

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SEMENTES**



TESE

**SOMBREAMENTO E UTILIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA
NA DETECÇÃO DE SEMENTES ESVERDEADAS DE SOJA**

CRISTIANE VELLEDA BRISOLARA

Pelotas-RS, 2013

CRISTIANE VELLEDA BRISOLARA

**SOMBREAMENTO E UTILIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA
NA DETECÇÃO DE SEMENTES ESVERDEADAS DE SOJA**

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

Orientador: Maria Ângela André Tillmann

Co-orientador: Henk Jalink

Pelotas-RS, 2013

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B859s Brisolara, Cristiane Velleda

Sombreamento e utilização da fluorescência da clorofila na detecção de sementes esverdeadas de soja / Cristiane Velleda Brisolara ; Maria Ângela André Tillmann, orientadora ; Henk Jalink, coorientador. — Pelotas, 2013.
95 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

1. Glycine max. 2. Fluorescência da clorofila. 3. Qualidade fisiológica. 4. Maturidade. I. Tillmann, Maria Ângela André, orient. II. Jalink, Henk, coorient. III. Título.

CDD : 633.34

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a Maria Angela Andre Tillmann

Prof. Dr. Francisco Amaral Villela

Prof^a. Dr^a Beatriz Helena Gomes Rocha

Prof^a. Dr^a Juliana de Magalhães Bandeira

Prof^a Dr^a. Gizele Ingrid Gadotti

Dedicatória

Ao Otávio, meu afilhado, que ao nascer me mostrou que assim como as flores, que geram novas flores para perpetuar a espécie, pessoas geram novos amores e perpetuam a vida.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação a esta pesquisa;

À Universidade Federal de Pelotas, pela sua sublime existência;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, por ser minha casa;

À orientadora Prof^a Dr^a Maria Angela Andre Tillmann pelo apoio, amizade, incentivo, bons exemplos e liberdade na condução do trabalho;

Ao co-orientador pesquisador holandês Henk Jalink pela orientação, amizade e zelo;

Ao proprietário da empresa Sementes Cereal Ouro, Nilto Schwening, pelo apoio incondicional;

À Wageningen University and Research, por me acolher e dar acesso a novas técnicas;

À minha mãe Neiva, pelo apoio, ajuda e silêncio;

A minha irmã Dani, pelas palavras sempre muito bem ditas;

À minha amiga Daisy Leticia, pela força e pelo tempo para me ajudar, sempre;

À minha amiga Juliana, pela ajuda e opinião;

Ao meu amigo Rodrigo, pela cobrança sempre bem-vinda;

Às minhas estagiárias Daniele e Aline por todo o tempo dedicado a este trabalho;

Ao professor Silvio Moure Cícero, por abrir caminho para meu trabalho na Holanda e ao seu orientado Victor pela ajuda na execução.

À amiga Renake, pela inspiração e ajuda efetiva.

A todos que de alguma maneira me ajudaram, de perto ou de longe, executando ou orientando.

Epígrafe

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez".

Jean Cocteau

RESUMO

BRISOLARA, Cristiane Velleda. **Sombreamento e utilização da fluorescência da clorofila na detecção de sementes esverdeadas de soja**. 2013. 95f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia em Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Orientador: Maria Ângela André Tillmann

A presença de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja representa um alerta da ocorrência de condições adversas durante o processo de maturação. A variação na intensidade luminosa é um fator abiótico que pode provocar a formação de sementes esverdeadas em vista que as respostas fisiológicas das plantas à essas variações passa pela adaptação e otimização na coleta da luz, melhorando a capacidade do aparelho fotossintético em converter a energia luminosa em uma forma utilizável. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de sementes esverdeadas sob níveis de sombreamento e seus efeitos na qualidade fisiológica do lote, relacionando a mensuração da fluorescência da clorofila na semente. Primeiramente (fase I), a soja, cv. IGRA 518 RR, foi semeada sob o regime de três níveis de sombreamento (0%, 30% e 50%) com aplicação de inseticida e fungicida. Foi avaliada a interação entre sombreamento e aplicação de químicos e seus efeitos na produção de sementes esverdeadas. Posteriormente (fase II), três cultivares de soja foram submetidas a quatro níveis de sombreamento, 0%, 35%, 50% e 65%. Foram realizados testes de qualidade no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Pelotas e também nas instituições holandesas *Plant Research International* e *Wageningen University*. Os equipamentos *CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001* e *CropReport*, sensíveis aos compostos incolores e fluorescentes, foram utilizados para mensurar a clorofila em sementes e durante o processo de absorção de água, respectivamente. O sombreamento em plantas de soja age no mecanismo fotossintético, fazendo com que a degradação da clorofila não ocorra normalmente, acarretando aumento da presença de moléculas fluorescentes independentemente do nível de sombreamento aos quais as plantas foram submetidas. Plantas de soja sombreadas durante a fase de enchimento de grão produzem sementes com teor de clorofila aumentado, predispondo a produção de sementes com maior emissão de fluorescência da clorofila, mesmo sem apresentar coloração verde em seu tegumento.

Palavras-chave: Glycine max, fluorescência da clorofila, qualidade fisiológica, maturidade.

ABSTRACT

BRISOLARA, Cristiane Velleda. **Shading and use of the chlorophyll fluorescence on detection of soybean greenish seed.** 2012. 95f. Thesis (Doctorate) – Post Graduation Program in Seeds Science and Technology Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Adviser: Maria Ângela André Tillmann

The presence of green seeds in seed lots of soybean as a warning of the occurrence of adverse conditions during the maturation process. The physiological response of plants to variation in light intensity passing through the adaptation and optimization of light collection in improving the capacity of the photosynthetic apparatus to convert light energy into a usable form. The purpose of this study was to evaluate levels of shading in the production of green seeds and their physiological effects on the quality of the lot, using the measurement of chlorophyll fluorescence. Firstly (step I), soybean cv. IGRA 518 RR was seeded under the scheme three shading levels (0%, 30% and 50%) with application of insecticide and fungicide. It was evaluated interaction between shading and application of chemicals and their effects on the production of green seed. Subsequently (phase II) three soybean cultivars were subjected to four levels of shading, 0%, 35%, 50% and 65%. Quality tests were performed at the Laboratory of Seed Analysis, Federal University of Pelotas and also in Dutch institutions Plant Research International and Wageningen University. Equipment sensitive fluorescent and colorless compounds were used to measure chlorophyll in seeds and during the process of water absorption. The shading in soybean acts on the photosynthetic mechanism, causing degradation of chlorophyll does not usually occur, leading to the increased presence of fluorescent molecules irrespective of the level of shading which the plants were submitted. Seeds of soybean shaded during the grain filling phase producing seeds with increased chlorophyll content, predisposing the production of seeds with higher chlorophyll fluorescence emission, green coloration without providing in its tegument.

Keywords: Glycine max, chlorophyll fluorescence, physiologic quality, maturation.

Lista de figuras

Figura 1	Esquema simplificado do catabolismo da clorofila	26
Figura 2	Detalhe da instalação dos sombrites no experimento.....	35
Figura 3	Câmara de envelhecimento acelerado - vista externa e interna.....	41
Figura 4	Equipamento <i>CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001</i>	43
Figura 5	Equipamento <i>CropReport</i> conectado ao software (a); LEDs; lente (b) e sementes posicionadas abaixo da lente (c).....	44
Figura 6	Vista superior do equipamento <i>CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001</i>	46
Figura 7	Medição da fluorescência da clorofila em semente de soja com equipamento <i>CF Seed Sorter and Analyser – Model JS 2001</i>	46
Figura 8	<i>Software</i> utilizado na medição da fluorescência da clorofila em semente de soja com equipamento <i>CF Seed Sorter and Analyser – Model JS 2001</i>	47
Figura 9	Substrato <i>Rockwool</i> [®]	49
Figura 10	Imagem das sementes captada pelo equipamento <i>CropReport</i>	49
Figura 11	Imagem das sementes com aplicação de máscara para eliminar ruídos da imagem. Sementes com e sem a máscara.....	50
Figura 12	Imagem das sementes com aplicação da máscara para leitura da fluorescência da clorofila. Detalhe da tela com o valor de fm (valor máximo onde a curva da fluorescência da clorofila satura) e do tamanho da semente.....	51
Figura 13	Histogramas da fluorescência da clorofila em pico Ampere (pA) medida através do equipamento <i>JS Seed Sorter 2001</i> , das cultivares 1, 2 e 3 submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%.....	66
Figura 14	Histogramas da fluorescência da clorofila em pico Ampere (pA) medida através do equipamento <i>JS Seed Sorter 2001</i> , das cultivares 1, 2 e 3, submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65% antes e depois do teste de envelhecimento acelerado.....	68
Figura 15	Evolução do tamanho (em pixel) das sementes das cultivares 1, 2 e 3 durante o processo de absorção de água das sementes, quando submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%...	71

Figura 16	Imagens da fluorescência da clorofila em sementes esverdeadas (SE) e de coloração característica (SC) capturadas através do equipamento CropReport durante processo de absorção de água no período de 48h.....	73
Figura 17	Fluorescência da clorofila das cultivares 1, 2 e 3, medida durante absorção de água até a emissão da radícula, através do equipamento <i>Crop Report</i> , quando submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%.....	75

Lista de tabelas

Tabela 1	Descrição da cultivar utilizada na fase I.....	34
Tabela 2	Descrição dos produtos químicos utilizados na fase I.....	35
Tabela 3	Descrição das cultivares utilizadas na fase II.....	38
Tabela 4	Caracterização das condições climatológicas durante desenvolvimento da soja na fase I.....	54
Tabela 5	Radiação solar incidente medida com o equipamento Quantum-Radiometer-Photometer Modelo LI 185-B em $W.m^{-2}$ e seu % em relação à área a pleno sol.....	54
Tabela 6	Efeito de três níveis de sombreamento e aplicação de inseticida, fungicida e inseticida e fungicida no número de vagens na parte superior, inferior e número de vagens total; no número de sementes esverdeadas na parte superior e inferior; e na altura de planta.....	55
Tabela 7	Efeito de três níveis de sombreamento na porcentagem de sementes esverdeadas na metade superior e inferior de plantas de soja.....	56
Tabela 8	Efeito de três níveis de sombreamento na altura de plantas de soja..	58
Tabela 9	Caracterização das condições climatológicas na fase II.....	59
Tabela 10	Resultados médios dos testes de umidade, germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de protrusão radicular, peso de mil sementes e percentual de sementes esverdeadas para as cultivares 1, 2 e 3 submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%...	60

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A soja.....	17
2.2 Fatores que predispõe a soja à expressão de sementes esverdeadas.....	19
2.3 Fotossíntese.....	21
2.4 Clorofila.....	22
2.5 Germinação e retenção de clorofila em sementes.....	26
2.6 Interferência de sementes esverdeadas no potencial fisiológico do lote...	28
2.7 Radiação solar e sombreamento.....	29
2.8 Qualidade fisiológica.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Fase I.....	34
3.1.1 Localização do experimento.....	34
3.1.2 Cultivar.....	34
3.1.3 Tratamentos.....	34
3.1.4 Condução do experimento.....	35
3.1.5 Condições climáticas.....	36
3.1.6 Radiação solar.....	36
3.1.7 Porcentagem de sementes esverdeadas.....	36
3.1.8 Determinação dos componentes do rendimento.....	37
3.2 Fase II.....	37
3.2.1 Localização do experimento.....	37
3.2.2 Cultivares.....	37
3.2.3 Tratamentos.....	38
3.2.4 Condução do experimento.....	38
3.2.5 Condições climáticas.....	39

3.2.6	Radiação solar.....	39
3.2.7	Porcentagem de sementes de esverdeadas.....	39
3.2.8	Avaliação da qualidade das sementes.....	39
3.2.8.1	Determinação do grau de umidade.....	39
3.2.8.2	Teste de germinação.....	40
3.2.8.3	Teste de primeira contagem de germinação.....	40
3.2.8.4	Teste de envelhecimento acelerado.....	40
3.2.8.5	Índice de velocidade de protrusão radicular.....	41
3.2.8.6	Peso de mil sementes.....	41
3.2.8.7	Fluorescência da clorofila.....	42
3.2.8.7.1	Funcionamento do equipamento <i>CF Seed Sorter and Analyser – Model JS 2001</i>	42
3.2.8.7.2	Funcionamento do equipamento <i>CropReport</i>	43
3.2.8.7.3	Determinação da fluorescência da clorofila em sementes.....	45
3.2.8.7.4	Determinação da fluorescência da clorofila antes e após envelhecimento	47
3.2.8.7.5	Determinação da fluorescência da clorofila durante absorção de água....	48
3.2.8.7.5.1	Em sementes com tegumento esverdeado.....	48
3.2.8.7.5.2	Em sementes de plantas sombreadas.....	48
3.2.8.7.6	Determinação do tamanho da semente e sua relação com a fluorescência da clorofila.....	51
3.2.9	Análise estatística.....	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Fase I.....	53
4.1.1	Condições climáticas.....	53
4.1.2	Radiação solar.....	54
4.1.3	Sombreamento e aplicação de inseticida e fungicida.....	55
4.2	Fase II.....	58
4.2.1	Condições climáticas.....	58
4.2.2	Radiação solar.....	59
4.2.3	Qualidade fisiológica.....	60
4.2.4	Fluorescência da clorofila.....	63
4.2.4.1	Fluorescência da clorofila em sementes.....	63
4.2.4.2	Fluorescência da clorofila antes e após envelhecimento.....	67
4.2.4.3	Fluorescência da clorofila e sua relação com o tamanho da semente.....	70
4.2.4.4	Fluorescência da clorofila durante absorção de água.....	72
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das mais importantes *commodities* do mundo, segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), o Brasil é o segundo maior produtor do grão, mais de 27 milhões de hectares foram cobertos pela cultura na safra 2012/2013. Para obter alta produtividade em uma cultura que abrange uma área desta magnitude, é necessário que se utilizem sementes de alta qualidade, garantida pela interação entre os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários da semente.

A presença de sementes esverdeadas em lotes de sementes de soja constitui motivo de apreensão, pois representa um sintoma da ocorrência de condições adversas durante o processo de maturação e possibilidade elevada de redução da germinação e do vigor. Em pesquisa feita no Estado do Mato Grosso do Sul, Rangel et al. (2011), concluíram que o acréscimo nos percentuais de sementes verdes provocam redução acentuada da germinação e do comprimento de raiz, confirmando que sementes esverdeadas afetam a qualidade do lote.

A distribuição estacional da radiação solar é fator fundamental para o desenvolvimento adequado das plantas, para promover o direcionamento das respostas fisiológicas e também como um fator que pode afetar outros componentes climáticos, como a temperatura (MARCOS FILHO, 2005), assim como a indiscutível relação entre a influência do processo de fotossíntese sobre o desempenho vegetal e componentes da produção.

Entre os diversos fatores ambientais, a luz é primordial para o crescimento das plantas, por fornecer energia para a fotossíntese. Segundo Marengo; Lopes (2002), as clorofilas são os principais pigmentos cloroplastídicos responsáveis pela captação da radiação solar que, durante o processo de fotossíntese, é convertida em energia química na forma de ATP e NADPH. A degradação da clorofila, por ser facilmente mensurável, tem sido utilizada como parâmetro para descrever o amarelecimento das folhas senescentes ou

mudanças de cor durante o amadurecimento de frutas (PHILIPPE; MATILE, 1999) e sementes (JALINK, 1998).

Durante a maturação das sementes a clorofila não degradada é um indicativo de redução na qualidade fisiológica em sementes de soja (ZORATTO, 2003). Em outras espécies isso também pode ser observado, como em trabalhos realizados com plantas jovens de jequitibá-rosa submetidas a diferentes condições de luminosidade apresentaram redução do desenvolvimento do sistema radicular e apresentaram teores de clorofila *a*, *b* e total maiores se cultivadas sob condição de baixa luminosidade (REGO et al., 2006), corroborando para evidenciar a importância da luminosidade no desenvolvimento das plantas de maneira geral.

A degradação completa da clorofila somente pode ser constatada se a soja for colhida a partir do estágio R7 e pode ser afetada pelo estágio de maturação, pelas condições de secagem, por condições climáticas e por produtos químicos dessecantes (WARD et al., 1992; 1995; SINNECKER 2002). Há relatos de produtores de soja desde a safra 2004/2005, sobre a presença de sementes esverdeadas de soja em determinadas áreas do território nacional, principalmente no Centro-Oeste, onde estão os principais Estados produtores de soja e onde se concentra um número elevado de empresas produtoras de sementes.

Com o passar do tempo, as sementes esverdeadas, que sabidamente tem menor potencial fisiológico que sementes de coloração normal, estão sendo encontradas em praticamente todos os Estados. A dificuldade em responder por que ocorre este fenômeno e excluir possíveis causas foi o que impulsionou a execução deste trabalho. A observação *in locu* de áreas onde não ocorreu déficit hídrico, mas apresentou alto percentual de sementes esverdeadas de soja, permitiu eliminar o fator déficit hídrico como possível causador deste fenômeno e evidenciou a relação entre a intensidade luminosa disponível para a cultura e a ocorrência de sementes esverdeadas.

A ocorrência de sementes esverdeadas de soja tem sido atribuída à maturação forçada, ataque de insetos ou consequência de algum estresse sofrido pela planta, porém, áreas com irrigação, controle de insetos e temperaturas máximas não excedentes a média, também apresentam sementes esverdeadas, eliminando também estes fatores.

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar a interação entre os fatores abióticos sombreamento e aplicação de produtos químicos (inseticida e fungicida) na formação de sementes de soja esverdeadas; e b) determinar se o fator abiótico sombreamento provoca esverdeamento de sementes de soja e alterações na quantidade de clorofila, através da técnica da fluorescência da clorofila, e sua relação com a qualidade fisiológica do lote.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A soja

A cultura da soja atingiu 130 anos de presença no Brasil em 2012. A exploração iniciou-se no sul do País e hoje já é encontrada nos mais diferentes ambientes, como em áreas de cerrado (FREITAS, 2011). Atualmente a produção de soja no Brasil é liderada pelos estados de Mato Grosso, com 29,2% da produção nacional, Paraná com 18,4%, Rio Grande do Sul com 14,0% e Goiás, com 10,8%. As estimativas para soja grão indicam uma produção brasileira de 88,9 milhões de toneladas em 2021/2022. Essa projeção é 17,8 milhões de toneladas maior em relação à produção brasileira na safra de 2011/2012. Historicamente a produção brasileira de soja tem crescido a uma taxa anual de 5,8% (MAPA, 2012).

No início do século 20, a soja tornou-se altamente popular e tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto devido às qualidades nutricionais e funcionais, como pela versatilidade na produção de diversos alimentos e ingredientes. Alimentos à base de soja constituem uma categoria crescente na indústria de alimentos, com diversidade de produtos que vão desde os tradicionais, até os ingredientes proteicos de soja e produtos alternativos de leite e carne, ou produtos enriquecidos com proteínas de soja (GOLBITZ, 2000).

A crescente modernização da agricultura brasileira tem exigido dos diferentes segmentos mudanças profundas no sentido de racionalização do processo produtivo. Dentre os insumos do setor agrícola, a semente de alta qualidade ocupa papel fundamental em todo sistema de produção que vise à otimização de padrões quantitativos e qualitativos (COSTA et al., 2001). O crescimento da cultura da soja no País esteve sempre associado aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo, como a mecanização e a criação de cultivares altamente produtivas adaptadas às diversas regiões, o desenvolvimento de pacotes tecnológicos relacionados ao

manejo de solos, ao manejo de adubação e calagem, manejo de pragas e doenças, além da identificação e busca de alternativas para os principais fatores responsáveis por perdas a operação de colheita, são fatores promotores desse avanço (FREITAS, 2011).

Neste cenário, a semente possui papel fundamental como agente transferidor de tecnologia, uma vez que ao levar para a propriedade sementes de uma cultivar, o produtor está levando também a moderna tecnologia existente nos programas de melhoramento genético. Para que todos os esforços realizados na obtenção de uma cultivar sejam traduzidos em benefícios para a produção agrícola é fundamental a utilização de sementes de alta qualidade (SHUSTER, 2003). A qualidade da semente de soja, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pode ser influenciada por diversos fatores que ocorrem antes e durante a colheita e em todas as demais etapas da produção, como secagem, beneficiamento, armazenamento e transporte. Tais fatores abrangem, entre outras condições, períodos de seca, danos por insetos, extremos de temperatura durante a maturação e fortes flutuações das condições de umidade ambiente, facilitando o aparecimento de sementes com altos índices de deterioração por umidade (FRANÇA-NETO et al., 2000) e esverdeamento.

O vigor das sementes compreende aquelas propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais sob ampla faixa de condições ambientais (*Association of Official Seed Analysts – AOSA*, 1983). Enquanto a viabilidade é medida principalmente pelo teste de germinação, que determina a máxima germinação da semente nas condições mais favoráveis possíveis, o vigor representa atributos mais sutis da qualidade fisiológica, não revelados pelo teste de germinação e é determinado sob condições desfavoráveis, ou medindo-se o declínio de alguma função bioquímica ou fisiológica (POPIGINIS, 1985), sendo afetado pela presença de sementes esverdeadas no lote (ZORATO, 2003).

Por esta razão, em 1983, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, estabeleceu padrões de qualidade e comercialização. Alterados através da Instrução Normativa nº 11, de 15 de maio de 2007, onde ficou definido o padrão oficial de classificação, os requisitos de identidade, qualidade intrínseca e extrínseca, amostragem e marcação ou rotulagem. No regulamento técnico da soja de 2007, estão os atributos avaliados (total de ardidos e

queimados, máximo de queimados e mofados), partidos, quebrados e amassados, matérias estranhas e impurezas, e também o percentual permitido de sementes esverdeadas de soja, evidenciando a importância negativa da presença destas sementes no lote. Ratificando a importância das sementes esverdeadas para a comercialização de soja no Brasil, França-Neto et al. (2012) chamaram a atenção para o trabalho de Bohner (2005) que, nos EUA, descreveu dois tipos de semente esverdeada. Se o tegumento apresenta cor verde e os cotilédones cor amarela, a semente é classificada como “Classe 2”; se toda a semente apresenta coloração esverdeada, é classificada como “Semente Danificada”. Apenas essa última classe está sujeita a deságios no preço pago aos produtores de soja americanos, enquanto que no Brasil é permitida a comercialização de lotes de grãos com até 8% de semente esverdeada, sem perda no valor comercial.

A descrição dos efeitos da coloração esverdeada sobre a qualidade dos grãos de soja e de seus derivados, realizada por Mandarino (2005), afirma que o grão verde apresenta basicamente o mesmo percentual de proteína que grão maduro, entretanto apresenta em média de 2% a 3% a menos de óleo, óleo esse que apresentará maior acidez, além de ter um custo maior de refino, pois a remoção da clorofila do óleo exige processos específicos. Como as clorofilas são potentes agentes oxidantes, a qualidade do óleo contaminado com clorofila poderá ser prejudicada, caso o mesmo seja armazenado na presença de luz. Além disso, grãos verdes proporcionam menor rendimento na produção de isolados proteicos. Dessa maneira, o autor diz ser fundamental que se faça a remoção da clorofila dos produtos de soja e de seus derivados ou, então, que a ocorrência de grão verde seja evitada. A presença dos pigmentos, mesmo em pequenas quantidades, aumenta o custo de refinação do óleo e reduz o valor comercial do grão. Os lotes com grão nessas condições não podem ser comercializados no mercado internacional, fato que se torna relevante frente ao enorme volume de exportação.

2.2 Fatores que predispõe a soja à expressão de sementes esverdeadas

A intensidade da ocorrência de semente esverdeada em um lote é variável em função do tipo, da intensidade e do estágio de ocorrência do estresse que resulta na morte prematura ou na maturação forçada da planta e

da cultivar. Estresses ambientais com características de doenças de raiz, como fusariose e macrofomia, de colmo, como o cancro da haste, e de folhas, como a ferrugem asiática; intenso ataque de insetos, principalmente percevejos sugadores; déficit hídrico (seca ou veranico) durante as fases finais de enchimento de grãos e de maturação, principalmente se associado com elevadas temperaturas; e ocorrência de geada intensa, podem ocasionar a produção de semente esverdeada (FRANÇA-NETO et al., 2012). Dentre esses fatores, as temperaturas elevadas são consideradas as principais responsáveis pela maturação "forçada" da soja, provocando a translocação muito rápida das reservas, impedindo a degradação completa da clorofila e provocando a formação de sementes esverdeadas (MARCOS FILHO, 2005). Fatores climáticos desfavoráveis, práticas agrícolas e tratamentos pós-colheita podem afetar a rota, a taxa e as quantidades de clorofila residual. Sementes de soja podem apresentar a coloração esverdeada como resultado de diversos fatores, mas afirmam também que existem genótipos em cuja semente a clorofila é retida no tegumento, mesmo quando madura, sendo essa uma característica genética (PALMER; KILEN, 1987).

Ao ser submetida a baixas intensidades luminosas, a soja pode apresentar menores taxas de fitomassa, de crescimento, de assimilação líquida e elevado estiolamento, condicionando o acamamento em condições de campo (MELGES et al., 1989; PEREIRA, 2002). Na pós-colheita, se a soja é submetida a processos de aquecimento e secagem, principalmente com aplicação de ar quente e seco ou vapor para reduzir a umidade e garantir um armazenamento seguro, pode ocorrer o bloqueio parcial da degradação natural da clorofila (GOMES, 2003).

Ratificando outros trabalhos, Costa et al. (2001) mostraram que a ocorrência de sementes verdes encontradas em alguns lotes pode estar associada a condições climáticas adversas durante o estágio da maturidade da soja, ou à própria constituição genética das cultivares, pois, essas características podem resultar no aparecimento de sementes verdes.

O conhecimento sobre a fisiologia e a bioquímica de degradação da clorofila é muito restrito. Sabe-se que inicia na senescência, sofre influência do genótipo e pode ser desencadeada por estresse hídrico, redução de luz ou elevada intensidade luminosa, mudanças de temperatura, aumento no teor de

etileno, aumento da permeabilidade de membrana e mudanças no pH. A degradação completa da clorofila somente pode ser observada se a soja for colhida a partir do estágio R7 e pode ser afetada pelo estágio de maturação, pelas condições de secagem, por condições climáticas e por produtos químicos dessecantes (WARD et al., 1992 e 1995; HEALTON; MARANGONI, 1996; SINNECKER, 2002). Sob circunstâncias normais, a planta amadurece e a enzima clorofilase degrada as clorofilas, resultando na coloração normal da semente de soja. No verão, caso o clima seja quente e seco, durante os últimos estádios de maturação da semente, a atividade desta enzima é influenciada. Acredita-se que com a morte prematura da planta e, conseqüentemente a maturação forçada da semente, a atividade da enzima clorofilase cesse antes de toda a clorofila ser degradada (FRANÇA-NETO et al., 2005).

O trabalho de Melges et al. (1989) mostrou a importância de níveis de irradiância¹ no crescimento e desenvolvimento da soja. O referido trabalho indicou que o número de folhas e vagens decresce em função do sombreamento, a taxa de acúmulo de fitomassa em cada órgão é tanto mais elevada quanto maior a densidade de fluxo de radiação solar até a saturação luminosa; a taxa de acúmulo de fitomassa seca devido ao sombreamento é menor nas raízes que nos outros órgãos, as plantas sombreadas apresentam maior estatura, pois apresentam maior alongamento dos entrenós e aumento da dominância apical, e, em maiores níveis de sombreamento ocorre maior retardamento na maturação.

2.3 Fotossíntese

Plantas verdes são organismos capazes de aproveitar a energia térmica do sol a partir da fotossíntese para produção de energia química. A radiação solar caracteriza-se como um conjunto de ondas eletromagnéticas que incidem sobre a superfície terrestre e cujo comprimento de onda predominante é de 500nm. A radiação utilizada pelas plantas para o processo fotossintético está contida na faixa da luz visível (400nm – 700nm), denominada de PAR (*Photosynthetic Active Radiation*), correspondendo entre 45% e 50% do total de radiação incidente (OMETTO, 1981).

¹ Radiação incidente sobre uma superfície

Nas plantas, a radiação fotossinteticamente ativa é captada por moléculas de clorofilas e carotenóides, que juntamente com proteínas estruturais constituem o complexo antena (TAIZ; ZIEGER, 2004). A energia é direcionada para os centros de reações, num processo conhecido como “esquema Z”. As plantas possuem dois centros de reações funcionando em série: o fotossistema I (FSI) e o fotossistema II (FSII) (BLAKENSHIP; PRINCE, 1985). As clorofilas do centro de reação do FSI apresentam pico máximo de absorção em $\lambda = 700\text{nm}$ e do FSII em $\lambda = 680\text{nm}$. Esses fotossistemas oxidam a água a oxigênio molecular para formar ATP e reduzir o NADP^+ a NADPH. Assim, a energia proveniente do sol é conservada na forma de ATP e na forma de coenzimas orgânicas (NADPH). Posteriormente, esses substratos são utilizados no ciclo de Calvin e Benson para produzir açúcares e/ou cadeias de carbono para rotas metabólicas.

A radiação solar desempenha papel importante na ativação de enzimas que estão envolvidas no processo fotossintético (TAIZ; ZIEGER, 2004). A enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase, também chamada de rubisco, é uma das enzimas ativadas pela radiação solar, fica localizada no cloroplasto, reage com o CO_2 e o conduz ao ciclo de Calvin para produzir moléculas de 3-fosfoglicerato, e também tem atividade de oxigenase, na qual o O_2 compete com o CO_2 pelo substrato comum ribulose-1,5-bifosfato. A ativação da rubisco depende do pH básico do lúmen, que é alterado em função da fase fotoquímica e também da concentração de Mg^{2+} (magnésio) e CO_2 , que são aumentadas em condições de luminosidade, ativando a carbamilação da rubisco, que libera íons H^+ , conforme o pH aumenta, e recebe íons de Mg^{2+} e COOH , tornando a enzima rubisco ativa (TAIZ; ZIEGER, 2004).

2.4 Clorofila

A clorofila é um metabólito secundário indispensável a partir do momento que a planta necessita da biossíntese de nutrientes. As moléculas de clorofila são formadas por complexos derivados da porfirina, que tem como átomo central o Mg^{+2} e são moléculas de extrema importância presentes em muitos sistemas biológicos, como por exemplo, nos citocromos, responsáveis pela transferência de elétrons na cadeia respiratória (WHITE et al., 1968). As clorofilas localizam-se nos cloroplastos, onde ocorrem as duas reações

importantes da fotossíntese: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto (STREIT, 2005).

Somente há alguns anos, a rota geral de degradação da clorofila foi estabelecida e desde então, diferentes catabólitos tem sido identificados em folhas senescentes e durante o amadurecimento dos frutos em uma série de espécies de plantas (HÖRTENSTEINER et al., 1998; Tanaka, 2006). A degradação das clorofilas resulta na formação de cinco grupos de compostos intermediários, julgando-se um deles ser o produto final. A classificação em grupos maiores e não em compostos individuais é devido à extremidade da cadeia da clorofila ser frequentemente substituída por grupos diferentes, sendo, possivelmente, resultante de fatores externos como estresses ambientais, ou por fatores internos, tais como permeabilidade da membrana celular, mudança de pH e alterações enzimáticas (HEATON e MARANGONI, 1996).

A degradação da clorofila é descrita por de uma série de reações bioquímicas que ocorrem nos cloroplastos e envolvem enzimas como as clorofilases, Mg-dequelatase e feoforbídeo a mono-oxigenase (PAO) (MATILE et al., 1999). No entanto, foi observado que a clorofilase e a PAO podem estar presentes na parte externa dos cloroplastos, no citosol ou em outras organelas da célula (TSUCHIYA, 1999; WATANABE, 1999), permitindo inferir que a degradação da clorofila pode ocorrer tanto dentro quanto fora dos cloroplastos.

Durante a desagregação da clorofila, o primeiro grupo de reações produz derivados esverdeados, enquanto que os passos mais avançados produzem compostos incolores. Nos estudos de Sinnecker (2002), o mecanismo de degradação do pigmento verde mostrou ser um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico não enzimático, que resultou em aumento de feofitinas e outros derivados fitilados. De acordo com Hörtensteiner et al. (2000), o processo é tão complexo quanto o da biossíntese da clorofila. As principais alterações que ocorrem no primeiro grupo de reações correspondem à liberação de Mg^{+2} pelo deslocamento de dois H^{+} sob condições ácidas e/ou pela ação da Mg-dequelatase e a clivagem da cadeia fitol pela enzima clorofilase, que produz intermediários esverdeados, tal como feofitinas, clorofilados e feoforbídeos (HEATON; MARANGONI, 1996; MANGOS; BERGER, 1997).

O segundo grupo de reações é responsável pelo “desverdecimento”, uma rápida formação de derivados incolores e polares, devido à abertura do anel tetrapirrólico pela ação da enzima PAO, que parece atuar especificamente sobre um feoforbídeo (MÜHLECKER et al., 1997; RODONI et al., 1997; OBERHUBER; KRÜTLER, 2002). Os produtos primários da ação dessa enzima são compostos incolores, fluorescentes, que são rapidamente transformados em catabólitos não fluorescentes (TAKAMIYA et al., 2000; WÜTHRICH et al., 2000; OBERHUBER et al., 2001; OBERHUBER; KRÄUTLER, 2002). Além da PAO, outras enzimas oxidativas, como a peroxidase e a lipoxigenase, também podem contribuir com a descoloração da clorofila (JOHNSON-FLANAGAN; SPENCER, 1996; MARTÍNEZ et al., 2001).

Em soja, as clorofilas são completamente degradadas em derivados incolores em condições adequadas de maturação e de secagem (HÖRTENSTEINER et al., 1998). Os resultados do processo de degradação inicial em catabólitos castanho-verde, que ainda possuem propriedades fotodinâmicas acontecem por causa da presença de um macrociclo de tetrapirrol intacto. A repartição natural começa com a hidrólise do grupo fitol, da clorofila *a*, ou da clorofila *b* pela clorofilase, formando clorofilídeos, e remoção do átomo de magnésio por Mg-dequelatase, formando feoforbídeos. Os passos finais de degradação envolve a formação de produtos incolores, fluorescentes ou não fluorescentes, que diferem uns dos outros na polaridade e na localização das ligações duplas do anel tetrapirrólico (KRÄUTLER; MATILE, 1999). Em sementes, tecidos meristemáticos e outros tecidos, pode-se encontrar proplastídeos, os quais são ontogenicamente precursores de todos os outros tipos de plastídeos vegetais. Se o desenvolvimento dos tecidos meristemáticos ou embrionário acontece na escuridão, o desenvolvimento dos proplastídeos resulta na formação do etioplasto, se os etioplastos forem submetidos a luminosidade continuam seu desenvolvimento e se tornam de cor verde, formando os cloroplastos (HOOBER, 2006).

Estudando a degradação da clorofila, Sinnecker (2002) analisou o perfil dos pigmentos (clorofila e derivados coloridos) em grãos de soja de três cultivares, em seis estádios de maturação R6 a R8 (com a adição temporal de três estádios intermediários, visando a identificação dos compostos intermediários da degradação da clorofila); além disso, identificou e caracterizou

os produtos de degradação da clorofila das sementes após submetê-las a três condições de secagem (temperatura ambiente a 25°C e em estufa nas temperaturas de 40°C e 75°C) e também propôs possíveis mecanismos químicos e/ou bioquímicos envolvidos na degradação da clorofila. O autor concluiu que tanto na maturação no campo, como na secagem a temperatura de 25°C, o mecanismo de degradação pareceu ocorrer por via enzimática, com possibilidades de ser mediado pela enzima oxigenase e apresentou formação de compostos incolores. Na temperatura de 40°C, houve retenção da cor verde e o mecanismo pareceu ocorrer por duas vias: a via enzimática, mediada pelas enzimas clorofilases, evidenciada pelo acúmulo de derivados defitilados (clorofilídeos e feoforbídeos) e uma segunda, a via química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas. Na temperatura de 75°C, foi observado também o acúmulo de clorofilas e feofitinas, que provavelmente ocorreu devido à inativação das enzimas e favorecimento da feofetização. Ponderou ainda o autor que, em soja, a degradação completa da clorofila somente pode ser obtida se for colhida a partir do estágio R7 e que a degradação em sementes oleaginosas é função do estágio de maturação, do teor de água e da temperatura de secagem.

Neste mesmo sentido, Borrmann (2009) observou que as sementes tiveram a degradação da clorofila aparentemente acelerada na pós-colheita por secagem a temperaturas superiores a 40°C, e apresentaram menores teores de clorofila *a* com aumento da temperatura de secagem. Neste mesmo trabalho, o autor assumiu que a degradação da clorofila não é catalisada por enzimas, que são parcial ou totalmente inativadas, mas que existe uma feofitinização dependente da temperatura, (resultante da desorganização das membranas) em meio ácido. A concentração de catabólitos de clorofila não coloridos (NCC) aumentou até o 114º dia após a semeadura, devido a constante degradação da clorofila. Depois disso, os níveis de clorofila tornaram-se menores, consequentemente, foram produzidos menos NCCs (BORRMANN, 2009).

O resultado do trabalho de Borrmann (2009) suporta a hipótese de que não há acúmulo de NCC na maturação de sementes de soja, mas, em vez disso, que os NCCs são ainda mais degradados, provavelmente para formar outras estruturas importantes para a germinação. As plantas verdes são capazes de adaptar as suas funções de fotossíntese de acordo com a exposição à intensidade de luz, transformando clorofila *b* em clorofila *a*, com a participação

da enzima redutase da clorofila *b* (KRÄUTLER, 2003; ROCA, 2004) e/ou da enzima a oxigenase (XU et al., 2001). Esta transformação é também fundamental para a maturação da clorofila *b*, porque a PAO, que leva à abertura do macrociclo oxigenolítico do feoforbídeo (HÖRTENSTEINER et al, 1998; MATILE et al., 1999), produz os catabólitos vermelhos de clorofila (RCCs), que são posteriormente modificados pela redutase RCC que hidrogena uma ligação dupla no anel tetrapirrólico formando catabólitos fluorescentes incolores (unidades de FCC) (Figura 1).

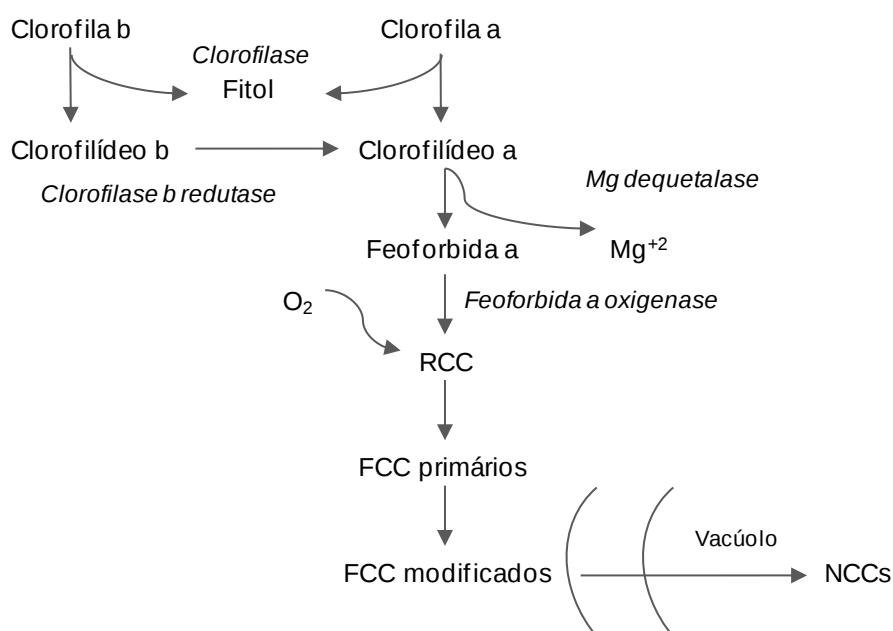


Figura 1 – Catabolismo da clorofila – esquema simplificado.

Fonte: <http://dalmeida.com/poscolheita/Cor3.pdf>

2.5 Germinação e retenção de clorofila em sementes

A germinação de sementes consiste na reativação do crescimento do embrião por meio de uma sequência ordenada de eventos metabólicos, resultando na ruptura do tegumento pela radícula. O início desse processo ocorre pela absorção de água pelas sementes e termina com o alongamento do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994). A embebição é fundamental para a germinação porque permite a retomada da atividade metabólica, contribuindo para os processos de mobilização e assimilação de reservas e crescimento

subsequente (MARCOS FILHO, 2005). A velocidade de embebição depende das características de cada espécie, dentre essas, da composição química e da permeabilidade do tegumento. Durante o processo de germinação das sementes várias enzimas estão envolvidas em reações metabólicas relacionadas à síntese e a degradação de moléculas (MCDONALD, 1999), como a clorofila.

A resposta fisiológica das plantas à variação na intensidade da luz passa pela adaptação e otimização na coleta da luz e da capacidade de conversão de energia do aparelho fotossintético, incluindo ajustes na estequiometria do fotossistema (MELIS, 1991; 1996). A quantidade de clorofila para maioria das espécies decresce no tegumento da semente, durante a maturação, alterando a coloração verde conferida pela clorofila para outra cor característica da espécie, a qual varia de acordo com a cultivar. Esse processo é chamado “*degreening*”, ou desverdecimento (WARD et al., 1995; JALINK et al., 1998a).

Sementes de *Brassica oleracea* com menor quantidade de fluorescência da clorofila, conforme Jalink et al. (1998b) apresentam maior porcentagem de plântulas normais e que as práticas de manejo da cultura influenciam o nível de clorofila das sementes colhidas. Ainda não está bem compreendido como ocorre a degradação de clorofila durante o processo de maturação das sementes, entretanto, já foi relatado em sementes de colza que a clorofila é decomposta durante as fases tardias do amadurecimento, sendo que o nível de clorofila final pode ser afetado tanto pelo genótipo quanto pelo ambiente (WARD et al., 1995).

A retenção de clorofila nas sementes também pode apresentar variabilidade em uma mesma planta, segundo França Neto et al. (2005) o índice de ocorrência de semente esverdeada pode variar dependendo do posicionamento das vagens na planta. Foi observado que plantas de soja que tiveram morte prematura e maturação forçada devido à ocorrência de fusariose nas raízes, apresentaram maior concentração de semente esverdeada no terço inferior (21,2%) em relação ao terço superior, onde foram constatados 3,5% de esverdeamento.

Diferentes graus da coloração verde podem ocorrer em sementes de soja, dependendo da fase e da intensidade dos estresses, que possam causar a morte ou a maturação forçada da planta. Se a morte prematura da planta ocorrer no final da fase de enchimento de grãos, a coloração verde estará confinada ao tegumento e poderá diminuir durante o armazenamento, se ocorrer no início ou

no meio da fase de enchimento de grãos, essa coloração se distribuirá por toda a semente e permanecerá estável, mesmo após o armazenamento (WIEBOLD, 2002; MANDARINO, 2005).

2.6 Interferência de sementes esverdeadas no potencial fisiológico do lote

A dificuldade de extração e identificação dos catabólitos derivados da clorofila pode explicar porque o mecanismo de degradação ainda não foi totalmente compreendido. Particularmente, na soja, este fenômeno tem um significado importante já que a ocorrência da cor verde afeta a qualidade de grãos de mercado. A presença de clorofila e outros pigmentos verdes em canola e soja não só conferem uma cor escura indesejável e promovem a oxidação em presença de luz, como também afetam o catalisador durante o processo de hidrogenação dos óleos (USUKI et al., 1984; ABRAHAM ; DE MAN, 1986; JOHNSON-FLANAGAN; THIAGARAJAH, 1990; WARD et al., 1992, 1995; GOMES et al., 2003). Segundo Zorato (2003), o impacto do pigmento verde sobre a qualidade fisiológica é maior quanto mais elevado for o índice de sementes esverdeadas e quanto maior a intensidade da tonalidade do verde incidindo nos cotilédones das sementes presentes no lote.

A partir de níveis de 10% de sementes esverdeadas encontrados em lotes de sementes de soja, conforme Costa et al. (2001), pode ocorrer redução do vigor (TZ 1-3), da viabilidade (TZ 1-5) e da germinação, principalmente, se o esverdeamento estiver concentrado na área envolvendo a radícula, plúmula e hipocótilo.

Trabalhando com sementes de repolho, Jalink et al. (1998), concluíram que o método baseado na medição de fluorescência é altamente específico para a detecção de clorofila. Outras substâncias, que podem influenciar na cor da semente, mas não apresentam fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e de emissão, não contribuem para o sinal de fluorescência. Por isso, o método de detecção da fluorescência da clorofila (FC) de sementes funciona para todas as sementes nas quais a clorofila sofre desagregação durante o processo de maturação e pode ser utilizado para a avaliação da maturidade e qualidade das sementes.

A utilização da técnica de FC na separação de sementes esverdeadas de soja e sua relação com o potencial fisiológico foi estudada por Cícero et al.

(2009) e verificaram que o processo de separação proporcionou acentuada diferença entre as frações de baixa e de alta fluorescência de clorofila, permitindo verificar que as sementes esverdeadas de soja apresentam alta fluorescência de clorofila e isto afeta a sua qualidade; concluíram, também, que é possível melhorar a qualidade do lote com a remoção de sementes esverdeadas, utilizando a técnica de separação por fluorescência de clorofila.

2.7 Radiação solar e sombreamento

A disponibilidade de radiação solar é um dos fatores que mais limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Toda energia necessária para a realização da fotossíntese, processo que transforma o CO_2 atmosférico em energia metabólica, é proveniente da radiação solar (TAIZ e ZIEGER, 2004). O sombreamento artificial é um método utilizado no estudo das necessidades luminosas das diferentes espécies em condições de viveiro, pois isola e quantifica o efeito da intensidade luminosa e fornece às parcelas experimentais condições uniformes de iluminação, em comparação aos estudos em condições naturais (ENGEL, 1989). Conforme mencionado anteriormente, entre os diversos componentes do ambiente, a luz é primordial para o crescimento das plantas, não só por fornecer energia para a fotossíntese, mas também por fornecer sinais que regulam seu desenvolvimento por meio de receptores de luz sensíveis a diferentes intensidades, qualidade espectral e estado de polarização. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade aos quais uma espécie está adaptada podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento (ATROCH et al., 2001).

Para a cultura da soja, a radiação solar está relacionada com a fotossíntese, alongação de haste principal e ramificações, expansão foliar, “pegamento” de vagens e grãos e fixação biológica (CÂMARA, 2000). A radiação solar é um importante componente ambiental que, além de fornecer energia luminosa para a fotossíntese, também fornece sinais ambientais para uma gama de processos fisiológicos da soja. Além da intensidade da radiação, a duração e a qualidade do espectro luminoso são determinantes para respostas morfológicas e fenotípicas marcantes em soja, tais como estatura da planta, indução ao florescimento e ontogenia (FARIAS et al., 2009; THOMAS, 1994). De

acordo com Shibles; Weber (1966), o total de fitomassa seca produzida pela soja, depende da percentagem de radiação fotossinteticamente ativa interceptada e da eficiência de utilização dessa energia pelo processo fotossintético. Alguns estudos têm evidenciado a plasticidade fisiológica de espécies vegetais em relação à radiação fotossinteticamente ativa disponível por meio de avaliações de crescimento inicial em relação a diferentes níveis de sombreamento (ALMEIDA et al., 2005). De acordo com Pereira (2002), no período de enchimento de sementes, a eficiência no uso da radiação aumenta de forma linear. Mesmo a planta apresentando auto-sombreamento e baixo incremento de massa seca de folhas, esse aumento na eficiência é explicado pelo fato de que, nesse período, há elevação da translocação de fotoassimilados para as sementes, principal dreno da planta de soja nesta fase do desenvolvimento. Amo (1985) e Fanti; Perez (2003) afirmam que as variações na quantidade, qualidade, presença ou ausência de luz influenciam fortemente o desenvolvimento que a planta irá apresentar e que, em uma comunidade florestal, a luz tem influência sobre a distribuição local das espécies, sendo reconhecido como o mais importante fator para os mecanismos de regeneração e crescimento das florestas.

Os níveis de sombreamento são tão importantes para o desenvolvimento de algumas espécies que Paiva et al. (2003) estudando mudas de cafeeiro crescendo sob um sombreamento de 50%, observaram que elas apresentavam maior crescimento vegetativo em relação às mudas formadas em sombreamentos de 30% e 90% e em pleno sol. Níveis extremos de luminosidade não são benéficos para as plantas, a absorção de quantidades muito altas de intensidades de radiação solar pelas plantas pode levá-las à saturação luminosa, diminuindo a eficiência no uso da radiação (ADAMS; ADAMS, 1992; Jiang et al., 2006). Essa radiação em excesso pode promover a produção de energia que, se não for utilizada ou dissipada pode ser repassada ao oxigênio, transformando-o em formas danosas, como por exemplo, peróxidos (H_2O_2) e superóxidos (O_2^{-2}), que promovem a degradação das proteínas do complexo antena do cloroplasto das células (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A capacidade de sobrevivência da planta aumenta com o tamanho da semente e pela expressão de caracteres morfológicos e fisiológicos que promovem crescimento sob reduzida disponibilidade luminosa. Funcionalmente,

o aumento das taxas fotossintéticas líquidas sob baixas irradiâncias, a diminuição na razão clorofila *a/b*, uma menor razão de massa entre raiz e parte aérea, maior área foliar específica, maiores razões de massa e área foliar, são fatores que resultariam em melhor aproveitamento da baixa radiação disponível (BOARDMAN, 1977; GIVNISH, 1988; LEI; LECHOIWICZ, 1998; POORTER, 1999).

O aumento da proporção de clorofila *b* é uma característica importante em ambientes sombreados, porque esta capta energia de outros comprimentos de onda e a transfere para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese e representa um mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa (SCALON et al., 2003). O trabalho de Lima et al. (2008), comprovou que os teores de clorofilas *a*, *b* e total de tecidos foliares de *Achillea millefolium* L. não são influenciadas por diferentes doses de nitrogênio mas são influenciadas de maneira significativa pelos níveis de sombreamento. Estudando níveis de sombreamento em maracujazeiro, Zanella et al. (2006) concluíram que o aumento destes níveis promove menor relação clorofila *a/b*, e acréscimos nas concentrações de clorofila total e carotenóides totais, confirmando a existência de relação entre o sombreamento e a produção de clorofila.

2.8 Qualidade fisiológica

A qualidade fisiológica de sementes de soja pode ser avaliada por diversos testes, sendo o teor de água inicial das sementes fator primordial para a padronização, pois o teor elevado de água pode favorecer o desempenho das sementes nos testes (COIMBRA, 2007). No processo de embebição e germinação de sementes, a água é o principal agente estimulador e controlador, proporciona amolecimento do tegumento, acréscimo no volume do embrião e dos tecidos de reserva, aumento nos estímulos da digestão, da translocação e da assimilação dos nutrientes, com consequente crescimento do eixo embrionário (VILLELA, 1998; GUIMARÃES et al., 2008). O processo de embebição é o começo do teste de germinação, que determina o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, e pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor para semeadura em campo (BRASIL, 2009). Simultaneamente ao teste de

germinação, é possível avaliar o vigor das sementes através do teste de primeira contagem de germinação, admitindo que amostras de sementes com alto vigor conseguem translocar suas reservas para o eixo embrionário (radícula e plúmula) com maior rapidez e eficiência, e apresentam plântulas normais em menor tempo (SINNECKER, 2002).

A protrusão radicular acontece conforme progride a absorção de água e ocorre a retomada do metabolismo por meio da ativação de sistemas enzimáticos que catalisam a digestão das reservas e estimulam o aumento da atividade respiratória nas células da semente. As reservas são transformadas em substâncias mais simples, solúveis e difusíveis que se translocam por difusão até os pontos de crescimento do eixo embrionário, onde são assimiladas para a formação de novos tecidos (MARCOS FILHO, 1986). Dessa forma, o índice de velocidade de protrusão radicular pode demonstrar a diferença na qualidade fisiológica das sementes através da velocidade com que sementes translocam as reservas para iniciar a protrusão da raiz.

O teste de envelhecimento acelerado tradicional avalia a resposta de sementes submetidas a temperatura e umidade relativamente elevadas, procurando estimar o potencial relativo de armazenamento de lotes (MARCOS FILHO, 2005). Endo et al. (1984) observaram que a clorofila é oxidada pela enzima lipoxigenase na presença de ácidos graxos insaturados, considerados a reação primária no processo de envelhecimento, por produzirem radicais livres que atacam posteriormente lipídios, proteínas e ácidos nucleicos numa reação em cadeia (HARRINGTON, 1973; VERTUCCI; LEOPOLD, 1987). O processo de envelhecimento envolve enzimas, tal como lipoxidase e enzimas oxidativas, que podem funcionar sob baixos conteúdos de água (VERTUCCI; LEOPOLD, 1987). Na presença de oxigênio, o envelhecimento das sementes é frequentemente associado à peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. A peroxidação de lipídeos tem potencial considerável em danificar membranas celulares, sendo importante na deterioração de sementes armazenadas, reduzindo a longevidade destas sob condições naturais (HARRINGTON, 1973; STEWART; BEWLEY, 1980; WILSON; MCDONALD, 1986; HENDRY ET AL., 1992; HENDRY, 1993). A aplicação do teste de envelhecimento acelerado em sementes que supostamente diferem quanto à quantidade de clorofila pode auxiliar na

compreensão de como ocorre a degradação da clorofila e indicar por analogia, se enzimas oxidativas atuam no processo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FASE I

3.1.1 Localização do experimento

Durante a safra 2010/2011, a instalação foi realizada no campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel no Campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), em Pelotas, Rio Grande do Sul, sob coordenadas geográficas S31°80'28", W52°41'88", e altitude de 13,2m.

3.1.2 Cultivar

Foram utilizadas sementes de soja, cultivar IGRA 518 RR, cujos descritores estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição da cultivar IGRA 518 RR utilizada para execução da fase I

Cultivar	Recomendação de Cultivo	Ciclo	Grupo de maturação	Hábito de crescimento	Material Transgênico
IGRA 518 RR	RS e sul do MS	Precoce	6.3	Indeterminado	Sim

3.1.3 Tratamentos

Sombreamento: 0%, 30% e 50%, aplicados com a instalação de sombrites² de 30% e 50% de sombreamento (Figura 2), e uma área com o

² A classificação do sombrite é dada em porcentagem e se refere à quantidade de proteção da luz, ou seja, um sombrite de 30% deixa passar 70% dos raios solares.

mesmo número de plantas sem qualquer cobertura foi utilizada (0% de sombreamento).



Figura 2 – Detalhe da instalação dos sombrites no experimento.

Aplicação de químicos: sem aplicação de produto químico, aplicação de fungicida, aplicação de inseticida e aplicação de fungicida e inseticida. O fungicida utilizado foi sistêmico do grupo triazol e o inseticida de contato e ingestão, dos grupos organofosforado e piretróides respectivamente; as doses foram utilizadas conforme a indicação do fabricante (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos produtos químicos utilizados na fase I

Produto	Classe	Grupo Químico	Ingrediente ativo
Fungicida	Fungicida sistêmico	Triazol	Difenoconazol 250g/L
Inseticida	Inseticida de contato e ingestão	Organofosforado e piretróides	Esfenvalerato 40g/L fenitrotona 800g/L

3.1.4 Condução do experimento

A terra utilizada foi corrigida através de calagem e adubada quimicamente utilizando a dose recomendada conforme necessidade da cultura e da terra. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, fatorial 3 x 4 (sombreamento x aplicação de produtos químicos) com três blocos e quatro repetições. A semeadura foi realizada nos dias 3, 4, e 5 de dezembro de 2010, conforme a janela de semeadura indicada para região caracterizando os blocos

I, II e III, respectivamente. Foram utilizados quarenta e oito vasos de plástico de 20L por bloco, totalizando 144 vasos e em cada vaso foram colocadas seis sementes de soja e, após 15 dias foi realizado o desbaste deixando três plantas por vaso. A irrigação foi realizada de maneira que cada vaso recebesse a mesma quantidade de água. Os sombrites foram instalados no estádio reprodutivo R5.5 (grão formado), conforme a descrição dos estádios de desenvolvimento da soja de Fehr (1971) e Yorinori (1996).

Sob cada sombrite foram dispostos quatro tipos de aplicação de produtos químicos: sem aplicação de produto químico (C), aplicação de fungicida (F), aplicação de inseticida (I) e aplicação de fungicida e inseticida (F+I). Quando as plantas atingiram o estádio R3 (início da frutificação), os vasos foram colocados em uma área aberta e os produtos químicos foram aplicados. Para garantir a uniformização das doses, foi usado um pulverizador de CO₂. Após a aplicação do inseticida e fungicida os vasos foram recolocados em sua posição original. A colheita individual das plantas foi realizada manualmente no estádio de desenvolvimento R8 (ponto de colheita/maturação plena).

3.1.5 Condições climáticas

A média das temperaturas máxima, média e mínima, durante período de 30 dias, e também os dados relativos à umidade relativa do ar e precipitação pluvial, durante os meses de dezembro de 2010 e janeiro, fevereiro, março e abril de 2011, foram extraídas do Boletim Agroclimatológico, disponibilizado no site da Embrapa Clima Temperado através do Laboratório de Agrometeorologia.

3.1.6 Radiação solar

A radiação solar incidente foi medida com o Equipamento *Quantum-Radiometer-Photometer Modelo LI-185B* para verificação do percentual de radiação sob cada sombrite e em área a pleno sol em cada bloco.

3.1.7 Porcentagem de sementes esverdeadas

O resultado foi expresso em percentual de sementes esverdeadas na metade superior e inferior das plantas. A porcentagem de sementes esverdeadas das amostras de sementes provenientes das porções inferior e superior das plantas foi realizada através de avaliação visual da coloração, sob

luz natural, por um único observador. De cada amostra de sementes previamente homogeneizada, foram retiradas aleatoriamente 100 sementes. Suas cores foram avaliadas por comparação com duas sementes padrão, uma de cor verde e outra de cor amarela. Amostras com menos de 100 sementes tiveram a porcentagem calculada por proporção.

3.1.8 Determinação dos componentes do rendimento

O resultado foi apresentado através da significância estatística da interação do sombreamento e aplicação de químicos nos componentes do rendimento usando delineamento blocos casualizados, num fatorial 3 x 4 com três blocos e quatro repetições. As variáveis avaliadas foram número de sementes esverdeadas das porções inferior e superior das plantas, número total de sementes esverdeadas por planta, altura de planta, número de ramos laterais, número de vagens das porções inferior e superior. A altura da planta foi medida a partir da divisão entre o sistema radicular e o eixo caulinar, até o meristema apical do eixo caulinar. Cada planta foi dividida transversalmente na metade do caule e o número de sementes esverdeadas e de vagens das porções inferior e superior foi contado.

3.2 FASE II

3.2.1 Localização do experimento de campo

Durante a safra 2011/2012, o experimento foi instalado em campos de produção de sementes comerciais na Fazenda Rio Verdinho da Barra Grande de propriedade da empresa Sementes Cereal Ouro em Rio Verde, Goiás, sob as coordenadas S17°44.63', W051°21.85', S17°42.52', W051°22.08' e S17°42.98', W051°20.75', para as cultivares 1, 2 e 3, respectivamente.

3.2.2 Cultivares

As cultivares de soja codificadas como 1, 2 e 3, todas de ciclo precoce, sendo a primeira convencional e as demais transgênicas de primeira geração (RR), conforme Tabela 2.

Tabela 3 – Descrição das cultivares utilizadas na fase II

Cultivar	Recomendação de Cultivo	Ciclo	Grupo de Maturação	Hábito de crescimento	Material Transgênico
1	RS, SC, PR, GO, DF, MG, SP, MS e MT	Precoce	6.1	Indeterminado	Não
2	GO, MT MS, MG, SP	Precoce	7.2	Indeterminado	Sim
3	RS, SC, PR, MS; SP; MG, GO; MT.	Precoce	6.7	Indeterminado	Sim

3.2.3 Tratamentos

Sombreamento: 0%, 35%, 50% e 65%. Sombrites de 35%, 50% e 65% de sombreamento foram instalados sobre a cultura e uma área com igual número de plantas sem qualquer cobertura, 0% de sombreamento, foi utilizada.

Aplicação de químicos: na fase II do experimento não houve diferenciação na aplicação de inseticida e fungicida nas sementes sombreadas e nas plantas controle. Os quatro níveis de sombreamento e as três cultivares receberam aplicações de inseticida e fungicida uniformes, conforme a necessidade de manejo das áreas.

3.2.4 Condução do experimento

A semeadura das cultivares de soja 1, 2 e 3, ocorreu, entre os dias 01 e 05 de outubro de 2011, conforme janela de cultivo indicada para região. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com três repetições. Uma área de 8m² foi utilizada para cada parcela.

As três cultivares receberam irrigação através de pivô central (Figura 5). Os sombrites foram instalados na fase em que as plantas atingiram o estágio R5.5 (desenvolvimento do grão), conforme descrição dos estádios de desenvolvimento de Fehr (1971) e Yorinori (1996). A colheita manual das plantas foi realizada individualmente no estágio de desenvolvimento R8 (ponto de colheita/maturação plena). Para garantir que apenas plantas sombreadas fossem colhidas foi deixado uma bordadura de 0,5m de cada lado da parcela.

3.2.5 Condições climáticas

A média das temperaturas máxima, média e mínima, durante período de 30 dias, e também os dados relativos à umidade relativa do ar e precipitação pluvial, entre os dias 26 de setembro de 2011 e 27 de fevereiro de 2012, foram extraídos do Boletim Agroclimatológico da estação climatológica da empresa Cereal Ouro em Rio Verde/GO.

3.2.6 Radiação solar

A medição da radiação solar incidente foi realizada por equipamentos da estação climatológica da empresa Cereal Ouro em Rio Verde/GO.

3.2.7 Porcentagem de sementes esverdeadas

A porcentagem de sementes esverdeadas das amostras de sementes foi realizada através de avaliação visual da coloração, sob luz natural, por um único observador. De cada amostra de sementes previamente homogeneizada, foram retiradas aleatoriamente 100 sementes. Suas cores foram avaliadas por comparação com duas sementes padrão, uma de cor verde e outra de cor amarela. O resultado foi expresso em percentual de sementes esverdeadas.

3.2.8 Avaliação da qualidade das sementes

O grau de umidade das amostras de semente soja e os testes de germinação, primeira contagem de germinação e peso de mil sementes foram realizados no Laboratório de Análise de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas. Os testes de envelhecimento acelerado, índice de velocidade de protrusão radicular e fluorescência da clorofila foram realizados no *Wageningen Seed Lab* do *Laboratory of Plant Physiology*, pertencente ao *Departmente of Plant Sciences*, após a aprovação do Comitê de Biossegurança da *Wageningen University*, na cidade de Wageningen, Holanda.

3.2.8.1 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade das amostras foi determinado utilizando o método da estufa a 105°C. Três repetições de cada amostra foram colocadas em estufa de

ventilação forçada a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24h, conforme metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.8.2 Teste de germinação

Foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes para cada tratamento, por repetição. A semeadura foi realizada em rolo de papel toalha, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e colocado em germinador em temperatura constante de 25°C , na presença de luz. As avaliações foram efetuadas no oitavo dia após instalação do teste e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais, conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.8.3 Teste de primeira contagem de germinação

Foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes para cada tratamento, por repetição. A metodologia utilizada foi segundo as recomendações de Krzyzanowski et al. (1999) e critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.8.4 Teste de envelhecimento acelerado

As amostras foram colocadas dentro de uma câmara plástica hermeticamente fechada e com um fundo falso, sobre uma espessa lâmina de água (Figura 3). As amostras ficaram na câmara a temperatura de 41°C durante 48h. Após este período, as amostras foram submetidas ao teste de germinação usando quatro repetições de 50 sementes, segundo as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).



Figura 3 – Câmara de envelhecimento acelerado - vista externa (a) e interna (b)

3.2.8.5 Índice de velocidade de protrusão radicular

Realizado em conjunto com a determinação da fluorescência da clorofila (FC) pelo equipamento *CropReport* (item 3.2.8.7.5.2), foi considerada germinada a semente que rompeu o tegumento e emitiu a raiz. As avaliações foram realizadas a partir da primeira semente que emitiu a raiz e, as avaliações subsequentes foram realizadas de hora em hora, dentro de um período de 15 horas. Após este período, sementes que a protrusão radicular ainda não havia ocorrido não foram avaliadas. O índice de velocidade de protrusão radicular foi obtido de acordo com uma adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVPR = PR_1/N_1 + PR_2/N_2 + \dots + PR_n/N_n$$

sendo:

IVPR – índice de velocidade de protrusão radicular

PR_1 , PR_2 , PR_n – número de sementes com protrusão radicular na primeira, segunda, ..., e última contagem, respectivamente.

N_1 , N_2 , N_n – número de horas decorridos entre a semeadura e a primeira, segunda,..., e última contagem, respectivamente.

Os resultados foram expressos em índices médios de velocidade de protrusão radicular para cada tratamento.

3.2.8.6 Peso de mil sementes

O peso de mil sementes foi determinado através da pesagem de oito repetições de 100 sementes, calculando-se o coeficiente de variação que, não

excedendo 4%, representou a média das mesmas, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.8.7 Fluorescência da clorofila

A mensuração da fluorescência da clorofila foi realizada através de dois equipamentos, *CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001* e *CropReport*, desenvolvidos pelo *Plant Research Institute* e pela *Wageningen University*. Ambos utilizam a mesma técnica para excitação das moléculas de clorofila e mensuração da fluorescência, mas diferem na capacidade de medição contínua de uma mesma amostra.

O equipamento *CF Seed Sorter and Analyser* foi programado para separar sementes em diferentes faixas de emissão da fluorescência da clorofila e utiliza sementes “secas”. O equipamento *CropReport* é capaz de monitorar a quantidade de clorofila sintetizada ou degradada em plantas durante a absorção de produtos e em diferentes estádios fenológicos, e, em sementes é capaz de medir a fluorescência da clorofila sintetizada ou degradada, durante o processo de absorção de água.

3.2.8.7.1 Funcionamento do equipamento *CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001*

Para a mensuração da fluorescência da clorofila foi utilizada luz de lâmpada de LED com interferência de 656nm. Um divisor de feixe reflete metade da intensidade da luz LED em direção à lente, concentrando a luz sobre a semente. Uma parte da FC é capturada pela mesma lente e 50% da luz é dirigida para um filtro de 730nm. O divisor de feixe do equipamento (Figura 4) facilita o alinhamento dos dois caminhos ópticos: a luz de excitação do LED e da fluorescência da clorofila. Com a combinação de dois filtros de interferência de 656nm e 730nm, o sinal é suprimido a uma corrente elétrica de cerca de 1 pico ampere (pA). Um amplificador é utilizado para a detecção sensível da FC da luz LED modulado em 77Hz e a corrente elétrica alternada do fotodiodo é convertida em um sinal proporcional à intensidade da fluorescência da clorofila. O uso de um amplificador possibilitou a medição sob condições de luz ambiente (JALINK et al., 1998; CICERO et al., 2009) e sua leitura realizada em corrente elétrica (Ampere).



Figura 4 – Equipamento *CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001*

As condições que determinaram a magnitude do sinal de fluorescência da clorofila foram a distribuição espectral, a intensidade da luz de excitação, a área da superfície da semente iluminada, a estrutura do revestimento de semente, a sensibilidade espectral do filtro de combinação e o ângulo sólido (determinado pela distância entre a semente e a lente, e o diâmetro da lente) do sistema de lentes.

3.2.8.7.2 Funcionamento do equipamento *CropReport*

A fluorescência da clorofila foi captada através de um gerador de imagens (Figura 5) que se baseia na rápida repetição da taxa fluorimétrica (FRRF), utilizando a duração dos impulsos para a obtenção de imagens de alta qualidade. Sub-pulsos saturantes foram usados para excitar a fluorescência de clorofila a originando o primeiro pulso, ou fluorescência inicial (F_0) e para atingir a fluorescência máxima, ou valor máximo em que a curva satura (F_m), conduzindo a um rendimento fotoquímico do FSII praticamente nulo, após os impulsos múltiplos. Foram captadas 20 imagens de forma síncrona dentro de 0,36 segundos com os impulsos de luz correspondentes. A partir destas imagens sequenciais de fluorescência, foram calculadas o rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m) e o tempo de resposta da medida transitória da curva de fluorescência (τ_{TR}) (JALINK; VAN DER SCHOOR, 2011).

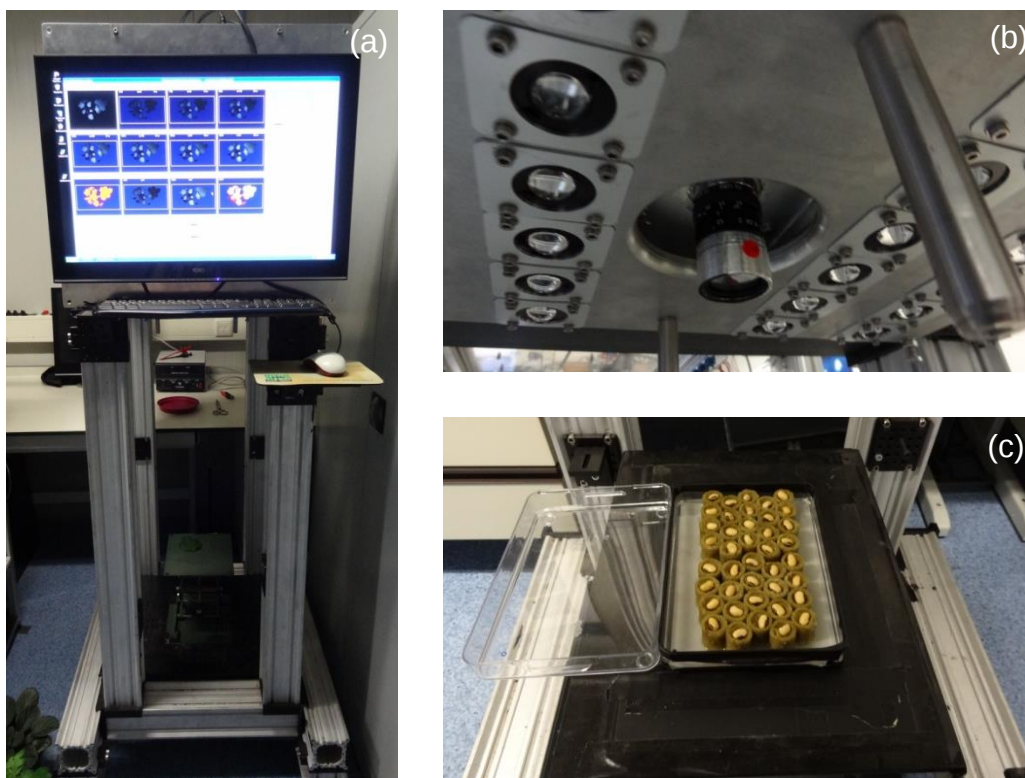


Figura 5 – Equipamento *CropReport* conectado ao software (a); lente e LEDs (b); e sementes posicionadas abaixo da lente (c)

Durante cada impulso dos LEDs uma imagem escura de 320 x 240 de pixel com 14 valores de cinza de bits foi captada pela câmara e diretamente transferida para o computador. Depois de captar uma sequência de todas as imagens, a imagem escura é subtraída a partir das imagens de fluorescência. Isto produz imagens para que cada pixel contenha informações de tempo de fluorescência. Para a metodologia da rápida repetição da taxa fluorimétrica fluorescência transitória, $F(t)$, pode ser formalmente expressa pela função:

$$F(t) = F + (F_m - F) \{C(t)(1-p)/(1-C(t)p)\}$$

sendo,

$F(t)$ - taxa fluorimétrica fluorescente

$C(t)$ - fração do centro de reação do FSII, $0 < C(t) < 1$

p - grau de transferência de energia entre os centros reativos fotossintéticos

Este processo polifásico é determinado principalmente por uma fase fotoquímica rápida, que pode ser concluída em milisegundos, e uma fase térmica

mais lenta (SCHREIBER; KRIEGER, 1996; HEREDIA; DE LAS RIVAS, 2003). Uma estimativa do rendimento quântico máximo do PSII fotoquímico pode ser calculada a partir da equação:

$$\Phi P = F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

sendo:

ΦP - rendimento quântico máximo do PSII

F_v/F_m - rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do PSII

F_0 - fluorescência mínima no instante $t = 0$

Este cálculo foi efetuado para cada pixel, produzindo uma imagem para o cálculo do rendimento fotoquímico do PSII, F_v/F_m , e uma imagem que corresponde ao tempo de resposta, τ_{TR} do sistema fotossintético.

3.2.8.7.3 Determinação da fluorescência da clorofila em sementes

A determinação da fluorescência da clorofila em sementes foi realizada no equipamento *CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001* (Figura 6). Foram utilizadas três repetições de 1000 sementes de cada tratamento. As sementes secas e em temperatura ambiente foram colocadas em um alimentador cujo tamanho e forma permitia que as sementes de soja deslizassem umas sobre as outras em direção ao laser e ao leitor óptico de fluorescência da clorofila. No painel frontal do equipamento foi ajustado a velocidade de vibração (*speed 46*) e o número de sementes que deveriam ser avaliadas.

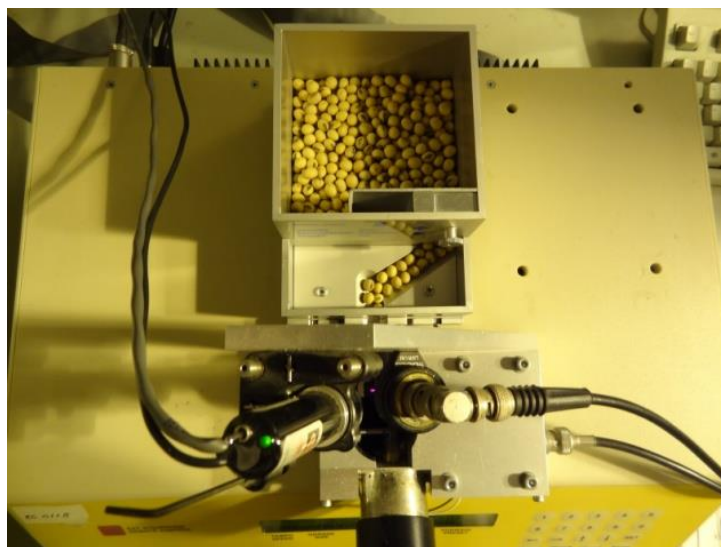


Figura 6 – Vista superior do equipamento *CF Seed Sorter and Analyser - Model JS 2001*

A baixa velocidade de vibração imposta ao equipamento permitiu que a área superficial das sementes de soja fosse analisada individualmente (Figura 7). A medição da fluorescência da clorofila foi expressa em pA (pico Ampere) e a leitura máxima da FC foi regulada para 3000 pA, valor acima do valor máximo atingido em testes preliminares.

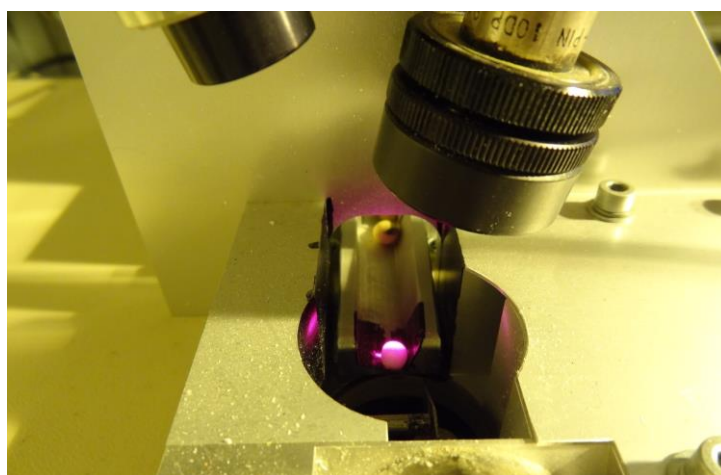


Figura 7 - Medição da fluorescência da clorofila em semente de soja com equipamento *CF Seed Sorter and Analyser – Model JS 2001*

O sinal de FC do amplificador alimentou um computador e criou um histograma de frequência usando para isso, um software desenvolvido para

separar as sementes a partir de diferentes faixas de fluorescência da clorofila em pA (Figura 8).

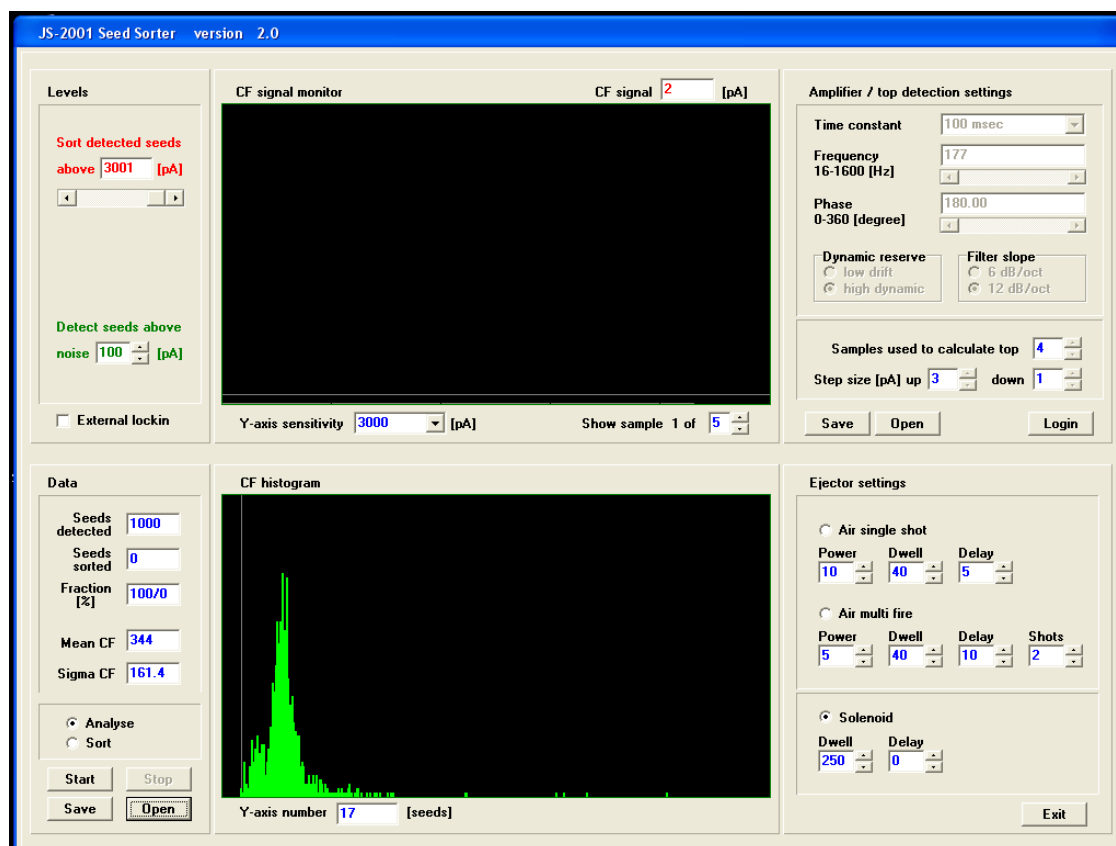


Figura 8 - Software usado na medição da fluorescência da clorofila em semente de soja com equipamento *CF Seed Sorter and Analyser – Model JS 2001*.

A partir dos dados deste programa foi criado de um novo histograma em planilha *Excel*[®], distribuindo os valores pA em faixas, partindo do valor zero até o valor máximo determinado na regulação do equipamento, 3000pA. Para a criação dos histogramas de frequência de cada tratamento foi utilizada a média das três repetições.

3.2.8.7.4 Determinação da fluorescência da clorofila antes e após envelhecimento

A fluorescência da clorofila de 200 sementes foi medida pelo equipamento *CF Seed Sorter and Analyser*, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.7.3, logo após as amostras foram colocadas em uma câmara plástica hermeticamente fechada e com um fundo falso, sobre uma espessa lâmina de

água a temperatura de 41°C durante 48h. Após o envelhecimento das sementes, as amostras foram novamente submetidas a mensuração da FC no equipamento *JS 2001 Seed Sorter and Analyser*. Foram gerados dois histogramas para cada cultivar, relativo às medições da fluorescência da clorofila antes e depois do processo de envelhecimento das sementes e o resultado dos histogramas foi expresso em pA (pico Ampere).

3.2.8.7.5 Determinação da fluorescência da clorofila durante absorção de água

3.2.8.7.5.1 Em sementes com tegumento esverdeado

Em uma análise preliminar, foi realizada a determinação da fluorescência da clorofila durante o processo de absorção de água pelas sementes. Duas amostras de 20 sementes de soja, uma com tegumento esverdeado, proveniente da primeira fase do experimento e outra com tegumento de coloração característica da espécie, foram individualmente colocadas em substrato inerte constituído de *Rockwool*® e acondicionadas em uma única caixa de plástico transparente com tampa.

A primeira medição de fluorescência da clorofila pelo equipamento *CropReport* foi realizada antes da adição de água, com as sementes ainda secas. Posteriormente foram adicionados 500mL de água na caixa plástica contendo o substrato e as sementes, as quais foram tampadas. Após este procedimento, as duas amostras foram posicionadas sob as lâmpadas LED do equipamento *CropReport* e imagens das sementes foram captadas a cada 15 minutos durante 48h. As imagens das duas amostras foram sequenciadas e o equipamento *CropReport* gerou um filme de 21 segundos, de modo que cada segundo representa aproximadamente 2,3 horas (<http://youtu.be/cMLUCq1LPqI>).

3.2.8.7.5.2 Em sementes de plantas sombreadas

A determinação da fluorescência da clorofila foi realizada durante o processo de absorção de água pelas sementes. Seis repetições de 20 sementes de cada tratamento foram individualmente colocadas com o hilo sempre voltado para o mesmo lado, em substrato inerte constituído de *Rockwool*® (Figura 9) e acondicionadas em uma caixa de plástico transparente com tampa.



Figura 9 – Substrato *Rockwool*®

A primeira medição de fluorescência da clorofila pelo equipamento *CropReport* (Figura 10) foi realizada antes da adição de água, com as sementes ainda secas. Posteriormente foram adicionados 500mL de água em cada caixa plástica contendo o substrato e as sementes, as quais foram tampadas. Após este procedimento todas as amostras foram armazenadas em germinador a 25°C, totalmente no escuro.

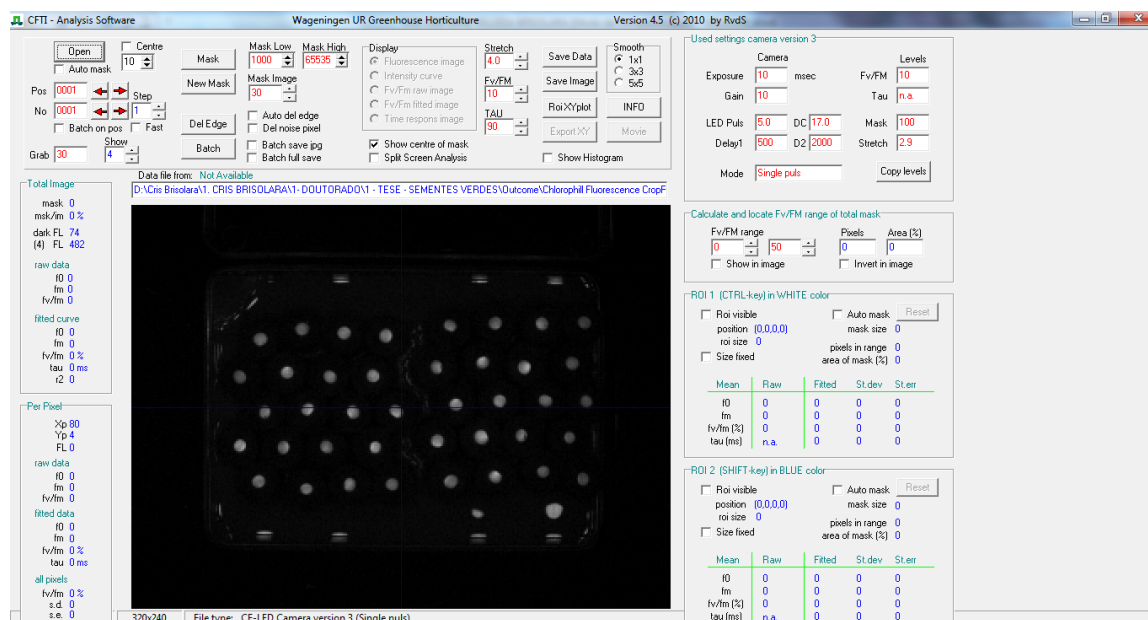


Figura 10 – Imagem das sementes captada pelo equipamento *CropReport*

Após 13h de absorção de água no escuro, as sementes foram retiradas do germinador e o equipamento *CropReport* foi utilizado para captar a primeira imagem das sementes entumecidas e a FC emitida por elas. Logo após a

medição da FC as sementes retornavam para o germinador. Esse procedimento foi realizado de hora em hora, por um período de 15 horas. Seguindo a mesma metodologia foram captadas 16 imagens sucessivas, entre 13h e 28h de absorção de água. As três cultivares tiveram o mesmo número de medições da FC e de imagens capturadas, totalizando 68 imagens de cada cultivar, sendo 17 de cada tratamento.

A FC de cada semente foi calculada com o auxílio do Software CFTI – Analysis Versão 4.5, 2010, pertencente à *Wageningen UR Greenhouse Horticulture*. Através de filtros (máscaras) cada imagem das sementes foi tratada até que todos os ruídos de imagem fossem retirados e ficasse apenas a imagem limpa da semente (Figura 11). Esse procedimento é importante porque um dos parâmetros usados pelo software para determinar a FC é a área analisada.

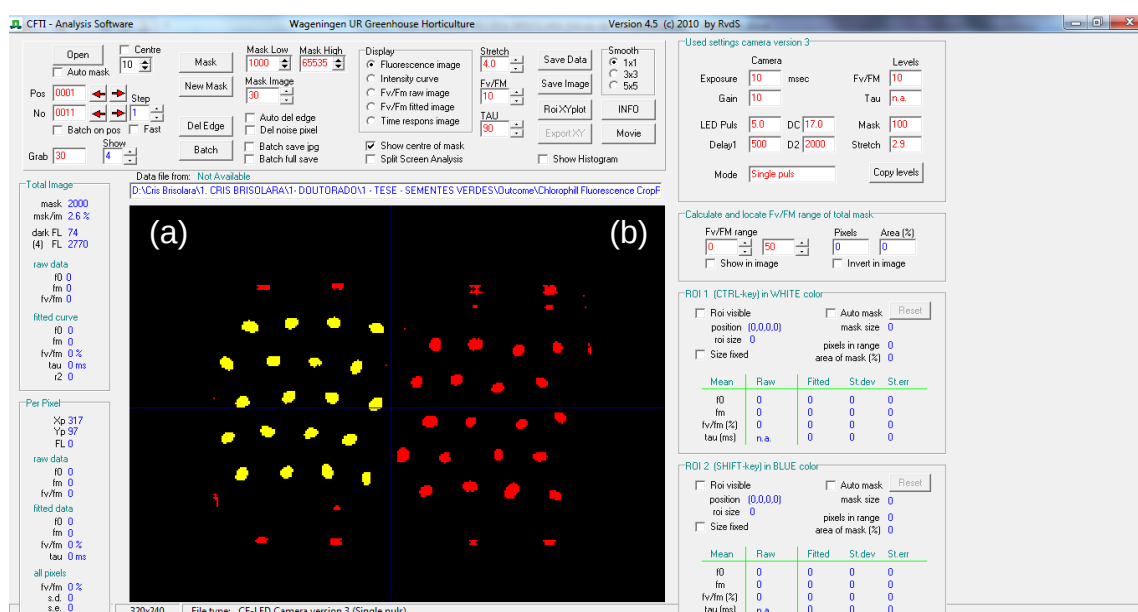


Figura 11 – Imagem das sementes com aplicação de máscara para eliminar ruídos da imagem. Sementes com a máscara (a). Sementes sem a máscara (b).

Com a imagem limpa, um último filtro foi aplicado (Figura 12a) para que fosse possível a leitura individual do tamanho e da FC de cada semente (Figura 12b). O processo foi repetido com as 18 leituras de cada amostra e a partir destes dados obteve-se a curva da FC durante o processo de absorção de água pela semente.

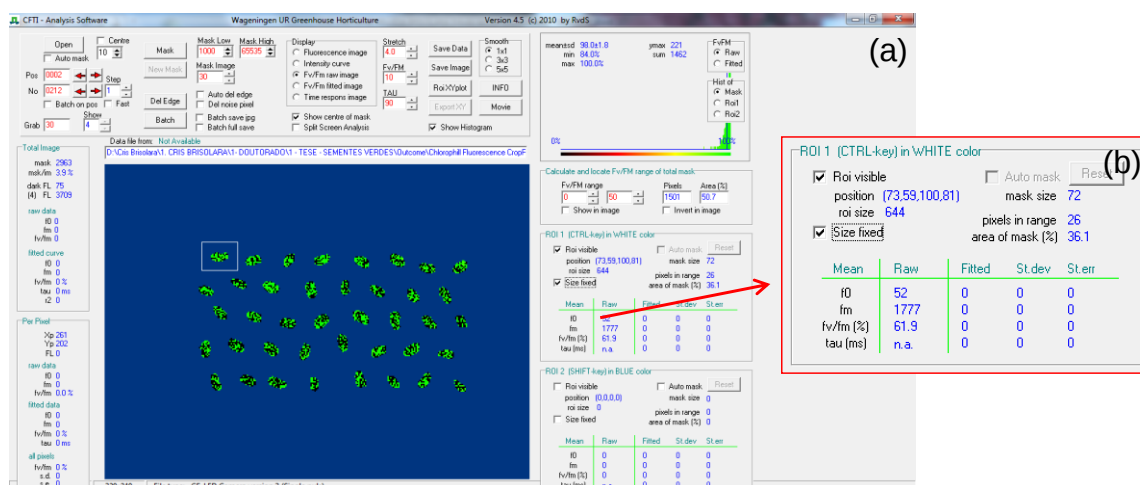


Figura 12 – Imagem das sementes com aplicação da máscara para leitura da fluorescência da clorofila (a). Detalhe da tela com o valor de Fm (valor máximo onde a curva da fluorescência da clorofila satura) e do tamanho da semente (b).

3.2.8.7.6 Determinação do tamanho da semente e sua relação com a fluorescência da clorofila

A determinação do tamanho das sementes foi realizada em conjunto com a fluorescência da clorofila no equipamento *CropReport* durante o processo de absorção de água pelas sementes. Foram utilizadas as mesmas seis repetições de 20 sementes de cada tratamento individualmente colocadas no substrato de *Rockwool*[®] para determinar o tamanho da semente.

Uma imagem é descrita por uma matriz $N \times M$ de valores de pixel (*picture element*) inteiros positivos, que indica a intensidade de cor em cada posição (i, j) da imagem. Um dado pixel $(p(i, j))$ na posição (n, m) possui um valor numérico que representa o valor da iluminação na área correspondente na imagem (FELICIANO et al., 2005). O tamanho da semente fornecido pelo programa ligado ao equipamento *CropReport* apresentou os resultados em *pixel*, e, para determinar exatamente o tamanho da semente utilizou-se uma medida conhecida de 200mm x 200mm e mensurou-se quantos pixel's o equipamento detectava nesta área, porém optou-se por usar a medição em pixel e não em mm² por ser mais usual ao se trabalhar com imagens computadorizadas. O resultado do tamanho das sementes foi obtido pela média das repetições das amostras e foi expresso em *pixel*.

3.2.9 Análise Estatística

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em blocos ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa WINSTAT. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados e discutidos os resultados da presença de sementes esverdeadas na primeira fase, relativa à interação entre os fatores sombreamento e aplicação de inseticida e fungicida isoladamente ou em combinação. Após serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na segunda fase da pesquisa, menos ampla em relação ao número de fatores estudados e focada principalmente nas alterações decorrentes do sombreamento nos níveis de clorofila e as respostas referentes à fluorescência da clorofila durante o processo absorção de água pelas sementes.

4.1 Fase I

4.1.1 Condições climáticas

As condições climáticas não se constituíram em fator limitante para o adequado desenvolvimento da cultura. A Tabela 3 mostra que a temperatura média do ar ficou na faixa que a soja melhor se adapta, entre 20°C e 30°C, exceto no mês de abril, que ficou 1,5°C abaixo da temperatura adequada mínima, porém a colheita das sementes foi realizada nos primeiros dias do mês e isso não foi um fator importante no período de enchimento de grãos. A cultura não sofreu déficit hídrico durante crescimento e desenvolvimento, a necessidade de água da cultura de 7 a 8mm/dia durante a floração e enchimento de grãos, e de 450 a 800mm/ciclo foi atendida tanto pela precipitação pluvial no período quanto pela irrigação. Os dados de temperatura e precipitação pluvial estão de acordo com os apresentados pela Embrapa (2011) como favoráveis para a cultura da soja.

A Tabela 4 mostra ainda, que a média das temperaturas ficou dentro do esperado para a região e não foi fator limitante para o “pegamento” da florada ou crescimento e desenvolvimento da cultura, assim como a umidade relativa do ar, que apresentou variação percentual de 10 pontos, mas manteve-se numa faixa favorável à cultura.

Tabela 4 – Caracterização das condições climatológicas durante desenvolvimento da soja na área experimental do Dep. de Fitotecnia da FAEM/UFPel. Média da temperatura máxima em 30 dias (TM); média da temperatura em 30 dias (T); média da temperatura mínima em 30 dias (Tm); umidade relativa do ar (UR); precipitação pluvial durante 30 dias (PP); radiação solar medida no local (R)

Período	TM (°C)	T (°C)	Tm (°C)	U.R.(%)	PP (mm)	R (W.m ⁻²)
Dez/2010	27.9	22.2	17.1	75.5	75.3	207,3
Jan/2011	30,0	24.9	21,0	79.1	65.7	226,9
Fev/2011	28.7	23.5	19.8	79.8	90.9	222,1
Mar/2011	26.8	21.5	17.2	79.7	144.4	190,7
Abr/2011	24.7	18.5	14.1	84.5	111.5	148,2

Fonte: Estação Climatológica Embrapa Pelotas (Capão do Leão)

4.1.2 Radiação solar

Observa-se na Tabela 4 que a radiação solar baixou sua incidência, conforme a tendência para a região, reduzindo em 33% a incidência solar recebida em abril, em relação à fevereiro, contudo, como o percentual de radiação solar que atingia as plantas era sempre o mesmo, a flutuação da incidência da radiação solar não foi um fator limitante à pesquisa. A medição da radiação solar incidente na área coberta com sombrite e a pleno sol, apresentada na Tabela 5, mostrou que o material utilizado para sombrear as plantas de soja foi eficiente, e, mesmo não apresentando o percentual exato de sombra comparativamente às especificações do sombrite, apresentou resultado bastante similar.

Tabela 5 - Radiação solar incidente medida com o equipamento Quantum-Radiometer-Photometer Modelo LI 185-B em W.m⁻² e seu percentual de sombra em relação à área a pleno sol.

Sombrite	Radiação (W.m ⁻²)	% de sombra
sem sombrite (0%)	3300	0
30%	2310	31
50%	1708	51

4.1.3 Sombreamento e aplicação de inseticida e fungicida

A análise estatística da interação dos níveis de sombreamento e aplicação de produtos químicos não apontou significância, sendo descartado como fator responsável pela produção de sementes esverdeadas. O fator sombreamento isolado foi significativo para o número de sementes esverdeadas e para altura de planta (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito de três níveis de sombreamento (Somb) e aplicação de inseticida (I), fungicida (F) e inseticida e fungicida (IF) no número de vagens na parte superior, inferior e número de vagens total; no número de sementes esverdeadas na parte superior e inferior; e na altura de planta.

	Somb	Somb x I	Somb x F	Somb x IF
Nº vagens/pl (sup)	NS	NS	NS	NS
Nº vagens/pl (inf)	NS	NS	NS	NS
Nº vagens total	NS	NS	NS	NS
Nº sem. esv. (sup)	S	NS	NS	NS
Nº sem. esv. (inf)	S	NS	NS	NS
Altura de planta	S	NS	NS	NS

NS = não significativo a 5% de significância pelo teste F.

S = significativo a 5% de significância pelo teste F.

A eficiência do uso de radiação (EUR) pode explicar porque o número de vagens apresentado na Tabela 6 não foi afetado pelo sombreamento e pela interação sombreamento e aplicação de inseticida e fungicida. A EUR expressa a eficiência com que a radiação solar interceptada é transformada em fitomassa seca (MONTEITH, 1977). Em soja, a variação da eficiência do uso de radiação ocorre em função do estágio de desenvolvimento e da atividade metabólica da cultura. A EUR no subperíodo vegetativo aumenta a partir da emissão do quinto trifólio, fase em que a intensidade de acúmulo de fitomassa seca é alta, mantendo-se elevada até o enchimento de grãos, em que se acentua a translocação de fitomassa seca dos órgãos vegetativos para os reprodutivos (SCHÖFFEL; VOLPE, 2001). Embora a planta tenha sido submetida a sombreamento e apresente pequeno incremento de fitomassa seca de folhas, o aumento de translocação de fotoassimilados para os grãos é o principal responsável por esse comportamento (PENGELLY et al., 1999; PEREIRA, 2002). Em condições de sombreamento ou de estresse hídrico moderado, as

plantas tendem a aumentar a EUR (WELLS, 1991; PORRAS et al., 1997; PEREIRA, 2002; PURCELL et al, 2002), justificando a não diferenciação do número de vagens nas plantas submetidas a diferentes níveis de sombreamento.

A Tabela 7 apresenta a incidência de sementes esverdeadas nas metades superior e inferior da planta, demonstrando que os três níveis de sombreamento apresentaram maior número de sementes com retenção de clorofila na porção inferior, reiterando França-Neto et al. (2005), ao salientarem que o índice de ocorrência de semente esverdeada é um fator que pode variar conforme o posicionamento das vagens na planta. As informações da Tabela 7 sugerem que sombreamento não é uma circunstância normal para o crescimento e desenvolvimento da soja, assim como para seu desverdecimento, pois conforme França-Neto et al. (2005), sob circunstâncias normais a planta amadurece e a enzima clorofilase degrada as clorofilas, resultando na coloração normal da semente de soja.

Tabela 7 – Efeito de três níveis de sombreamento na porcentagem de sementes esverdeadas na metade superior e inferior de plantas de soja

Sombreamento	Sementes esverdeadas (%)	
	Metade Superior	Metade Inferior
0%	8 b	13 c
30%	8 b	20 b
50%	14 a	32 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Apesar do processo de amadurecimento dos grãos iniciarem pela porção inferior do vegetal, o sombreamento dos próprios ramos da planta faz com que o processo de degradação da clorofila seja retardado, e por isso, gere maior formação de sementes esverdeadas na porção inferior do vegetal.

A Tabela 7 apresenta o efeito do sombreamento na produção de sementes esverdeadas, no maior o nível de sombreamento ocorreu o maior percentual de sementes esverdeadas na planta. As plantas apresentaram mesmo percentual de sementes esverdeadas na metade superior ao serem

submetidas aos níveis 0% e 30% de sombreamento, mas diferiram significativamente em comparação ao percentual de sombreamento de 50%. Na metade inferior das plantas, a percepção do efeito do sombreamento foi evidente, quanto maior o nível do sombreamento, maior a diferença significativa entre os percentuais de sementes esverdeadas produzidas, já que neste caso, o efeito do sombreamento promovido pelo sombrite é somado ao sombreamento provocado pelos ramos superiores da própria planta. Esta ocorrência demonstra que independentemente da fração da planta, o aumento nos percentuais de sementes esverdeadas em plantas de soja está relacionado com os níveis de sombreamento aos quais são submetidas.

É provável que sementes provenientes da metade inferior das plantas sombreadas tenham produzido número maior de sementes esverdeadas que a metade superior devido à associação do sombreamento a menor oferta de radiação fotossinteticamente ativa captada por moléculas de clorofilas e carotenóides. Essas moléculas produzem energia usando o aparato fotossintético. Como a produção de energia pelos fotossistemas que oxidam a água a oxigênio molecular para formar ATP e reduzir o NADP^+ a NADPH ficam comprometidos, a energia proveniente do sol e conservada na forma de ATP e na forma de coenzimas orgânicas (NADPH) não é utilizada para síntese e degradação de compostos, como por exemplo, a clorofila.

A Tabela 8 mostra que houve diferença na altura das plantas submetidas a diferentes níveis de sombreamento e que os níveis maiores provocam maior estiolamento das plantas. Corroborando com a premissa que o sombreamento influencia a fisiologia das plantas, em um trabalho realizado por Rego e Possamai (2006), plantas jovens de jequitibá-rosa foram submetidas a diferentes condições de luminosidade e alguns parâmetros de crescimento avaliados foram influenciados pelo sombreamento. A interação entre diferentes níveis de sombreamento e aplicação de inseticida e fungicida, não apresentaram alteração na altura das plantas, somente o sombreamento como fator isolado.

Tabela 8 – Efeito de três níveis de sombreamento na altura de plantas de soja

Sombreamento	Altura de planta (cm)
0%	57 c
30%	63 b
50%	65 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Não houve esverdeamento das sementes de soja devido a interação entre os fatores sombreamento e aplicação de fungicida e inseticida. Porém, apesar da resposta estatística a respeito da interação entre os fatores ter sido negativa, e de todos os cuidados em relação à condução do trabalho terem sido tomados, o alto percentual de sementes esverdeadas encontrado nas amostras sem aplicação de inseticida e fungicida pode ter ocorrido devido à falta destes produtos, e não pelo seu uso, ou seja, as sementes de plantas que não receberam inseticida e fungicida podem ter ficado esverdeadas pela incidência de insetos sugadores como o percevejo, que estressa a planta, afeta sua fisiologia e faz com que ocorra seu amadurecimento precoce, assim como as plantas que não receberam fungicida e sofreram a incidência de fungos. Assim, a fase II do experimento foi desenvolvida considerando apenas com o fator sombreamento.

4.2 Fase II

4.2.1 Condições climáticas

As condições climáticas não foram um fator limitante para o adequado desenvolvimento das plantas das três cultivares. A Tabela 8 apresenta as características climáticas durante o desenvolvimento da soja nos campos de produção de sementes em Rio Verde/GO no período de desenvolvimento do trabalho de campo. A temperatura média do ar ficou entre 26,9°C e 29,5°C, próximo à temperatura considerada máxima para que a soja melhor se adapte, que é, segundo Embrapa (2011) em torno de 30°C. As temperaturas máxima e mínima mantiveram-se dentro de limites aceitáveis para o adequado desenvolvimento e crescimento da cultura.

A umidade relativa do ar (Tabela 9), manteve-se na faixa que possibilitou a semeadura no início de outubro, o manejo de defensivos durante o ciclo da cultura e não beneficiou a proliferação de doenças de fim de ciclo (DFC) no mês de fevereiro. No período de colheita, também no mês de fevereiro, manteve-se numa faixa não muito alta, o que poderia acarretar dano mecânico latente, nem muito baixa, o que poderia provocar dano mecânico imediato por trincamento das sementes colhidas em ambiente demasiadamente seco e, assim, interferir na avaliação da qualidade das sementes.

Tabela 9 - Caracterização das condições climatológicas. Período (30 dias); média da temperatura máxima em 30 dias (TM); média da temperatura em 30 dias (T); média da temperatura mínima em 30 dias (Tm); umidade relativa do ar (UR); precipitação pluvial durante 30 dias (PP); radiação solar medida no local (R)

Período	TM (°C)	T (°C)	Tm (°C)	UR (%)	PP (mm)	R (W.m ⁻²)
26/09 a 26/10/11	29.5	22.7	18.00	74.0	192.9	198.6
27/10 a 27/11/11	28.7	22.6	17.2	75.2	59.4	229.4
28/11 a 28/12/11	28.2	22.2	18.5	85.1	160.2	225.2
29/12 a 29/01/12	26.9	21.5	18.5	87.9	152.1	189.7
30/01 a 27/02/12	29.3	22.5	18.3	79.7	334.2	207.4
Média geral	28.6	22.4	18.3	81.9	186.7	210.1

Fonte: Estação climatológica da empresa Cereal Ouro em Rio Verde/GO.

A adequada precipitação pluvial do período (Tabela 9) garantiu água suficiente para que a cultura não sofresse déficit hídrico durante o crescimento e desenvolvimento, sendo necessária irrigação através de pivô central apenas em alguns dias, quando as chuvas eram mais espaçadas. Os dados de temperatura e precipitação pluvial na fase II também estão de acordo com os apresentados pela Embrapa (2011) como favoráveis para a cultura da soja.

4.2.2 Radiação solar

A Tabela 8 mostra que a germinação da soja ocorreu em baixa radiação solar, mas após o período de instalação do dossel, aproximadamente 30 dias após a semeadura, houve aumento na radiação disponível, permanecendo assim por mais 60 dias (de 27 de outubro a 28 de dezembro), garantindo a

indução do florescimento e um início de enchimento de grão na presença de adequada disponibilidade de radiação. Após esse período, a média de radiação disponível baixou um pouco durante o mês de janeiro, voltando a níveis próximos aos anteriores em fevereiro, na fase final do acúmulo de matéria seca nas sementes.

4.2.3 Qualidade fisiológica

O período de enchimento das sementes é um dos estádios mais críticos durante o desenvolvimento da semente, o sombreamento tal como qualquer estresse ambiental adverso durante este processo pode resultar num acúmulo de clorofila e reduzir a qualidade das sementes. A Tabela 10 apresenta o grau de umidade e os resultados dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de protrusão radicular, peso de mil sementes e fluorescência da clorofila realizados nas amostras de sementes provenientes de plantas submetidas à sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%.

Tabela 10 - Resultados médios da determinação do grau de umidade (U), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado (EA), índice de velocidade de protrusão radicular (IVPR), peso de mil sementes (P1000), percentual de sementes esverdeadas (SE) e fluorescência da clorofila (FC) para as cultivares (C) 1, 2 e 3 submetidas aos níveis de sombreamento (S) de 0%, 35%, 50% e 65%

C	S (%)	U (%)	G (%)	PCG (%)	EA (%)	IVPR (-)	P1000 (g)	SE (%)	FC (pA)
1	0	7,6 a	92 a	70 a	85 a	2,6 b	136 a	0	321 a
	35	7,6 a	90 a	77 a	82 a	2,8 ab	128 b	0	419 b
	50	7,7 a	91 a	82 a	83 a	3,2 a	120 c	0	412 b
	65	7,7 a	94 a	72 a	81 a	3,3 a	120 c	0	436 b
2	0	7,7 a	88 a	72 a	84 a	1,4 a	136 a	0	381 a
	35	7,8 a	82 a	76 a	74 ab	1,8 a	128 b	0	507 b
	50	7,7 a	89 a	67 a	73 b	1,0 a	128 b	0	567 b
	65	7,7 a	89 a	71 a	69 b	1,2 a	120 c	0	527 b
3	0	7,8 a	87 a	74 a	84 a	1,5 a	128 a	0	342 a
	35	7,7 a	89 a	81 a	80 a	1,3 a	120 b	0	472 b
	50	7,8 a	81 a	69 a	81 a	1,3 a	120 b	0	431 b
	65	7,8 a	85 a	76 a	86 a	1,9 a	112 c	0	433 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A determinação do grau de umidade (Tabela 10) não apresentou diferença entre os teores de água das amostras das três cultivares. A uniformidade da umidade inicial das sementes foi importante porque a água é o principal agente estimulador e controlador na germinação de sementes e no processo de absorção de água. A água proporciona amolecimento do tegumento, acréscimo no volume do embrião e dos tecidos de reserva, aumento nos estímulos da digestão, translocação e a assimilação dos nutrientes, com consequente crescimento do eixo embrionário. A uniformidade no teor de água garantiu que o resultado dos demais testes aplicados às amostras fosse verossímil.

O teste de germinação (Tabela 10) mostrou que os percentuais de plântulas normais foram muito próximos e não diferiram significativamente para nenhuma das três cultivares, não havendo diferença significativa entre os tratamentos de sombreamento. Semelhantemente ao teste de germinação, o teste de primeira contagem de germinação (Tabela 10) não mostrou diferença significativa para nenhuma das três cultivares. O teste de primeira contagem baseia-se, no princípio de que as amostras que apresentam maior percentagem de plântulas normais, na primeira contagem, são as mais vigorosas (KRZYŻANOWSKI et al., 1999), segundo esta premissa, foi possível afirmar que em nenhuma cultivar os tratamentos aos quais as cultivares foram submetidas, diferenciaram significativamente.

O teste de envelhecimento acelerado (Tabela 10) não foi sensível para identificar diferenças no potencial fisiológico das sementes de duas das três cultivares analisadas, de maneira que as cultivares 1 e 3 não apresentaram diferença significativa entre sem sombreamento (0%) e os tratamentos de 35%, 50% e 65% de sombreamento. Na cultivar 2 ocorreu diferença significativa apenas entre sem sombreamento e os tratamentos de 50% e 65% de sombreamento. O não sombreamento não ter diferido dos demais, em duas das três cultivares, pode ser um indicativo de que o sombreamento não afeta o vigor das sementes.

No índice de velocidade de protrusão radicular (Tabela 10), as cultivares 1, 2 e 3 não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos de sombreamento. Baseado nos resultados do índice de velocidade de protrusão radicular verificou-se que o teste não apresentou resultados que corroborassem

com a afirmativa de que o sombreamento das plantas provoca diferença na velocidade de germinação das sementes provenientes destas plantas.

Ao contrário dos demais testes, o peso de mil sementes das amostras mostrou diferença significativa entre os tratamentos nas três cultivares (Tabela 9). As sementes com maior peso foram as que não sofreram estresse pelo sombreamento, seguidas pelas sombreadas com 35% e 50%, e as mais leves foram as de sombreamento de 65%. Através do teste do peso de mil sementes, Alves et al. (2012) verificaram que sementes de girassol, provenientes de diferentes áreas do capítulo, apresentavam diferença na qualidade fisiológica de sementes, corroborando com a precisão do teste para indicar a diferenciação fisiológica entre lotes de sementes. Nota-se que houve um prejuízo para o acúmulo de reserva nas sementes das plantas sombreadas, assim pode-se inferir que plantas não sombreadas conseguem converter com maior habilidade os nutrientes em matéria seca, ficando suas sementes com peso maior que plantas que sofreram sombreamento em qualquer percentual dentro da faixa avaliada.

Essa diferença na capacidade de converter a energia da fotossíntese em matéria seca pode ser explicada pela alteração fisiológica que ocorre durante a maturação das semente, em que os passos finais da degradação da clorofila originam produtos incolores fluorescentes ou não fluorescentes que diferem um do outro pela polaridade e localização das duplas ligações do anel tetrapirrólico (KRÄUTLER, 1999) e formam compostos intermediários, julgando-se um deles ser o produto final. Sendo o sombreamento um estresse ambiental que possivelmente condiciona a formação destes compostos individuais intermediários, e, sabendo que a formação destes compostos também dependem de fatores internos como permeabilidade da membrana celular, mudança de pH e alterações enzimáticas (HEATON; MARANGONI, 1996), pode-se dizer que a redução no peso das sementes de acordo com o nível de sombreamento a que a plantas estão expostas provavelmente está ligada à formação destes grupos intermediários, tendo em vista que a enzima rubisco, uma das enzimas ativadas pela radiação solar, é responsável pela produção de energia e, consequentemente está ligada à produção de matéria seca. Sendo sua ativação dependente do pH básico do lúmen, que por sua vez é alterado em função da fase fotoquímica e também da concentração de Mg^{+2} e CO_2 (TAIZ;

ZIEGER, 2004), pode-se entender que a ativação da rubisco está ligada à degradação da clorofila, pois é a partir deste processo que os íons Mg^{+2} são liberados do anel tetrapirrólico da clorofila.

A quantidade de clorofila no tegumento das sementes diminui durante a maturação, um processo conhecido como “desverdecimento” (JALINK et al., 1998a; ONYILAGHA et al., 2011). O impacto do pigmento verde sobre a qualidade fisiológica é maior quanto mais elevado for o índice de sementes esverdeadas e quanto maior a intensidade da tonalidade do verde incidindo nos cotilédones das sementes presentes no lote. Entretanto, não houve constatação de porcentagem de sementes esverdeadas nas amostras de sementes de soja (Tabela 10), independentemente do sombreamento. Apesar do teste do peso de mil sementes ter apresentado diferença entre as amostras de sementes de plantas sombreadas e a não sombreadas, esta diferença não foi observada na avaliação visual das sementes quanto ao esverdeamento.

Os testes de avaliação da qualidade das sementes, exceto pelo resultado do peso de mil sementes, não diferiram, e apesar de não ter sido detectado a presença de sementes esverdeadas, sabe-se que a clorofila não degradada é um indicativo de redução na qualidade fisiológica em sementes de soja (ZORATTO, 2003). Porém, a diferença significativa entre amostras de sementes provenientes de plantas sombreadas e não sombreadas, em relação à presença de moléculas fluorescentes de clorofila (Tabela 10), comprova a alteração fisiológica e bioquímica em sua degradação, que sabidamente, inicia na senescência, sofre influência do genótipo e pode ser desencadeada por estresses (WARD et al., 1992; 1995; HEALTON; MARANGONI, 1996; SINNECKER, 2002) como o sombreamento.

4.2.4 Fluorescência da Clorofila

4.2.4.1 Fluorescência da clorofila em sementes

A fluorescência da clorofila medida nas cultivares 1, 2 e 3, apresentada na Tabela 9, mostra que sementes de plantas de soja não sombreadas apresentaram média da fluorescência da clorofila (medida pelo Equipamento *CF Seed Sorter & Analyser – Model JS2001*) bem abaixo das amostras de sementes provenientes de plantas submetidas a diferentes níveis de sombreamento, apresentando diferenças significativas. Pode-se assim, inferir que a resposta

similar nas três cultivares testadas comprova que o sombreamento em plantas de soja age no seu mecanismo fotossintético, fazendo com que a degradação da clorofila não ocorra normalmente, acarretando o aumento da presença de moléculas fluorescentes de clorofila independentemente do nível de sombreamento aos quais as sementes são submetidas quando ainda estão ligadas a planta mãe, porém diante da falta de uma explicação científica precisa sobre a degradação da clorofila, não é possível afirmar qual rota metabólica é afetada. A FC detectada indicaria a degradação da clorofila formando produtos incolores fluorescentes ou significaria a presença de algumas moléculas de clorofila intactas, que não teriam sido degradadas, mas que tornaram-se imperceptíveis a olho nu.

A diferença nos teores de clorofila, indicados pela sua fluorescência e ocasionada pelo sombreamento das plantas, está de acordo com o estudo de Rego et al. (2006), ao verificarem que plantas jovens de jequitibá-rosa submetidas a diferentes condições de luminosidade tiveram diminuição no desenvolvimento do sistema radicular e apresentaram teores de clorofila *a*, *b* e total maiores ao serem cultivadas sob luminosidade reduzida. Estudos mostraram a utilização da técnica de fluorescência de clorofila na separação de sementes esverdeadas de soja e sua relação com o potencial fisiológico e concluíram que o processo de separação proporcionou grande diferença entre as frações de baixa e de alta fluorescência de clorofila, permitindo verificar que as sementes esverdeadas de soja apresentam alta fluorescência de clorofila e isto afeta a sua qualidade (CICERO et al., 2009), analogamente às amostras sombreadas, apesar de as sementes não terem apresentado coloração verde no tegumento, existe uma relação entre a presença de moléculas fluorescentes de clorofila, com a qualidade fisiológica das sementes, prejudicando a fisiologia da maturação destas sementes.

As amostras de sementes avaliadas pelo equipamento *CF Seed Sorter & Analyser – Model JS2001* não apresentaram coloração verde no tegumento, porém, foi possível diferenciá-las a partir da FC medida em pico Ampere, conforme os histogramas das cultivares 1, 2 e 3 (Figura 13). A distribuição de frequência indica quais amostras apresentaram maior concentração de sementes com baixa e com alta concentração de FC.

O histograma da cultivar 1 (Figura 13a) apresentou distribuição de frequência normal e a base da testemunha (0%) concentrada mais próxima ao zero que os demais tratamentos, cujas bases, sobrepostas, estão mais distantes do zero e mais largas, abrangendo valores mais altos de FC na distribuição de frequência. Os histogramas dos tratamentos de 35%, 50% e 65% de sombreamento apresentaram a moda (valor mais frequente do conjunto de dados) à esquerda do valor médio, indicando que sementes colhidas de plantas estressadas pelo sombreamento, podem apresentar sinais de FC de grande magnitude. O método baseado na medição de fluorescência é altamente específico para a clorofila, outras substâncias, que podem influenciar a cor da semente, mas não apresentam fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e de emissão, não contribuem para o sinal de fluorescência, garantindo que a magnitude dos sinais provém apenas da clorofila.

O histograma da cultivar 2 (Figura 13b) mostrou distribuição de frequência normal e diferença significativa entre sementes de plantas não sombreadas e sombreadas. O valor médio do sombreamento nulo mostrou-se bem próximo ao centro do histograma, assim como a moda. Sementes que receberam 35%, 50% e 65% de sombreamento apresentaram moda à esquerda da média, indicando também para essa cultivar, a presença de sinais de FC de grande magnitude nestes tratamentos, diferenciando-os da testemunha em relação a FC detectada.

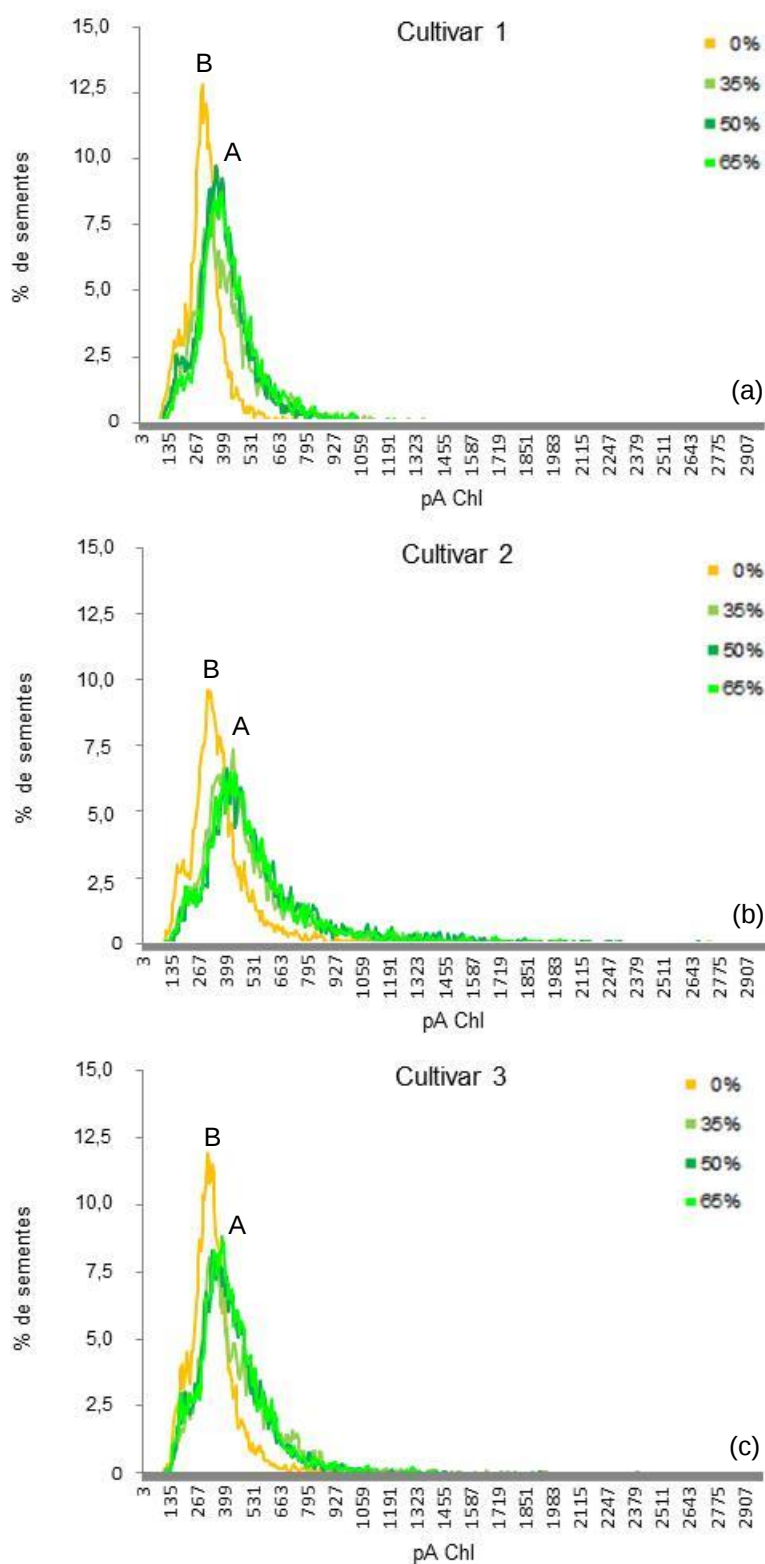


Figura 13 – Histogramas da fluorescência da clorofila em pico Ampere (pA) medida através do equipamento *JS Seed Sorter 2001*, em sementes das cultivares 1 (a), 2 (b) e 3 (c) submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%. As letras A e B posicionadas acima dos histogramas representam a diferença entre os resultados em pico Ampere sem sombreamento e os demais sombreamentos.

A sobreposição dos histogramas das sementes tratadas indica que o sombreamento afeta o processo fisiológico de degradação da clorofila. Diferentes sombreamentos não acarretam diferentes níveis de FC, mas o histograma evidencia que existe diferença entre sementes provenientes de plantas sombreadas e expostas ao sol. É provável que ocorra o aumento da proporção de clorofila *b*, característica em ambientes sombreados, mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa. Considerando que clorofila *b* capta energia de outros comprimentos de onda e a transfere para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (SCALON et al., 2003), pode-se afirmar que existe associação entre o sombreamento e a produção de clorofila, como nos trabalhos de Lima et al. (2008), que comprovaram que os teores de clorofilas *a*, *b* e total de tecidos foliares de *Achillea millefolium* L. são influenciadas de maneira significativa pelos níveis de sombreamento e de Zanella et al. (2006), que estudando níveis de sombreamento em maracujazeiro, concluíram que o aumento destes níveis promove menor relação clorofila *a/b*, e acréscimos nas concentrações de clorofila total e carotenóides totais, confirmando a existência de uma relação direta entre o sombreamento e a produção de clorofila.

A cultivar 3 (Figura 13c) apresentou o mesmo padrão dos histogramas das cultivares 1 e 2, a medição da FC das amostras que foram sombreadas com 35%, 50% e 65%, foi maior em relação a FC encontrada na não sombreada. Os histogramas também apresentaram a moda à esquerda da média e o histograma da amostra de sombreamento nulo, apresentou distribuição de frequência normal, com maior concentração de sementes na faixa de menor fluorescência em pA.

A similaridade dos histogramas (Figura 13) das três cultivares quanto à detecção da FC evidencia que independente do nível de sombreamento a que uma planta de soja seja exposta, ocorre uma modificação nas reações de degradação da clorofila, mesmo não havendo retenção da cor verde no tegumento.

4.2.4.2 Fluorescência da clorofila antes e após envelhecimento acelerado

A Figura 14 mostra que não houve diferença na conformação dos histogramas da fluorescência da clorofila das amostras das cultivares 1, 2 e 3 antes e após serem submetidas ao teste de envelhecimento acelerado.

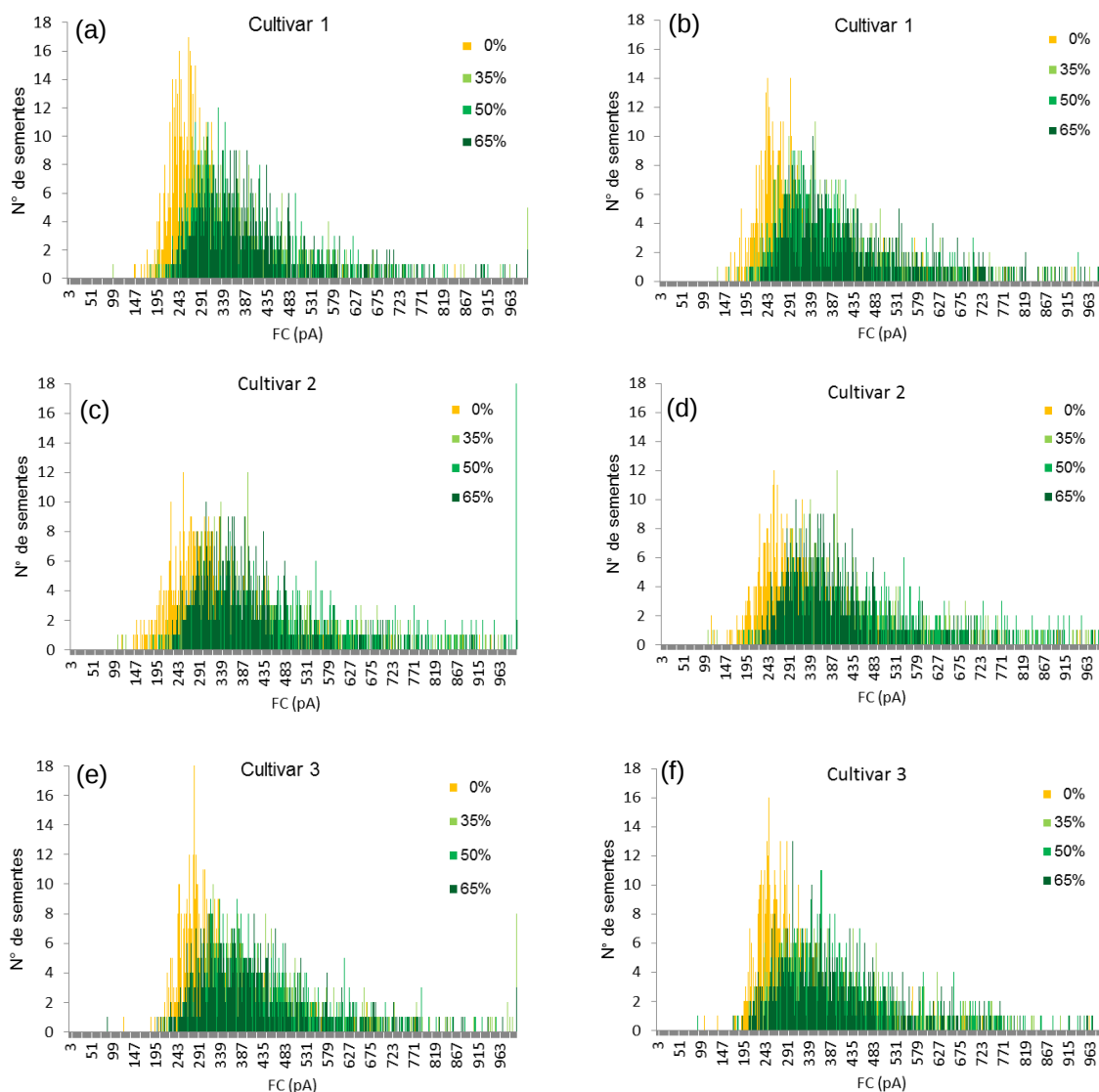


Figura 14 – Histogramas da fluorescência da clorofila (FC) em pico Ampere (pA) medida através do equipamento *JS Seed Sorter 2001*, em sementes das cultivares 1, (a; b) 2 (c; d) e 3 (e; f) submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%, antes e depois do teste de envelhecimento acelerado.

Pequenas diferenças nas conformações dos histogramas podem ter sido acarretadas pela diferença na posição que uma mesma semente pode ter assumido nas duas vezes em que foi submetida a leitura de FC, ou pela velocidade que esta semente passou no feixe de luz LED, sendo possível

afirmar, portanto, que não houve diferença entre os níveis de FC dos histogramas antes e depois do teste de envelhecimento acelerado.

Os resultados de FC apresentados nos histogramas das cultivares 1, 2 e 3 antes das amostras serem submetidas à condição de alta temperatura e umidade relativa demonstraram que a amostra com 0% de sombreamento concentrou a maioria das sementes em uma faixa de pico Ampere mais baixa que os tratamentos de sombreamento 35%, 50% e 65% (Figuras 14a, 14c, 14e) e mantiveram-se assim após a exposição das amostras ao teste de envelhecimento acelerado (Figuras 14b, 14d, 14f). A semelhança entre os níveis de FC detectados nos histogramas antes e depois do teste de envelhecimento acelerado fornece indícios de que o mecanismo de degradação da clorofila tenha sido afetado pelo sombreamento da planta mãe e as condições de alta umidade e temperatura influenciam o mecanismo de degradação da clorofila. Pressupondo que o teste de envelhecimento acelerado consiga reproduzir os processos de envelhecimento da semente e de degradação da clorofila durante o armazenamento, pode-se inferir que o mecanismo de degradação das sementes foi alterado, pois os níveis de FC permaneceram os mesmos, embora fossem esperados níveis mais baixos. Apesar de as sementes não mostraram diferenciação de cor no tegumento, mostraram diferentes níveis de clorofila e, supondo que ocorresse a feofetinização, processo comum durante o armazenamento de alimentos, as medições de clorofila apresentariam outros níveis após o envelhecimento das amostras, pois durante a feofitinação, o magnésio do centro da molécula de clorofila é substituído por hidrogênio (HEATON e MARANGONI, 1996) e passa a feofitina, deixando de emitir a fluorescência característica da molécula de clorofila. A soja é frequentemente submetida a processos de aquecimento e secagem na pós-colheita, principalmente com aplicação de ar quente e seco ou vapor para reduzir a umidade, sendo que este manejo pode bloquear parcialmente a degradação natural da clorofila (GOMES, 2003). Observando os níveis de clorofila nos histogramas da Figura 14 pode-se deduzir que este bloqueio pode ter ocorrido nas amostras estudadas, pois os níveis de clorofila não se alteraram, embora o normal fosse diminuir durante o armazenamento (WIEBOLD, 2002; MANDARINO, 2005), indicando apenas que o sombreamento alterou o processo de degradação natural da clorofila, não sendo possível observar a diferença

durante a simulação de armazenamento, promovida pelo teste de envelhecimento acelerado. A clorofila também pode ser degradada devido a ação enzimática, tal como as enzimas oxidativas, que podem funcionar em baixa atividade da água (VERTUCCI; LEOPOLD, 1987), exatamente como nas sementes de soja que passam por secagem artificial antes do armazenamento. Na presença de oxigênio, nas sementes armazenadas, o envelhecimento é frequentemente associado à peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (HARRINGTON, 1973; STEWART; BEWLEY, 1980; WILSON; MCDONALD, 1986; HENDRY et al., 1992; HENDRY, 1993), a clorofila é então oxidada pela enzima lipoxigenase na presença de ácidos graxos insaturados, considerando a reação primária no processo de envelhecimento, por produzirem radicais livres que atacam posteriormente lipídios, proteínas e ácidos nucléicos numa reação em cadeia (HARRINGTON, 1973; ENDO, 1984; VERTUCCI; LEOPOLD, 1987).

É provável que o estresse sofrido pelas plantas devido ao sombreamento tenha interferido em algum destes processos provocando alterações no metabolismo das sementes que tiveram seu armazenamento simulado pelo teste de envelhecimento acelerado, pois tanto a feofetinizacão quanto à peroxidação degradam a clorofila e conseqüentemente reduzem a fluorescência detectada. A atividade fluorescente detectada no teste da FC e nos níveis apresentados pelas amostras sofre influência das condições de alta umidade e temperatura e não induzem o processo de deterioração com o uso da clorofila como primeiro substrato, conforme descrito por Endo (1984).

4.2.4.3 Fluorescência da clorofila e sua relação com tamanho da semente

A determinação da fluorescência da clorofila, medição não invasiva da clorofila em sementes, monitora o aparato fotossintético e relaciona a fluorescência emitida pela semente e a área responsável pela emissão, estabelecendo uma relação entre a FC e o tamanho da semente. A velocidade de absorção de água pela semente varia com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato semente/água, forças intermoleculares, composição química e condição fisiológica. A Figura 15 mostra que, de modo geral, o aumento do tamanho das sementes, em pixel, seguiu um padrão ao longo do processo de absorção de

água, independentemente da cultivar ou do nível de sombreamento a que tenha sido submetida.

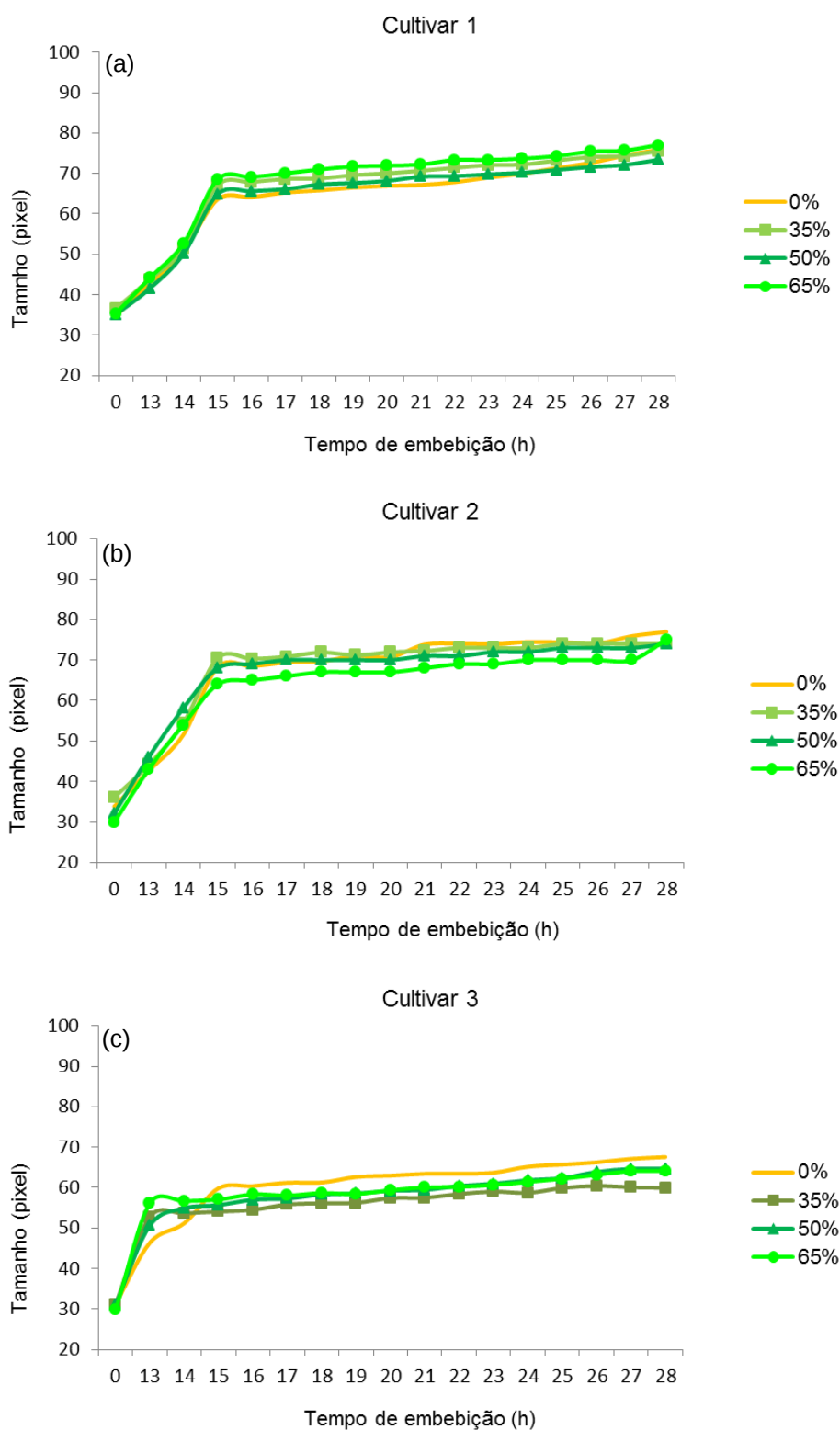


Figura 15 – Evolução do tamanho (em *pixel*) das sementes das cultivares 1 (a), 2 (b), e 3 (c) durante o processo de absorção de água das sementes, quando submetidas aos níveis de sombreamento de 0%, 35%, 50% e 65%.

As amostras de sementes possuíam tamanhos entre 6,0mm e 6,5mm, tornando a observação do aumento de tamanho durante a curva de absorção de água importante para assegurar que mesmo sementes de tamanhos diferentes apresentariam curva de mesmo padrão.

Observando as cultivares 1 e 2 (Figuras 15a e 15b, respectivamente) percebe-se que o tamanho em pixel das amostras aumenta vertiginosamente até 15h de absorção de água, e passa a subir de modo moderado e constante até o final das medições, acompanhando o comportamento da curva da FC (Figura 17a e 17b, respectivamente) durante o processo de absorção de água. Já a curva do tamanho das sementes da cultivar 3 (Figura 15c) apresenta o mesmo comportamento em relação a FC durante o processo de absorção de água, mas seu crescimento vertiginoso cessa um pouco antes que as demais cultivares, com 13h de absorção de água, voltando a crescer às 28h de embebição. A partir destas informações infere-se que a pequena diferença entre os tamanhos das sementes não interferiu na captação da FC das sementes.

4.2.4.4 Fluorescência da clorofila durante absorção de água

A Figura 16 apresenta a diferença visual entre a fluorescência da clorofila de sementes de soja com esverdeamento no tegumento e sementes com coloração característica da espécie. É possível perceber que sementes com grande retenção de clorofila no tegumento emitem fluorescência desde as primeiras horas de absorção de água (2,3h) e em toda a área da semente. Sementes com tegumento de coloração normal só apresentam aumento da FC no eixo embrionário próximo ao momento da protrusão da raiz, demonstrando diferenças no mecanismo fisiológico de sementes esverdeadas e sementes de coloração característica.

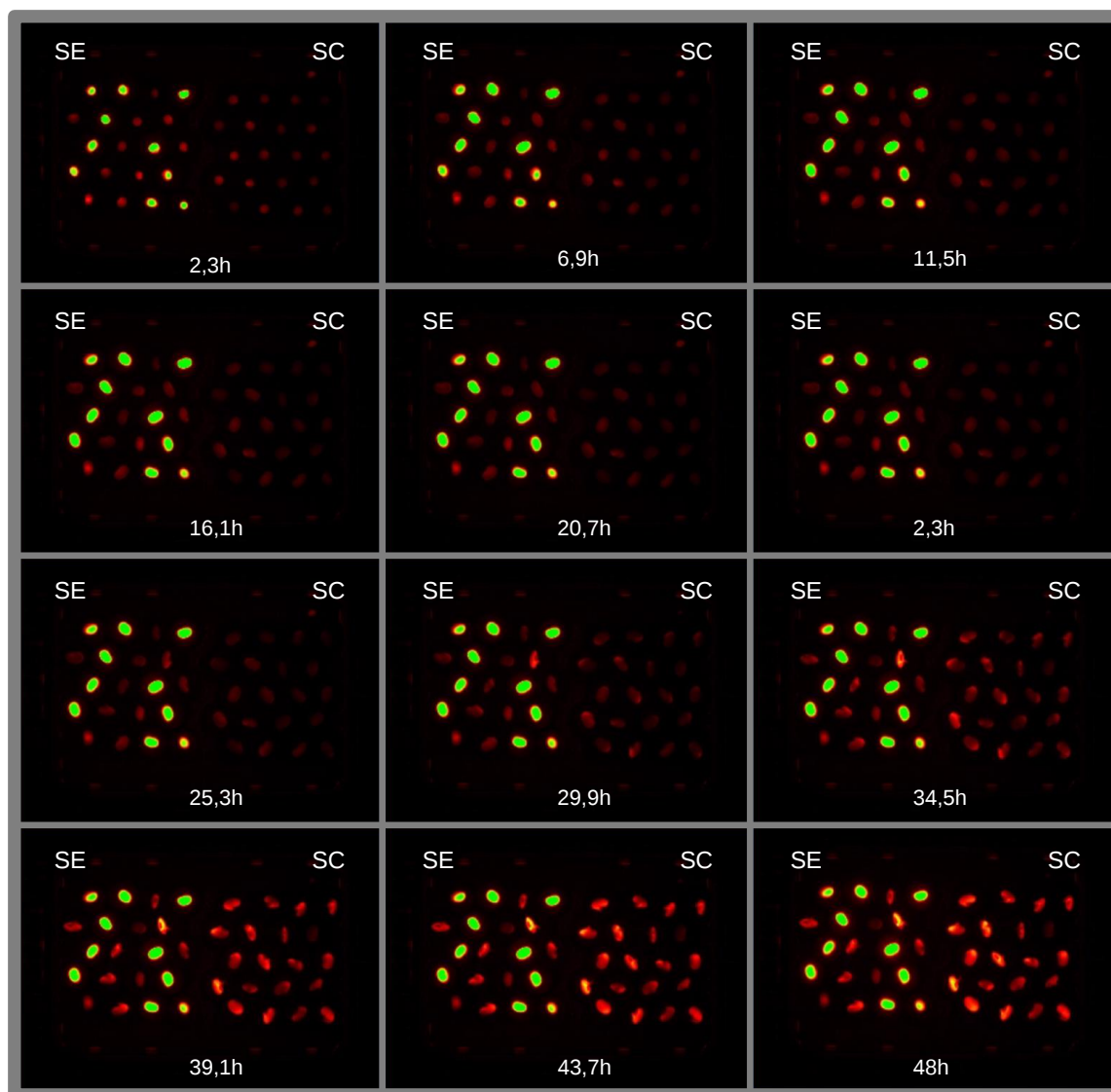


Figura 16 – Fluorescência da clorofila em sementes esverdeadas (SE) e sementes de coloração característica (SC) captadas através do equipamento *CropReport* durante processo de absorção de água no período de 48h.

A diferença de FC durante a absorção de água das sementes das cultivares 1, 2 e 3 (Figura 17) entre o tratamento de 0% de sombreamento e os demais sombreamentos, demonstra que a intensidade da emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila das sementes que tiveram privação da radiação solar é diferente da intensidade emitida pelas moléculas de clorofila de sementes que chegaram à maturação fisiológica a pleno sol (GOMEZ, 2012). Níveis de clorofila presentes nas sementes aparecem na primeira medição, antes do início da absorção de água e são, provavelmente, resquícios da degradação da clorofila pela enzima clorofilase quando as sementes ainda

estavam ligadas fisiologicamente à planta mãe, já que durante o processo de maturação, a clorofila a sofre a ação de várias enzimas até originar catabólitos fluorescentes primários de clorofila, que logo após são modificados e armazenados no vacúolo sob a forma de catabólitos não coloridos de clorofila (BORRMANN et al., 2009).

A FC das três cultivares decresce abruptamente, passa a um declínio sutil até estabilizar e volta a aumentar os níveis de FC com a aproximação do momento da protrusão da raiz (Figura. 17), quando a síntese de clorofila, assim como outros compostos, passa a ser maior devido à necessidade de formar novos tecidos.

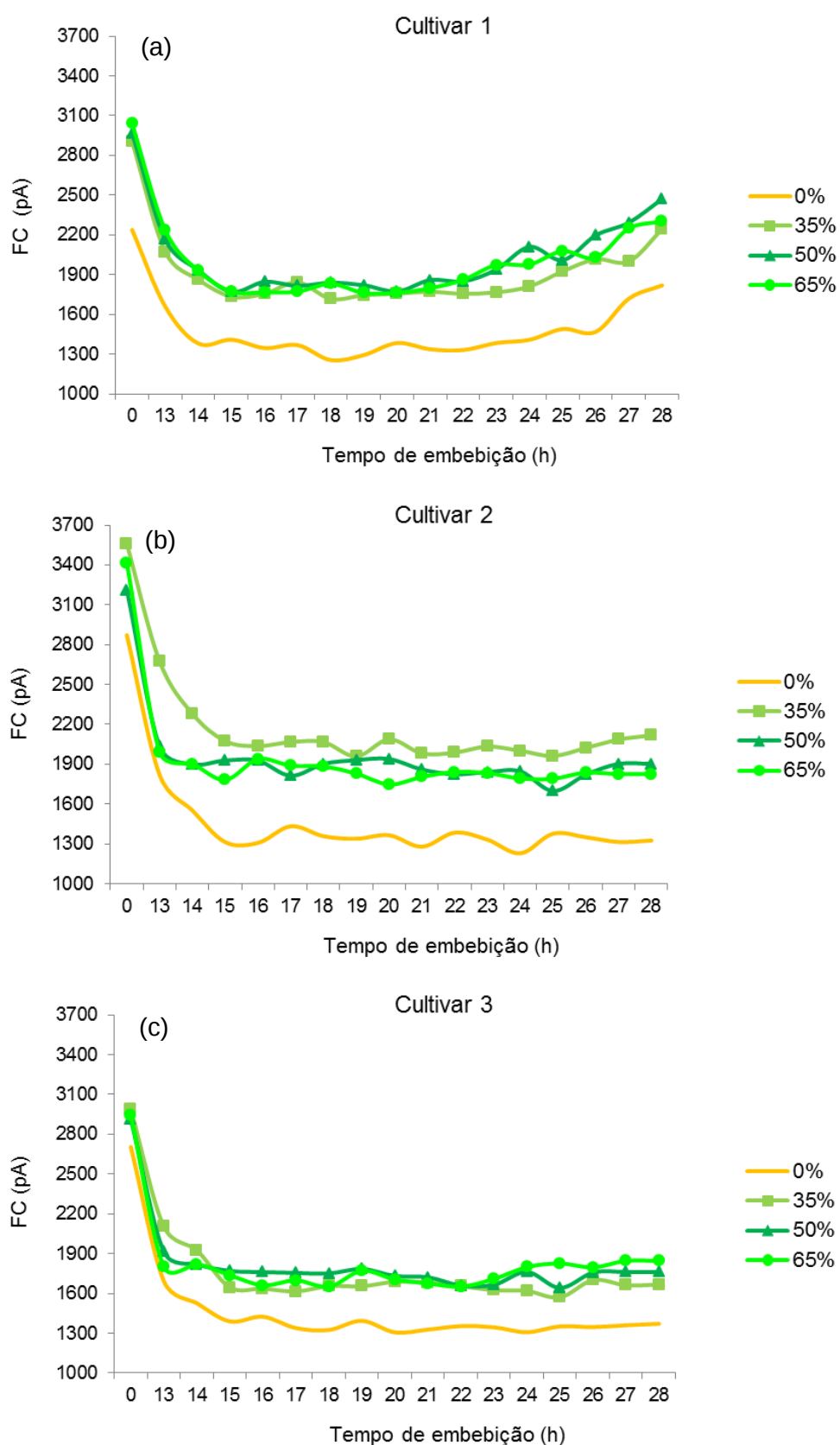


Figura 17 – Fluorescência da clorofila das cultivares 1 (a), 2 (b) e 3 (c), medida durante absorção de água até a emissão da radícula, através do equipamento *Crop Report*, quando submetidas aos níveis de sombreamento 0%, 35%, 50% e 65%.

Durante o processo de absorção de água pelas sementes, sementes de plantas sem sombreamento da cultivar 1, apresentaram níveis de FC menores que sementes de plantas que receberam os tratamentos de sombreamento de 35%, 50% e 65% (Figura 17a). Os níveis de clorofila do sombreamento nulo decresceram entre 0h e 14h de absorção de água e das demais amostras decresceram até 15h, quando provavelmente, começaram a responder à excitação da clorofila causada pelos flashes de luz LED emitidos pelo equipamento *CropReport* a cada medida da FC. No momento que as sementes foram retiradas do ambiente sem luz e passaram a receber luz LED de hora em hora (13h após o início do processo), os protoplastos pararam de se desenvolver no sentido de formar os etioplastos e passaram a desenvolver pigmentação verde, adquirindo então a função de cloroplastos (GOMEZ, 2012), aumentando os níveis de clorofila detectados através de sua fluorescência, fazendo com que os níveis de FC cessassem a redução. Entre 14h e 15h, as curvas continuaram em decréscimo, mas não tão acentuado. Após este período a FC manteve-se em um platô, com oscilações, tendendo ao aumento.

Aproximadamente 24h após o início da absorção de água, o sombreamento zero e de 35% apresentaram aumento no nível de FC e, as amostras de 50% e 65% apresentaram os mesmos aumentos, porém 2 horas antes, aproximadamente 22h após o início da absorção e alcançaram níveis mais altos que o tratamento de 35% e o zero, indicando que novas moléculas de clorofila foram produzidas em maior quantidade nos tratamentos de 50% e 65% (Figura 20a). Durante o processo de absorção de água ocorre a retomada da atividade metabólica para os processos de mobilização e assimilação de reservas (Marcos Filho, 2005) e, apesar de terem iniciado em tempos diferentes, as curvas de todas as amostras da cultivar 1 aumentaram os níveis de FC até o final das medições, indicando que a clorofila fez parte da retomada da atividade metabólica das sementes. O gráfico da cultivar 1 mostra claramente a diferença entre os níveis de clorofila presente nas amostras do sombreamento nulo (0%) e nas amostras de sementes das plantas expostas aos sombreamentos de 35%, 50% e 65%.

Em relação a cultivar 2, os níveis de clorofila do sombreamento nulo ficaram abaixo dos níveis dos tratamentos de sombreamento 35%, 50% e 65% na primeira medição, no estado em que as sementes ainda não haviam

começado o processo de absorção de água. Nas medições subsequentes, a diferença entre os níveis de FC do sombreamento zero e demais tratamentos aumentou expressivamente (Figura 17b). De maneira similar, a cultivar 1, enquanto as sementes da cultivar 2 estavam no escuro, houve somente degradação da clorofila, até que os etioplastos passassem a função de cloroplastos. Os níveis de clorofila dos tratamentos 0% e 35% de sombreamento decresceram até aproximadamente 15h de absorção. A degradação da clorofila dos tratamentos de 50% e 65% foi interrompida no momento que as sementes começaram a receber luz LED, após 13h de absorção. A queda nos níveis de clorofila da curva do sombreamento nulo foi a mais acentuada de todas, e a curva do tratamento de 35% de sombreamento mostrou redução da FC inferior aos tratamentos de 50% e 65%. Entre 15h e 27h de absorção de água, todas as curvas da cultivar 2 mantiveram respostas similares, com oscilações um pouco mais uniformes, sem tendência a declínio ou elevação, e não apresentaram claramente o momento em que a clorofila começa a ser detectada em níveis maiores (Figura 17b). A partir de 27h de absorção de água, percebe-se uma leve propensão de aumento nos níveis de clorofila em todos os tratamentos. As respostas encontradas para a cultivar 2 de FC durante o processo de embebição mostram de maneira indubitável a diferença entre os níveis de clorofila presente em amostras de sementes oriundas de plantas sombreadas e não sombreadas.

Já para a cultivar 3 foi detectado diferença mínima na medição inicial da FC entre a amostra de 0% de sombreamento e as demais amostras (Figura 17c), indicando que o sombreamento em qualquer percentual testado mantém nas sementes a clorofila remanescente da fase que ainda estava ligada a planta mãe. O gráfico apresenta para a amostra de sombreamento nulo, níveis de clorofila menores que os níveis dos tratamentos de 35%, 50% e 65%. Assim como na cultivar 2, os níveis de clorofila da testemunha e do tratamento de sombreamento 35% decresceram até aproximadamente 15h de absorção e dos tratamentos de 50% e 65% decresceram até 13h. Supõe-se que a degradação da clorofila tenha sido interrompida no momento que as sementes começaram a receber luz de LED, após 13h de absorção, mas que a transição no processo degradação e síntese de clorofila tenha sido mais rápida para os tratamentos de sombreamento 50% e 65%.

Os níveis de FC de todos os tratamentos ficaram estáveis, apresentando declínios e ascensões sutis até 28h de absorção de água. Após esse período, todas as curvas ascenderam até a última medição da FC da cultivar 3, feita 48h após o início das medições (quatro horas após a última medição das cultivares 1 e 2). O aumento significativo dos níveis de FC provavelmente ocorreu porque as sementes estavam em estágio de desenvolvimento mais adiantado (já havia ocorrido a protrusão da raiz da maioria das sementes) e por ter tido mais tempo para a síntese de novos tecidos e também de clorofila.

O sombreamento imposto às cultivares analisadas reduziu a quantidade de luz que chegou às plantas e consequentemente a luz fotossinteticamente ativa aos cloroplastos, comprometendo a produção de energia pelos fotossistemas e a conservação desta energia na forma de ATP e coenzimas orgânicas (NADPH). Para que esse sistema não fosse prejudicado as plantas sombreadas adaptaram suas funções fotossintéticas de acordo com a intensidade de luz a qual foram expostas, mantendo uma menor razão clorofila *a*/clorofila *b*, sendo o excesso de clorofila *b*, posteriormente transformado em clorofila *a* no processo de catabolismo da clorofila, com a ajuda da enzima clorofila *b* redutase (BORRMANN, 2009; ROCA et al., 2004) e/ou da enzima *a* oxigenase (XU et al., 2001), potencializando a capacidade fotossintética da planta. A maior proporção relativa de clorofila *b* nas plantas sombreadas possibilitou a captação de energia de outros comprimentos de onda e a transferência para a clorofila *a*, que efetivamente realiza as reações fotoquímicas da fotossíntese (WHATLEY; WHATLEY, 1982). Através dos gráficos apresentados na Figura 17 pode-se dizer que o sombreamento influenciou nas reações que ocorreram nos cloroplastos durante a fotossíntese e que, a reação de degradação enzimática da clorofila através das enzimas clorofilase, Mg-dequelatase e feoforbídeo *a* mono-oxigenase (PAO) (MATILE et al., 1999), pode ser uma dessas reações.

Os níveis de FC decaíram durante o período em que as sementes ficaram no escuro, nas três cultivares (Figura 17) porque em sementes, tecidos meristemáticos e outros tecidos, os proplastídeos são ontogenicamente precursores de todos os outros tipos de plastídeos e, tendo o desenvolvimento dos tecidos meristemáticos ocorrido na escuridão, o desenvolvimento dos proplastídeos resultou na formação de etioplastos, que após a exposição das

sementes aos flashes de luz LED do equipamento *CropReport*, passaram a cloroplastos e se tornaram de cor verde (HOOBER, 2006). De modo geral, a partir do momento em que as sementes foram expostas a luz e os etioplastos se tornaram cloroplastos, os níveis de FC mantiveram-se estáveis, conforme pode ser visto entre o período 14h e 28h de absorção de água nas três cultivares.

Independentemente da cultivar e dos níveis de sombreamento a que as plantas matriz foram submetidas, pode-se observar o decréscimo da fluorescência da clorofila (Figura 17) durante sua degradação em derivados incolores (Hörtensteiner et al., 2000) e menos fluorescentes. A diferença entre os níveis de clorofila iniciais do sombreamento zero e dos outros tratamentos não foi o mesmo nas três cultivares, mas analisando o comportamento das curvas, é possível dizer que independentemente do nível inicial de clorofila, sementes de plantas não sombreadas tiveram maior capacidade de degradar a clorofila remanescente do que as sementes geradas por plantas que passaram por estresse de baixa luminosidade. Nessa etapa do teste, em que as sementes estavam em ambiente escuro, acredita-se que estivesse ocorrendo o processo de degradação inicial da clorofila em catabólitos castanho-verde (de propriedades fotodinâmicas devido à presença de um macrociclo de tetrapirrol intacto), e que as principais alterações ocorridas correspondem à liberação de Mg^{+2} pelo deslocamento de dois H^{+} sob condições ácidas e/ou pela ação da Mg-dequelatase e a clivagem da cadeia fitol pela enzima clorofilase, que produz intermediários esverdeados, tal como feofitinas, clorofilados e feoforbídeos (HEATON; MARANGONI, 1996; MANGOS; BERGER, 1997; KRÄUTLER e MATILE, 1999).

Acredita-se que posteriormente outras reações responsáveis pelo “desverdecimento” ocorreram, as quais ainda são pouco compreendidas mas envolvem processos bioquímicos de transformação de catabólitos esverdeados em incolores, já que as sementes testadas não apresentaram coloração verde. A seguir supõe-se que ocorra uma rápida formação de derivados incolores e polares, devido à abertura do anel tetrapirrólico pela ação da enzima PAO, que aparentemente possui especificidade sobre um feoforbídeo (MÜHLECKER ET AL., 1997; RODONI ET AL., 1997; OBERHUBER; KRÜTLER, 2002). Os produtos primários da ação dessa enzima são compostos incolores, fluorescentes e rapidamente transformados em catabólitos não fluorescentes de

estruturas químicas ainda pouco elucidadas (OBERHUBER et al., 2001; OBERHUBER; KRÄUTLER, 2002; TAKAMIYA et al., 2000; WÜTHRICH et al., 2000) e sem a participação de nenhuma enzima conhecida (KRÄUTLER, 2002), mas que se supõe diferirem umas das outras na polaridade e na localização das ligações duplas do anel tetrapirrólico (KRÄUTLER E MATILE, 1999).

Além da feoforbídeo a mono-oxigenase (PAO), outras enzimas oxidativas, como a peroxidase e a lipoxigenase, também podem ter contribuído para a degradação da clorofila (JOHNSON-FLANAGAN; SPENCER, 1996; MARTÍNEZ et al., 2001) e consequentemente para a redução nos níveis de FC das cultivares estudadas. Acredita-se que estas reações tenham acontecido aproximadamente entre os períodos 14h e 28h, quando a degradação e a síntese de clorofila estavam aparentemente em equilíbrio (Figura 17). O catabolismo da clorofila pode ser entendido como um processo de detoxificação para a planta por causa da perda das propriedades fotodinâmicas e pró-oxidantes das clorofilas (PRUZINSKÁ et al., 2003; HÖRTENSTEINER, 2004), pois apesar de ser fundamental para o desenvolvimento das plantas, a clorofila poderia provocar a redução do oxigênio, processo que normalmente envolve a formação de oxigênio *singlete* através da redução de um metal de transição como manganês, ferro ou cobre que sendo reduzido, poderia transferir um elétron para oxigênio molecular ou peróxido, trazendo toxicidade às plantas (BARJA, 2000).

Durante o período inicial de absorção de água e medição da FC as sementes estavam no escuro, sabendo que a germinação epígea, natural das sementes de soja, ocorre sem contato direto com a luz solar, pode-se considerar que as respostas das amostras analisadas são similares ao que acontece na natureza e dizer que a degradação da clorofila presente na semente pode originar catabólitos precursores de substâncias importantes para o processo germinativo (KRÄUTLER, 2003; BORRMANN et al., 2009), pois o tratamento zero e os tratamentos de 35%, 50% e 65% das três cultivares aumentaram os níveis de clorofila próximo a protrusão da raiz, ou seja, em torno de 28h após o início do teste.

Associando níveis de fluorescência da clorofila das cultivares de soja 1, 2 e 3 mensurados durante o processo de absorção de água até a protrusão radicular e a diferença no acúmulo de matéria seca das sementes, é possível

dizer que o sombreamento de 35%, 50% e 65% afeta a eficiência de utilização de energia pelo processo fotossintético e a translocação de fotoassimilados para sementes de plantas submetidas a estes níveis de sombreamento.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um campo de produção de sementes pode ser alvo de insetos, fungos ou nematóides e adotar o manejo adequado significa recorrer à aplicação de produtos específicos para controlar pragas e doenças. Entretanto, a aplicação de produtos químicos pode interferir no metabolismo normal do vegetal, neste sentido tentou-se isolar estes fatores a fim de verificar a sua interferência na formação de sementes esverdeadas, já que por ser uma resposta do mecanismo fisiológico das plantas, o esverdeamento de sementes de soja é de difícil resolução. Inúmeros fatores bióticos e abióticos podem estar relacionados a este fenômeno, e isolar estes fatores em pesquisas que apontem uma alternativa é o caminho atualmente percorrido por empresas e instituições de pesquisa.

O sombreamento é um fator abiótico que influencia a dinâmica do metabolismo vegetal, por isso estudos mais detalhados a respeito de como o sombreamento influencia o mecanismo fisiológico das plantas durante a maturação das sementes são necessários. A imposição do estresse sombreamento em estágio fenológico anterior ao utilizado neste estudo e, a escolha de variedades de soja de ciclo mais longo, poderiam dar respostas mais precisas sobre a atuação do sombreamento no metabolismo das plantas de soja. Assim como a escolha de variedades com diferentes tipos de arquitetura foliar, poderiam indicar a melhor relação entre a capacidade de interceptar a energia fotossinteticamente ativa, quando as plantas estão sob sombreamento, e a propensão destas plantas em produzir sementes esverdeadas, mesmo quando colhidas na maturação.

Autores ainda divergem sobre o tema e inferem a respeito, já que ainda não houve comprovação de nenhuma teoria que elucidasse os fatores que afetam a síntese e degradação da clorofila em sementes esverdeadas de soja, entretanto, pesquisadores da *Wageningen University*, na Holanda, há anos dedicam-se a pesquisar sobre a fluorescência da clorofila e disponibilizam seus equipamentos a pesquisadores de outras instituições, de maneira que também

possam contribuir para elucidar o mecanismo da fluorescência da clorofila em plantas e sementes. Assim, a fluorescência da clorofila, ferramenta eficiente para a diferenciação de amostras quanto ao teor de clorofila, disponível através da parceria entre instituições brasileiras e a universidade holandesa, pode ser aproveitada em novas pesquisas sobre o efeito da clorofila na qualidade das sementes a partir de amostras com diferentes níveis de esverdeamento. Tendo em vista que a especificidade do equipamento utilizado para mensurar a fluorescência da clorofila permite que novos estudos façam a relação entre níveis de clorofila e a atividade de enzimas como clorofilase, Mg-dequetalase e feoforbídeo a mono-oxigenase, concomitantemente com a qualidade fisiológica.

Neste estudo não houve comprovação de que plantas sombreadas produzam sementes esverdeadas, porém ficou evidente que houve diferenciação nos níveis de clorofila produzidos. Existem comprovações de que fatores ambientais como temperatura e déficit hídrico provocam tanto o esverdeamento das sementes quanto a redução de sua qualidade, porém a rota bioquímica alterada neste processo ainda não foi demonstrada. Desta forma, a aplicação de marcadores moleculares e a identificação do gene que participa deste processo poderia elucidar o que realmente acontece durante a maturação das sementes quando elas são submetidas a algum estresse, usando a biotecnologia para elucidar e tentar prevenir a formação de sementes esverdeadas, de baixa qualidade ao invés de utilizar recursos para separá-las eficazmente das sementes de coloração normal e de boa qualidade.

6. CONCLUSÃO

O sombreamento em plantas de soja age no mecanismo fotossintético, fazendo com que a degradação da clorofila não ocorra normalmente, acarretando aumento da presença de moléculas fluorescentes independentemente do nível de sombreamento aos quais as plantas foram submetidas. Plantas de soja sombreadas durante a fase de enchimento de grão produzem sementes com teor de clorofila aumentado, predispondo a produção de sementes com maior emissão de fluorescência da clorofila, mesmo sem apresentar coloração verde em seu tegumento. Sementes com grande retenção de clorofila no tegumento emitem fluorescência desde as primeiras horas de absorção de água e em toda a área da semente. Sementes com tegumento de coloração característica só apresentam aumento da fluorescência da clorofila no eixo embrionário próximo ao momento da protrusão da raiz, demonstrando diferenças no mecanismo fisiológico de sementes esverdeadas e sementes com coloração característica da espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, V., De MAN, J.D., Hydrogenation of canola oil as affected by chlorophyll. *JAOCS* v. 63, p. 1185–1188, 1986.
- ADAMS, D.B.; ADAMS, W.W.N. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.599-626, 1992.
- ALMEIDA, S. M. Z.; SOARES, A. M.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; GAJEGO, E. B. Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 62-68, 2005.
- ALVES, F.V.; SÁ JUNIOR, A. De.; SANTANA, D.G.; SANTOS, C.M. Composição química e qualidade fisiológica de sementes de girassol de plantas submetidas à competição intraespecífica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3 p. 457-465, 2012.
- AMO, S. R. del. Alguns aspectos de la influencia de la luz sobre el crecimiento de estados juveniles de especies primarias. In: GOMES-POMPA, A.; AMO R., S. del (Ed.). **Investigaciones sobre la regeneracion de selvas altas en Veracruz, Mexico**. Mexico. Alhambra Mexicana, 1985. p. 79-92.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigor testing handbook**. East Lasing. AOSA, 1983. 88p. (Handbook on seed testing. Contribution, 32)
- ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forticata* LINK submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 853-862, 2001.
- BARJA, P. R. **Produção e difusão de oxigênio : processos biofísicos da fotossíntese investigados com a técnica fotoacústica**. Campinas, SP : [s. n.], 2000.

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

BLAKENSHIP, R.E.; PRINCE, R.C. 1985. Excited state redox potential and the Z scheme of photosynthesis. **Trends Biochem. Sci.** 10. 382-383.

BOARDMAN, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 28 p. 355-377, 1977.

BOBBIO, P.A., BOBBIO, F.O. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo : Varela, 222p., 1995.

BORRMANN, D.; ANDRADE, J.C.; MARQUEZ, U.M.L. Chlorophyll Degradation and Formation of Colorless Chlorophyll Derivatives during Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Seed Maturation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 2030–2034, 2009.

BORRMANN, D. **Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila com ênfase na formação de metabolitos incolores clorofila**. Disponível em:
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-25092009-150741/pt-br.php>

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia da produção II**. Câmara, G. M. S. (editor). Piracicaba: G.M.S. Câmara, 2000. 450p.

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

COIMBRA, R. A. Teste de germinação com acondicionamento dos rolos de papel em sacos plásticos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p. 92-97, 2007.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261p. (Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.15)

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Estação climatológica Pelotas (Capão do Leão). Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/agromet/estacao/boletim.html>>. Acessada em: 28 jul. 2011.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. The photooxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.4, p.985-989, 1984.

ENGEL, V. L. **Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de essências nativas, concentração de clorofila nas folhas e aspectos de anatomia**. 1989. 202 f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FANTI, S. C.; PEREZ, S. C. J. G. A. Influência do sombreamento artificial e da adubação química na produção de mudas de *Adenantha pavonina* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 49-56, 2003.

FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. **Seca - soja em carência de água**. 2009. <<http://bioinfo.cnpso.embrapa.br/seca/index.php/ecofisiolo>> Acesso em: 21 dez. 2011.

FEHR, W.R. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v.11, n.6, p.929-931, 1971.

FELICIANO, F. F.; SOUZA, I. L. de.; LETA, F.R. Visão computacional aplicada à metrologia dimensional automatizada: considerações sobre sua exatidão. **Engevista**, v. 7, n. 2, p. 38-50, 2005.

FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Tecnologia de produção de sementes. In: CDROM, Embrapa Soja. **A cultura de soja no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2000.

FRANÇA-NETO, J.B.; PÁDUA, G.P.; CARVALHO, M.L.M.; COSTA, O.; BRUMATTI, P.S.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. da; HENNING, A.A.; SANCHES, D.P. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 4p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 38).

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

FREITAS, M.C.M.; ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.12, 2011.

GIVNISH, T.J.; Adpatation to sun and shade: a wholeplant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.63-92, 1988.

GOMEZ, F. M. **Regulación de los pasos iniciales de la degradación de clorofila durante la senescencia foliar**. 2012. 336f. Tese (Doctorado em Ciencias Biologicas) - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.

GOMES, M.S., SINNECKER, P., TANAKA, R.T., LANFER-MARQUEZ, U.M., **Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean** (Glycine max L. Merr). J. Agric. Food Chem. v.51, p.1634–1639, 2003.

GOLBITZ, P. **Soyfoods: State of the industry and market**. In: SOYFOODS 2000. Orlando, Florida: p.16-18, 2000.

GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO, M. E.; Hidratação de sementes. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. Chapadinha, v.2, n.1, p.31, 2008.

HARRINGTON, J. F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 453-461, 1973.

HEATON, J.W., MARANGONI, A.G., Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends Food Sci. Technol.** v.7, p.8–15, 1996.

HENDRY, G. A. F. et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, Lancaster, v. 122, p. 273-279, 1992.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, New York, v. 3, p. 141-153, 1993.

HOOBER, J.K. **Chloroplast Development: Whence and Whither**. In **The Structure and Function of Plastids** (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 27-51, 2006.

HÖRTENSTEINER, S., RODONI, S., SCHELLENBERG, M., VICENTINI, F., NANDI, O.I., QUI, Y.L., MATILE, P. Evolution of chlorophyll degradation the significance of RCC reductase. **Plant Biol.** v.2, p.63–67, 2000.

HÖRTENSTEINER, S. The loss of green color during chlorophyll degradation: A prerequisite to prevent cell death. **Planta** v.219, p.191–194, 2004.

HÖRTENSTEINER, S., WÜTHRICH, K.L., MATILE, P., ONGANIA, K.H., KRÄUTLER, B., The key step in chlorophyll breakdown in higher plants: cleavage of pheophorbide-a macrocycle by a monooxygenase. **J. Biol. Chem.** 273, 15335–15339. 1998.

HEREDIA, P., DE LAS RIVAS, J. J. **PLANT PHYSIOL.** 160, 1499-1506.

JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R. LED Induced Chlorophyll Fluorescence Transient Imager for Measurements of Health and Stress Status of Whole Plants. Proc. IS on High Technology for Greenhouse Systems – GreenSys 2009 Ed.: M. Dorais. Acta Horticulturae. 893, **International Society for Horticultural Science ISHS**, 2011.

JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; FRANDAS, A.; VAN DER PIJLEN, J.G. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and performance. **Seed Science Research**, v.8, p.437-443, 1998a.

JALINK, H.; FRANDAS, A.; VAN DER SCHOOR, R.; BINO, J.B.; **Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality**. Sci. Agric., Piracicaba, 55 (número especial), p.88-93, 1998b.

JIANG, A.C.D.; GAO, H.Y.; ZOU, Q.; JIANG, G.M.; LI, L. H. Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. **Environmental and Experimental Botany**, v.55, p.87-96, 2006.

JOHNSON-FLANAGAN, A.M., THIAGARAJAH, M.R., Degreening in canola (*Brassica napus*, c.v. Westar) embryos under optimum conditions. **J. Plant Physiol.** 136, 180–186. 1990.

KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites. In *The Porphyrin Handbook*: Kadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, R., Eds.; Elsevier Science Publishing: New York, v.13, p.183-209, 2003.

KRÄUTLER, B.; MATILE, P. Solving the riddle of chlorophyll breakdown. **Accounts of Chemical Research**. v.32, p.35–43. 1999.

KRÄUTLER, B. Unravelling chlorophyll catabolism in higher plants. **Biochem. Soc. Trans.** v.30, p.625–630. 2002.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

LEI, T.T.; LECHOWICZ, M.J. 1998. Diverse responses of maple saplings to forest light regimes. **Annals of Botany** 82: 9-19.

LIMA, M. C.; SERPA, R.; GALHO, V. M.; MORAES, P. O.; CORRÊA, M. F.; DURIGON, M.; CARVALHO, D.; SCHNEIDER, L.; MARIOT, M. P.; AMARANTE, L. Efeitos de níveis de sombreamento e concentrações de Nitrogênio sobre o teor de clorofila em *Achillea millefolium* L. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XVII. 2008. Pelotas. Disponível em <<http://www.ufpel.edu.br/cic/2011/>> Acessado em: 02 mar 2012.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-77, 1962.

MANDARINO, J.M.G. **Coloração esverdeada nos grãos de soja e seus derivados**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 4p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico 77).

MANGOS, T. J.; BERGER, R. G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Zitschrift fur Lebensmittel – Untersuchung und-Forschung**, New York, v. 204, n. 5, p. 345-350, 1997.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas, SP. Fundação CARGILL. 86 p. 1986.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p. v.12.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa-MG, Editora UFV. 451 p. 2005. Sas. Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Care, North Carolina: SAS Institute Inc. 2002.

MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.L.; AÑON, M.C. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.58, p.379-387, 2001.

MATILE, P.; HORTENSTEINER, S. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 50, p.67-95. 1999.

MATILE, P.; HÖRTENSTEINER, S.; THOMAS, H. Chlorophyll degradation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.50, p.67–95. 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO Assessoria de gestão estratégica Brasil - **Projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022** Brasília, abril de 2012.

MELIS, A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. **Biochim Biophys Acta** v.1058, p.87–106, 1991.

MELIS, A Excitation energy transfer: functional and dynamic aspects of Lhc (cab) proteins. In DR Ort, CF Yocum, eds, Advance in Photosynthesis, Vol 4. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**, The Netherlands, p 523–538, 1996.

MELGES, E.; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A. Crescimento e conversão da energia solar em soja cultivada sob quatro níveis de radiação solar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.9, p.1065-1072, 1989.

MONTEITH, J.L. Climate and the efficiency of crop production in Britain. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.281, p.227-294, 1977.

MÜHLECKER, W., ONGANIA, K.H., KRÄUTLER, B., MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S., Tracking down chlorophyll breakdown in plants: elucidation of the constitution of a fluorescent chlorophyll catabolite. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v.36, p.401–404, 1997.

OBERHUBER, M.; BERGHOLD, J.; MÜLLER, W.; HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown: on a nonfluorescent chlorophyll catabolite from spinach. **Helv. Chim. Acta**, Weinheim, v.84, p.2615-2627, 2001.

OBERHUBER, M.; KRÄUTLER, B. Breakdown of chlorophyll, electrochemical bilin reduction provides synthetic access to fluorescent chlorophyll catabolites. **ChemBioChem**, Weinheim, v.3, n.1, p.104-107, 2002.

OMETTO, J.C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1981. 425p.

ONYILAGHA, J.C.; ELLIOTT, R.H.; BUCKNER, E.; OKIROR, S.O.; RANEY, J.P. Seed chlorophyll influences vigor in oilseed rape (*Brassica napus* L. var AC Excel). **Journal of Agricultural Science**. v 3, n. 2, p. 73-79. 2011.

PAIVA, C. L.; GUIMARÃES, R. J.; SOUZA, C. A. S. Influência de diferentes níveis de sombreamento sobre o crescimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 134-140, 2003.

PALMER, R.G.; KILEN, T.C. **Qualitative genetics and cytogenetics**. In: WILCOX, J.R. (Ed.) Soybeans: improvement, production, and uses. Madison: American Society of Agronomy, 1987. p.135-209.

PENGELLY, B.C.; BLAMEY, F.P.C.; MUCHOW, R.C. Radiation interception and the accumulation of biomass and nitrogen by soybean and three tropical annual forage legumes. **Field Crops Research**, v.63, p.99-112, 1999.

PEREIRA, C.R. **Análise do crescimento e desenvolvimento da cultura de soja sob diferentes condições ambientais**. Tese 282f. (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2002.

POORTER, L. Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. **Functional Ecology**. v.13, p.396-410, 1999.

POPIGINIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília. M. A. AGIPLAN. 289p, 1985.

ROCA, M.; JAMES, C.; PRUZINSKÁ, A.; HÖRTENSTEINER, S.; THOMAS, H.; OUGHAM, H. Analysis of the chlorophyll catabolism pathway in leaves of an introgression senescence mutant of *Lolium temulentum*. **Phytochemistry**. 65, 1231–1238, 2004.

PORRAS, C.A; CAYÓN, D.G.; DELGADO, O.A. Comportamiento fisiológico de genótipos de soja en diferentes arreglos de siembra. **Acta Agronomica**, v.47, n.1, p.9-15, 1997.

PRUZINSKÁ, A.; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death1* gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2003, 100, 15259–15264.

PURCELL, L.C.; BALL, R.A.; REAPER, J.D.; VORIES, E.D. Radiation use efficiency and biomass production in soybean at different plant population densities. **Crop Science**, v.42, p.172-177, 2002.

RANGEL, M.A.S.; MINUZZI, A.; PIEREZAN, L.; TEODÓSIO, T.K.C.; ONO, F.B.; CARDOSO, P.C. Presença e qualidade de sementes esverdeadas de soja na região sul do estado do Mato Grosso do Sul. **Acta Scientiarum – Agronomy**, Maringá, v.33, n.1, p.127-132, 2011.

REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do jequitibá-rosa. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Embrapa Florestas, v.53, p.179-194, 2006.

ROCHA, V.S.; SEDIYAMA, T.; DA SILVA, R.F.; SEDIYAMA, C.S.; THIEBAUT, J.T.L. Embebição de água e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.6, p.51-66, 1984.

RODONI, S., MÜHLECKER, W., ANDERL, M., KRÄUTLER, B., MOSER, D., THOMAS, H., MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown in senescent chloroplasts. **Plant Physiol.** v.115, p.669–676, 1997.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; SCALON FILHO, R. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 753-758, 2003.

SCHREIBER, U.; KRIEGER, A. Two fundamentally diferente types of variable chlorophyll fluorescence in vivo. **FEBS Lett.** 397: 131-135. 1996.

SCHÖFFEL, E.R.; VOLPE, C.A. Eficiência de conversão da radiação fotossinteticamente ativa interceptada pela soja para produção de fitomassa. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, n.2, v.9, p.241-249, 2001.

SHUSTER I. O DNA da semente, 2003. Disponível na Internet: <<http://www.coodetec.com.br/artigos>> Acessado em: 19 fev 2012.

SHIBLES, R.M.; WEBER, C.R. Interception of solar radiation and dry matter production by various soybean planting patterns. **Crop Science**, v.6, p.55-59, 1966.

SILVA, K.R. da.; VILLELA, F.A. Pré-hidratação e avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 2 p. 331-345, 2011.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de semente de soja**. São Paulo: USP. 2002. 103f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.

STEWART, R.C., BEWLEY, J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiol.** 65: pp. 245-248, 1980.

STREIT, N.M. As clorofilas: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3º ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAKAMIYA, K.-i., TSUCHIYA, T.; OHTA, H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? **Trends Plant Sci.**, v.5, p.426-431, 2000.

TANAKA, R. **Chlorophyll metabolism**. Curr Opin Plant Biol. [PubMed - indexed for MEDLINE]. v.9, n.3, p.248-55, 2006.

THOMAS, J.F. Ontogenetic and morphological plasticity in crop plants. In: BOOTE, K.J. et al. Physiology and Determinations of Crop Yield. Madison: **ASA/CSSA/SSSA**, Cap.7B, p.181-185, 1994.

USUKI, R., SUZUKI, T., ENDO, Y., KANEDA, T.K., Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.** n.61, p.785–788, 1984.

VILLELA, F. A. Water relations in seed biology. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.55, n.2, p.98-101, 1998.

VERTUCCI, C.W.; LEOPOLD, A.C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, Michigan, v.84, n.4, p.1038-1043, 1987.

TSUCHIYA, T.; OHTA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; SHIMABA, H.; MASUDA, T.; TAKAMIYA KI. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. **Proc Natl Acad Sci. USA** v. 96 p. 15362–15367. 1999.

YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1996. 75p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 14).

WATANABE, K.; OHTA, H.; TSUCHIYA, T.; MIKAMI, B.; MASUDA, T.; SHIOI, Y. TAKAMIYA, K. Purification and Some Properties of Pheophorbide in *Chenopodium album*. **Plant Cell Physiol.** v.40, p.104-108, 1999.

WHATLEY, J.M.; WHATLEY, F.R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo, EPU-EDUSP, 1982. 101p. (temas de biologia, 30).

WARD, K.; SCARTH, R. DAUN, J.; McVETTY, P.B.E. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.72, n.3, p.643-649, 1992.

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

WELLS, R. Soybean growth response to plant density: relationships among canopy photosynthesis, leaf area, and light interception. **Crop Science**, v.31, p.755-761, 1991.

WIEBOLD, B. Soybean plants killed before maturity possess grain that remains green. 2002. Disponível em: <<http://www.psu.missouri.edu/soyx/green.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2012

WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. **Principles of Biochemistry**. New York: Academic Press, 1968.

WILSON, D. O.; McDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, p. 296- 300, 1986.

WÜTHRICH, K.L.; BOVET, L.; HUNZIKER, P.E.; DONNISON, I.S.; HÖRTENSTEINER, S. Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. **Plant J.** v.21, p.189–198, 2000.

ZORATO, M. de F.; **O reflexo da presença de sementes esverdeadas na qualidade fisiológica em soja**. 2003. 84f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2003.

ZANELLA, F.; SONCELA, R.; LIMA, A.L.S.; Formação de mudas de maracujazeiro “amarelo” sob níveis de sombreamento em Ji-Paraná/RO. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 880-884. 2006.

XU, H. et al. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.24. 2001.