

## QUALIDADE SANITÁRIA DAS SEMENTES DE SOJA SEM AS TRÊS LIPOXIGENASES<sup>1</sup>

Carlos Alberto Osório Martins<sup>2</sup>

Carlos Sigueyuki Sedyama<sup>3</sup>

Maurílio Alves Moreira<sup>4</sup>

Valterley Soares Rocha<sup>3</sup>

Maria Goreti de Almeida Oliveira<sup>4</sup>

José Luiz Lopes Gomes<sup>3</sup>

### RESUMO

O gosto de feijão cru das sementes da soja e de seus produtos alimentícios derivados tem como causa principal as enzimas lipoxigenases (Lox1, Lox2 e Lox3). A eliminação genética dessas enzimas é a maneira mais adequada de contornar os problemas associados ao sabor desagradável. Visando elucidar a influência dessa eliminação genética, na qualidade sanitária de sementes da soja, variedades normais de soja (FT-Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12) e suas respectivas linhagens obtidas por retrocruzamentos, sem as três lipoxigenases nas sementes (linhagens triplo-nulas) e com as três lipoxigenases (triplo-positivas), foram avaliadas quanto à incidência de infecção por fungos e bactérias em suas sementes. As variedades Doko-RC e IAC-12, com as sua respectivas linhagens, apresentaram melhor qualidade sanitária de sementes que a variedade FT-Cristalina RCH. A remoção genética das três lipoxigenases das sementes, nas três variedades estudadas, não apresentou efeito deletério na resistência das sementes à infecção por fungos ou bactérias.

Palavras-chave: *Glycine max*, sabor, cultivar.

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 4-02-2003

<sup>2</sup> Bolsista do Bioagro, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

<sup>3</sup> Dep. de Fitotecnia, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

<sup>4</sup> Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

**ABSTRACT****SANITARY QUALITY OF SOYBEAN SEEDS  
LACKING THE THREE LIPOXYGENASES**

The beany flavor of soybean seeds and their food products is mainly due to the action of lipoxygenase (Lox1, Lox2 and Lox3) enzymes. The genetic elimination of these enzymes from the seeds is a more appropriate way to overcome the problems associated with this undesirable flavor. Aiming at elucidating the influence of genetic elimination of lipoxygenases in the sanitary quality of soybean seeds, normal varieties of soy (FT-Cristalina RCH, Doko RC and IAC-12) and their respective lines, derived by backcrosses, lacking the three lipoxygenases in the seeds (triple-null lines) and with the three lipoxygenases (triple-positive lines), had their seeds evaluated for the incidence of infection by fungi and bacteria. Doko RC and IAC-12 varieties and their respective lines presented seeds of superior sanitary quality than FT-Cristalina RCH. The genetic removal of the three lipoxygenases from the seeds, in the three studied varieties, did not present deleterious effect on the resistance of the seeds to the infection by fungi or bacteria.

Key words: *Glycine max*, flavor, cultivar.

**INTRODUÇÃO**

Sementes oleaginosas contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, sendo suscetíveis à deterioração mais rapidamente (3). Em condições de estresse hídrico, os lipídios estão sujeitos ao ataque direto, autocatalítico, por oxigênio atmosférico. Em altos níveis de umidade, a atividade de lipoxigenases favorece o mecanismo alternativo para o ataque dos lipídios pelo oxigênio (17).

As sementes de soja, uma oleaginosa, são extremamente sensíveis à deterioração por infecção fúngica e bacteriana, principalmente na maturidade e nas fases de maturação, pós-maturação e pós-colheita. Os microrganismos que atacam as sementes reduzem sua germinação e transmitem doenças às novas safras. No Brasil, das 14 doenças convencionalmente importantes, oito são essencialmente transmitidas pelas sementes e quatro são passíveis de serem transmitidas por elas (5, 12).

Para melhorar as características de sabor dos produtos protéicos derivados da soja, fator decisivo na sua aceitação por número maior de consumidores, pesquisadores estão removendo geneticamente as lipoxigenases das sementes, por meio de retrocruzamentos, produzindo linhagens altamente promissoras quanto à melhoria do sabor, qualidade industrial e produtividade de grãos. Com a retirada das lipoxigenases das sementes, no entanto, há a possibilidade de alteração da sua qualidade sanitária, sendo, portanto, necessário verificar o comportamento dessas sementes desprovidas das lipoxigenases (15).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade sanitária de isolinhas de soja utilizando-se variedades normais contendo as três lipoxigenases de sementes e linhagens triplo-nulas, modificadas geneticamente, apresentando ausência completa das três isoenzimas lipoxigenases nas sementes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situado em Viçosa, Minas Gerais, no período de março de 1998 a setembro de 1999, com semeadura no Campo Experimental "Prof. Diogo Alves de Mello". As análises das sementes foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFV.

As variedades de soja estudadas foram FT-Cristalina RCH, Doko-RC e IAC-12, com as respectivas linhagens triplo-nulas, portadoras dos três pares de genes homozigotos recessivos (designadas FT-Cristalina RCH TN, Doko-RC TN e IAC-12 TN) e as linhagens triplo-positivas, portadoras dos genes homozigotos dominantes (designadas FT-Cristalina RCH TP, Doko-RC TP e IAC-12 TP). Essas linhagens foram obtidas por meio de retrocruzamentos, utilizando-se como progenitores não-recorrentes materiais introduzidos do Japão e dos Estados Unidos.

A seleção das sementes triplo-nulas e triplo-positivas foi realizada por meio de testes colorimétricos (16) e da determinação da atividade das lipoxigenases (14), para confirmação dos genótipos. Os materiais genéticos foram, portanto, designados FT-Cristalina RCH Comercial ( $Lx_1Lx_1Lx_2Lx_2Lx_3Lx_3$ ), FT-Cristalina RCH Triplo-Nula ( $lx_1lx_1lx_2lx_2lx_3lx_3$ ) e FT-Cristalina RCH Triplo-Positiva ( $Lx_1Lx_1Lx_2Lx_2Lx_3Lx_3$ ), com denominações análogas para Doko-RC e IAC-12.

A semeadura foi realizada no campo, em três épocas (27 de outubro, 18 de novembro e 14 de dezembro de 1998), em terreno preparado com uma aração e duas gradagens, tendo sido aplicado o herbicida sulfentrazone, em pré-plantio, na dosagem de  $1 \text{ L} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Foram utilizados 400 kg/ha do adubo 4-14-8 no sulco de plantio. Em cada época, plantaram-se dez linhas de FT-Cristalina RCH Comercial, dez linhas de FT-Cristalina RCH TP e dez linhas de FT-Cristalina RCH TN. Com relação à Doko-RC, foram plantadas oito linhas e, quanto à IAC-12, quatro linhas de cada material.

A parcela foi constituída de uma fileira de 2,5 m de comprimento, espaçada de 0,70 m uma da outra, com densidade de dez plantas por metro. Foram consideradas úteis as dez plantas centrais da fileira, descartando-se

as demais. O ensaio recebeu três capinas manuais, irrigação quando necessário e controle de percevejo, por meio de duas aplicações da mistura de 30 mL de endossulfam e 6 mL de espalhante adesivo, em 20 L de água, utilizando-se pulverizador costal.

As plantas foram colhidas manualmente, no estágio de maturação  $R_8$  (6). As vagens foram contadas e debulhadas manualmente e as sementes foram armazenadas, com 10 a 11% de umidade (base úmida), em câmara fria, à temperatura de 4°C e umidade relativa de 50%, para posterior análise.

Na avaliação da qualidade sanitária das sementes, foram analisadas as sementes de quatro linhas de cada material genético de cada variedade. No caso das variedades FT-Cristalina RCH e Doko-RC, foram selecionadas as linhas de maior produtividade, enquanto na variedade IAC-12 foram utilizadas as quatro linhas disponíveis.

No teste de sanidade das sementes, utilizou-se o método do papel-filtro (*blotter test*) em caixas gerbox, previamente lavadas com detergente e desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% (Q-bon 20%) (10). Em cada caixa, foram colocadas seis folhas de papel-filtro autoclavadas, embebidas em solução de água desmineralizada e tratadas com estreptomicina a 100 mg.L<sup>-1</sup>, sobre as quais, em condições assépticas, foram colocadas 25 sementes. Cada repetição foi constituída de duas caixas, num total de oito caixas gerbox, perfazendo 200 sementes por tratamento. As sementes foram pré-tratadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2% (40% de água sanitária e 60% de água destilada), durante um minuto cada uma, sendo, em seguida, lavadas com água desmineralizada e distribuídas, de maneira equidistante, nas caixas "gerbox".

As sementes foram incubadas em laboratório com temperatura de 20 ± 2°C, luminosidade natural e umidade relativa em torno de 70%, durante sete dias, segundo critérios adotados por Henning (11). Após o crescimento e a esporulação dos patógenos, fez-se a identificação e determinou-se a percentagem de sementes infectadas por bactérias em geral e por *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora kikuchii* e outros fungos. A identificação dos fungos foi feita por plaqueamento, os quais foram incubados em recinto com temperatura ambiente de 25 °C por oito dias. Após o crescimento e a esporulação dos fungos internos sobre as sementes, realizou-se a identificação destes ao microscópio estereoscópio (2). Os resultados foram expressos em percentagem de sementes infectadas por fungos ou bactérias.

Os dados foram previamente transformados em arco seno ( $\arcsin(x/100)$ ) e submetidos à análise de variância. As médias foram

comparadas pelo teste de Tukey, quando os efeitos foram significativos pelo teste F, ambos a 5% de probabilidade.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, com tratamentos em fatorial 3 x 3 x 3 [três variedades, três épocas de semeadura e três tipos de materiais genéticos (variedade comercial, linhagem com presença ou ausência das três lipoxigenases nas sementes)].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de sanidade das sementes indicou que os fungos mais prevalentes nas amostras foram *Phomopsis* sp. e *Aspergillus* sp., com pouca incidência de *Fusarium* sp. e de bactérias. Como indicador do efeito da retirada de lipoxigenases sobre a sanidade das sementes, optou-se pela análise da frequência de sementes infectadas por qualquer fungo e, ou, bactéria.

O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 1. Todos os efeitos principais e interações foram significativos, indicando que cada variedade apresenta sementes de qualidade sanitária diferenciada e a eliminação genética das lipoxigenases causa distintos efeitos sobre as sementes, dependendo da época de semeadura (Quadro 2).

QUADRO 1 - Resumo da análise de variância dos dados de percentagem de sementes infectadas no teste de sanidade das sementes

Fonte de variação	gl	Quadrado médio
Variedades (V)	2	1895,08**
Épocas de semeadura (E)	2	433,22**
Materiais genéticos (MG)	2	221,19**
V x MG	4	98,98*
V x E	4	405,25**
E x MG	4	227,17**
V x MG x E	8	223,79**
Resíduo	89	11,97
Média geral		17,80
C.V. (%)		19,44

\* e \*\* F Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

**QUADRO 2 - Percentagem de sementes infectadas, no teste de sanidade, das sementes dos materiais comerciais e linhagens triplo-positivas (com as três lipoxigenases nas sementes) e triplo-nulas (sem lipoxigenases nas sementes) das variedades FT-Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12, em três épocas de plantio<sup>1</sup>.**

Época de semeadura	Material genético	Sementes infectadas (%)		
		FT-Cristalina RCH	Doko-RC	IAC-12
27/10/98	Comercial	31,96 Ba	18,93 Aa	18,70 Aa
27/10/98	TP	51,50 Aa	11,24 Bb	8,65 Bb
27/10/98	TN	23,38 Ca	12,52 Ba	7,54 Bb
	Média	35,61	14,23	11,63
18/11/98	Comercial	14,43 Bc	4,06 Ab	6,83 Bb
18/11/98	TP	25,39 Ab	8,31 Bb	16,03 Aa
18/11/98	TN	22,08 Aa	12,52 Aa	15,30 Aa
	Média	20,63	8,30	12,72
14/12/98	Comercial	22,05 Ab	16,26 Ba	20,55 Aa
14/12/98	TP	19,02 Ab	27,72 Aa	17,15 Aa
14/12/98	TN	25,62 Aa	15,30 Ba	7,54 Bb
	Média	22,23	19,76	15,08
Média Geral		26,16	14,10	13,14

1/ Nas colunas, médias das variedades seguidas das mesmas letras maiúsculas dentro da mesma época de semeadura ou seguidas das mesmas letras minúsculas dentro do mesmo material genético não diferem, significativamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A variedade FT-Cristalina RCH e suas linhagens com ou sem lipoxigenases nas sementes, exceto no caso da linhagem TP, na terceira época de plantio, apresentaram maior infecção que as variedades Doko-RC e IAC-12 e linhagens delas derivadas. Além disso, nas sementes dessa variedade e de suas linhagens com ou sem as lipoxigenases, observou-se maior grau de infecção na primeira época de semeadura. Esta época caracterizou-se como período de maior temperatura e frequência de

chuvas, mas não parece ter causado influência na sanidade das sementes dos materiais de Doko-RC e IAC-12.

Ambientes com temperaturas mais amenas, altitude mais elevada e quantidade de chuva mais adequada e bem distribuída favorecem a colheita de sementes de boa qualidade fisiológica (1).

Analisando a influência da retirada de lipoxigenases das sementes, nas diferentes variedades estudadas, verifica-se que não há efeito deletério direto da retirada das lipoxigenases sobre a resistência das sementes à infecção por fungos ou bactérias. Esse fato pode ser observado, por exemplo, na primeira época de plantio, em que as sementes da linhagem TP da variedade FT-Cristalina RCH apresentaram maior porcentagem de infecção que as dos demais materiais; por seu lado, as linhagens TN de todas as variedades tiveram menores porcentagens de sementes infectadas que as variedades originais na primeira época de plantio. Em apenas um caso, Doko-RC TN na segunda época de plantio, uma linhagem TN apresentou sementes mais infectadas que a variedade original ou sua correspondente TP.

Em geral, os níveis de infecção estão mais relacionados com o ambiente durante a formação e maturação das sementes. De acordo com Costa et al. (4), as altas temperaturas, juntamente com chuvas frequentes, no período de pós-maturação à pré-colheita das sementes, são os principais fatores que contribuem para aumentar a incidência de doenças, provocando a deterioração das sementes. Gonçalves (8) verificou que as qualidades fisiológica e sanitária das sementes variam de acordo com o genótipo, a época de semeadura, o regime hídrico e o ano agrícola. Oliveira (13) observou menor infecção das sementes das variedades Doko e FT-Cristalina e da linhagem CR1,3 (sem lipoxigenases 1 e 3 nas sementes) em relação às demais variedades avaliadas em campo, em Viçosa, MG. Goulart (9) observou que a incidência de fungos nas sementes de soja varia de acordo com o local de produção, com as condições climáticas durante as fases de maturação e colheita, com a resistência varietal e com a aplicação ou não de controle químico.

As condições climáticas desfavoráveis, como chuvas e altas temperaturas durante as fases de maturação e colheita, afetam, além da qualidade fisiológica, a sanidade das sementes. Altas temperaturas e elevada umidade relativa do ar, durante as fases de maturação e colheita da semente de soja, podem aumentar a infecção de sementes por fungos, como *Phomopsis spp.* e *Fusarium spp.* Dependendo das condições climáticas, sementes aparentemente saudáveis podem estar altamente infectadas por tais fungos. Nesse caso, a germinação avaliada pelo teste de germinação pode ser drasticamente reduzida, ao passo que a emergência das plântulas oriundas dessas sementes no teste de solo ou areia não é

afetada se a qualidade fisiológica for boa e as condições forem adequadas para rápida germinação e emergência (7). Quanto maior o índice de sementes infectadas por *Phomopsis* spp., menor a porcentagem de germinação, ao passo que a emergência em areia ou no solo não é afetada pelo fungo, uma vez que, neste caso, o contato íntimo entre as sementes é evitado, pois elas são separadas umas das outras pela areia ou pelo solo e, quando emergem, o tegumento permanece enterrado enquanto os cotilédones são empurrados para a superfície pelo hipocótilo em alongação, reduzindo a contaminação das plântulas.

### CONCLUSÕES

1) As variedades de soja Doko-RC e IAC-12, com as suas respectivas linhagens, apresentam melhor qualidade sanitária de sementes que a variedade FT-Cristalina RCH.

2) A remoção genética das três lipoxigenases das sementes de soja, nas três variedades estudadas, realizada com o objetivo de aumentar sua aceitação pela indústria de alimentos, não apresenta efeito deletério na resistência das sementes à infecção por fungos ou bactérias.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FINEP, pelo apoio financeiro para a execução das diversas etapas relacionadas a este trabalho.

### REFERÊNCIAS

1. AZEVEDO, P.H. Avaliação da germinação e sanidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), com presença e ausência de lipoxigenases, produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais. Viçosa, UFV, 1998. 94p. (Tese de Mestrado).
2. BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
3. BEWLEY, D.J. & BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2.ed. New York, Plenum Press, 1994. 445p.
4. COSTA, N.P.; MESQUITA, C.M.; MAURINA, C.M.; BORDIGNON, J.R.; MANDARINO, J.M.G.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYŻANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. & PEREIRA, J.E. Avaliação e controle de qualidade de sementes e grãos de soja produzidos no Brasil, na safra 1998/1999. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 22, Londrina. Resumos, Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 2000. p.207.
5. DHINGRA, O.D. & ACUÑA, R.S. Patologia de semente de soja. Viçosa-MG, Editora UFV, 1997. 119p.
6. FEHR, W.R. Breeding. In: Norman, A.G. (ed.). Soybean physiology, agronomy, and utilization. New York, Academic Press, 1978. p.119-55.
7. FRANÇA NETO, J.B. & HENNING, A.A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 1984. 39p. (Circular Técnica, 9).



8. GONÇALVES, M.C. Influência da época de semeadura, em regime de irrigação suplementar ou de sequeiro, sobre a produção e qualidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Viçosa, UFV, 1989. 253p. (Tese de Doutorado)
9. GOULART, A.C.P. Qualidade sanitária de sementes de soja produzidas em Mato Grosso do Sul. In: Congresso Brasileiro de Soja, 1999, Londrina, Anais... Londrina, EMBRAPA Soja, 1999. p.444. (Documentos, 124).
10. HENNING, A.A. Patologia de sementes. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 1994. 43p. (Documentos, 90).
11. HENNING, A.A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: Soave, J. & Wetzel, M.M.V.S. (eds.). Patologia de sementes. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.441-53.
12. MACHADO, J. da C. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras, LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.
13. OLIVEIRA, D.A. Qualidade fisiológica e produção de aldeídos em sementes de linhagens com ausência de lipoxigenases em soja. Viçosa, UFV, 1996. 67p. (Tese de mestrado).
14. OLIVEIRA, D.A.; PIOVESAN, N.D.; MORAES, R.M.A.; ROCHEBOIS, G.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Identification of the three genotypic classes for soybean lipoxigenases 1 and 3 based on enzymatic activity. *Biotechnology Techniques*, 12:71-4, 1998.
15. SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.C. & REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: Borém, A. (ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa, MG, UFV, 1999. p.487-533.
16. SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, E. & IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxigenase isozymes in soybean seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43:742-7, 1995.
17. VICK, B.A. & ZIMMERMAN, D.C. Lipoxigenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedling. *Plant Physiology*, 57:780-8, 1976.