

CORRELAÇÃO ENTRE A EVOLUÇÃO DE N-HEXANAL E ALDEÍDOS TOTAIS E A GERMINAÇÃO E VIGOR DE SEMENTES DE SOJA^{1/}

Waldir José Pinheiro Reis^{2/}
Valterley Soares Rocha^{3/}
Sebastião Tavares Rezende^{2/}
Maurílio Alves Moreira^{2/}
Carlos Siqueyuki Sedyama^{3/}

1. INTRODUÇÃO

A cultura de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) continua expandindo a fronteira agrícola do Brasil, principalmente em áreas de vegetação de cerrado, nas regiões Centro-Oeste e Norte. Contudo, nessas novas áreas de cultivo, a cultura tem requerido novas tecnologias, destacando-se o uso de sementes de alta qualidade e vigor, o que nem sempre tem sido verificado, como comprovaram SEDIYAMA *et alii* (19).

A perda de vigor e viabilidade de sementes, provocada pelo armazenamento e por condições desfavoráveis de germinação, tem desafiado os melhoristas de soja do Brasil e do exterior. Sementes que germinam bem numa área geográfica podem ter desempenho ruim em outra.

Em geral, sabe-se muito pouco a respeito das causas fisiológicas e dos fatores genéticos que afetam a viabilidade e o vigor das sementes; porém, problemas dessa natureza são considerados dos mais importantes pelos produtores de soja do Brasil. Em geral, os trabalhos realizados com a finalidade de selecionar genótipos com sementes de melhores características de germinação e vigor ignoram a ação bioquímica dos fatores genéticos responsáveis por essas características, pois ain-

^{1/} Aceito para publicação em 17-8-1988. Realizado com auxílio do CNPq (Proc. n.º 404387/87. O/GE/FV).

^{2/} Departamento de Química da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

^{3/} Departamento de Fitotecnia da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

da é desconhecida e se constitui num dos grandes objetivos dos projetos de pesquisa da atualidade.

Grande número de pesquisas tem sido conduzido para determinar a importância da peroxidação de lipídios no envelhecimento de sementes de soja (3, 4, 11, 14, 15, 16, 20).

A peroxidação de lipídios produz radicais livres intermediários altamente reativos, hidroperóxidos e grande variedade de produtos secundários, resultantes da decomposição dos hidroperóxidos, dentre os quais aldeídos de baixo peso molecular (22). A velocidade dessa reação é grandemente favorecida pelas enzimas lipoxigenases, presentes em quantidades expressivas em sementes de soja (21).

Os aldeídos formados na degradação dos hidroperóxidos apresentam vários efeitos citotóxicos. Reagem a grupos sulfidrilas, provocando inativação de enzimas (1), diminuem a taxa de mitose em células (7) e inibem as proteínas tubulinas, principais proteínas dos microtúbulos, necessárias para a formação do fuso acromático (9).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a correlação existente entre a evolução do aldeído n-hexanal e de aldeídos totais e a germinação e vigor de sementes de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de soja da variedade UFV-6 (Rio Doce), plantadas no dia 09 de dezembro de 1986, em área pertencente à Universidade Federal de Viçosa, MG.

Procedeu-se ao retardamento da colheita, com o objetivo de induzir a perda de qualidade fisiológica das sementes. Realizaram-se colheitas em cinco épocas diferentes: a primeira sete dias após o estágio de maturação R8, descrito por FEHR e CAVINESS (8), e as demais com intervalos de 15 dias.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio do teste de emergência em leito de areia, teste-padrão de germinação, teste de tetrazólio (potencial de vigor e potencial de germinação) e teste de condutividade elétrica.

A instalação do teste de emergência em leito de areia deu-se em 15 de setembro. Nessa mesma data, as sementes restantes foram acondicionadas em sacos plásticos e guardadas em geladeiras, a 4°C, para a realização posterior dos demais testes de qualidade fisiológica e das análises químicas.

2.1. Teste de Emergência em Leito de Areia

Este teste foi realizado com oito amostras de 40 sementes para cada época de colheita. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Efetuou-se apenas uma avaliação, no décimo dia da instalação do teste, e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais e de plântulas anormais.

2.2. Teste-Padrão de Germinação

A germinação das sementes foi também avaliada por meio do teste-padrão de germinação, utilizando-se oito amostras de 50 sementes por tratamento, que foram colocadas em papel-toalha Germitest previamente umedecido com água desmineralizada, confeccionando-se rolos, que foram colocados em germinadores com temperatura regulada para $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (2). Foi efetuada apenas uma avaliação, após cinco dias.

2.3. Teste de Tetrazólio

O potencial de vigor das sementes foi representado pelo total das sementes incluídas nas categorias de 1 a 3 e o potencial de germinação pelo total incluído nas categorias de 1 a 6 do teste de tetrazólio (6).

Nesse teste foram utilizadas oito amostras de 25 sementes para cada tratamento. As sementes foram: pré-acondicionadas em papel-toalha umedecido com água desmineralizada, por 16 horas, a 30°C.

Após esse período, as sementes foram imersas em copos plásticos, com solução de 2, 3, 5, cloreto de trifênil tetrazólio, a 0,5%, pH 7,0. As sementes permaneceram imersas nessa solução por quatro horas, à temperatura de 40°C. Após esse período, foram lavadas com água corrente, permanecendo na água, sob refrigeração, até a leitura.

Para a avaliação, as sementes foram separadas em germináveis e não germináveis, e as germináveis foram classificadas em seis categorias (6). O potencial de vigor e de germinação foi expresso em porcentagem.

2.4. Condutividade Elétrica

Oito amostras de 50 sementes por tratamento foram pesadas e colocadas em copos de plásticos que continham 250 ml de água desmineralizada. Em seguida, foram colocadas em incubador, à temperatura constante de 20°C, por 24 horas (13). Ao final desse período, a solução, com os solutos das sementes, foi transferida para outro copo. As leituras foram realizadas em ponte de condutividade elétrica e os dados transformados em μ mhos/grama de sementes.

2.5. Determinação do Conteúdo de n-Hexanal

A determinação de n-hexanal foi realizada em farinhas obtidas das sementes, utilizando-se a técnica de cromatografia por «head space», adaptada por Visentainer (1986), citado por REZENDE (18). A inativação das enzimas foi feita com hidróxido de sódio 0,5 N, 15 minutos após o início da moagem, conforme proposto por CASTRO *et alii* (4). Os resultados foram expressos em área do pico obtido no cromatograma, em cm^2 .

2.6. Determinação do Conteúdo de Aldeídos Totais

A determinação de aldeídos totais foi realizada por meio do método colorimétrico, utilizando-se como reagente de cor o 3-metil-2 benzotiazolona hidrazona (MBTH).

Para isso, 30 sementes de cada tratamento, tomadas ao acaso, foram colocadas em béquer que continha 50,0 ml de água desionizada e incubadas em germinador, por 24 horas, para a extração dos aldeídos. De cada béquer, tomaram-se três alíquotas de 1,0 ml da solução, adicionadas a 1,0 ml de solução de MBTH a 0,2%, e acrescentaram-se 2,5 ml de solução de FeCl_3 a 0,23%. Exatamente cinco minutos após o tratamento com solução de FeCl_3 , adicionaram-se 6,5 ml de acetona e realizou-se a leitura, a 635 nm, em espectrofotômetro PERKIN ELMER, mod. 552A.

Para construir a curva-padrão, usaram-se várias concentrações de formaldeído. Conseqüentemente, a produção de aldeído foi expressa em gramas de aldeídos, como formaldeídos, por 30 sementes.

As sementes utilizadas no presente trabalho foram submetidas a uma classifi-

cação física prévia, em peneiras de crivo oblongo, aproveitando-se somente as retidas nas peneiras 11 e 12.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 encontram-se as médias estimadas dos dados obtidos nos testes de germinação, vigor e condutividade elétrica, para as cinco épocas de colheita da soja, cultivar UFV-6. Observa-se que houve um efeito negativo do retardamento da colheita sobre o vigor e qualidade das sementes. O teste-padrão de germinação e o teste de emergência em leito de areia, utilizados rotineiramente para avaliar a qualidade fisiológica, evidenciaram deterioração significativa das sementes com o retardamento da colheita. O teste de tetrazólio, normalmente utilizado para promover estimativas rápidas do vigor das sementes, mostrou também que o retardamento da colheita provocou expressiva perda de vigor. Finalmente, os valores obtidos com o teste de condutividade elétrica, que apresenta boa correlação com o vigor da semente (5), confirmaram os resultados do teste de tetrazólio.

Tais resultados mostram que, apesar de ser o padrão de germinação determinado pela constituição genética da semente, a expressão eventual desse padrão é freqüentemente modificada pelas condições ambientais. Influem especialmente nesse sentido as condições climáticas prevaletentes tanto antes e depois dos estádios de sua formação quanto depois de terem atingido o estágio de maturação fisiológica, quando a semente se apresenta com maior vigor (17) e, a partir do qual, é considerada como armazenada no campo (10).

Verifica-se, no Quadro 2, que houve diferença significativa entre as épocas de colheita, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, quanto ao teor de n-hexanal nas farinhas de soja analisadas e quanto ao teor de aldeídos totais das sementes. O retardamento da colheita promoveu o aumento tanto do teor de n-hexanal, conforme ilustra a Figura 1, quanto do teor de aldeídos totais.

O incremento do teor de n-hexanal nas farinhas, devido ao retardamento da colheita, foi também descrito por CASTRO *et alii* (4).

O prolongamento do período compreendido entre a maturação fisiológica e a colheita deve propiciar condições favoráveis ao desencadeamento de processos bioquímicos inesperados, dentre os quais a hidroperoxidação de lipídios, com a conseqüente produção de aldeídos. Como evidenciado por outros pesquisadores (11, 22), os aldeídos apresentam vários efeitos citotóxicos, o que poderá promover diminuição do potencial de germinação e de vigor de sementes de soja.

As estimativas dos coeficientes de correlação entre os dados de germinação, vigor e condutividade elétrica e a produção de n-hexanal encontram-se no Quadro 3. Observa-se que todas as correlações foram significativas. Verificou-se ainda que havia correlações significativas, a 1% de probabilidade (coeficiente de correlação igual a 0,95), entre o teor de n-hexanal e o de aldeídos totais. Conseqüentemente, esse último parâmetro correlaciona-se também com a germinação e vigor das sementes. O fato é que fica demonstrado que a perda de germinação e de vigor de sementes de soja correlaciona-se positivamente com a produção de aldeídos.

Tais resultados sugerem que a determinação desses compostos poderá até vir a ser considerado como parâmetro novo para avaliar a qualidade fisiológica e o vigor de sementes de soja em programas de melhoramento genético. Contudo, para que isso se concretize, fazem-se necessárias outras pesquisas, envolvendo maior número de cultivares, buscando caracterizá-los quanto à qualidade fisiológica das sementes, utilizando-se como parâmetro o nível de aldeídos. Dessa forma, poder-

QUADRO 1 - Médias estimadas dos dados obtidos nos testes de germinação e vigor e de condutividade elétrica, para cinco épocas de colheita de soja, cv. UFV-6 (Rio Doce).

Épocas de colheita (Estádio + Dias)	Teste-padrão de germinação (%)				Leito de areia (%)				Teste de tetrazólio (%)			Condutividade elétrica (umhos/g)
	Plântulas normais		Plântulas anormais		Plântulas normais		Plântulas anormais		Potencial de vigor		Potencial de germinação	
R8 + 7	79,75 a		17,50 b		83,12 a		7,50 ab		80,00 a		94,00 a	39,28 d
R8 + 22	39,25 b		37,50 a		64,37 b		11,87 a		56,00 b		81,50 a	59,02 c
R8 + 37	24,00 c		32,00 a		41,25 c		11,87 a		38,50 c		65,50 b	48,30 c
R8 + 52	8,50 d		15,75 b		11,56 d		5,62 ab		21,50 d		44,00 c	74,39 b
R8 + 67	1,00 e		4,25 e		1,25 e		1,87 b		18,50 d		42,00 c	101,86 a
C.V. (%)	16,07		29,75		14,41		57,19		18,51		14,61	9,06

* As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

QUADRO 2 - Médias estimadas dos teores de n-hexanal, determinados na farinha, e de aldeídos totais, extraídos de trinta sementes, em cinco épocas de colheita da soja, cv. UFV-6 (Rio Doce)*

Épocas de colheita (estádios + dias)	Teores de n-hexanal (área do pico, em cm ²)	Massas de aldeídos totais (g)
R8 + 7	0,86 c	$2,43 \times 10^{-4}$ d
R8 + 22	1,10 c	$2,43 \times 10^{-4}$ d
R8 + 37	1,36 c	$3,18 \times 10^{-4}$ c
R8 + 52	6,28 b	$5,38 \times 10^{-4}$ b
R8 + 67	8,97 a	$8,12 \times 10^{-4}$ a
C.V. (%)	18,57	

* As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

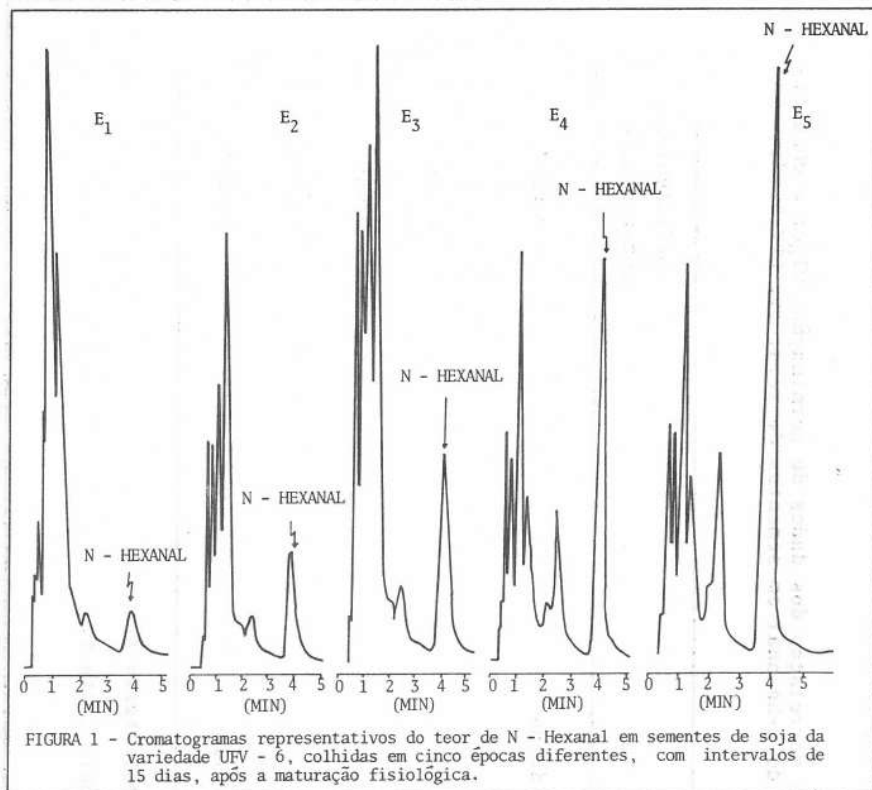


FIGURA 1 - Cromatogramas representativos do teor de N - Hexanal em sementes de soja da variedade UFV - 6, colhidas em cinco épocas diferentes, com intervalos de 15 dias, após a maturação fisiológica.

se-á ter melhor idéia da consistência do método e, assim, atribuir-lhe maior confiabilidade.

Finalmente, considerando que os aldeídos são um dos principais produtos da ação das enzimas lipoxigenases sobre ácidos graxos polinsaturados e que é possível a eliminação genética dessas isozimas (12), os resultados deste trabalho poderão ser de grande valia no melhoramento da qualidade fisiológica da semente de soja, por via do controle da evolução de aldeídos.

4. RESUMO

Com o presente trabalho investigou-se a correlação entre a evolução de n-hexanal e de aldeídos totais e a germinação e vigor de sementes de soja. Utilizaram-se sementes da variedade UFV-6, colhidas em cinco épocas diferentes, após a maturação fisiológica, com intervalos de 15 dias, verificando-se perda da qualidade fisiológica, provocada pelo retardamento da colheita. Os teores de n-hexanal foram determinados em farinha de soja por cromatografia de gás, utilizando-se a técnica de «head space». Para a determinação do teor de aldeídos totais, 30 sementes de cada tratamento foram imersas em 50 ml de água desionizada por 24 horas, a 25°C. Os aldeídos extraídos foram determinados colorimetricamente, utilizando-se como reagente de cor o 3-metil-2 benzotiazolona hidrazona (MBTH).

Verificou-se que havia correlação significativa entre a perda de vigor de se-

QUADRO 3 - Estimativas dos coeficientes de correlação dos dados de germinação, vigor e condutividade elétrica com a produção de n-hexanal em sementes de soja, cv. UFV-6 (Rio Doce)*

Variáveis	Coeficientes de correlação
Plântulas normais no teste-padrão de germinação	- 0,92**
Plântulas normais no teste de emergência	
- leito de areia	- 0,87**
Condutividade elétrica	- 0,95**
Potencial de vigor no teste de tetrazólio	- 0,83**
Potencial de germinação no teste de tetrazólio	- 0,92**

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste t.

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste t.

mentes de soja e a evolução de n-hexanal e aldeídos totais nessas sementes.

Uma vez que os aldeídos são um dos principais produtos da atuação de lipoxigenases sobre ácidos graxos polinsaturados, essa observação será de grande valia para a melhor caracterização dos fatores bioquímicos relacionados com a perda da qualidade fisiológica da semente de soja.

5. SUMMARY

(N-HEXANAL AND TOTAL ALDEHYDES PRODUCTION, GERMINATION AND VIGOUR IN SOYBEAN SEEDS)

Aldehyde production in soy flour was examined for its ability to indicate loss of seed viability and vigour. Five soybean seed lots, from the cultivar UFV-6, which were delay harvested at 15 days intervals after physiological maturity were tested for n-hexanal production, aldehydes assayed in the water solution after 24 hrs soaking, loss of seed germination and vigour. n-Hexanal levels in the soy flours were analysed by gas chromatography. Aldehydes in the water solution were analysed colorimetrically using MBTH as reagent. It was shown that delayed soybean harvesting after physiological maturity promotes loss of seed viability and vigour. The data presented here demonstrate a highly significant correlation between the amount of n-hexanal produced in the soy flour and aldehydes captured in 24 hrs of water soaking with loss of seed viability and vigour as determined by standard procedures.

Aldehydes are considered to be the main breakdown product of enzyme catalysed oxidation of C18:2 and C18:3 fatty acids. The observation made in this paper will be important to better characterize the biochemical factors that promote soybean seed aging.

6. LITERATURA CITADA

1. BENEDETTI, A.; COMPORTI, M. & ESTERBAUER, H. Identification of 4-hidroxinonenal as a citotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 620:281-296. 1980.
2. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. S.1., 1980. 188 p.
3. CHAPMAN, G.W.Jr. & ROBERTSON, J.A. Changes in phospholipid levels during high moisture storage of soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 54:195-198. 1977.
4. CASTRO, C.A.S.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A.; SILVA, R.F. & REZENDE, S.T. Liberação do aldeído n-hexanal como índice para estimar o vigor de sementes de soja. *Revista Ceres* (aceito para publicação).
5. COSTA, A.V. *Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de Soja (Glycine max (L.) Merrill) com Tegumento Impermeável, Produzida em Três Localidades do Brasil Central*. Viçosa, Imprensa Universitária, 1984. 164 p. (Tese de Doutorado).

6. DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M. & LIENHARD, M. *O teste de tetrazólio para viabilidade da semente*. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.
7. DIANZANI, M.V. Biological activity of methylglyoxal and related aldehydes. In: HELMUTH, H.W. (ed.). *Submolecular Biology and Cancer*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1979. p. 245-270. (CIBA Foundation Series 67).
8. FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. *Stages of Soybean Development*. Ames, Iowa State University, Cooperative Extension Service, 1979. 12 p.
9. GABRIEL, L.; BONELLI, G. & DIANZANI, M.U. Inhibition of colchicine binding to rat liver tubulin by aldehydes and by linoleic acid hidroperoxide. *Chemical-Biological Interactions*, 19:101-109. 1977.
10. HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. (ed.). *Seed biology*. New York, Academic Press, 1972, v. 3. p. 145-245.
11. KALOYEREAS, S.A. Rancidity as a factor in the loss of viability of pine and other seeds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 35:176-179. 1958.
12. KITAMURA, K.; DAVIES, C.S.; KAIZUMA, N. & NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seed. *Crop Sci.*, 23: 924-927. 1983.
13. MATHEWS, S. & POWELL, A.A. Electrol conductivity test. In: PERRY, D.A. (ed.). *Handbook of vigour test methods*. Zurich, International Testing Association, 1981. p. 37-42.
14. PRIESTLEY, D.A. & LEOPOLD, A.C. Absence of lipid peroxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiology*, 65:245-248. 1980.
15. PRIESTLEY, D.A. & LEOPOLD, A.C. Lipid changes during natural aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum*, 59:467-470. 1983.
16. PRIESTLEY, D.A.; McBRIDE, M.B. & LEOPOLD, A.C. Tocopherol and organic free radical levels in soybean seed during natural and accelerated aging. *Plant Physiology*, 66:715-719. 1980.
17. QUEIROZ, E.E.; NEUMAIER, N.; TORRES, E.; TERAZAWA, E.; PALHANO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; BIACHETTI, A. & YAMASHITA, J. *Recomendações técnicas para a colheita da soja*. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 1978. 32 p.
18. REZENDE, S.I. *Efeito da Eliminação Genética das Lipoxigenases L1 e L3 e das Características Físicas no Teor de n-Hexanal em Grãos de Soja*. Viçosa. Imprensa Universitária, 1986. 41 p. (Tese de Mestrado).
19. SEDIYAMA, T.; ARANTES, N.E.; REIS, M.S. & DHINGRA, O.D. Estudos das condições agrônomicas das lavouras de soja do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Minas Gerais. 1977/88. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PESQUISA DE SOJA. 1., Londrina. Anais... Londrina, EMBRAPA/CNPSoja, 1979. v. 1. p. 341-350.

20. STEWART, R.R.C. & BEWLEY, J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65:245-248. 1980.
21. TAPPEL, A.L. Hematin Compounds and Lipoxidase as Biocatalysts. In: SCHULTZ, W.H. (ed.). SIMPOSIUM ON FOODS. Westport, AVI Publishing Company, 1962. p. 122-138.
22. WILSON, D.O.Jr. & McDONALD, M.B.Jr. The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Science and Technology*, 14:269-300. 1986.