



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JOSÉ LEONARDO BRUNO

**ACÚMULO DE MASSA FRESCA E DE ÓLEO EM SEMENTES  
DE SOJA CULTIVADAS *IN VITRO***

---

Londrina  
2013

JOSÉ LEONARDO BRUNO

ACÚMULO DE MASSA FRESCA E DE ÓLEO EM SEMENTES  
DE SOJA CULTIVADAS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, na área de Geração e Caracterização de Matéria-prima.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egidio  
Cavenaghi Prete

Londrina  
2013

JOSÉ LEONARDO BRUNO

**ACÚMULO DE MASSA FRESCA E DE ÓLEO EM SEMENTES DE  
SOJA CULTIVADAS IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para a obtenção de título de Mestre em Bioenergia, na área de Geração e Caracterização de Matéria prima.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi  
Prete  
Universidade Estadual de Londrina- UEL

---

Profa. Dra. Cristiane de Conti Medina  
Universidade Estadual de Londrina- UEL

---

Dr. Mateus Carvalho Basílio de Azevedo  
Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR -  
Londrina

Londrina, 22 de março de 2013.

Este trabalho é dedicado à minha esposa e sempre companheira Márcia e aos meus filhos; que Deus esteja sempre presente em nossas vidas.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter colocado pessoas tão especiais na minha caminhada; sem Ele nada seria possível.

Agradeço a todas as pessoas e instituições que direta e indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete, pelo incentivo, paciência, confiança e esmerosa orientação, que tanto contribuiu para conclusão deste trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina - UEL, pelo apoio de todos os professores e pelos laboratórios que foram colocados à inteira disposição.

A Embrapa Soja, pelo fornecimento das cultivares de soja usadas neste trabalho.

Ao Centro de Ciências Exatas - CCE e ao Programa de Bioenergia na pessoa da prof. Dr<sup>a</sup> Carmen Luisa Barbosa Guedes, pelo total apoio das atividades institucionais e interinstitucionais.

Ao Centro de Ciências Agrárias - CCA, pelo uso dos laboratórios e casa de vegetação.

Ao prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria e ao Técnico de Laboratório Geraldo, pelas dicas e orientações para realização do cultivo *in vitro*.

Aos amigos Adriano Thibes Hoshino e Nátali Maindl de Souza, pela ajuda imprescindível na avaliação das análises estatísticas.

Aos técnicos e amigos Davi, José, João e Márcio, pelo apoio nos laboratórios de Entomologia, Fitopatologia e Solos.

A todos amigos do Mestrado em Bioenergia pela interação e apoio nas atividades curriculares e viagens para realização das disciplinas fora de nossa Universidade.

À Fazenda Escola – FAZESC, na pessoa do prof. Dr Caio Abércio da Silva, pelo apoio; e a todos os amigos que direta e indiretamente contribuíram dia a dia para realização das atividades deste trabalho.

À minha esposa Márcia Aparecida da Silva Bruno, meus filhos Guilherme Henrique Bruno, Matheus Vinícius Bruno e Gabriela Beatriz Bruno, pelo apoio nas horas de maiores dificuldades, e compreensão pelas ausências nas viagens.

Aos meus pais, Pascoal Bruno e Joana da Silva Bruno, que mesmo na distância e compreensão da vida universitária, encontrava palavras de apoio e conselhos para não desistir de mais um sonho.

A todos meus irmãos, em especial meu irmão Vicente Ricardo Bruno, que em um momento de desistência da minha parte, ainda no colegial, na falta de dinheiro por parte de nossos pais, se prontificou a comprar livros para o término de meus estudos.

“O temor do SENHOR é o princípio do conhecimento; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução”.

Provérbios 1,7.

BRUNO, José Leonardo. **Acúmulo de massa fresca e de óleo em sementes de soja cultivadas *in vitro***. 2013. 44f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

A semente de soja apresenta, em média, 20% do peso em óleo e 40% em proteína. Estes teores podem sofrer influências, das condições ambientais durante o enchimento das sementes, produzindo modificações na sua composição química. Temperaturas mais altas promovem o acúmulo de proteína e temperaturas amenas favorecem o acúmulo de óleo. Em condições de cultivo *in vivo* é difícil controlar estes fatores. Neste sentido, o cultivo *in vitro* vem auxiliar a pesquisa, pois a semente pode ficar isolada da planta mãe em ambiente controlado. Com o objetivo de avaliar o cultivo *in vivo*, em casa de vegetação, e o cultivo *in vitro*, em laboratório, sementes imaturas das cultivares BRS 184 e BRS 282 foram removidas da planta mãe, no estágio R<sub>5</sub> e então cultivadas *in vitro*, com meio de cultura líquido, contendo, 20 mM, 40 mM e 60 mM de glutamina. As sementes foram cultivadas em frascos de vidro com agitação constante, por oito dias à temperatura de 25 ± 0,2 °C, com a concentração de sacarose de 204,5 mM. Decorrido o tempo de cultivo, foi determinado o ganho de massa de matéria fresca das sementes e posteriormente determinado o teor de óleo. O cultivo *in vitro* de sementes de soja proporcionou maior acúmulo de massa de matéria fresca que no cultivo *in vivo*. O acúmulo de óleo nas sementes de soja apresenta interações complexas, variando entre genótipo e condições ambientais tanto no cultivo *in vivo* quanto *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Glycine max*. Desenvolvimento da semente. Composição da semente. Glutamina

BRUNO, José Leonardo. **Accumulation of fresh and oil in soybean seeds cultivated in vitro**. 2013. 44p. Dissertation (Master in Bioenergy) - State University of Londrina, Londrina, 2013.

### **ABSTRACT**

The soybean seed presents around 20% of oil and 40% of protein. These levels, during the filling of the seeds, can be influenced by environmental conditions, where are produced changes on its chemical composition. The higher temperatures promote the accumulation of protein, and the moderate temperatures favor the oil accumulation. Under in vivo growing conditions the control of these factors is difficult. The in vitro procedure can help the research, because the seed can be isolated from the mother plant in controlled environment. The objective of this experiment was to evaluate the in vivo procedure, conducted in the greenhouse, and in vitro procedure, developed in the laboratory, where the immature seeds of the cultivars BRS 184 and BRS 282 were taken from the mother plant in R<sub>5</sub> stage, cultured in vitro, with a liquid culture medium containing 20 mM, 40 mM and 60 mM glutamine. The seeds were cultivated in glass bottles with a constant agitation, during eight days at 25 ± 0.2 °C, with a sucrose concentration of 204.5 mM. After eight days of cultivation the mass gain of the fresh seeds and after the oil content were determined. The in vitro cultivation of soybeans provides greater accumulation of fresh mass than the in vivo cultivation. The accumulation of oil in soybean seeds presents a complex interaction, ranging between the genotype and the environmental conditions, under in vivo and in vitro cultivation.

**Keywords:** Glycine max. Seed development. Seed composition. Glutamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Obtenção de sementes em casa de vegetação, em diferentes épocas de plantio. ....	23
<b>Figura 2-</b>	Sementes obtidas, das vagens do terço médio da planta, cultivada na casa de vegetação. ....	23
<b>Figura 3-</b>	Câmara de Fluxo Laminar, preparo dos tratamentos em condições estéril.....	26
<b>Figura 4-</b>	Filtragem da solução de glutamina na câmara de fluxo laminar no filtro CORNING (CA). ....	26
<b>Figura 5-</b>	Agitador Orbital, para cultivo <i>in vitro</i> com luz contínua, frascos de 300 ml contendo semente e tratamentos de glutamina a 100 rotações minuto <sup>-1</sup> , por oito dias. ....	27
<b>Figura 6-</b>	Sementes no meio de cultivo, com agitação constante, por oito dias.....	27
<b>Figura 7-</b>	Moagem da amostra de três grãos de soja após secagem.....	29
<b>Figura 8-</b>	Amostra em centrífuga a 1500 rotações minuto <sup>-1</sup> , com força gravitacional (FG) de 457.....	30
<b>Figura 9-</b>	Amostra (A), com solvente e massa de matéria, amostra (B) contra prova da amostra (A).....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Épocas e datas de semeadura em casa de vegetação, coleta de sementes para início ( <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> zero dia) e fim ( <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> oito dias) dos cultivos.....	24
<b>Tabela 2-</b>	Massa de matéria fresca, em gramas de sementes, das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , com doses de glutamina, na primeira época de semeadura. ....	31
<b>Tabela 3-</b>	Teor de óleo, em porcentagem (%), das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com doses de glutamina, na primeira época de semeadura.....	32
<b>Tabela 4-</b>	Massa de matéria fresca, em gramas de semente, das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com doses de glutamina, na segunda época de semeadura.....	33
<b>Tabela 5-</b>	Teor de óleo, em porcentagem (%), das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com doses de glutamina, na segunda época de semeadura.....	34
<b>Tabela 6-</b>	Massa de matéria fresca, em gramas de semente, das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com doses de glutamina na terceira época de semeadura. ....	35
<b>Tabela 7-</b>	Teor de óleo, em porcentagem (%), das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com doses de glutamina, na terceira época de semeadura.....	36
<b>Tabela 8-</b>	Teores médios de óleo <sup>1</sup> e proteína <sup>2</sup> , em porcentagem dos cultivos BRS 184 e BRS 282 cultivados em casa de vegetação em três épocas , E1 (semeado em 03/02/2011), E2 (semeado em 12/03/2012), E3 (semeado em 07/04/2012), Universidade Estadual de Londrina, 2012. ....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acetato de celulose
ANP	Agência Nacional de Petróleo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
mM	Mili-molar
MMF	Massa de Matéria Fresca

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1	IMPORTÂNCIA DA SOJA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	16
3.2	FATORES QUE INFLUEM NO TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA .....	17
3.3	CULTIVO DE SEMENTE DE SOJA <i>IN VITRO</i> .....	19
4.1	OBTENÇÃO DE SEMENTES .....	22
4.2	CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	24
4.3	DETERMINAÇÃO DA MASSA DA MATÉRIA FRESCA .....	27
4.4	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÓLEO .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da crise do petróleo nos últimos anos, aliada à demanda crescente por combustíveis e a preocupação com o meio ambiente, intensificou-se a pesquisa por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. Estas têm seu foco na produção de biocombustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, mas com a preocupação voltada para o meio ambiente.

Vários óleos vegetais já foram testados na preparação do biodiesel, tais como: canola, soja, pinhão-mansão, milho, girassol, mamona e algodão, entre outros, e cada um confere características específicas aos biocombustíveis.

Cada região possui aptidão para produção de determinadas espécies, sendo que na Europa predomina a produção e utilização de biodiesel de canola (*Brassica spp.*). O consumo de biodiesel no Brasil, em 2011, foi de 2,6 bilhões de litros, o que representou aumento de 3,3% em relação à 2010, e a matéria-prima principal foi a soja, a qual representou 80,6% do total de biodiesel produzido. Em dados atuais, a participação do óleo de soja na produção de biodiesel chegou a 73,44%, em setembro de 2012; esta diferença está, principalmente, relacionada ao valor agregado da soja nos últimos anos, (BRASIL, 2011; 2012a; 2012b).

Devido à sua composição química, diversidade de usos e lucratividade, a área cultivada com soja no Brasil na safra 2012/2013 ocupou 27,3 milhões de hectares, com produção prevista de 82,6 milhões de toneladas. É a principal cultura no Brasil, e o país poderá tornar-se o maior produtor mundial, pela primeira vez superando os Estados Unidos da América. A produtividade da cultura aumenta ano após ano, podendo alcançar a média de 3023 kg ha<sup>-1</sup>, na safra 2012/2013 (CONAB, 2013). No Estado do Paraná a produtividade prevista é de 3740 kg ha<sup>-1</sup>. Este aumento de produção de soja está associado à sua utilização como fonte de proteína, sendo o óleo um coproduto com alto valor agregado pela demanda e diversidade de uso (CONAB, 2013).

A semente de soja madura contém, aproximadamente, 40% de proteína, 20% de óleo, 17% de celulose e hemicelulose, 7% de açúcares, 5% de fibras e 6% de cinzas em base seca (KROBER e CARTER, 1962). A concentração de proteína e óleo na semente tem controle genético, mas sofre grande influência do meio ambiente (WILSON, 1982; BURTON, 1989).

Evidências sugerem que o crescimento e a composição da semente de soja são controlados pelo suprimento de assimilados, disponibilizados pela planta mãe. Desse modo, torna-se difícil avaliar a contribuição do genótipo e a influência das condições do ambiente no acúmulo de óleo nas sementes. Portanto, o cultivo de sementes *in vitro* em condições controladas, objetivo desse trabalho, permite estudos dos fatores que regulam o crescimento e a composição da semente de soja sem a interação com a planta mãe.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento de semente de dois cultivares de soja em cultivo *in vitro* e *in vivo*, determinando a acumulação de massa da matéria fresca e teores de óleo, em diferentes concentrações de glutamina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o acúmulo de óleo entre os cultivares BRS 184 e BRS 282.
- Avaliar o crescimento da semente das cultivares BRS 184 e BRS 282, no cultivo *in vitro*.
- Quantificar o acúmulo de óleo das cultivares BRS 184 e BRS 282.
- Comparar no cultivo *in vivo*, em casa de vegetação, o aumento da massa de matéria fresca e o teor de óleo das cultivares BRS 184 e BRS 282.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 IMPORTÂNCIA DA SOJA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A soja tem sua origem nas regiões central e norte da China, estando disponíveis descrições sobre a planta entre 3000 e 2000 a.C. A partir de 200 a.C., a soja foi introduzida na Coréia e no Japão (PROBST e JUDD, 1973).

Dentre as várias leguminosas tropicais e subtropicais cultivadas no Brasil, a soja destaca-se como uma das principais, econômica e nutricionalmente, em função do alto teor proteico das sementes (SCHRADER e THOMAS, 1981).

Com o aumento da demanda mundial por combustíveis, esforços políticos por desenvolvimento nos campos agrícola, social e também energético, favorecem também a pesquisa e o desenvolvimento da produção de biocombustíveis. A soja tem grande vantagem neste mercado, por ser cultivada em várias partes do país, tendo também uma grande estrutura de suporte à produção e pesquisa. O aumento da produção está associado à sua utilização como fonte de proteína, sendo o óleo um coproduto com alto valor agregado pela demanda e diversidade de uso. Levando-se em consideração que 90% do processo para produção de biodiesel dependem da matéria-prima, a qualidade desta torna-se fundamental. Atualmente, o uso de óleos vegetais transformados (transesterificados), tem sido uma alternativa na substituição de combustíveis derivados de petróleo, gerando impacto econômico, social e ambiental. O tipo de óleo a ser utilizado na produção do biodiesel depende de fatores geográficos, pois cada região produz um determinado tipo de óleo, segundo sua aptidão.

Neste contexto, o óleo de soja, que surgiu como um coproduto do processamento do farelo, tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos, servindo como fonte de matéria-prima para as indústrias química e alimentar.

A área cultivada com soja no Brasil ocupa, hoje, 27,3 milhões de hectares, com produção de 82,6 milhões de toneladas, tornando-se a principal cultura da safra 2012/13. O estado do Paraná é o segundo produtor nacional, com 4,7 milhões de hectares, e estimativa de produtividade de 3200 kg por hectare (CONAB, 2013). Em especial na Região Sul, onde o Paraná é o primeiro produtor, a participação do óleo de soja na produção de biodiesel é de 82,5%, segundo Boletim da ANP (Agência Nacional do Petróleo), do mês de outubro de 2012.

### 3.2 FATORES QUE INFLUEM NO TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA

As pesquisas em melhoramento genético da soja no Brasil têm seguido, basicamente, demandas tradicionais por aumento de produtividade e redução de custos na produção, sendo também marcadas pela busca de resistência às pragas e doenças, com pouca preocupação em relação as características químicas, físicas e biológicas da semente.

Durante muitas décadas os consumidores, dentre eles multinacionais exportadoras, procuravam simplesmente soja, depois passaram a buscar grãos que possuíssem um teor mínimo de óleo ou proteína. Atualmente, abre-se um mercado mais diversificado e exigente na procura de tipos especiais de soja, que contenham as características físicas, químicas e biológicas adequadas à determinados fins ou usos.

A semente de soja madura contém, aproximadamente, 40% de proteína, 20% de óleo, 17% de celulose e hemicelulose, 7% de açúcares, 5% de fibras e 6% de cinzas em base seca (KROBER e CARTER, 1962).

A semeadura da soja em determinada época pode expor as plantas a estresse ambiental no campo, durante os vários estádios vegetativos e/ ou reprodutivos, modificando sua composição química. Segundo Rao et al.(1993), as quantidades de óleo e proteínas também podem ser influenciadas pelo ambiente no qual o vegetal é cultivado.

Considerando que a cultura da soja é influenciada por diversos fatores ao longo de seu ciclo, é relevante destacar a escolha da época de semeadura, como fator cultural que, isoladamente, mais promove o desenvolvimento das plantas e a produção da lavoura (COSTA et al. 1995; MARCOS FILHO, 2005).

Estudos de Wilson et al.(1982) verificaram alteração no teor de óleo em condições de baixos níveis de manganês nas folhas (<10 ppm), tendo observado, ainda, que as condições climáticas e localização geográfica são fatores que influenciam os níveis de ácidos graxos no óleo de soja.

As mudanças de temperatura nos períodos de 20 a 30 e 30 a 40 dias antes da maturação dos grãos de soja exercem maior influência no acúmulo de óleo do que as ocorridas em outros períodos (HOWELL e CARTTER, 1953; FARACO et al., 1981).

Em trabalho sobre a influência da glutamina no incremento de

proteína e óleo em semente de soja, Pipolo (2002) sugere que a porcentagem de proteína na semente aumenta à medida que há uma maior disponibilidade de glutamina para a semente. Adicionalmente, as porcentagens de proteína e óleo são inversamente proporcionais, quando da variação nas concentrações de glutamina.

Vários autores estudaram a correlação inversa entre proteína e óleo nas sementes de soja (JOHNSON et al., 1955; KWON e TORRIE, 1964; THORNE e FEHR, 1970; HYMOWITZ et al., 1972; SIMPSON JUNIOR e WILCOX, 1983; BURTON, 1985).

Segundo Wilcox (1992) e Rao et al. (1993), as quantidades de óleo e proteínas também podem ser influenciadas pelo ambiente em que o vegetal é cultivado. Wilcox et al. (1974) concluíram que o retardamento da colheita não afetou o teor de proteína; porém, notaram aumento de 5%, em média, no teor de óleo. (DURIGAN et al., 1989) afirmaram que o retardamento de colheita afeta os teores de proteína e óleo.

A concentração de óleo em semente de soja, dentro do banco mundial de germoplasma, pode variar de 8,3% a 27,9%, com valor médio de 19,5% (WILCOX e GUODONG, 1997). Estes autores encontraram correlação genética negativa entre o teor de proteína e a produtividade, mas encontraram forte associação positiva entre o teor de óleo e produtividade. Na semente de soja, os principais ácidos graxos são: palmítico (16:0;11%), esteárico (18:0;4%), oleico (18:1;24%), linoleico (18:2;54%) e linolênico com (18:3;7%) (WILSON, 2004).

A composição química das sementes é o resultado do acúmulo de substâncias de reserva produzidas nos cotilédones durante o enchimento das sementes, nos estádios R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub> (FEHR e CAVINEES, 1977). O óleo apresenta um máximo ritmo de acumulação entre 20 e 40 dias após a floração, durante o estágio R<sub>5</sub> (WILSON, 2004).

O óleo de soja é rico em ácido linoleico e apresenta baixas quantidades de ácido linolênico, aproximadamente 6,5%. Ainda que a composição das sementes não apresente diferença considerável entre os cultivares atuais de soja, há um crescente entendimento de sua regulação gênica e a proporção entre os vários ácidos graxos que definem a qualidade, podendo ser modificada pelo melhoramento genético (WILSON, 2004).

Atualmente, estão sendo desenvolvidas cultivares com valor agregado, aumentando-se a concentração de determinados compostos, gerando

categorias como: alto oleico, baixo linolênico, baixo fitato, alta metionina.

As condições ambientais durante o enchimento das sementes produzem modificações na sua composição química. Dornbos e Mullen (1992) verificaram que o conteúdo de óleo aumenta com a temperatura média diária durante a etapa R<sub>5</sub> – R<sub>6</sub> até um ótimo entre 25 °C e 28 °C. Temperaturas mais altas promovem o acúmulo de proteína e temperaturas amenas favorecem o acúmulo de óleo. Entretanto, Piper e Boote (1999) verificaram que sob temperaturas médias próximas de 20 °C, as relações se invertem: quanto menor a temperatura, menores são os teores de óleo nas sementes de soja. Assim as relações causa-efeito sobre a mudança da temperatura e a qualidade não estão claras devido à pouca compreensão da interação genótipo e ambiente.

Em estudos realizado por Caneppele et al. (2012), nas regiões norte, sul, leste e oeste do Mato Grosso na safra de 2011, constatou-se que os teores de proteína e extrato etérico não apresentaram variabilidade significativa.

Sob condições de deficiência hídrica, a modificação no conteúdo de óleo é mais sensível que as que ocorrem com o teor de proteína (ROSE, 1988). Estresse hídrico nos estádios iniciais do enchimento da semente aumenta o teor de óleo, enquanto que se ocorrer nos estádios finais diminui o teor de óleo, aumentando o de proteínas.

A dificuldade de isolar esses fatores no campo, estimulam o estudo destes através do cultivo *in vitro*, auxiliando a compreensão das bases funcionais das respostas sobre a qualidade e composição das sementes.

### 3.3 CULTIVO DE SEMENTE DE SOJA *IN VITRO*

Cultivar células e tecidos significa, em síntese, manter vivos células e tecidos retirados de um organismo. Essa manutenção, geralmente, é feita em tubos de ensaio, garrafas ou placas de petri em ambiente estéril (livre de contaminação por microrganismos), contendo um meio de cultura nutritivo. O uso original de recipiente de vidro deu surgimento à expressão *in vitro*.

A cultura de tecidos vegetais é feita de explantes, que é todo segmentado de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*, podendo ser um fragmento de folha, raiz, de caule ou de qualquer tecido que

responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (THORNE, 1981).

O cultivo de sementes *in vitro* em condições controladas, permite estudo dos fatores que regulam o crescimento e a composição da semente de soja sem a interação com a planta mãe, a qual exerce total controle na disponibilidade destes assimilados para a semente (OBENDORF et al, 1983). Segundo o mesmo autor, uma das maneiras de diminuir as dificuldades é isolar os frutos em formação e cultivá-los em meio artificial adequado. Outra técnica é o cultivo de cotilédones imaturos, desenvolvida por Thompson et al. (1977). Tem-se também como alternativa o cultivo de explantes de frutos, conforme descreveram Mosquim e Sodek (1991).

Trabalhos de Thompson et al. (1977) e Obendorf e Wettlaufer (1984) demonstraram, ainda, que a semente de soja apresenta desenvolvimento normal em condições *in vitro* a partir de um conjunto simples de materiais. Sacarose é a forma primária de translocação de carboidratos, tendo papel fundamental na partição do carbono para síntese de proteína e óleo. Por outro lado, as principais fontes de nitrogênio que suprem o crescimento da semente e síntese das proteínas de armazenamento, são: glutamina contribuindo com 55% do N da semente, e asparagina contribuindo com 20%. Os mesmos autores constataram também que as concentrações de glutamina de 31, 62,5 e 125 mM tiveram pouco efeito no acúmulo de matéria seca em cotilédones de soja cultivados *in vitro*, mas a concentração de proteína foi máxima em 62 mM.

Avaliando no cultivo *in vitro* a necessidade de carbono e nitrogênio em semente de soja, com níveis de sacarose, Saravitz e Raper Jr (1995) determinaram que o acúmulo máximo de matéria seca ocorreu quando as sementes foram cultivadas com 120 mM de sacarose e 6,0 mM de glutamina. O aumento da disponibilidade de glutamina elevou a concentração de proteína sem o aumento da matéria seca, decrescendo a concentração de óleo.

Em princípio, Pipolo (2002) concorda que os teores de óleo e proteína dos grãos de soja são governados geneticamente; porém, fortemente influenciados pelo ambiente. Em estudos observando o desenvolvimento das sementes em cultivo *in vitro*, a partir do estágio R<sub>5</sub>, com temperatura variando entre 21 e 29 °C, o autor verificou que as concentrações de proteína e óleo e a taxa de acúmulo de massa seca não apresentaram diferenças significativas.

O suprimento de N no crescimento de sementes de soja cultivadas *in vitro*, e a concentração de N tiveram pouco efeito no acúmulo de matéria seca; mas o seu acúmulo em proporção direta à concentração de N no meio e a concentração de óleo decresceu (HAYATI et al., 1996).

Avaliando em cultivo *in vitro* os teores de óleo e massa fresca das sementes, Santos et al. (2010) constataram que em uma mesma cultivar não houve diferença estatística nas concentrações de 20 mM, 40 mM e 60 mM de glutamina. Porém, quando compararam cultivares, o ganho de massa fresca nas concentrações de 40 mM e 60 mM de glutamina foi mais intenso na cultivar CD 206 que na CD 202. Para a concentração de óleo, verificaram que houve aumento para o tratamento de 20 mM de glutamina, sendo a cultivar CD 202 superior em todos os tratamentos, com acúmulo maior em relação a CD 206. As diferenças entre tratamentos de glutamina e cultivares são apresentadas em diversos trabalhos, com isso intensificam-se as pesquisas sobre estas diferenças e interações no cultivo *in vitro*.

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido na Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Foram realizados três ensaios em três épocas distintas para o suprimento de sementes, com delineamento experimental inteiramente aleatorizado, com esquema fatorial 2 x 5, com 5 repetições. O fator A consistiu em duas cultivares de soja e o fator B em três níveis de glutamina (20, 40 e 60 mM) disponíveis nas soluções de cultivo *in vitro*, além de dois tratamentos cultivados *in vivo*, ou seja, sementes conduzidas na planta-mãe em casa de vegetação e colhidas a zero e oito dias.

#### 4.1 OBTENÇÃO DE SEMENTES

As cultivares selecionadas foram a BRS 184 (FT Guaíra x 13 c) de ciclo semiprecoce com 24,2% de óleo e BRS 282 (Embrapa 48 x BR94-23316) de ciclo semiprecoce com 18,6% de óleo (EMBRAPA, 2011). As sementes foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos com volume de nove litros, empregando solo de área não agrícola, coletado na profundidade de dois metros. Seguindo análise de solo, utilizou-se a adubação de 30 g da formulação 04-14-08 (nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente) por vaso. As sementeiras foram realizadas com intervalos de alguns dias (Tabela 1) para proporcionar contínuo suprimento de sementes imaturas para uso no experimento de cultivo *in vitro* e *in vivo*, tendo sido conduzidas três plantas por vaso, observado na figura 1. As práticas culturais adotadas foram semelhantes para ambas as cultivares. De acordo com as necessidades hídricas da planta e determinadas pelo ambiente, procedeu-se irrigação diária do solo.

Vagens do terço médio da planta com três sementes foram removidas quatro a cinco semanas depois do florescimento (fase linear do crescimento da semente), conforme figura 2, quando se apresentavam totalmente alongadas e as sementes ocupando entre 70% a 90% do lúmen da vagem, sendo este o estágio R<sub>5</sub>, quando vistas contra a luz. As sementes no estágio R<sub>5</sub> foram submetidas ao desenvolvimento *in vitro* por oito dias, nos teores de glutamina descritos acima. As plantas mantiveram o desenvolvimento em casa de vegetação e ao fim do período de oito dias, foram coletadas sementes das vagens do terço médio da planta *in vivo*, com objetivo de comparação com os tratamentos *in vitro*. As sementes do cultivo *in vitro* e *in vivo* foram submetidas à determinação de peso de massa de matéria fresca e dos teores de óleo.

**Figura 1-** Obtenção de sementes em casa de vegetação, em diferentes épocas de plantio.



**Figura 2-** Sementes obtidas, das vagens do terço médio da planta, cultivada na casa de vegetação.



**Tabela 1-** Épocas e datas de semeadura em casa de vegetação, coleta de sementes para início (*in vivo* e *in vitro* zero dia) e fim (*in vitro* e *in vivo* oito dias) dos cultivos

Época	Semeadura	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> zero dia	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> 8 dias
1º	03/02/2012	10/04/2012	18/04/2012
2º	12/03/2012	22/05/2012	30/05/2012
3º	07/04/2012	05/06/2012	13/06/2012

#### 4.2 CULTIVO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* foi realizado conforme metodologia descrita por Pipolo (2002). Preparou-se meio de cultura nas seguintes concentração (mM) dos componentes: KCL, 10; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 8.0; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,499; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.150; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.0025; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2.99; KI, 0.005; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,100; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.001; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.100; Na EDTA, 0.1; glycina, 0.027; ácido nicotínico, 0.004; tiamina HCL, 0.001; piridoxina HCL, 0.0005 e mio-inositol, 0.555, (OBENDORF, 1983). Foram confeccionados cinco litros de solução estoque, sem a adição de sacarose e mio-inositol, para não ocorrer contaminação, sendo este meio de cultura armazenado em geladeira.

No dia da instalação dos cultivos, retirou-se do meio em estoque 500 mL, adicionando sacarose e mio-inositol; após, aferiu-se o pH do meio, que foi ajustado para 6,0. Para prevenir a germinação precoce das sementes, a concentração de sacarose foi de 204,5 mM, como preconiza Obendorf e Wettlaufer (1984).

Em cada frascos de vidro com capacidade de 300 mL, foram adicionados 10 mL do meio de cultura completo com a sacarose e o mio-inositol, posteriormente autoclavados a 121 °C e 18 PSI por 20 minutos. Após a retirada da autoclave, os frascos contendo o meio de cultura foram levados para a câmara de fluxo laminar, conforme figura 3, onde permaneceram por cerca de meia hora, para que ocorresse o resfriamento. Após resfriamento, foram adicionados os tratamentos nas três concentrações de glutamina 20, 40 e 60 mM, cada um com sua respectiva concentração diluída em 50 mL de água destilada e autoclavada. A solução foi esterilizada por ultrafiltração com filtro da marca CORNING 430320 de 22 micras CA (Cellulose Acetate) figura 4, pois a glutamina não pode ser autoclavada, sendo a alta

temperatura prejudicial na preservação de suas características. Posteriormente foram adicionados quatro mL da glutamina ultrafiltrada, em cada frasco.

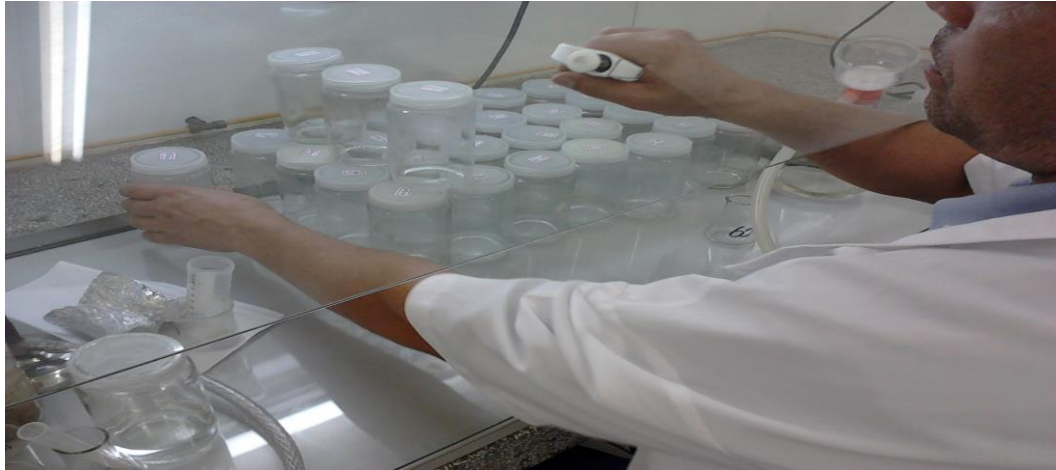
Com as plantas no estágio R<sub>5</sub>, foram coletadas as vagens do terço médio da planta e esterilizadas, utilizando-se do seguinte procedimento: em constante agitação, as vagens foram submersas em recipiente com 200 mL de água com 10 gotas de detergente líquido, durante três minutos, lavadas três vezes em água destilada, e imersas por 15 minutos em 200 mL de hipoclorito de sódio e cinco mL de dióxido de cloro 5%, diluídos em 100 mL de água.

Na câmara de fluxo laminar esterilizada a solução foi descartada e as vagens lavadas 5 vezes com água destilada. Em condição estéril, com o auxílio de tesoura e pinça, as sementes foram retiradas das vagens, buscando não danificá-las, e colocadas em placa de petri na solução de 20 mL de água destilada e autoclavada com um mL de dióxido de cloro 5%, por cinco minutos. Depois disso, foram colocadas três sementes em cada frasco, sendo que cada frasco foi encerrado com tampa transparente, lacrado com filme plástico, de modo a garantir isolamento do meio de cultivo do ambiente .

As sementes foram cultivadas em temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  em ambiente com luz contínua de lâmpadas fluorescentes compactas modelo spiralux 23w 6400k 127v, acondicionadas sobre o agitador orbital (orbital ma 140) figura 5. O aparelho foi envolto por uma estrutura de papelão, revestido internamente com papel refletivo, para proporcionar melhor distribuição da luz onde se encontrava os frascos do experimento, evitando-se também a passagem de luz externa ou penumbra, mantendo assim a quantidade de luz constante por todo o período. A mesa estava regulada para agitar os frascos na frequência constante de  $100\text{ rotações minuto}^{-1}$ .

Após todos os procedimentos descritos, as sementes foram mantidas nos frascos, em meio de cultivo, por oito dias conforme figura 6.

**Figura 3-** Câmara de Fluxo Laminar, preparo dos tratamentos em condições estéreis.



**Figura 4-** Filtragem da solução de glutamina na câmara de fluxo laminar no filtro CORNING (CA).



**Figura 5-** Agitador Orbital, para cultivo *in vitro* com luz contínua, frascos de 300 ml contendo semente e tratamentos de glutamina a 100 rotações minuto<sup>-1</sup>, por oito dias.



**Figura 6-** Sementes no meio de cultivo, com agitação constante, por oito dias.



### 4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA DA MATÉRIA FRESCA

Para determinação da massa da matéria fresca MMF das sementes, os frascos com meio de cultura foram pesados antes e após as sementes serem colocadas, no intuito de se obter a massa inicial da semente. Ao final de cada experimento, com oito dias de cultivo, as três sementes foram retiradas dos frascos, enxugadas em papel toalha e tiveram sua massa final determinadas. O acúmulo de massa de matéria fresca foi determinado a partir da diferença de valores da massa final em relação a massa inicial. Já as sementes do cultivo *in vivo*, foram retiradas também da planta-mãe e tiveram suas massas determinadas diretamente, sendo um com zero dias, ocorrendo no mesmo dia em que se iniciou o cultivo *in vitro*, e outro com oito dias após o término do cultivo *in vitro*.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÓLEO

A concentração de óleo foi determinada conforme descrito por Sasser (1990); Thomas (2001); Pipolo (2002). Após determinação da massa da matéria fresca, as sementes foram secas em estufa com temperatura controlada a 35 °C por 24 horas, depois foram moídas manualmente em cadinhos de porcelana observado na figura 7 e colocadas em tubos de ensaio de 15 mL com tampa. As amostras foram cobertas com 2,5 mL de hexano, 2,5 mL tercbutil metil éter 99,5%. A amostra foi homogeneizada por agitação, através do vórtex por dois minutos e deixada em repouso por 24 horas a 25 °C.

Após este período, os tubos contendo as amostras foram homogeneizados novamente por dois minutos e então centrifugados por 10 minutos a 1500 rotações minuto<sup>-1</sup>, com força gravitacional (FG) de 457 conforme figura 8. Quando centrifugada, a parte sólida da amostra que no caso é a massa da semente da qual está sendo extraído o óleo ou sendo desengordurada, fica totalmente no fundo do frasco, facilitando a remoção de parte do solvente com pipeta de Pasteur. Por questões de confiabilidade na determinação dos resultados, não se deve fazer a retirada por completo do solvente, pois pode ocorrer arrasto de partículas mais finas das sementes, podendo causar alterações na amostra contendo o óleo que foi extraído. Todo solvente retirado de cada amostra foi acondicionado em outro tubo de ensaio de 15 mL, para se obter uma contra prova da amostra observado na figura 9.

Em seguida, foram adicionados mais 2,5 mL de cada solvente à amostra, repetindo o processo por três vezes, sendo que a segunda e a terceira extração contaram com os tubos em repouso por quatro horas.

Depois da terceira extração, a amostra desengordurada contendo o solvente remanescente foi colocada em estufa, permanecendo por 12 horas a 35 °C, para a evaporação completa dos solventes.

O conteúdo de óleo foi determinado como a diferença de massa entre a amostra inicial e o farelo remanescente depois da extração. A concentração de óleo foi expressa como a quantidade de óleo em 100 mg de amostra inicial. Já as amostras para a contra prova foram colocadas em bloco digestor à temperatura de 50 °C até a total evaporação dos solventes. Deste modo, restando apenas o óleo nos tubos, estes tiveram as suas massas determinadas.

**Figura 7-** Moagem da amostra de três grãos de soja após secagem.



**Figura 8-** Amostra em centrífuga a 1500 rotações minuto<sup>-1</sup>, com força gravitacional (FG) de 457.



**Figura 9-** Amostra (A), com solvente e massa de matéria, amostra (B) contra prova da amostra (A).



## 5 RESULTADOS

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de massa de matéria fresca, obtidos no primeiro experimento, com sementes provenientes da primeira época de semeadura.

**Tabela 2-** Massa de matéria fresca, em gramas de sementes, das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas *in vitro* e *in vivo*, com doses de glutamina, na primeira época de semeadura.

cultivar	<i>in vivo</i> zero dia	<i>in vitro</i> dose de glutamina			<i>in vivo</i> oito dias	média
		20 mM	40 mM	60 mM		
BRS 184	0,17 Ac	0,38 Aa	0,30 Ab	0,22 Abc	0,21 Ac	0,26 A
BRS 282	0,17 Aa	0,23 Ba	0,19 Ba	0,21 Aa	0,19 Aa	0,20 B
média	0,17 c	0,31 a	0,24 b	0,22 bc	0,20 bc	

Coeficiente de Variação (CV) % = 18,46

\* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na avaliação dos teores de massa de matéria fresca, das cultivares BRS 184 e BRS 282, primeira época, foi encontrado estatisticamente um acúmulo superior para a cultivar BRS 184. Salienta-se que as duas cultivares apresentavam teores semelhantes na época de retirada das sementes da planta-mãe.

No cultivo *in vitro*, a cultivar BRS 184 foi notadamente superior a cultivar BRS 282 nos tratamentos de 20 mM e 40 mM.

No cultivo *in vivo*, as duas cultivares não diferiram estatisticamente entre si, tanto a zero, quanto a oito dias.

Entre os tratamentos aplicados à cultivar BRS 184, o que mais se destacou foi o de cultivo *in vitro*, com 20 mM de glutamina, sendo superior a todos os tratamentos, inclusive quando comparado ao cultivo *in vivo*. Este tratamento também foi estatisticamente superior aos demais, considerando-se a média das duas cultivares.

Na Tabela 3, são apresentados os resultados de teores de óleo, obtidos no primeiro experimento, com sementes provenientes da primeira época de semeadura.

**Tabela 3-** Teor de óleo, em porcentagem (%), das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas *in vitro* e *in vivo* com doses de glutamina, na primeira época de semeadura.

cultivar	<i>in vivo</i> zero dia	in vitro dose de glutamina			<i>in vivo</i> oito dias	média
		20 mM	40 mM	60 mM		
BRS 184	11,7 0 Ab	18,53Aa	11,56 Bb	13,54 Bb	20,36 Aa	15,14 B
BRS 282	14,56 Ab	18,26Aab	17,98Aab	18,42 Aab	19,85 Aa	17,81 A
média	13,13 c	18,40 ab	14,77 c	15,98 bc	20,11a	

CV% = 15,28

\* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quando comparadas as cultivares, BRS 282 acumulou maior porcentagem de óleo que a cultivar BRS 184. Quando da retirada de sementes das plantas, o teor inicial de óleo era maior na BRS 282. Durante o cultivo *in vivo* na casa de vegetação, a cultivar BRS 184 acúmulo mais óleo que a cultivar BRS 282.

Ao compararmos cultivo *in vivo* com cultivo *in vitro*, notamos que as cultivares BRS 184 e BRS 282 acumularam teores de óleo de maneira diferencial no cultivo *in vitro*.

A concentração do meio de cultivo com 20 mM de glutamina, foi a que proporcionou o maior acúmulo de óleo, notadamente para a BRS 184. Nas concentrações de 40 mM e 60mM, o acúmulo de óleo nessa cultivar foi prejudicado, o que não ocorreu com a cultivar BRS 282.

O melhor tratamento para a característica *in vitro*, foi na concentração de 20 mM de glutamina.

Após oito dias na casa de vegetação, o cultivo *in vivo* proporcionou os maiores acúmulos de óleo nas sementes, não havendo diferença estatística entre as cultivares.

Na tabela 4, são encontrados os resultados de massa de matéria fresca obtidos no segundo experimento, com sementes provenientes da segunda época de semeadura.

**Tabela 4-** Massa de matéria fresca, em gramas de semente, das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas *in vitro* e *in vivo* com doses de glutamina, na segunda época de semeadura.

cultivar	in vivo zero dia	dose de glutamina <i>in vitro</i>			in vivo oito dias	média
		20 mM	40 mM	60 mM		
BRS 184	0,20 Ac	0,25 Ab	0,23 Abc	0,23 Abc	0,30 Aa	0,24 A
BRS 282	0,18 Ac	0,24 Aab	0,21 Abc	0,20 Bc	0,28 Aa	0,22 B
média	0,19 c	0,25 b	0,22 bc	0,21 c	0,29 a	

CV% = 10,34

\*Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na avaliação dos teores de massa de matéria fresca entre as cultivares BRS 184 e BRS 282, a cultivar BRS 184 foi, na média superior estatisticamente. Nota-se que a cultivar BRS 184 não possuía massa maior que a BRS 282, quando da retirada das sementes na planta mãe. A cultivar BRS 184, foi superior estatisticamente também no tratamento de 60 mM.

No tratamento *in vitro*, a concentração de 20 mM de glutamina, foi superior aos tratamentos de 60 mM e *in vivo* zero dias. Quando são comparados todos os tratamentos, o cultivo *in vivo* e após oito dias, foi superior aos demais.

Na tabela 5 encontram-se os resultados de teores de óleo, obtidos no segundo experimento, com sementes provenientes da segunda época de semeadura.

**Tabela 5-** Teor de óleo, em porcentagem (%), das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas *in vitro* e *in vivo* com doses de glutamina, na segunda época de semeadura.

Cultivar	<i>in vivo</i> zero dia	dose de glutamina <i>in vitro</i>			<i>in vivo</i> oito dias	média
		20 mM	40 mM	60 mM		
BRS 184	14,83 Ab	14,96 Ab	14,74 Ab	19,19 Aa	17,53 Ba	16,25 A
BRS 282	16,29 Ab	14,69 Ab	15,51 Ab	16,51 Bb	19,22 Aa	16,45 A
Média	15,56 b	14,83 b	15,13 b	17,85 a	18,38 a	

CV% = 7,84

= Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na segunda época, quando se avaliou os teores de óleo entre as cultivares BRS 184 e BRS 282, não se observou diferença estatística entre elas. Foi observado diferença entre as duas cultivares no cultivo *in vitro*, no tratamento de glutamina na concentração de 60 mM, sendo a cultivar BRS 184 superior. Já no tratamento após oito dias *in vivo*, a cultivar BRS 282 foi superior à cultivar BRS 184.

O melhor tratamento para o cultivo *in vitro*, foi a concentração de 60 mM de glutamina.

No cultivo *in vivo*, o tratamento após oito dias, foi superior, principalmente para a cultivar BRS 282.

Na tabela 6 são apresentados os resultados de massa de matéria fresca, obtidos no terceiro experimento, com sementes provenientes da terceira época de semeadura.

**Tabela 6-** Massa de matéria fresca, em gramas de semente, das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas *in vitro* e *in vivo* com doses de glutamina na terceira época de semeadura.

cultivar	<i>in vivo</i> zero dia	dose de glutamina <i>in vitro</i>			<i>in vivo</i> oito dias	média
		20 mM	40 mM	60 mM		
BRS 184	0,21 Ac	0,28 Aa	0,24 Aab	0,22 Ac	0,25 Aab	0,24 A
BRS 282	0,18 Ab	0,30 Aa	0,23 Ab	0,19 Bb	0,22 Ab	0,22 B
média	0,19 c	0,29 a	0,23 b	0,21 bc	0,24 b	

CV% = 11,02

= Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na terceira época, comparou-se o acúmulo de massa de matéria fresca entre as cultivares BRS 184 e BRS 282, a cultivar BRS 184 obteve maior acúmulo, estatisticamente superior à BRS 282.

No cultivo *in vitro*, avaliando-se as duas cultivares, o maior ganho de massa de matéria fresca foi no tratamento com 20 mM de glutamina, apesar de não haver diferença estatística entre as duas cultivares neste tratamento.

A diferença estatística entre as cultivares, ocorreu no tratamento com 60 mM de glutamina, tendo a BRS 184 um maior acúmulo de massa fresca.

Quando comparados os dois cultivos *in vitro* e *in vivo*, o cultivo *in vitro* se destaca com a maior acumulação de massa, na concentração de 20 mM de glutamina sendo estatisticamente superior aos tratamentos *in vivo* zero dias e *in vitro* 60 mM.

Na tabela 7 encontram-se os resultados de teores de óleo, obtidos no terceiro experimento, com sementes provenientes da terceira época de semeadura.

**Tabela 7-** Teor de óleo, em porcentagem (%), das cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivadas *in vitro* e *in vivo* com doses de glutamina, na terceira época de semeadura.

cultivar	<i>in vivo</i> zero dia	dose de glutamina <i>in vitro</i>			<i>in vivo</i> oito dias	média
		20 mM	40 mM	60 mM		
BRS 184	18,19 Aab	16,33 Ab	17,81 Aab	17,91Aab	19,27 Aa	17,90 A
BRS 282	15,73 Bab	15,46 Ab	16,21 Aab	17,90 Aa	17,80Aab	16,62 B
média	16,96 ab	15,90 b	17,01 ab	17,90 a	18,54 a	

CV% = 7,69

\* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No acúmulo de óleo da terceira época, na comparação das duas cultivares, a BRS 184 foi estatisticamente superior à BRS 282. O teor de óleo inicial das sementes, imediatamente retiradas da planta, já era superior nesta cultivar BRS 184.

Dentro dos tratamentos, só houve diferença estatística no *tratamento in vivo*, imediatamente após a retirada das sementes, já tendo a cultivar BRS 184 maior teor de óleo que a cultivar BRS 282.

Quando são comparados os tratamentos *in vivo* e *in vitro*, observa-se que, para a cultivar BRS 184, o tratamento *in vivo* oito dias apresenta diferença estatística do 20 mM, com médias 19,27 e 16,33 %, respectivamente. Para a BRS 282, o tratamento de 60 mM foi estatisticamente superior ao 20 mM, com médias respectivas de 17,90 e 15,46 %.

## 6. DISCUSSÃO.

A escolha das cultivares BRS 184 e BRS 282 para a execução deste trabalho foi baseada no Boletim da EMBRAPA (Cultivares de Soja Região Centro-Sul do Brasil de 2011/2012). A cultivar BRS 184 apresenta grupo de maturação (GM) 6.7 e a BRS 282 G.M 6.9, ou seja, com ciclos muito próximos entre si. Isto foi confirmado nas três épocas de semeadura, pois os estádios R<sub>1</sub> (floração) das duas cultivares ocorreram simultaneamente. Além disso, as cultivares selecionadas apresentam teores de óleo contrastantes: BRS 184 com 24,24% e BRS 282 com 18,60% de teor médio de óleo; entretanto, esta diferença não foi observada nas três épocas de semeadura, já que os valores encontrados para a BRS 184 foi de 17,70% e para a BRS 282 de 16,67%, conforme tabela 8.

**Tabela 8-** Teores médios de óleo<sup>1</sup> e proteína<sup>2</sup>, em porcentagem dos cultivares BRS 184 e BRS 282 cultivados em casa de vegetação em três épocas, E1 (semeado em 03/02/2011), E2 (semeado em 12/03/2012), E3 (semeado em 07/04/2012), Universidade Estadual de Londrina, 2012.

cultivar		época 1	época 2	época3	média
BRS 184	óleo (%)	19,13	16,87	17,12	17,70
	proteína	38,66	39,34	39,17	39,06
BRS 282	óleo (%)	17,62	16,67	15,72	16,67
	proteína	37,69	39,63	41,66	39,66

(1) extraído pelo método Soxhlet

(2) extraído pelo método Kjeldahl

No Boletim da EMBRAPA (2011), os teores de proteína citados foram de 39% para BRS 184 e 40,7% para BRS 282, muito próximos dos obtidos neste trabalho, onde a cultivar BRS 184 apresentou 39% e BRS 282 39,6%.

Em consulta à Embrapa Soja, informação pessoal de Antônio Eduardo Pipolo, os teores médios de proteína e óleo constantes no documento, sobre Cultivares de Soja, são resultados da coleta de ensaios de valor de cultivo e uso realizados em todo o Brasil, e muitas vezes as cultivares estão presentes em regiões e anos diferentes. Isso é confirmado por Caneppele (2012) que em estudos

realizados nas regiões norte, sul, leste e oeste do Mato Grosso na safra de 2011 observou que os teores de proteína e extrato etéreo não apresentavam variabilidade significativa. Na tabela 8, também é possível ver a relação inversa entre os teores de óleo e proteína para as duas cultivares analisadas, concordando com os trabalhos de, Johnson et al., (1955); Kwon e Torrie (1964); Thorne e Fehr (1970); Hymowitz et al., (1972); Simpson Junior e Wilcox (1983); Burton (1985); Pipolo (2002); Santos et al., (2010).

Estudos de variabilidade dos teores de óleo e proteína em soja ainda são necessários para melhor compreensão da influência do ambiente e suas respostas na composição da semente de soja.

Para contornar os efeitos da variação de temperatura do ambiente de cultivo na fisiologia e no estado nutricional da planta, que têm influência direta no teor de óleo das sementes, realizou-se neste trabalho o cultivo *in vitro*. Foram retiradas as sementes da planta mãe na fase de máximo acúmulo de matéria fresca e colocadas em meio de cultura, para cultivo *in vitro* por apenas oito dias. Pode-se verificar o intenso crescimento das mesmas com significativo incremento da matéria fresca, conforme tabelas 2,4 e 6. Esse aumento foi observado com maior intensidade para a cultivar BRS 184, principalmente na primeira época de semeadura, para cultivo *in vitro*. Considerando-se somente o desenvolvimento na planta mãe ou cultivo *in vivo*, observa-se que houve maior acúmulo de matéria fresca na segunda época de semeadura. Apesar de selecionar as vagens e sementes uniformemente, ou seja, com peso médio de cada semente com, aproximadamente 180 miligramas, observa-se nas tabelas 2,4 e 6, que ocorreram variações de crescimento após oito dias, tanto para o cultivo *in vivo* quanto para o cultivo *in vitro*. Essas variações podem estar relacionadas com momentos fisiológicos ou expressões genéticas que se manifestam diferentemente, conforme o estágio de desenvolvimento da planta. Observa-se que a cultivar BRS 184, teve um crescimento mais intenso que a BRS 282, e que esta velocidade maior de crescimento manifesta-se com um menor ciclo de vida desta cultivar. A cultivar BRS 184 pertence ao grupo de maturação 6.7 e a cultivar BRS 282 ao grupo de maturação 6.9, mesmo elas tendo florescido na mesma data. O mesmo comportamento foi observado por Santos et al.,(2010), quando compararam os cultivares CD 202 e CD 206.

A determinação dos teores de óleo das sementes neste trabalho

seguiu a metodologia de, Sasser (1990); Thomas (2001); Pipolo (2002); Santos et al.,(2010), devido à pequena quantidade da amostra obtida em cada parcela experimental de, aproximadamente, 0,55 gramas. O momento da retirada da semente da planta mãe foi de 30 dias após o florescimento, ou seja, na fase máxima de acúmulo de óleo (WILSON, 2004).

O teor médio de óleo das sementes retiradas na primeira época de semeadura foi de 13,3%; na segunda, 15,55%; e na terceira, 16,96%. Após oito dias, estes valores apresentaram no cultivo *in vivo*, respectivamente, médias de 20,11%, 18,38% e 18,54%. Estes valores confirmam que as sementes foram retiradas no final do estágio R<sub>5</sub>, de máximo acúmulo de óleo. No cultivo *in vitro*, as sementes acumularam óleo de maneira diferencial, conforme a dose de glutamina do meio. Esperava-se que o aumento da dose de glutamina, fonte de nitrogênio, fosse aumentar o teor de proteína e, conseqüentemente, reduzir os teores de óleo, confirmando a correlação inversa entre estes compostos na semente de soja, (JOHNSON et al., 1955; KWON e TORRIE, 1964; THORNE e FEHR, 1970; HYMOWITZ et al., 1972; SIMPSON JUNIOR e WILCOX, 1983; BURTON, 1985). Isso foi confirmado somente no experimento realizado na primeira época. Na segunda e terceira épocas, conforme tabela 6 e 8, observa-se que o maior teor de óleo, no cultivo *in vitro*, foi obtido na concentração de 60 mM de glutamina, contrariando o esperado.

Comparando-se as cultivares, esperava-se um teor de óleo maior para a cultivar BRS 184, o que ocorreu somente na terceira época de semeadura. Na segunda época, os teores foram similares e na primeira, a cultivar BRS 282, apresentou maior teor de óleo, contrariando o esperado. Essas diferenças encontradas podem estar relacionadas à pequena quantidade das amostras, o que dificultou as análises. A dificuldade no cultivo *in vitro* esta relacionada com a ocorrência de contaminações, o que não ocorreu neste experimento, e com o pequeno número de sementes por amostra. Assim deve-se estar atento para aumentar o número de repetições visando reduzir os valores dos coeficientes de variação (CV), como os obtidos nos experimentos.

## 7 CONCLUSÃO

O cultivo *in vitro* de sementes de soja proporciona maior acúmulo de massa de matéria fresca, que o cultivo *in vivo*. O acúmulo de óleo nas sementes de soja apresenta interações complexas, variando entre genótipos e condições ambientais no cultivo *in vivo* e no cultivo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis. **EPE- Empresa de Pesquisa Energética**, p.32-34. 2012.
- BRASIL. Balanço Energético Nacional. **EPE- Empresa de Pesquisa Energética**, p.14. 2011.
- BRASIL. Boletim mensal de biodiesel. **ANP- Agência Nacional do Petróleo**, p.11. 2012.
- BURTON, J. W. Breeding soybean for improved protein quantity and quality. In: World Soybean Research Conference. **Boulder: Westview press**, v.3, p.361-367. 1985.
- BURTON, J. W. Breeding soybean cultivars for increase seed protein percentage. **World conference on soybean investigacion**, v.2, p.1079-1085. 1989.
- CANEPPELE, M. A. B.; P. J. ANDRADE ; O. B. PINTO JUNIOR. Variabilidade espacial da qualidade do grão de soja em Mato Grosso. **Universidade de Mato Grosso - UFMT, MT, Cuiabá. VI Congresso Brasileiro de Soja**. 2012.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2013, Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. **Companhia Nacional de Abastecimento**. , acesso em: 10 de janeiro de 2013. 2013.
- COSTA, N. P. F. N., J.B.; HENNING, A.A.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CABRAL, N.T.; MENDES, M.C. Efeito da época de semeadura sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja no Estado do Mato Grosso. **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, p.107-112. 1995.
- DORNBOS, D. L.; MULLEN R.E. Soybean and oil contents and fatty acid composition adjustment by drought and temperature. **Journal of American Oil Chemistuy Society**, v.59, p.230-232. 1992.
- DURIGAN, J. F.; A. L. SÁNCHEZ ; G. M. ASSIS. Respostas de genótipos de soja (Glycine max (L.) Merrill) ao retardamento de colheita quanto aos conteúdos de proteína e óleo da semente. **Científica**, v.17, p.121-125. 1989.
- EMBRAPA. Cultivares de soja 2011/2012 região Centro -Sul do Brasil **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, p.52. 2011.

FARACO, M. H.; R. M. MORAES; J. P. F. TEIXEIRA; M. T. R. SILVA ; H. A. A. MASCARENHAS. Influência de anos agrícolas sobre a composição e acúmulo de óleo em grãos de soja CV Santa Rosa In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA. **EMBRAPA/CNPQ**, v.1, p.544-553. 1981.

FEHR, W. R. ; C. E. CAVINEES. Stages of soybean development. Special Report 80. Cooperative Extension Service. **Agriculture and home economics exp. stn. Iowa State University, Ames, Iowa**, v.11, p.929-931. 1977.

HAYATI, R.; D. B. EGLI ; S. J. CRAFTS-BRANDNER. Carbon and nitrogen supply and seed growth in soybean: studies using an in vitro culture system. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.33-44. 1996.

HOWELL, R. W. ; J. L. CARTTER. Physiological factors affecting composition of soybeans. I - Response of oil and other constituents of soybeans to temperature under controlled conditions. **Agronomy Journal**, v.45, p.526-528. 1953.

HYMOWITZ, T.; F. I. COLLINS; J. PANCZNER ; W. M. WALKER. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p.613-616. 1972.

JOHNSON, H. W.; H. F. ROBINSON ; R. E. COMSTOCK. Genotypic and phenotypic correlations in soybeans and these implications in selection. **Agronomy journal**, v.47, p.477-483. 1955.

KROBER, O. A. ; J. C. CARTER. Quantitative interrelations of protein and nonprotein constituents of soybean. **Crop Science**, v.2, p.171-172. 1962.

KWON, S. H. ; J. H. TORRIE. Heritability and interrelationship among traits of two soybean populations. **Crop Science**, v.4, p.196-198. 1964.

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

MOSQUIM, P. R. ; L. SODEK. Culture of soybean fruit explants: growth conditions and efficiency of nitrogen sources for reserve protein synthesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.27, p.71-76. 1991.

OBENDORF, R. L. R., G.T.; BYRNE, M.C. Soy bean seed growth maturation by in vitro pod culture. **Annals of Botany**, v.51, p.217-227. 1983.

OBENDORF, R. L.; S. H. WETTLAUFER. Precocious germination during in vitro growth of soybean seeds. **Plant Physiology**, v.76, p.1024-1028. 1984.

PIPER, E. L. ; K. J. J. A. BOOTE. Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein percentages. **Oil Chem Soc**, v.76, p.1233-1241. 1999.

PIPOLO, A. E. Influência da temperatura sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja (*Glycine max* (L) Merrill). **Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP**, p.128. 2002.

PROBST, A. H. ; R. W. JUDD. Origin, US history, development and world distribution. In: CALDWELL, B.E. (Ed.) Soybeans: improvement, production and uses.: **American Society of Agronomy Madison**, p.1-19. 1973.

RAO, A. C. S.; J. L. V. K. SMITH; R. I. JANDHYALA ; J. F. PARR. Cultivar and climatic effects on the protein content of soft white winter wheat. **Agronomy Journal**, Madison, v.85, p.1023-1028. 1993.

ROSE, I. A. Effect of moisture stress on the oil and protein components of soybean seeds. **Australian T. Agric. Res**, v.39, p.163-170. 1988.

SANTOS, E. L.; A. E. PÍPOLO; R. T. FARIA ; C. E. C. PRETE. Influence of genotype on protein and oil concentration of soybean seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, p.793-799. 2010.

SARAVITZ, C. H. ; C. D. RAPER JUNIOR. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown in vitro. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.799-805. 1995.

SASSER, M. Identificatio of bacteria by gás chormatografia of cellular fatty acids. **MIDI, Technical Note 101**. 1990.

SCHRADER, L. E. ; R. J. THOMAS. Nitrate uptake reduction and transport in the whole plant. In Nitrogenand carbon metabolism. **ed J.D. Bewley**, p.49-93. 1981.

SIMPSON JUNIOR, A. M. ; J. R. WILCOX. Genetic and phenotypic associations of agronomic characteristics in four high protein soybean populations. **Crop Science, Madison**, v.23, p.1077-1081. 1983.

THOMAS, J. M. G. Impact of elevated temperature and carbon dioxide on development and composition of soybean seed. **Thesis (Ph.D) - University of Florida**, p.187. 2001.

THOMPSON, J. F.; J. T. MADISON ; A. E. MUENSTER. In vitro culture of immature cotyledons of soya bean [*Glycine Max* (L) Merrill]. **Annals of Botany**, v.41, p.29-49. 1977.

THORNE, J. C. ; W. R. FEHR. Incorporation of highprotein, exotic germplasm into soybean populations by 2 and 3-way crosses. **Crop Science, Madison**, v.10, p.652-655. 1970.

THORNE, J. H. Morphology and ultrastructure of maternal seed coat tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. **Plant Physiology**, p.67:1016-1025. 1981.

WILCOX, J. R. ; Z. GUODONG. Relationship between seed yield and seed protein in determinate and indeterminate soybean populations. **Crop Science**, v.37, p.361-364. 1997.

WILCOX, J. R.; F. A. LAVIOLETTE ; K. L. ATHOW. Deterioration of soybean seed quality associated with delayed harvest. **Plant Disease Reporter**, v.58, n.2, p.130-133. 1974.

WILCOX, J. R. C., Normal and low lenolenic acid soybean strains. Response to planting date. **Crop Science, Madison**, v.32, p.1248-1251. 1992.

WILSON, D. O. B., F. C.; OHKI, K.; PARKER, M. B.; SHUMAN, L. M.; JELLUM, M. D. . Changes in soy bean seed oil and protein as influenced by manganese nutrition. **Crop Science, Madison**, v.22, n. 5, p.948-952. 1982.

WILSON, R. E. Seed composition. In: Boerma H.R. and Specht J. E.. **Soybeans: improvement, production, and. uses**, p.621-677. 2004.