, G.; VON LUPKE, A.; HINZ, G. The cargo in vacuolar storage protein transport vesicles is stratified. **Traffic**, v.6, n.1, p.45–55, 2005.

WOBUS, U.; WEBER, H. Seed maturation: genetic programs and control signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, n.1, p.33–38, 1999.

YAKLICH, R. W.; VIGIL, E. L.; WERGIN, W. P. Morphological and fine structural characteristics of aerenchyma cells in the soybean seed coat. **Seed Science and Technology**, v.23, n.2, p.321–330, 1995.

YAKLICH, R. W.; BARLA-SZABO, G. Seed coat cracking in soybean. **Crop Science**, v.33, n.5, p.1016–1019, 1993.

YAKLICH, R. W.; VIGIL, E. L.; ERBE, E. F.; WERGIN, W. P. The fine structure of aleurone cells in the soybean seed coat. **Protoplasma**, v.167, n.1-2, p.108–119, 1992.

YAMAZAKI, T.; TAKAOKA, M.; KATOH, E.; HANADA, K.; SAKITA, M.; SAKATA, K.; NISHIUCHI, Y.; HIRANO, H. A possible physiological function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes. **European Journal of Biochemistry**, v.270, n.6, p.1269–1276, 2003.

YAN, J.; HE, C.; WANG, J.; MAO, Z.; HOLADAY, S. A.; ALLEN, R. D.; ZHANG, H. Over expression of the *Arabidopsis* 14-3-3 protein GF14 $\lambda$  in cotton leads to a “stay-green” phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. **Plant and Cell Physiology**, v.45, n.8, p.1007–1014, 2004.

YANG, X.; TU, L.; ZHU, L.; FU, L.; MIN, L.; ZHANG, X. Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.13, p.3661-3674, 2008.

YI, J.; DERYNCK, M. R.; LI, X.; TELMER, P.; MARSOLAIS, F.; DHAUBHADEL, S. A single repeat MYB transcription factor, GmMYB176, regulates CHS8 gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean. **The Plant Journal**, v.62, n.6, p.1019–1034, 2010.

ZABALA, G.; VODKIN, L. A rearrangement resulting in small tandem repeats in the F3'5'H gene of white flower genotypes is associated with the soybean *W1* locus. **Crop Science**, v.47, n.2, p.S113–S124. 2007.

ZABALA, G.; VODKIN, L. Novel exon combinations generated by alternative splicing of gene fragments mobilized by a CACTA transposon in *Glycine max*. **BMC Plant Biology**, v.7, n.38, p.1-9, 2007.

ZABALA, G.; VODKIN, L. The *wp* mutation of *Glycine max* carries a gene-fragment-rich transposon of the CACTA superfamily. **The Plant Cell**, v.17, n.10, p.2619–2632, 2005.

ZABALA, G.; VODKIN, L. Cloning of the pleiotropic *T* locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase. **Genetics**, v.163, n.1, p.295–309, 2003.

ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification**: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application N°.0534858, 1993.

ZENG, C.-L.; WANG, J.-B.; LIU, A.-L.; WU, X.-M. Seed coat microsculpturing changes during seed development in diploid and amphidiploid *Brassica* species. **Annals of Botany**, v.93, n.5, p.555–566, 2004.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y.; TANG, X. J.; DENG, Y. Y.; CHI, J. W. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.11, p.5935–5944, 2011.

ZHANG, M. E.; GUO, B. J. Nutritional functions and exploitation of black cereal and oil food resources. **Journal of South China Normal University**, v.5,n.2, p.114-120, 2001.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v.12, n.8, p.1047-1064, 2005.

ZIMMER, P. D. Fundamentos da qualidade da semente. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. (Orgs.). **Sementes**: Fundamentos científicos e tecnológicos. 3ªed., 2012. p.105-160.

## **Anexos**

## Anexo A

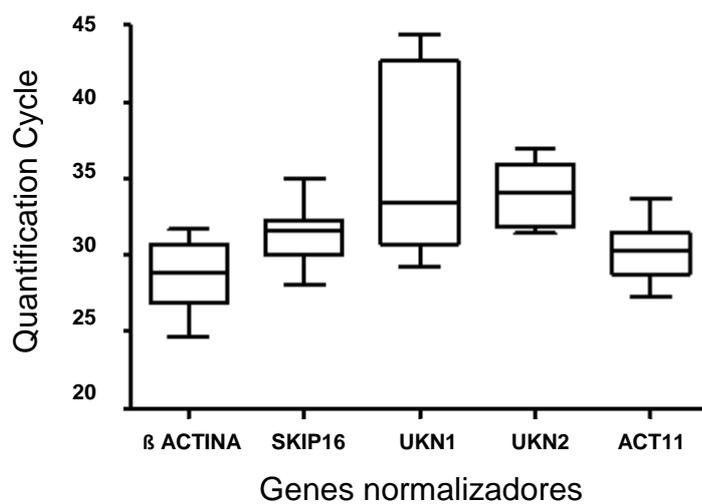
Características das cultivares de soja CD 202 e BMX Potência RR.

Características	Cultivares	
	CD 202	BMX Potência RR
Hábito de crescimento	Determinado	Indeterminado
Grupo de maturidade relativa	6,4	6,7
Ciclo*	116-130 dias	106-114 dias
Altura de planta*	103 cm	90-100 cm
Cor da flor	branca	branca
Cor da pubescência	cinza	cinza
Cor do tegumento	amarela	amarela
Forma da semente	esférica	esférica
Cor do hilo	marrom clara	marrom clara
Transgenia	ausente	presente

\* Pode sofrer variação com o ambiente de cultivo. As linhagens IAC e TP, de tegumentos pretos, não possuem caracterização de descritores oficial.

## Anexo B

Variância dos dados de *Quantification Cycle* para os cinco genes normalizadores selecionados para avaliação.



**Anexo C**

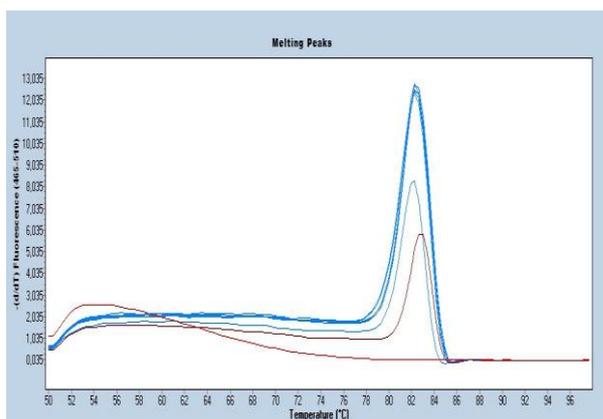
Concentração ótima de iniciadores para genes alvos e genes normalizadores<sup>1</sup>.

Genes	200 nM	400 nM
VINVI	X	
SCB1	X	
SCS1	X	
SBP		X
LEGINSULIN	X	
CHIA1		X
SGF14		X
CHS8*		X
SKIP 16 <sup>1</sup>	X	
ACT11 <sup>1</sup>	X	

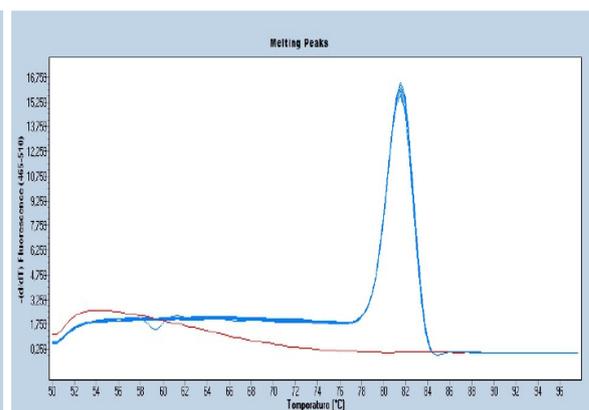
## Anexo D

Curvas de dissociação dos genes alvos e dos genes normalizadores<sup>1</sup>.

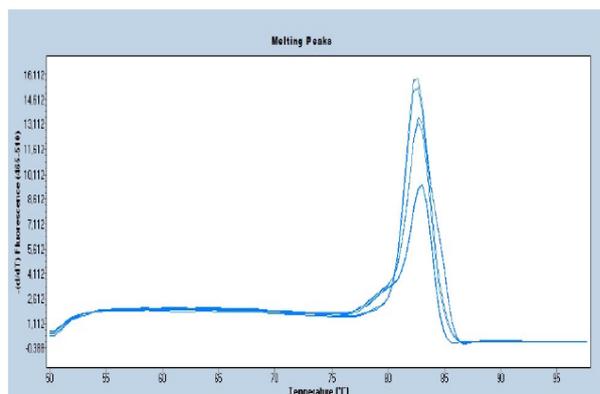
VINV1



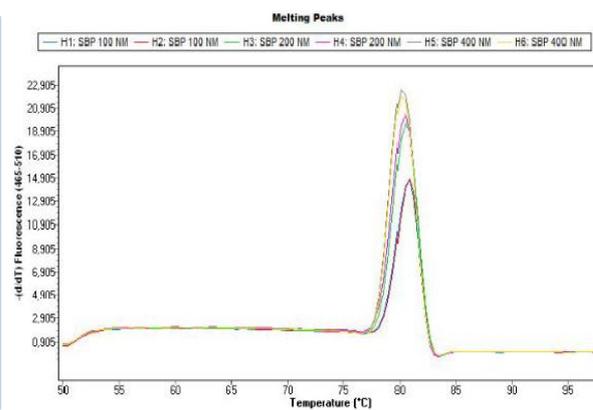
SCB1



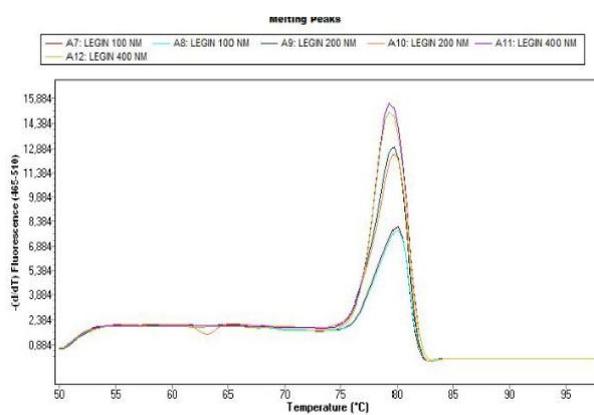
SCS1



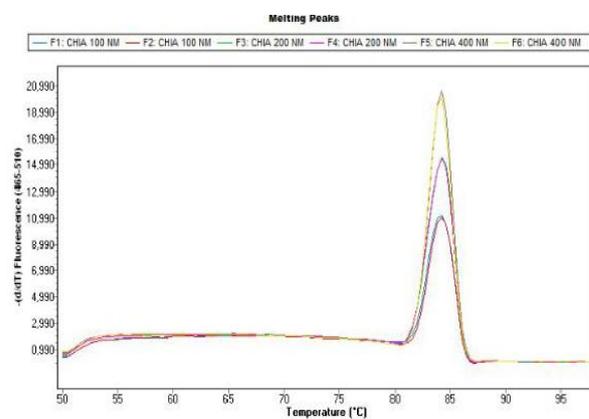
SBP



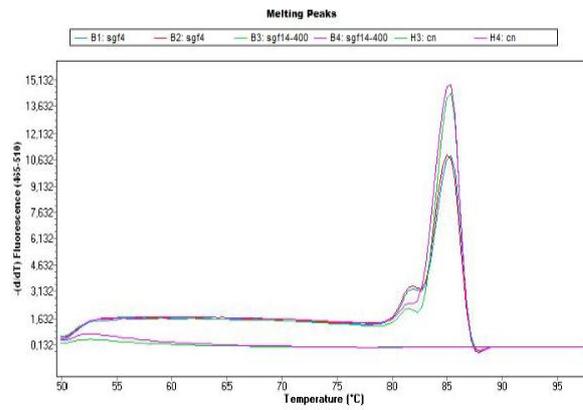
LEGINSULIN



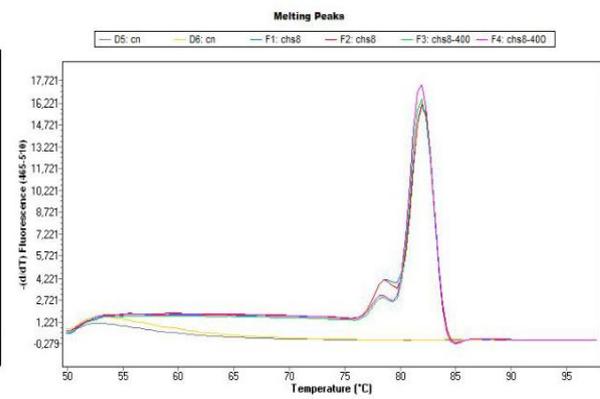
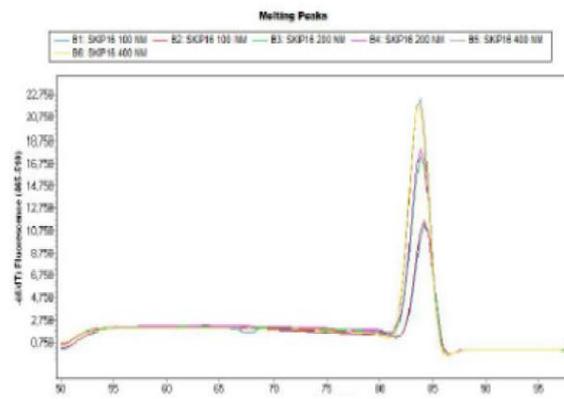
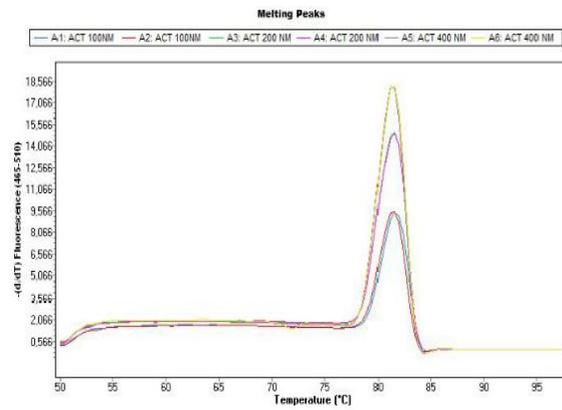
CHIA1



## SGF14c



## CHS8\*

SKIP16<sup>1</sup>ACT11<sup>1</sup>

## Anexo E

Eficiência de amplificação dos iniciadores.

Genes	<i>Slope</i> (S)	Eficiência (E)
VINV1	-3,355 <sup>1</sup>	0,98638
SCB1	-3,615	0,89071
SCS1	-3,572	0,90526
SBP	-2,518	1,4954
LEGINSULIN	-3,609	0,89271
CHIA1	-2,992	1,15886
SGF14	-3,164	1,07041
CHS8*	-3,339	0,99292
SKIP16	-3,185	1,0605
ACT11	-3,057	1,12382

<sup>1</sup> Padrões aceitáveis para *Slope* de -3.2, segundo *Applied Biosystems*®.

## Anexo F

Resumo da análise de variância dos resultados.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		VNV1	SCB1	SCS1	SBP
Genótipos (F1)	3	0,14255*	24,84011*	2,24729*	0,87926*
ECT (F2)	6	0,03401*	57,44627*	11,92768*	0,42988*
F1xF2	18	0,07972*	16,84838*	1,96661*	0,26369*
Tratamentos	27	0,07655*	26,75810*	4,21136*	0,36902*
Resíduo	28	0,00046	0,26534	0,05108	0,01192

ECT – Épocas de coleta de tegumentos; GL – Graus de liberdade. \*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio			
		LEGINSULIN	CHIA1	SGF14c	CHS8*
Genótipos (F1)	3	5438,472 <sup>1</sup>	165,776 <sup>1</sup>	116,175 <sup>1</sup>	88,671 <sup>1</sup>
ECT (F2)	6	12171,401 <sup>1</sup>	242,331 <sup>1</sup>	24,607 <sup>1</sup>	37,649 <sup>1</sup>
Int. F1xF2	18	7304,928 <sup>1</sup>	225,679 <sup>1</sup>	46,641 <sup>1</sup>	44,654 <sup>1</sup>
Tratamentos	27	8178,983 <sup>1</sup>	222,723 <sup>1</sup>	49,471 <sup>1</sup>	47,988 <sup>1</sup>
Resíduo	28	43,240	0,103	3,239	0,819

ECT – Épocas de coleta de tegumentos; GL – Graus de Liberdade. <sup>1</sup> Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

FV	GL	Quadrado médio				
		Fenóis	Antioxidantes	Antocianinas	Carotenóides	Lignina
Genótipos	3	10,93*	7042,07*	0,155*	1345,05*	115,84*
Resíduo	16	0,002	8,23	0,002	71,39	1,94
CV (%)		1,4	2,8	7,7	6,9	7,6

FV – Fontes de variação; GL – Graus de liberdade. \*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio				
		G	PC	CPA	CR	CT
Genótipos	3	16,0 <sup>ns</sup>	6,4 <sup>ns</sup>	6,22*	0,12 <sup>ns</sup>	6,91*
Resíduo	16	51,2	7,6	0,48	0,43	1,35
CV (%)		1,81	2,82	7,68	5,13	5,33

GL – Graus de liberdade; G – germinação; PC – primeira contagem; CPA – comprimento da parte aérea; CR – comprimento de raiz; CT – comprimento total de plântula. ns – não significativo; \*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio				
		G	PC	CPA	CR	CT
Genótipos	3	75,47*	1797,33*	14,31*	17,79*	50,95*
Resíduo	16	16,80	106,80	0,19	0,46	0,82
CV (%)		4,45	13,53	6,36	6,65	5,35

GL – Graus de liberdade; G – germinação; PC – primeira contagem; CPA – comprimento da parte aérea; CR – comprimento de raiz; CT – comprimento total de plântula. Com imersão prévia das sementes em água deionizada por 24 horas. \*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio					
		E	IVE	VE	IVG	CE	MMS
Genótipos	3	66,67 <sup>ns</sup>	0,06*	0,92*	22,02*	4,39 <sup>ns</sup>	47,47*
Resíduo	16	42,50	0,007	0,04	0,25	3,40	0,02
CV (%)		6,79	6,40	2,62	4,66	2,76	1,38

GL – Graus de liberdade; E – emergência em solo; IVE – índice de velocidade de emergência; VE – velocidade de emergência; IVG – índice de velocidade de germinação; CE – condutividade elétrica; MMS – massa de mil sementes. ns – não significativo. \*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Embebição das sementes		
Genótipo	3	7991,41*
Tempo	46	26956,17*
Genótipo x Tempo	138	177,71*
Repetição	4	561,61*
R <sup>2</sup>	0,99	
CV (%)	4,8	
Genótipo: BMX Potência RR		
Tempo x Tempo x Tempo	1	53071,85*
R <sup>2</sup>	0,96	
Genótipo: CD 202		
Tempo x Tempo x Tempo	1	49933,92*
R <sup>2</sup>	0,96	
Genótipo: TP		
Tempo x Tempo x Tempo	1	30871,88*
R <sup>2</sup>	0,96	
Genótipo: IAC		
Tempo x Tempo x Tempo	1	36907,23*
R <sup>2</sup>	0,98	

Tempo - Tempo de embebição das sementes (horas); GL – Graus de liberdade. \*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.