

PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE DE SOJA E SUA QUALIDADE FISIOLÓGICA¹

Roberto Kazuhiko Zito²
Carlos Sigueyuki Sedyama²
Valterley Soares Rocha²
Everaldo Gonçalves de Barros³
Maurílio Alves Moreira⁴
Múcio Silva Reis²

1. INTRODUÇÃO

Estudos feitos por SILVA CASTRO (14) revelaram que, no estádio R8, as sementes da variedade de soja 'Savana' apresentam qualidade fisiológica inferior às da 'Doko'. Ainda segundo esse autor, as sementes da 'Savana' tiveram queda mais acentuada na sua qualidade, quando submetidas ao retardamento da colheita.

Sabe-se que há acentuada perda da qualidade fisiológica em consequência do retardamento de colheita (1,13,14), no entanto, os eventos que antecedem a maturidade fisiológica (R7) ou a de colheita (R8) não são conhecidos, havendo, portanto, interesse de se estudar os processos fisiológicos, durante o desenvolvimento da semente.

Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade fisiológica das sementes de soja das variedades 'Doko' e 'Savana', nas

¹ Trabalho realizado com o apoio do CNPq, da FAPEMIG e do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico/FINEP.

Aceito para publicação em 20.07.1994.

² Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa.

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa.

épocas R5,5; R6; R7; R8; R8 + 15 dias; e R8 + 30 dias, e verificar suas possíveis correlações com o padrão de acúmulo de proteínas de reserva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados climatológicos do ano agrícola 1991/92, período em que foram realizadas as colheitas, foram fornecidos pela Estação Meteorológica da Universidade Federal de Viçosa e se encontram na Figura 1.

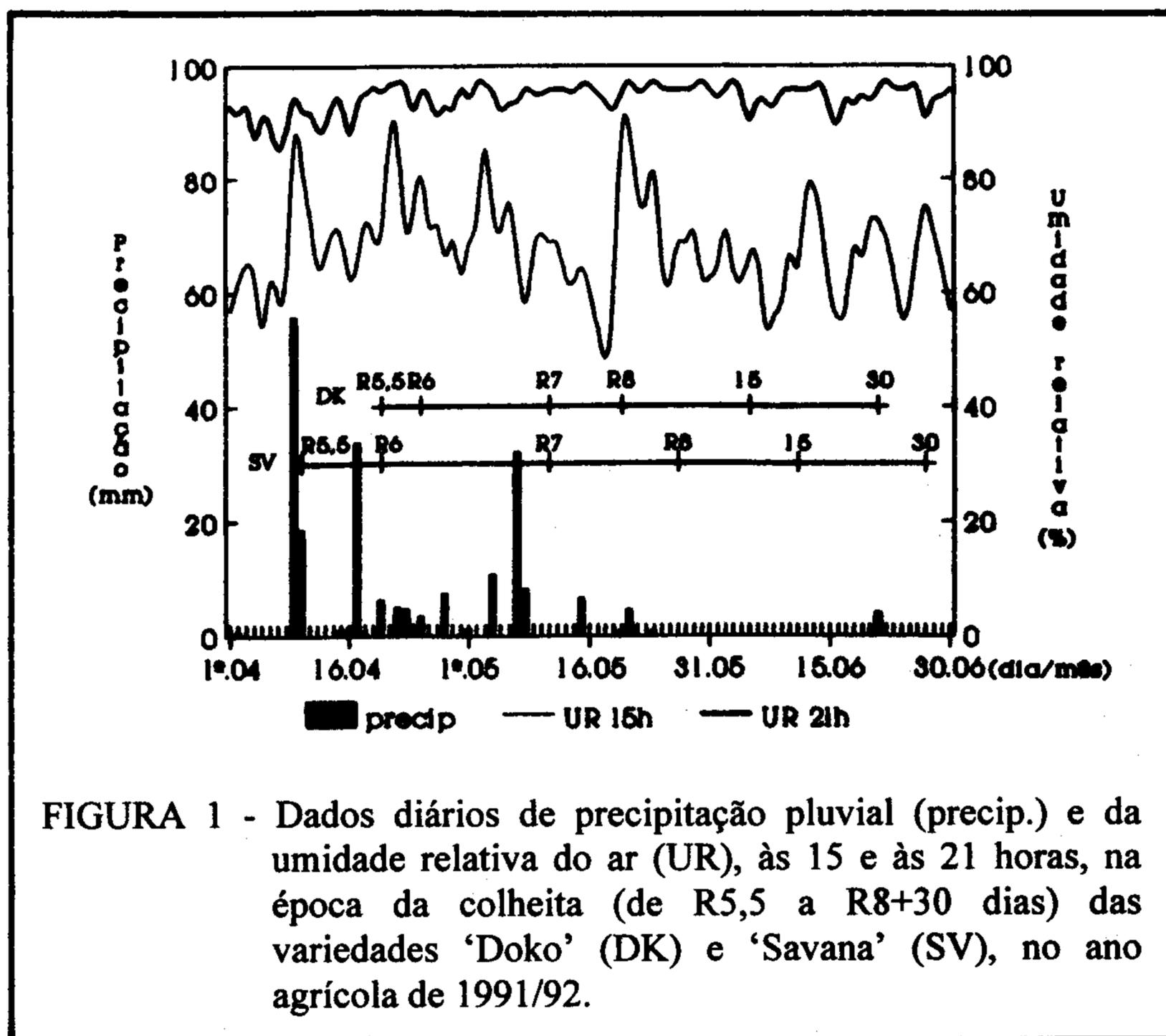


FIGURA 1 - Dados diários de precipitação pluvial (precip.) e da umidade relativa do ar (UR), às 15 e às 21 horas, na época da colheita (de R5,5 a R8+30 dias) das variedades 'Doko' (DK) e 'Savana' (SV), no ano agrícola de 1991/92.

O experimento, conduzido em área experimental da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, foi disposto em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, com tratamentos em esquema fatorial 6x2, usando seis épocas de colheita (R5,5; R6; R7; R8; R8 + 15 dias; e R8 + 30 dias) e duas variedades ('Doko' e 'Savana').

Cada parcela foi constituída de uma linha de 1,5 m, sendo o espaçamento entre elas de 0,80 m. As sementes foram colhidas retirando-se as vagens, nos estádios predeterminados, de diferentes plantas e diferentes pontos da parcela.

As sementes colhidas foram divididas em duas partes: uma destinada à análise bioquímica e outra a testes de qualidade fisiológica. Para os testes de qualidade fisiológica, as vagens foram debulhadas manualmente e as sementes foram deixadas à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram acondicionadas em saquinhos de papel e colocadas à temperatura de $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 60%, até a instalação dos ensaios de avaliação da qualidade fisiológica. Para a análise bioquímica, as vagens intactas foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas a -80°C até o início dos trabalhos de análise eletroforética, debulhando-as imediatamente após a sua retirada do congelador.

A qualidade fisiológica foi avaliada conforme se segue:

Germinação em rolo de papel: conduzida com amostras de 50 sementes, de cada parcela de campo, em germinador à temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Utilizaram-se rolo de papel como substrato e volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato. As avaliações foram efetuadas aos cinco e oito dias, seguindo-se os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (2).

Percentagem de rachadura do tegumento: obtida pela avaliação visual da percentagem de sementes com rachaduras, em amostras de 50 sementes de cada parcela de campo. Como a colheita, a debulha e o manuseio das sementes foram manuais, todas as rachaduras foram consideradas fisiológicas. Entende-se por rachadura fisiológica qualquer interrupção na continuidade do tegumento, independente da forma ou do tamanho.

Peso de 100 sementes: obtido por meio de pesagem, em balança com precisão de centigramas, de 50 sementes tomadas ao acaso, de cada parcela de campo, com teor de umidade de aproximadamente 12%.

Potencial de germinação e vigor pelo teste de tetrazólio: foram utilizadas duas repetições de 50 sementes, tomadas ao acaso, para cada tratamento, reunindo-se as sementes de dois blocos para formar uma repetição, em razão da escassez de sementes. As sementes foram pré-condicionadas em papel-toalha convenientemente umedecido, em germinador, a 30°C , durante 16 horas. Decorrido esse período, as sementes foram imersas em solução 0,075% de cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio, com pH 7, contendo sistema-tampão de pH composto pelos sais KH_2P_0_4 e $\text{Na}_2\text{HP}_0_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, durante quatro horas, a 40°C . Em seguida, as sementes foram lavadas e avaliadas, individualmente, computando-se o número de sementes potencialmente germináveis e

potencialmente vigorosas. Foram consideradas sementes potencialmente germináveis aquelas incluídas nas classes de 1 a 5 e potencialmente vigorosas aquelas incluídas nas classes de 1 a 3 dos critérios de avaliação propostos por KRZYZANOWSKI *et alii* (8).

Os padrões eletroforéticos das proteínas de reserva das sementes foram avaliados como se segue:

Análise eletroforética: realizada em sistema SDS-PAGE com gradiente de concentração de acrilamida de 10 a 18% em gel contendo 0,58 g/L de SDS, 276 g/L de uréia, 0,833 ml/L de TEMED, 0,71 g/L de persulfato de amônio, 52,94 g/L de TRIS, 3,8 g/L de Bis-acrilamida e 70 ml/L de solução HCl 1M. Utilizou-se um gel empilhador ("stacking gel") de 5% de acrilamida, contendo 0,58 g/L SDS, 165,00 g/L de uréia, 1,51ml/L de TEMED, 0,33 g/L de persulfato de amônio, 52,94 mg/L de TRIS, 2,33 g/L de Bis-acrilamida e 70,00 ml/L de solução HCl 1M.

Amostras de cotilédones de seis sementes de cada parcela foram retiradas com a ajuda de um estilete. O peso total das amostras de cada conjunto de seis sementes foi de, aproximadamente, 30 mg. A extração foi realizada em gral gelado, com 2 ml de solução extratora contendo 50 ml/L de TRIS-HCl 1M, 2,0 g/L de SDS e 300 g/L de uréia. Como agente redutor, utilizou-se o beta-mercaptoetanol na dose de 0,75 µL/mL da solução extratora.

O resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação, realizada durante 15 minutos a 14.000 rpm, em centrífuga Eppendorf (modelo 5415 c). Foram retirados 120 µL do sobrenadante e transferidos para um frasco tipo "eppendorff", contendo 15 µL de azul-de-bromofenol. As amostras foram, então, aplicadas no gel, a um volume de 20 µL por canaleta.

A eletroforese foi conduzida em temperatura ambiente, com uma voltagem inicial constante de 100 V. Quando a linha frontal do azul-de-bromofenol atingia o limite entre o gel empilhador e o gel separador, a voltagem era mudada para 150 V, permanecendo constante durante quatro horas e meia, quando então a linha frontal do azul-de-bromofenol chegava ao final do gel e dava-se por encerrada a eletroforese. Os polipeptídeos separados foram corados com solução contendo 1 g/L de Coomassie Brilliant Blue R-250, em solução 9:45:46 (V/V) metanol/ácido acético/água. O gel foi descolorido com solução metanol/ ácido acético/ água (10:3:27 V/V).

Análise estatística: o delineamento experimental utilizado nos testes de germinação em rolo de papel, peso de 100 sementes e percentagem de rompimento de tegumento foi em blocos casualizados com tratamentos no

esquema fatorial 6x2, composto pelas seis épocas de colheita e duas variedades de soja, com quatro repetições.

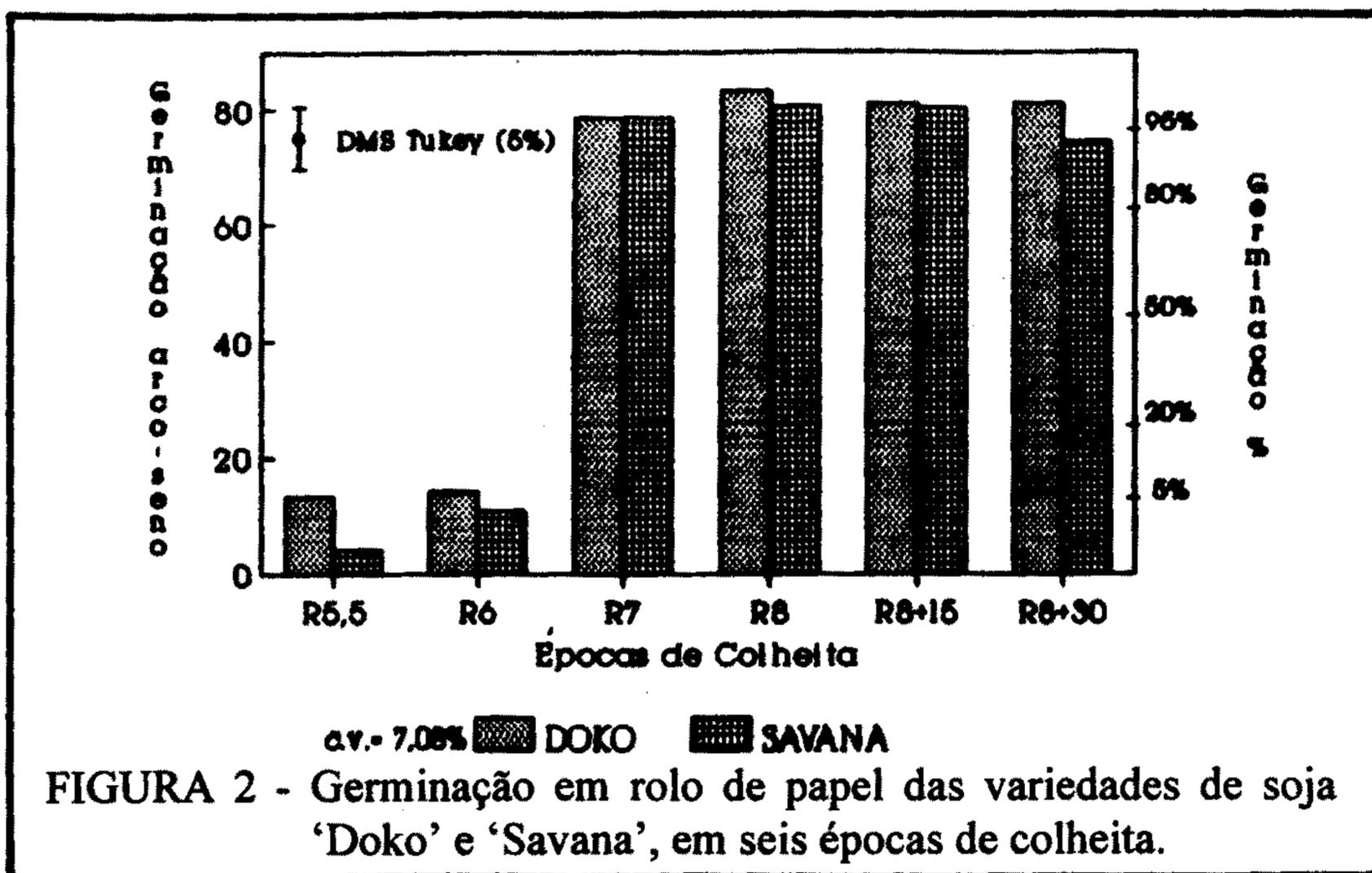
As avaliações de potencial de vigor e germinação pelo teste de tetrazólio seguiram o mesmo esquema fatorial, porém utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições, obtidas da reunião das sementes de dois blocos cada.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados percentuais foram transformados em arco-seno $(\%/100)^{1/2}$ para a realização das análises estatísticas. Dados com valores iguais a 0 e 100% foram substituídos por $1/4N$ e $1-1/4N$, respectivamente, em que N é o valor do denominador utilizado no cálculo da percentagem (5).

Dados de germinação em rolo de papel do tratamento 'Savana' R5,5 não foram incluídos na realização da análise de variância e do teste de Tukey, porque neste tratamento não houve germinação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontra-se, na Figura 2, a representação gráfica dos resultados de germinação. Pode-se verificar que o retardamento da colheita não provocou diminuição na capacidade germinativa das sementes nas variedades estudadas. Esses resultados são, em parte, semelhantes aos encontrados por BRACCINI (1), que também trabalhou com essas duas variedades e não detectou diferenças significativas de qualidade de sementes na 'Savana' até 30 dias após R8, enquanto a 'Doko' apresentou menor germinação nessa época de colheita.



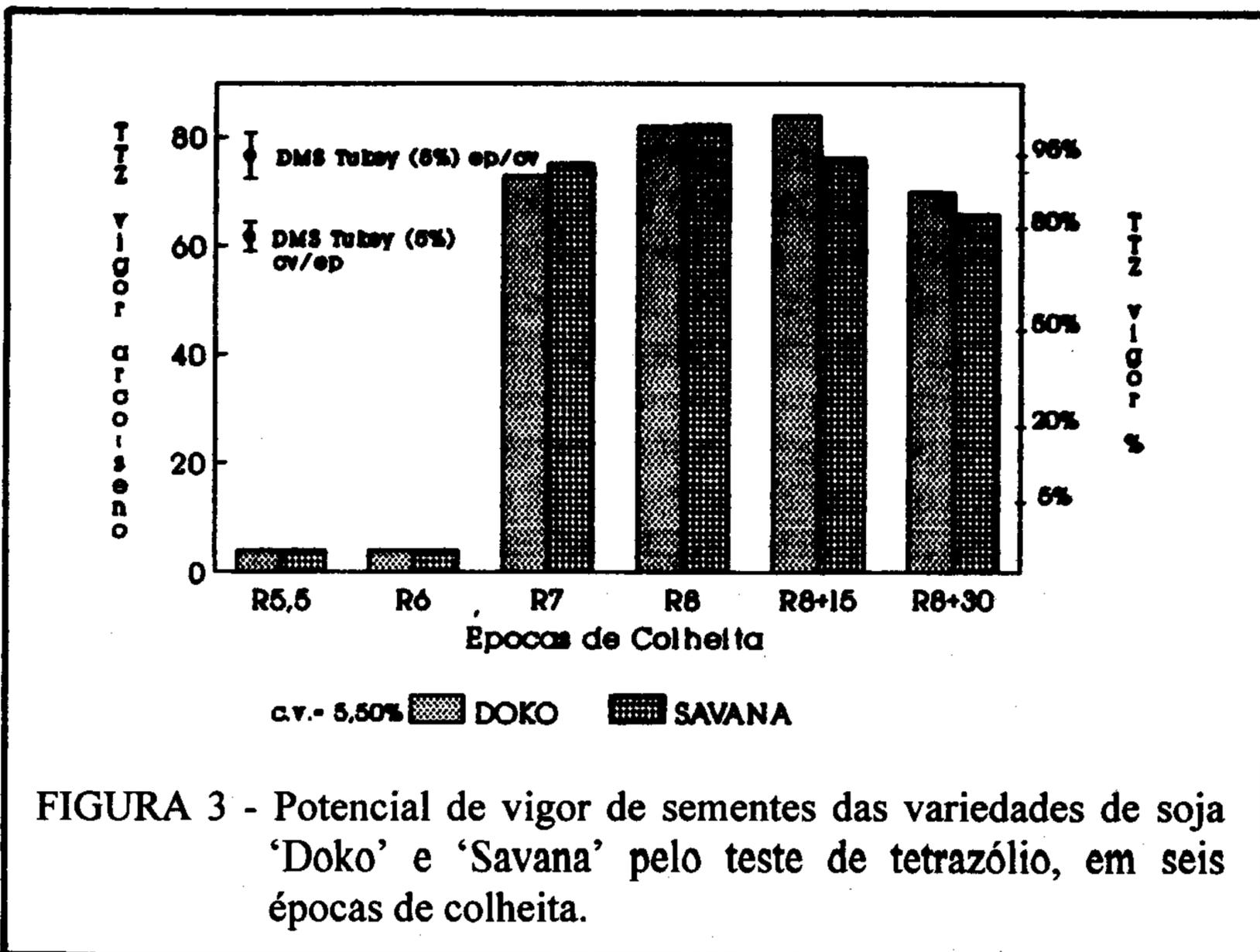
SILVA CASTRO (14), por sua vez, encontrou queda da qualidade bastante pronunciada na variedade 'Savana' com tratamentos de retardamento da colheita.

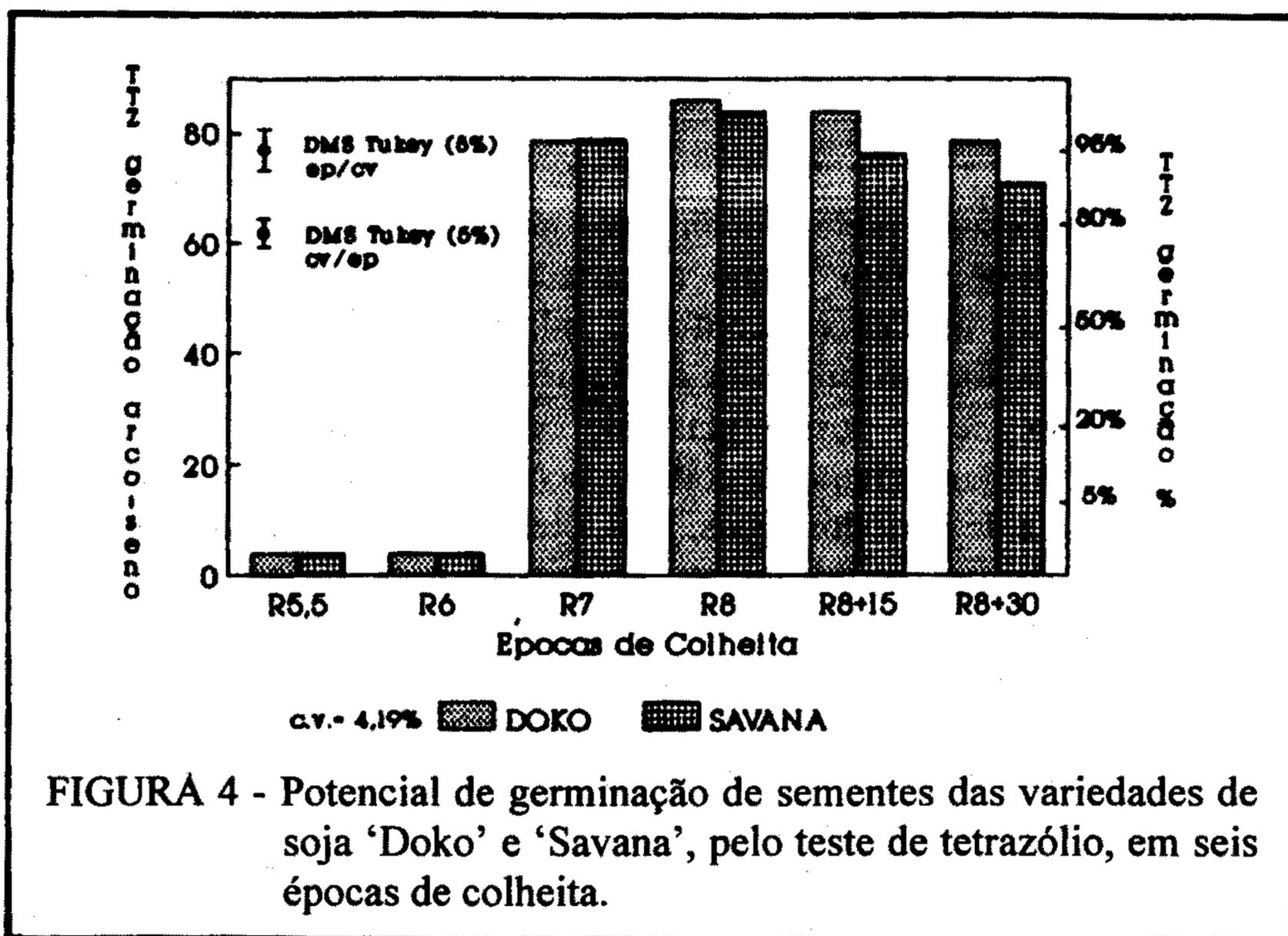
Os resultados obtidos no presente trabalho, de certa forma, não foram semelhantes àqueles encontrados na literatura. Uma das possíveis explicações para o fato é que a variedade 'Savana' é extremamente sensível a danos mecânicos, conforme salientam HENNING *et alii* (6) e, neste trabalho, todo o processo de colheita foi realizado manualmente, portanto, com menor possibilidade de ocorrência de danos mecânicos. Além disso, o retardamento da colheita ocorreu numa época em que houve predominância de períodos secos, sem alternância com períodos chuvosos (Figura 1), o que provavelmente contribuiu para a não-ocorrência de deterioração por umidade.

A pequena capacidade germinativa apresentada pelas duas variedades nos estádios iniciais de desenvolvimento das sementes era esperada, já que a semente ainda não apresenta bom estado de organização das membranas nesses estádios (7, 9).

Estes resultados, entretanto, diferem daqueles encontrados por FRAGA *et alii* (3), que verificaram haver razoável capacidade germinativa em R5,5 e R6, na variedade 'UFV-1'.

Os valores médios de potencial de germinação e vigor pelo teste de tetrazólio obtidos estão representados, graficamente, nas Figuras 3 e 4.

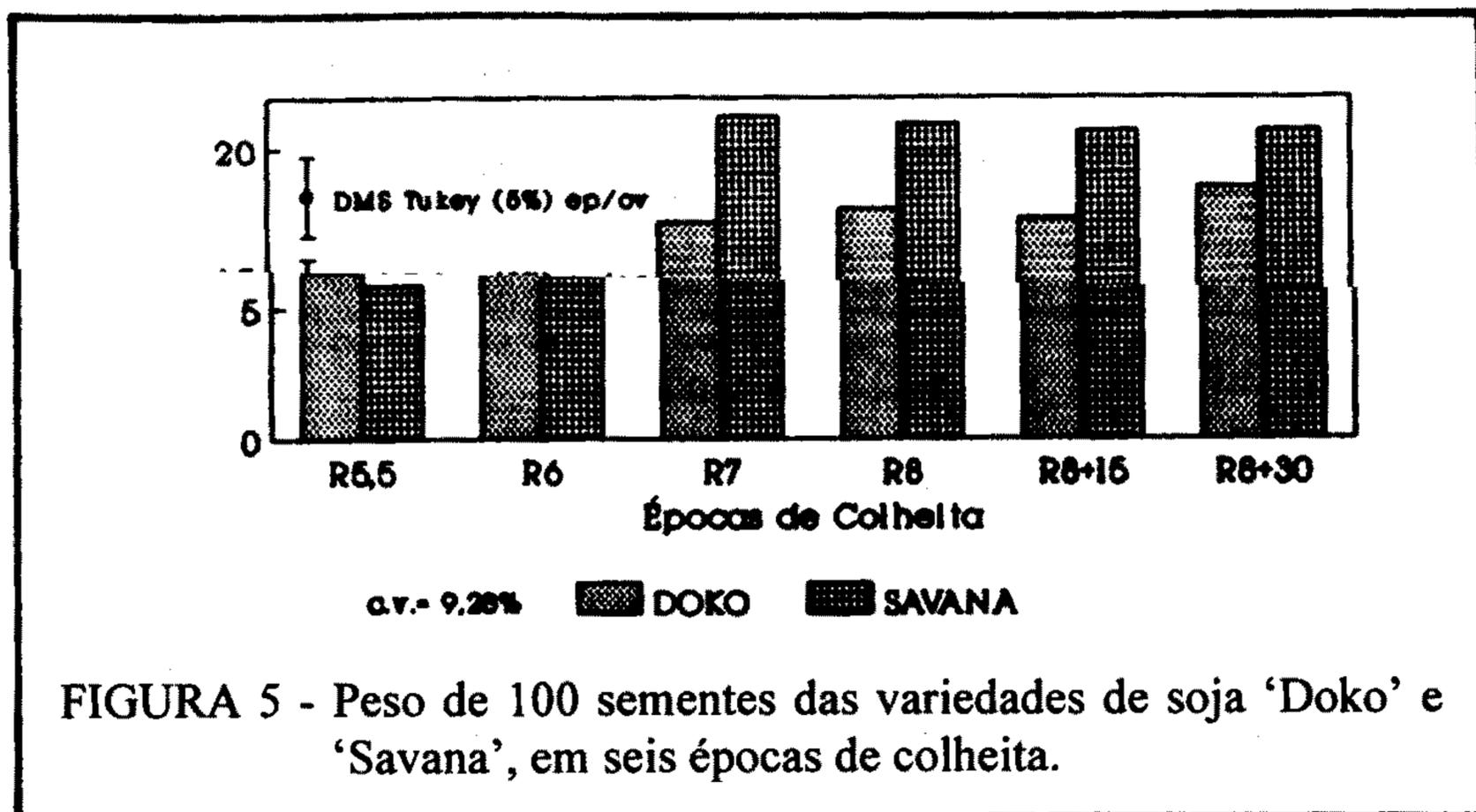




Pode-se verificar que os maiores valores de potencial de vigor estão nas colheitas realizadas em R8 e R8 + 15 na variedade 'Doko' e naquelas realizadas em R7, R8 e R8 + 15 na variedade 'Savana'. Este teste apresentou sensibilidade para mostrar diminuição no potencial de vigor nas duas variedades estudadas, quando submetidas a 30 dias de retardamento da colheita (Figura 3). Resultados semelhantes foram encontrados por SILVA CASTRO (14) e BRACCINI (1). Com relação ao potencial de germinação, não houve diferenças após R7 na variedade 'Doko', porém observou-se queda pronunciada na variedade 'Savana', nas últimas épocas de colheita (Figura 4). Esta diminuição no potencial de germinação encontrado na 'Savana' possibilitou a distinção das duas variedades nas épocas das colheitas correspondentes aos tratamentos de retardamento da colheita. Estes resultados mostram que a 'Savana' parece ser mais susceptível à deterioração no campo, observação já feita por SILVA CASTRO (14). A ausência de germinação em R5,5 e R6 contradiz os resultados encontrados por FRAGA *et alii* (3), indicando diferença entre variedades quanto a esse caráter.

Os valores médios de peso de 100 sementes estão, graficamente, representados na Figura 5. Os resultados mostram que há, para as duas variedades, aumento progressivo do peso de 100 sementes até R7, quando atingem o valor máximo. A partir de R7 nenhuma variedade apresentou alteração no peso de 100 sementes (teor de umidade padronizado em

12%). Desse modo, a maturação fisiológica das sementes, tomando-se como base o aumento do peso, ocorreu no estágio R7, nas duas variedades de soja estudadas. Estes resultados estão de acordo com FRAGA *et alii* (3).

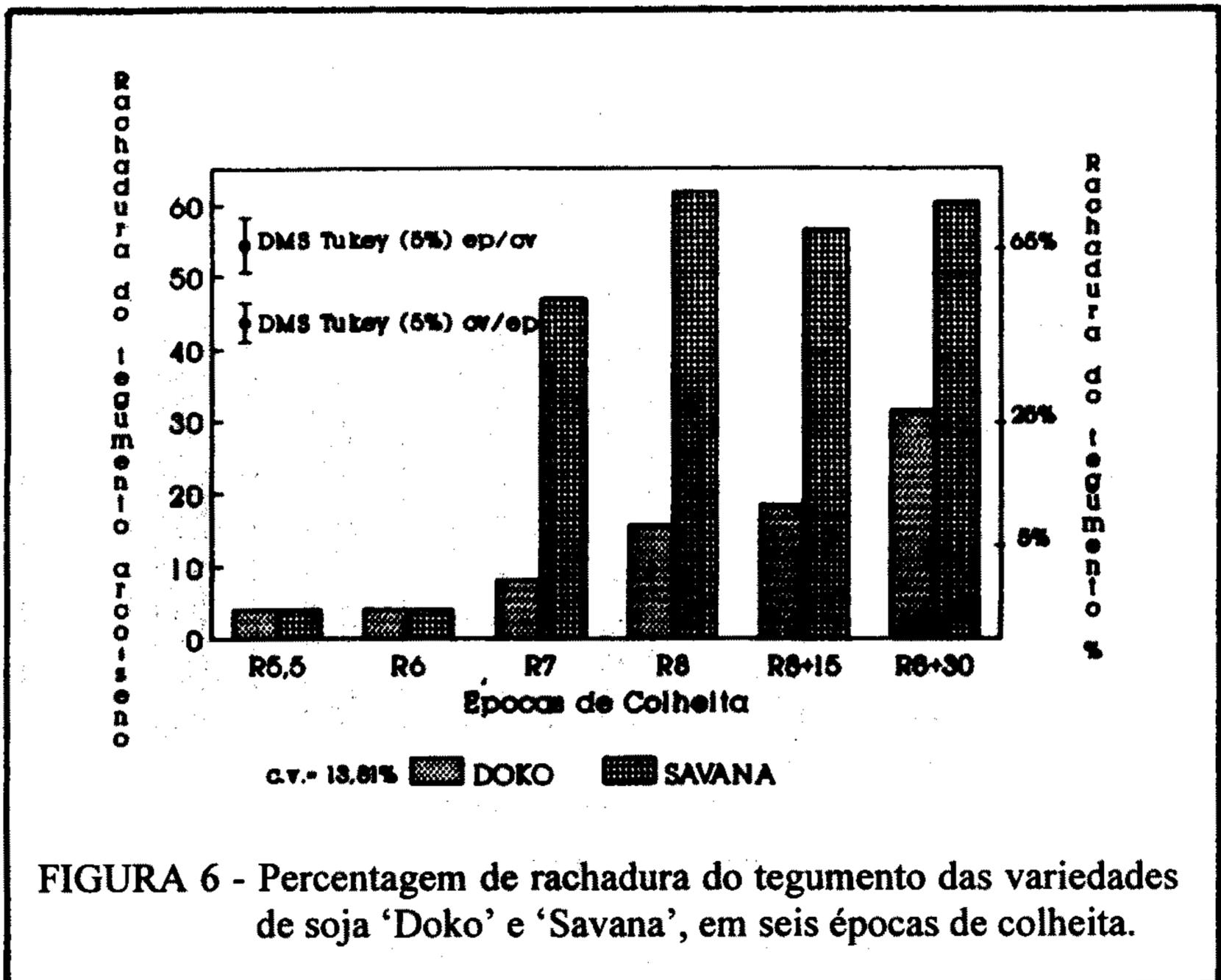


Observa-se, também, que a variedade 'Savana' apresentou maior peso de 100 sementes que a 'Doko', nas épocas posteriores a R6.

Esses resultados podem estar relacionados com o maior período de enchimento de grãos, observado na 'Savana' (Figura 1).

Os resultados médios de incidência de rompimento de tegumento encontram-se na Figura 6. Verifica-se que a variedade 'Savana' apresentou valores maiores em relação à 'Doko'. O aumento gradativo dos valores de rachadura do tegumento encontrado na variedade 'Doko' está de acordo com resultados encontrados por VIEIRA *et alii* (15). A variedade 'Savana' não apresentou diferenças após R8, porém, já em R7 a incidência de rompimento do tegumento foi alta. Estes resultados parecem estar mais relacionados com rachaduras de origem genética. Diferenças de percentagem de sementes rachadas entre variedades também foram relatadas por MIYASAKA (11, 12). Analisando dados de MIYASAKA (11), pode-se verificar que, de modo geral, variedades que apresentam maiores valores de peso de 100 sementes apresentam, também, maiores valores de percentagem de sementes rachadas.

A variedade 'Savana' apresentou valores médios de rachadura de



tegumento, significativamente, maiores em todas as épocas posteriores a R6.

Com respeito aos padrões de acúmulo das proteínas de reserva das sementes, o gel gradiente de poliacrilamida mostra que apenas a subunidade "beta", da proteína 7S, parece se acumular mais precocemente na variedade 'Savana' que na 'Doko' (Figura 7). Sabe-se que a subunidade "beta" se acumula na fase de maturação da semente (4, 10), fato que está de acordo com o padrão de acúmulo de proteínas de reserva da variedade 'Doko', porém, não-ratificado pelos resultados encontrados com a 'Savana'.

Em R6, a variedade 'Savana' apresentou acúmulo de "beta" muito mais intenso que a 'Doko', porém não se verificou nenhuma diferença de qualidade de sementes entre as duas variedades, nesta época de colheita. Já em R7, na qual a subunidade "beta" também está presente em maior quantidade na 'Savana' que na 'Doko', as diferenças entre as duas variedades só foram verificadas nas características de peso de 100 sementes e incidência de rachadura de tegumento.

Neste estudo não foi possível constatar correlação entre a qualidade de sementes e o padrão de acúmulo de proteínas de reserva.

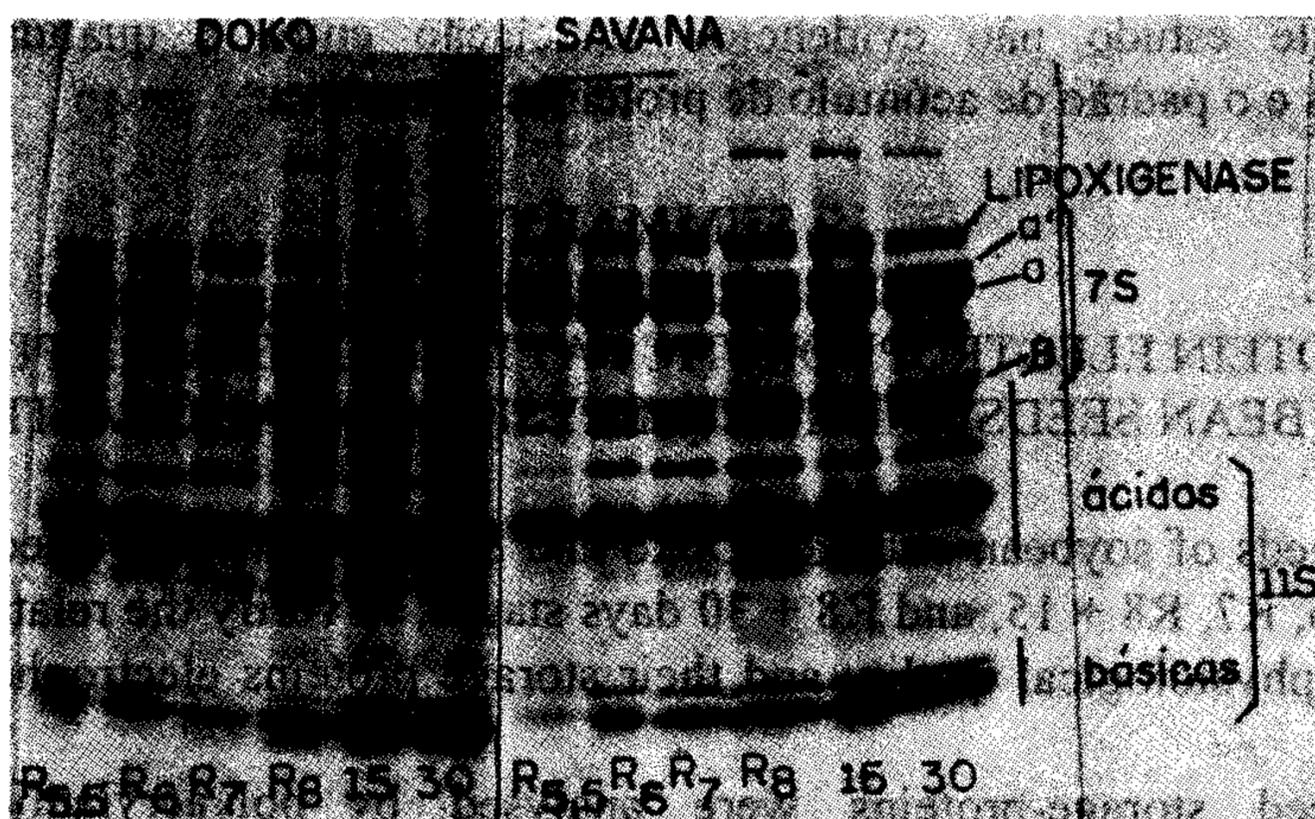


FIGURA 7 - Padrão eletroforético de proteínas de reserva das variedades de soja 'Doko' e 'Savana', formado em gel gradiente de poliacrilamida de 10 a 18%.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade fisiológica das sementes de soja das variedades 'Doko' e 'Savana', nos estádios R5,5; R6; R7; R8; R8 + 15 dias; e R8 + 30 dias, e verificar suas possíveis correlações com o padrão de acúmulo de proteínas de reserva na semente.

Coletaram-se sementes das duas variedades nas épocas de colheita acima citadas e as amostras foram subdivididas em duas partes, uma destinada à análise bioquímica e a outra aos testes de qualidade fisiológica. A análise bioquímica foi feita pela eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida. Os testes fisiológicos foram: germinação em rolo de papel; potencial de germinação e vigor no teste de tetrazólio; peso de 100 sementes; e percentagem de rachadura do tegumento.

A análise bioquímica mostrou diferença apenas da subunidade "beta" da 7S, que se acumulou mais precocemente na variedade 'Savana'. Os resultados dos testes fisiológicos mostraram ausência de diferenças capazes de discriminar as duas variedades estudadas em relação à qualidade fisiológica de sementes, provavelmente em razão do semeio tardio, que possibilitou melhores condições climáticas por ocasião do retardamento de colheita, diminuindo, assim, a deterioração das sementes no campo. Além disso, a debulha manual realizada neste experimento evitou a ocorrência de injúrias mecânicas, proporcionando melhor

preservação da qualidade da semente.

Este estudo não evidenciou correlação entre a qualidade de sementes e o padrão de acúmulo de proteínas de reserva.

5. SUMMARY

(PROTEIN ELECTROPHORETIC PATTERN OF DEVELOPING SOYBEAN SEEDS AND THEIR PHYSIOLOGICAL QUALITY)

Seeds of soybean cultivars Doko and Savana were harvested at the R5.5, R6, R7, R8 + 15, and R8 + 30 days stages, to verify the relationship of their physiological quality and their storage proteins electrophoretical pattern.

Seed storage-proteins were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. The physiological quality of was analyzed by the paper roll germination test, tetrazolium, 100 seeds weight and seed coat damage percentage. The biochemical analysis showed that the beta subunit of 7S storage-protein begins to accumulate earlier in Savana than in Doko seeds.

In relation to seed physiological quality, the test results did not show significant differences between the two varieties, maybe due to the late planting date, that enabled better weather conditions during the stages after the R8, minimizing field seed deterioration. Moreover, the manual threshing minimized mechanical injuries on the seeds.

This work showed that there is no correlation between seed quality and seed storage-proteins accumulation pattern.

6. LITERATURA CITADA

1. BRACCINI, A. L. *Avaliação da qualidade fisiológica da semente de variedades e linhagens de soja (Glycine max (L.) Merrill) com diferentes graus de impermeabilidade do tegumento*. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1993. 109 p. (Tese M.S.).
2. BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. Brasília, 1980. 188 p.
3. FRAGA, A. C.; SILVA, R. F. da; SEDIYAMA, T.; THIEBÁUT, J. T. L. & REIS, M. S. Determinação da maturação fisiológica das sementes de soja, var. "UFV", em três épocas de semeadura. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2, Brasília, 1981. *Anais...* Brasília, EMBRAPA/CNPSo, 1982. p. 589-601.
4. GAYLER, K. R. & SYKES, G. C. Beta-conglycinins in developing soybean seeds. *Plant Physiol.*, 67:958-961, 1981.
5. GOMEZ, K. A. & GÓMEZ, A. A. *Statistical procedures for agricultural research*. New York, John Wiley & Sons, 1984. 680 p.
6. HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. de B. & COSTA, N. P. da. Problemas de qualidade de sementes da cultivar Savana (BR-9). In: CONGRESSO BRASILEIRO

- DE SEMENTES, 4, Brasília, 1985. *Resumos atrasados...* Brasília, ABRATES, 1985. p. 8.
7. HEYDECKER, W. Vigour. In: ROBERTS, E. H. (ed.). *Viability of seeds*. London, Chapman and Hall, 1974. p. 209-252.
8. KRZYŻANOWSKI F. C. FRANCA NETO. J. B. & HENNING. A.A. Relato dos
10. MEINKE, D. W.; CHEN, J. & BEACHY, R. N. Expression of storage-proteins genes during soybean seed development. *Planta*, 153:130-139, 1981.
11. MIYASAKA, S. Melhoramento da soja. 1 - Observações preliminares sobre o comportamento de algumas variedades de soja em São Paulo. *Bragantia*, 14(2):9-17, 1954.
12. MIYASAKA, S. *Contribuição para o melhoramento da soja no Estado de São Paulo*. Piracicaba, ESALQ, 1958. 47 p. (Tese D.S.).
13. SEDIYAMA, C. S. *Influência do retardamento da colheita de soja sobre a deiscência das vagens, qualidade e poder germinativo das sementes*. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1972. 68p. (Tese M.S.).
14. SILVA CASTRO, C. A. Produção de n-hexanal e aldeídos totais como índices para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1989. 141 p. (Tese D.S.).
15. VIEIRA, R. D.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R. F. da; SEDIYAMA, C. S.; THIÉBAUT, J. T. L. & XIMENES, P. A. Estudo da qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivar UFV-1, em quinze épocas de colheita. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2, Brasília, 1981. *Anais...* Londrina, EMBRAPA/CNPSO, 1982. p. 633-644.