

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes**



**Tese**

**Folha viva, como critério de desfolha, para a produção de sementes de  
azevém anual, com elevado vigor**

**Alberto Bohn**

**Pelotas, dezembro de 2021**

**Alberto Bohn**

Engenheiro Agrônomo

**Folha viva, como critério de desfolha, para a produção de sementes de  
azevém anual, com elevado vigor**

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

Orientador: Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso

Pelotas, dezembro de 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B677f Bohn, Alberto

Folha viva, como critério de desfolha, para a produção de sementes de azevém anual, com elevado vigor / Alberto Bohn ; Carlos Eduardo da Silva Pedroso, orientador. – Pelotas, 2021.

45 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Forragem colhida. 2. Altura do resíduo. 3. Qualidade de sementes. 4. Envelhecimento acelerado. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Pedroso, Carlos Eduardo da Silva, orient. II. Título.

CDD : 631.521

**Alberto Bohn**

Engenheiro Agrônomo

**Folha viva, como critério de desfolha, para a produção de sementes de azevém anual, com elevado vigor**

**Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.**

**Data da Defesa: 17 de dezembro de 2021**

**Banca examinadora:**

.....  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso (Orientador)**  
**Doutor em Zootecnia pela, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)**

.....  
**Pesquisadora. Dr<sup>a</sup>. Andréa Mittelmann**  
**Doutora em Agronomia, pela Universidade de São Paulo (USP)**

.....  
**Dr<sup>a</sup>. Andréia da Silva Almeida**  
**Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)**

.....  
**Dr<sup>a</sup>. Andréa Noguez Bicca Martins**  
**Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)**

*Aos meus pais, Carlitos Bohn e Maria Jacinta Angst Bohn.  
Dedico*

## **Agradecimentos**

À Deus primeiramente, que me deu a vida. Meus pais, Carlitos Bohn e Maria Jacinta Angst Bohn e minhas irmãs Marise e seu marido (Dalmir), Ligia Bohn e seu filho Leonel. Todos os meus familiares, que me apoiaram incondicionalmente em toda minha trajetória profissional.

Meu agradecimento vai, também, em especial ao professor Carlos Eduardo da Silva Pedroso, que em todos os momentos da minha carreira, tanto no mestrado, como agora, neste momento me apoiou e orientou, para que, eu chegasse neste momento, com um grande conhecimento. Ao Gabriel Bortolin e sua namorada Yucélia, que me ajudaram a executar este trabalho e permitiram com que pudesse finalizar todas as etapas do processo. A todos os meus amigos, que fiz durante a minha jornada em Pelotas, muitos ficaram marcados na minha vida. Aos colegas e professores de Pós-Graduação, que me ajudaram e orientaram, de alguma forma ou outra, me incentivaram, meu muito obrigado.

## Resumo

BOHN, Alberto. **Folha viva, como critério de desfolha, para a produção de sementes de azevém anual, com elevado vigor.** 2021. Doutorado em Ciências – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O Azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) de suma importância forrageira em áreas de clima temperado. Sua distribuição expressiva, tem relativa contribuição para o desempenho de áreas do sistema de integração lavoura-pecuária. O presente estudo teve como objetivo, avaliar os efeitos gerados, pelo momento e intensidade da desfolha sobre a produção e qualidade de sementes de azevém anual – BRS Estações. A manutenção dos níveis 0, 25 e 50% da estatura inicial da planta no momento da desfolha caracterizaram a intensidade, enquanto os intervalos entre desfolhas foram dois, ou seja, o necessário para a expansão completa de duas e três folhas. Os resultados mostraram que maiores intensidades e menores momentos entre desfolhas possibilitaram maiores colheitas de forragem, próximas a 4.000 kg.ha<sup>-1</sup> de massa seca de forragem. Desfolhas intensas e pouco frequentes resultaram em alta produção de sementes (1.700 kg.ha<sup>-1</sup>). Todavia, quando executada com maior momento, reduziu de maneira expressiva o peso de mil sementes (P<0.001), e desfavoreceu a qualidade fisiológica, uma vez que, conteúdos superiores de amido e proteína (P>0.05), foram verificados em sementes oriundas de plantas mantidas com 50% de sua estatura após a desfolha. Quando houve menor intensidade de desfolha aumentou em mais de duas vezes a proporção de folhas no resíduo. Os maiores teores de amido e de proteína apresentaram elevada correlação com o resíduo de folhas vivas e com a germinação, o que demonstra o efeito marcante do manejo sobre o desempenho da semente. O teste de envelhecimento acelerado das sementes, foi importante para distinguir níveis de qualidade. Nesta avaliação, sementes oriundas de plantas mantidas com resíduo superior após a desfolha apresentaram uma taxa de peroxidação lipídica 26% inferior na comparação com o tratamento de maior intensidade, seguida de uma maior atividade e expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX (P<0.05). Plântulas com desempenho superior após a condução deste teste de vigor foram verificadas em sementes originadas de plantas submetidas à menor intensidade e maior intervalo de desfolha. De forma geral, a adoção de desfolhas que privilegiaram a manutenção de folhas no resíduo permitiu a obtenção de sementes de azevém anual com qualidade superior. A atividade antioxidante após o teste de envelhecimento mostrou alto potencial para determinar a qualidade das sementes de azevém anual.

**Palavras-chave:** forragem colhida, altura do resíduo, qualidade de sementes, envelhecimento acelerado, espécies reativas de oxigênio, atividade antioxidante

## Abstract

Bohn, Alberto. **Leaf stage, as a defoliation criterion, for the production of high vigour, ryegrass seeds.** 2021. Doctorate in Science – Postgraduate Program in Seed Science and Technology, Faculty of Agronomy “Eliseu Maciel”, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, 2021.

The annual ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) of paramount forage importance in temperate climate areas. Its expressive distribution has a relative contribution to the performance of areas of the crop-livestock integration system. The objective of this study, was to evaluate the effects generated by the interval and momently of defoliation on the production and quality of annual ryegrass seeds – BRS Estações. The maintenance of levels 0, 25 and 50% of the initial height of the plant at the time of defoliation characterized the intensity, while the intervals between defoliations were 2, that is, the necessary for the complete expansion of two and tree sheets. The results showed that higher intensities and shorter intervals between defoliations, allowed higher forage harvests, close to (4.0 ton.ha<sup>-1</sup>) of forage dry mass. Intense and infrequent defoliation resulted in high seed production (1.7 ton.ha<sup>-1</sup>). However, when performed with high frequency, it significantly reduced the weight of a thousand seeds ( $P < 0.001$ ) and disfavored the physiological quality, since higher starch and protein contents ( $P > 0.05$ ) were verified in seeds from plants maintained with 50% of your height after defoliation. When there was lower defoliation intensity, the proportion of leaves in the residue increased by more than twice. The highest levels of starch and protein showed a high correlation with the residue of live leaves and with germination, which demonstrates the marked effect of management on seed performance. The accelerated aging test of seeds was important to distinguish quality levels. In this evaluation, seeds from plants maintained with higher residue after defoliation showed a 26% lower lipid peroxidation rate compared to the higher intensity treatment, followed by greater activity and expression of the antioxidant enzymes SOD, CAT and APX ( $P < 0.05$ ). Seedlings with superior performance after conducting this vigor test were verified in seeds originating from plants subjected to lower intensity and greater defoliation interval. In general, the adoption of defoliation that favored the maintenance of leaves in the residue allowed obtaining higher quality annual ryegrass seeds. The antioxidant activity after the accelerated aging test showed high potential to determine the quality of annual ryegrass seeds.

**Keywords:** harvested forage, residual stuble height, seed quality, accelerated aging, reactive oxygen species, antioxidant activity



*“O sucesso não exige explicações, mas o fracasso não aceita desculpas”.*  
**Napoleon Hill**

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Desenvolvimento.....</b>	<b>12</b>
2.1 Introdução .....	12
2.2 Material e Métodos.....	13
2.2.1 Experimento no campo.....	13
2.2.1.1 Local.....	13
2.2.1.2 Semeadura e desfolha da pastagem.....	14
2.2.1.3 Produção de sementes.....	16
2.2.2 Composição bioquímica das sementes.....	17
2.2.2.1 Níveis de amido e de proteína das sementes colhidas.....	17
2.2.2.2 Qualidade fisiológica das sementes colhidas.....	18
2.2.2.3 Envelhecimento acelerado das sementes.....	18
2.2.3 Análise estatística.....	20
2.3 Resultados.....	20
2.3.1 Colheita de forragem e características estruturais das plantas.....	21
2.3.2 Produção e qualidade de sementes.....	23
2.3.2.1 Produção de sementes.....	23
2.3.2.2 Composição bioquímica da semente.....	25
2.3.2.3 Germinação das sementes.....	25
2.3.3 Vigor das sementes.....	27
2.3.3.1 Atividade antioxidante, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em sementes após o envelhecimento acelerado.....	27
2.3.3.2 Germinação das sementes e desempenho das plântulas após o envelhecimento acelerado.....	29
2.4 Discussão.....	33
<b>3.0 Conclusão.....</b>	<b>39</b>
<b>4.0 Referências.....</b>	<b>39</b>

## 1. Introdução

Azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) é uma espécie com exímio valor forrageiro em áreas de clima temperado. Sua expressiva produção de forragem contribui para o desempenho de áreas que comportam um sistema de integração lavoura-pecuária (OLIVEIRA et al. 2014; KUNRATH et al. 2020). Neste sistema, a obtenção de um “stand” adequado de plantas de azevém anual logo após o final do ciclo das culturas de estação quente, depende da utilização de sementes com elevada qualidade. Quando a opção é por sementes de baixa qualidade, falhas consideráveis no “stand”, seguidas da redução da velocidade no estabelecimento podem ser verificadas (TERNUS et al. 2018).

Obter sementes de azevém anual com elevado desempenho requer um eficiente manejo durante o sistema produtivo. A escolha pela densidade ideal de semeadura, assim como, o arranjo de plantas e a adubação nitrogenada, constituem fatores de expressiva contribuição neste processo (SIMIĆ et al. 2009, 2010, 2012; SVEČANJAK et al. 2020; BOHN et al. 2020). Somada a estes relevantes procedimentos, o emprego da desfolha, ato que permite a remoção de forragem, beneficia os atributos produtivos em plantas e incrementa a produção de sementes (ROLSTON et al. 2010, 2012; CUNHA et al. 2016; ANDERSON et al. 2019). No entanto, seus benefícios são dependentes da forma com que esta ferramenta é utilizada. Young III et al. (1996), por exemplo, verificaram a desfolha até cerca de um terço dos perfilhos primários perderem o seu meristema apical pode incrementar a produção de sementes. Ao estender a utilização da desfolha até o final de outubro, Rolston et al. (2012) verificaram o rendimento de sementes, de aproximadamente 1.17 ton.ha<sup>-1</sup>, em comparação com o fechamento no início do mesmo mês.

Assim como a data de encerramento da desfolha, a forma com que esta ferramenta é utilizada até esta data específica, pode afetar significativamente o desempenho das plantas na produção de sementes. Quando utilizada moderadamente, os benefícios são vinculados à qualidade superior da luz que atinge a base das plantas. Segundo Deregibus et al. (1983), o perfilhamento em azevém, é altamente influenciado pela qualidade da luz, uma vez que as plantas desenvolvem um maior número destas estruturas quando iluminadas por maiores proporções de vermelho/vermelho. No entanto, a utilização intensiva, ao

exemplo da manutenção de baixos resíduos, pode comprometer severamente a rebrota após a desfolha. Os colmos, defasados nesta condição, possuem uma importante função ao armazenar transitoriamente carboidratos quando a produção a partir da fonte é maior do que a procura da planta, o que promove estabilidade em uma possível redução da eficiência fotossintética (SLEWINSKI, 2012). Ao destacar a importância desta estrutura depois de seguidas desfolhas em festuca, Donaghy et al. (2008) mencionam que, o resíduo é o órgão primário no armazenamento de carboidratos solúveis em água (CSA). Neste trabalho, os autores verificaram que, efetuar a desfolha com base na completa expansão de novas folhas, mais precisamente de duas, maximizou a qualidade da forragem, permitiu a reposição da CSA a níveis pré-desfolha e resultou numa taxa satisfatória de rebrota.

O método baseado na completa expansão de um determinado número de folhas representa, uma interessante alternativa para maximizar a utilização de gramíneas de estação fria (LOAIZA et al. 2016; INSUA et al. 2019; KAUFONONGA et al. 2017). Ao justificar a condução de seu estudo com a escassez de maiores informações do emprego desta metodologia em azevém anual, Solomon et al. (2017) verificaram que o intervalo necessário para a expansão completa de 4 folhas e a manutenção de um resíduo de 10 cm maximizou a produtividade nesta espécie ao longo da época de crescimento, enquanto que, a utilização de um resíduo inferior (5 cm) reduziu seu desempenho. De modo geral, a adoção de uma nova desfolha a partir da completa expansão de duas até quatro folhas, parece beneficiar a capacidade de rebrota e maximizar o rendimento de gramíneas forrageiras de estação fria. Portanto, a otimização verificada a partir do emprego deste método sugere potencial de uso durante a condução da desfolha em um manejo que objetiva a produção de sementes com elevado desempenho.

Verificar o desempenho e determinar a qualidade de sementes de azevém anual, nem sempre, é passível apenas pelo uso do teste de germinação. Mesmo com um expressivo efeito sobre a produção de sementes, ao exemplo da avaliação de níveis de desfolha e de adubação nitrogenada, o percentual final de germinação se mantém elevado, independente do tratamento avaliado (CUNHA et al. 2016; BOHN et al. 2020). Para detecção de diferenças de qualidade não identificadas pelo teste de germinação em sementes de

gramíneas forrageiras de estação fria, a utilização de testes de vigor pode constituir uma importante ferramenta para este propósito (WANG et al. 2004; CAETANO et al. 2019). Eficiente em detectar a qualidade das sementes de várias espécies, o teste de envelhecimento acelerado, através do uso associado de elevada temperatura e umidade, é eficiente em simular uma condição desfavorável que a semente de azevém pode vir a encontrar quando semeada e detectar diferenças de qualidade (LOPES et al. 2009; TUNES et al. 2011).

Desempenho superior após o Envelhecimento Acelerado (EA), pode estar associado à eficiência do aparato antioxidante da semente em anular a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (PAGANO et al. 2019). Em revisão sobre o tema, Wang et al. (2014) relatam que, a quantidade de enzimas antioxidantes envolvidas na remoção de (ROS) estão correlacionadas com o vigor da semente. Neste caso a superóxido dismutase (SOD) é reconhecida por, catalisar a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . As enzimas Catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) agem na oxidação  $H_2O_2$ , transformando-o em  $H_2O$  e  $O_2$ . Isto proporcionará uma importante defesa primária contra os radicais livres (GILL; TUTEJA, 2010; DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Conforme detalhado até o momento, o manejo da desfolha com base na expansão de um determinado número de folhas, assim como, a altura do resíduo após o processo, influenciam a produção, e na qualidade das sementes de azevém anual, sendo a última, fator determinante na eficiência do (EA) e pelo desempenho da atividade antioxidante. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos ocasionados pela intensidade e momentos de desfolhas, sobre o desempenho e qualidade das sementes de azevém anual, assim como, o seu desempenho, após submissão ao teste de envelhecimento acelerado.

## 2. Desenvolvimento

### 2.1 Introdução

Azevém anual (*Lolium multiflorum* L.), é uma forrageira valorizada, especialmente em áreas temperadas onde contribui para a alimentação animal,

além de apresentar elevado desempenho em uma gama de sistemas de produção (de OLIVEIRA et al. 2014; KUNRATH et al. 2020). Nestes sistemas, a forma como a forragem é colhida, determina o desempenho da pastagem ao longo do ciclo de produção. O momento ideal da desfolha, é uma ferramenta que deve ser relacionada ao estado fisiológico da planta, deste modo, pode ser usada para melhorar a produção de forragem em gramíneas temperadas (INSUA et al. 2017; KAUFONONGA et al. 2017; LOAIZA et al. 2017).

A altura do resíduo, também desempenha um papel importante na rebrota, e, no rendimento anual da forragem da cultura, ao longo do ciclo de produção (SOLOMON et al. 2017). No entanto, estudos realizados no sul do Brasil, indicam que, o uso de desfolha, ferramenta utilizada no manejo de plantas dessa região, pode reduzir a produtividade de sementes de azevém, quando usado de forma intensiva (CUNHA et al. 2015). Young et al. (1996) descobriram que, a produção de sementes de azevém anual, não foi afetada pelo pastejo, até a remoção completa dos meristemas apicais dos perfilhos primários. Porém, os autores não avaliaram um possível efeito da altura do resíduo na produção subsequente de sementes. Alternativamente, Donaghy et al. (2008) relataram que, a altura do resíduo, é o principal fator que determina o armazenamento de carboidratos solúveis em água (CSA), necessários para o crescimento da planta, bem como, para a produção de sementes. Assim, o volume das lâminas foliares remanescentes após a desfolha pode determinar o rendimento e o vigor das sementes.

O teste de envelhecimento acelerado (EA) pode ser usado para medir o vigor da semente de azevém anual (LOPES et al. 2009; TUNES et al. 2011). O desempenho superior após o teste de (EA), está associado à eficiência da capacidade antioxidante da semente em inibir a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $OH^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (PAGANO et al. 2019). Em uma revisão sobre o tema, Wang et al. (2015) relataram que, o nível de enzimas antioxidantes envolvidas na remoção de (ROS), está correlacionado com o vigor da semente. Neste importante sistema fisiológico, a superóxido dismutase (SOD) é conhecida por catalisar a dismutação dos radicais superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . As enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) atuam na oxidação do  $H_2O_2$ , transformando-o em  $H_2O$  e  $O_2$ . O desempenho superior

do CAT também é um determinante do vigor da semente (TIMÓTEO; MARCOS-FILHO, 2013). Tal como, acontece com a atividade da CAT, cada mecanismo antioxidante fornece uma importante defesa primária contra ROS (GILL; TUTEJA, 2010; DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Apesar das informações consistentes sobre os impactos da intensidade e momentos de desfolha na produção de forragem, as pesquisas que avaliam os impactos desses fatores no rendimento e qualidade de sementes de azevém anual, permanecem escassas. A adaptação do uso dessa ferramenta, que leva em conta o estado fisiológico da planta, para a produção de sementes de azevém, poderia ajudar a superar a perda de rendimento de sementes, devido à desfoliação intensiva. Com base na pesquisa acima, este estudo, tem como objetivo, avaliar a produção de forragem e sementes de plantas e aspectos da fisiologia e bioquímica das sementes para determinar a combinação adequada de intensidade e o momento ideal de desfolha para obter sementes de azevém anual, de alta qualidade.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Experimento no campo

#### 2.2.1.1 Local

O experimento de campo foi conduzido em 2016 na unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Clima Temperado), localizada em Capão do Leão-RS (31°49'10.1"S, 52°27'46.2"W; 16 m acima do nível do mar). A região é classificada como do tipo Cfa (temperada e úmida com verões quentes), de acordo com a classificação de *Köppen*. Os dados meteorológicos foram registrados usando uma estação meteorológica automática situada próximo ao local experimental (Figura 1).

O solo no local é classificado como planosolo solódico eutrófico, e, é caracterizado por uma drenagem imperfeita a pobre, situado em uma área típica de várzea com relevo plano a suavemente ondulado. A camada superficial do solo é caracterizada por 46% de areia, 37% de silte e 17% de argila. Os atributos químicos mais relevantes são pH (em água) 5,7; P (Mehlich) 10,2 mg dm<sup>3</sup>; K 34 mg dm<sup>3</sup>; Al 0,1 cmol dm<sup>3</sup>; Ca 2,0 cmol dm<sup>3</sup>; Mg 1,05 cmol dm<sup>3</sup> e matéria orgânica do solo 1,5%. A calagem e a fertilização basal foram realizadas conforme recomendado para o azevém anual (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004).

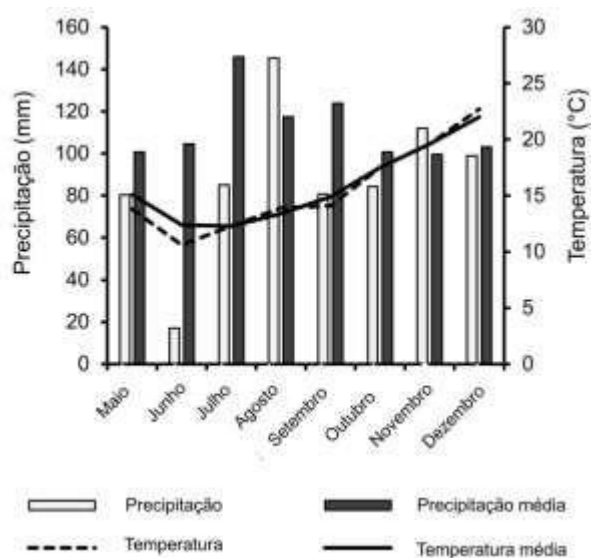


Figura 1 - Temperatura e precipitação ao longo do período experimental, assim como a média para verificada para estas variáveis climatológicas nos últimos trinta anos em Capão do Leão, RS-Brasil

#### 2.2.1.2 Semeadura e desfolha de pastagem

O local do estudo, que estava em pousio, estava coberto com espécies voluntárias. O glifosato [N-(fosfometil) glicina] foi aplicado para controlar as plantas existentes. A semeadura de azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) cv. BRS Estações, ocorreu em 20 de maio de 2016. Utilizou-se a densidade de 25 kg.ha<sup>-1</sup> de sementes puras viáveis e, logo após a semeadura, um rolo compactador foi utilizado. A área experimental foi delimitada no início da emergência das plântulas. Vinte e sete parcelas de 15 m<sup>2</sup> (3m x 5m) foram distribuídas aleatoriamente em três blocos.

Quando as plantas de todas as parcelas atingiram altura média de 20 cm, medida em 10 pontos aleatórios de cada parcela com régua, foram consideradas aptas para a primeira desfolha.



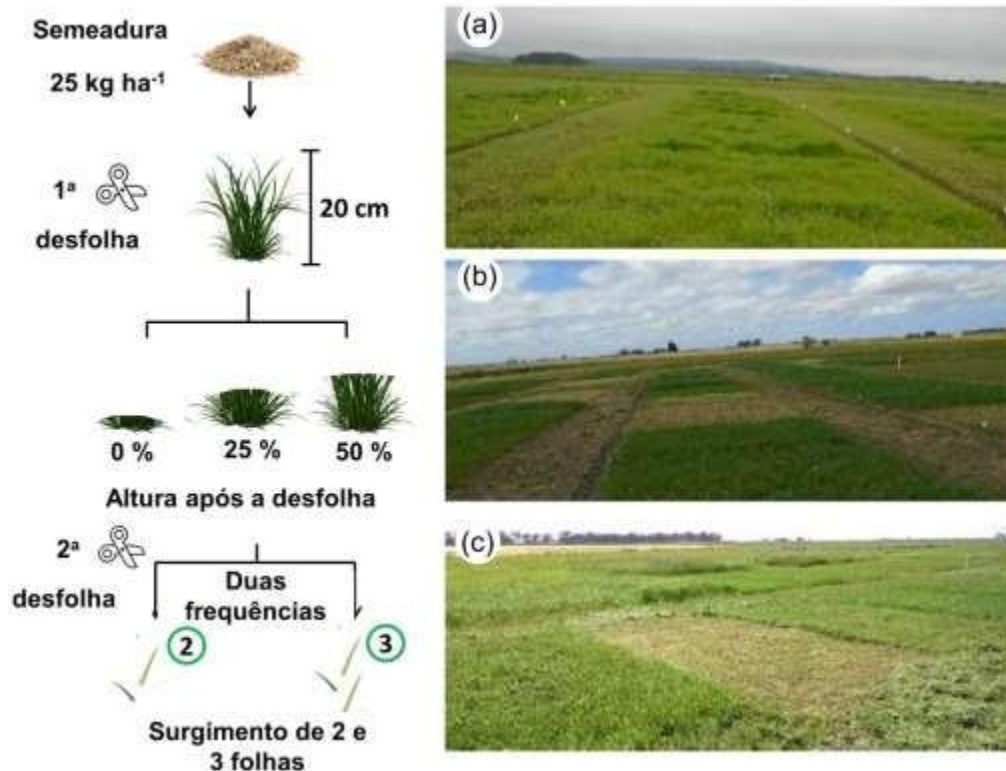


Figura 2 - Resumo gráfico dos fatores frequência e intensidade de desfolha aplicados ao longo do ciclo de azevém anual, Cultivar BRS Estações. Apenas uma desfolha e os intervalos 2 e 3 folhas para uma segunda utilização desta ferramenta representam o fator frequência, enquanto que 0, 25 e 50% representam os níveis do fator intensidade – com base na estatura inicial da planta – mantido em cada desfolha. (a) Período de estabelecimento que antecedeu o início dos tratamentos. (b) e (c) Tratamentos impostos com diferentes intensidades e frequências de desfolha

A primeira desfolha em cada parcela, realizada com diferentes níveis de intensidade: foram efetuadas desfolhas rente ao solo, considerado residual de 0 (próximo ao solo), 25% e 50% da altura da planta pré-desfolhação. Os momentos de desfolha, incluíram desfolha única (12 de agosto de 2016, quando as plantas atingiram 20 cm) e duas desfolhações. A segunda desfolha, ocorreu em dois momentos: (1) após a expansão completa de duas folhas (em 9 de setembro de 2016, denotado como intervalo curto entre as desfolhações); ou (2) após a expansão total de três folhas (em 26 de setembro de 2016, denotado como intervalo longo entre desfolhações). Para ambos os intervalos, a segunda desfolha ocorreu em três intensidades diferentes (manutenção de 0%, 25% e

50% da altura da altura plantas em condição pré-desfolha (Figura 2). Após cada desfolha,  $40 \text{ kg.N.ha}^{-1}$ , aplicado nas parcelas na forma de ureia (46% N).

Antes da última desfolha, foram medidas as alturas da planta e da última lígula, bem como o comprimento da base da planta até a última lígula. Após a desfolhação final, foram contados os números de perfilhos vivos e mortos para cinco plantas de cada parcela, totalizando 15 plantas por tratamento. Essas plantas foram escolhidas aleatoriamente em cada parcela e identificadas por meio de fio elétrico colorido. A produção de forragem, avaliada nas datas de desfolhamento relatadas, foi determinada no centro de cada parcela. As alturas de desfolha foram estabelecidas em dois quadros de  $0.5 \times 0.25 \text{ m}$  localizados aleatoriamente, usando uma faca auto-retrátil. Para mensurar as características morfológicas do resíduo, 20 perfilhos foram selecionados aleatoriamente em cada parcela e coletados após a desfolha. A forragem colhida e o resíduo coletado, separados em lâminas foliares, caules mais bainhas e material morto. Para a determinação da matéria seca (MS), cada componente foi colocado em estufa de ar forçado (MA035/1554, Marconi, SP, Brasil) a  $60^\circ\text{C}$  por 72 h. Os resultados foram expressos em porcentagem e  $\text{ton.MS.ha}^{-1}$ .

#### 2.2.1.3 Produção de sementes

A produção de sementes foi determinada com o uso de dois quadros de amostragem ( $0.5 \times 0.25 \text{ m}$ ) aleatoriamente alocados dentro de cada parcela. A colheita ocorreu quando as sementes atingiram um percentual de umidade de  $35\% \pm 3$ , conforme proposto por Eichelberger et al. (2001). A data da colheita das sementes foi influenciada apenas pela frequência de desfolha, em que sementes oriundas de plantas desfolhadas uma única vez, foram colhidas no dia 09 de novembro de 2016, enquanto que, as sementes provenientes de plantas duplamente desfolhadas foram colhidas em 14 de novembro de 2016 (intervalo duas folhas) e 21 de novembro de 2016 (intervalo três folhas). Nas primeiras 12 horas após a colheita, as sementes foram secas à sombra e sobre piso de concreto coberto. A secagem das sementes, foi completada em uma estufa de ar forçado ( $30^\circ\text{C}$ ) até que as sementes atingissem aproximadamente 13% de umidade. Todo o processo de secagem, foi realizado enquanto as sementes ainda estavam nas espiguetas. As amostras foram trilhadas e separadas em sementes e material inerte com o uso de uma peneira com malha de  $4 \times 22 \text{ mm}$ . Os rendimentos médios de sementes obtidos, convertidos em  $\text{ton.ha}^{-1}$ .

Os pesos médios das sementes colhidas em cada tratamento (g) foram estimados em oito subamostras de 100 sementes por unidade experimental (Brasil 2009). Pesos e valores foram obtidos utilizando a seguinte fórmula (Brasil 2009):

$$\text{Peso médio da semente} = \frac{\text{Peso da amostra} \times 1000}{\text{Número de sementes}}$$

## 2.2.2 Composição bioquímica, qualidade e vigor das sementes

### 2.2.2.1 Níveis de amido e proteína das sementes colhidas

Três amostras, cada uma contendo 200 mg de sementes por tratamento, foram maceradas em almofariz e homogeneizadas com 10 mL de solução extratora MCW (metanol:clorofórmio:água, na proporção 12:5:3). Após 24 horas, os extratos foram centrifugados a 600g por 30 min. Os sobrenadantes foram coletados, e, os precipitados mantidos por 72 horas em estufa de ar forçado (30°C) para desidratação das amostras para determinação do teor de amido. Após a secagem, os precipitados foram suspensos novamente em 10 mL de ácido perclórico a 30% (v/v) e agitados por 30 min em um agitador orbital para digerir o amido (McCREADY et al. 1950). Os extratos foram então centrifugados a 400g por 30 min. Cada sobrenadante (50 mL), foi colocado em um tubo de ensaio e foram adicionados 3 mL de solução de antrona (0,15% p/v de ácido sulfúrico concentrado). Após 15 min, as misturas foram incubadas a 90°C durante 20 min. Em seguida, foram mantidos no escuro, até atingirem a temperatura ambiente. Após essa etapa, as leituras foram realizadas a 620 nm em espectrofotômetro (UV-1900, Shimadzu, Kyoto, Japão).

O teor de proteína da semente, determinado a partir de três amostras de 200 mg de sementes de cada tratamento, maceradas em um almofariz e homogeneizadas em 1500 mL de tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM; ácido ascórbico 1 mM). As amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e 5 mL de cada foram usados para quantificar proteínas seguindo o procedimento de Bradford (1976).

### 2.2.2.2 Qualidade fisiológica das sementes

A qualidade fisiológica das sementes, foi avaliada por meio do teste de germinação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL,

2009). Das sementes colhidas em cada parcela, foi coletada uma amostra contendo 100 sementes, as quais, foram dispostas em uma caixa de acrílico (*gerbox*) contendo papel especializado para germinação. Como parte do protocolo de superação da dormência das sementes, este papel foi umedecido com solução de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) 0,2% na proporção 2,5 vezes o seu peso. As caixas de acrílico contendo as sementes foram mantidas a 5°C por 7 dias na ausência de luz. Após esse período, as caixas foram transferidas para uma sala de germinação a 20°C na presença de luz contínua por 14 dias. O número de sementes germinadas foi contado diariamente para determinar as seguintes variáveis: germinação cumulativa, velocidade média de germinação (VMG) e tempo médio de germinação (TMG). A emissão da radícula da semente ( $\sim 2$  mm) foi adotada como critério de germinação. Essa avaliação foi realizada diariamente durante 14 dias, sendo os resultados expressos em germinação cumulativa. As sementes permaneceram na sala de germinação durante todo o período.

Para obter o VGM, a equação descrita por Borghetti; Ferreira (2004) foi utilizada:

$$\text{VGM} = \frac{G_1 + G_2 + \dots + G_n}{G_1 + 2G_2 + \dots + nG_n}$$

onde “G” é o número de sementes germinadas e “n” é o último dia de germinação.

Para o TMG, a seguinte equação proposta por Orchard (1977) foi utilizada:

$$\text{TMG} = \frac{\sum(D_n)}{\sum n}$$

onde n é o número de sementes germinadas em cada dia e D é o dia da contagem.

### 2.2.2.3 Envelhecimento acelerado (EA) das sementes

As sementes obtidas em cada uma das parcelas experimentais, também foram submetidas ao teste de (EA) em solução saturada de NaCl a 41°C por 48 horas, sem luz, conforme metodologia descrita por Tunes et al. (2011). Após o teste de (EA), foram coletadas amostras para determinar a expressão e atividade das enzimas antioxidantes, bem como, os níveis de peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxidação lipídica.

A porcentagem de germinação das sementes e o desempenho das plântulas foram avaliados após o teste de Envelhecimento Acelerado (EA). Para isso, as sementes que passaram no teste de (EA) foram germinadas, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o teste de germinação (incluindo dormência). As sementes que germinaram no teste de (EA) foram cultivadas como mudas. Para avaliar seu desempenho, 10 plântulas foram coletadas aleatoriamente representando cada uma das parcelas experimentais (cada uma das três repetições) aos 5 dias após a transferência das sementes para a sala de germinação (20°C) - momento em que também foi conduzida a contabilização de todas as sementes germinadas comprimento das plântulas foi mensurado. As plântulas foram então separadas em parte aérea e raiz, colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa de ventilação forçada (60°C) por 72 horas para determinação da massa seca. Os resultados de desempenho das plântulas foram expressos em cm e mg.

Foi avaliada a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em sementes após o teste de EA. Amostras contendo 200 mg de sementes foram colocadas em tubos *Eppendorf* com solução extratora composta por borato de lítio (200 mM, pH 8,3), Tris citrato (200 mM, pH 8,3) e 2-mercaptoetanol (0,15% na proporção de 1: 2 ( w/v)). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7% com aplicação de 20 mL de cada amostra. Foi utilizado o sistema de coloração descrito por Alfenas (2006). Os resultados foram interpretados com base na análise visual dos géis, com o número e a intensidade das bandas verificados visualmente.

Para determinar a atividade de enzimas antioxidantes após o teste de EA, 200 mg de sementes de cada unidade experimental foram maceradas em N líquido e homogeneizadas em 50% (p/p) de polivinil polipirrolidona (PVPP), 2 mL de tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Os extratos obtidos foram centrifugados a 12000g e 4°C por 20 min. Os sobrenadantes foram usados para verificar a atividade das enzimas antioxidantes.

A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi estimada como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) em 50%. As leituras foram realizadas a 560 nm (BEAUCHAMP; FRIDOVICH 1971). A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6)

foi verificada pelo consumo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240 nm, segundo Azevedo et al. (1998). O protocolo sugerido por Nakano; Asada (1981) foi usado para determinar a atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) com leituras de 290 nm.

Três amostras (200 mg) de sementes de cada tratamento foram utilizadas para determinar o teor de  $H_2O_2$  e o nível de peroxidação lipídica a partir da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA). Amostras de sementes foram maceradas em nitrogênio líquido com adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Cada homogenato foi centrifugado a 12000g por 15 min, e o sobrenadante foi separado para análise posterior.

O teor de  $H_2O_2$  nas sementes foi estimado seguindo a metodologia proposta por Velikova et al. (2000), com leituras realizadas em 390 nm. A peroxidação lipídica das sementes foi obtida para cada amostra pela determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 535 e 600 nm (Cakmak et al. 1993). A peroxidação lipídica foi expressa em nmol de MDA usando um coeficiente de extinção de  $1,55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.3 Análise estatística

Este estudo usou um delineamento de blocos padronizados. Um esquema fatorial completo 3 x 3, usado com três repetições para todas as análises. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, caso fossem encontrados padrões significativos, foram submetidos ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparações. As variáveis avaliadas ao longo do experimento foram analisadas por meio de correlações simples de Pearson ( $P < 0,05$ ). Para essas análises, foi utilizado o SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Colheita de forragem e características estruturais das plantas

Aumentos na produção de forragem ( $P < 0,001$ ) de 59% e 64% foram observados após a desfolha secundária nos estágios de 2 e 3 folhas, respectivamente, em comparação com uma desfolha (Tabela 1). Não houve efeito de interação de momento e intensidade na forragem colhida. Não foram observadas diferenças entre os estágios de duas e três folhas para a massa de forragem colhida. Em associação com a intensidade de colheita de 50% da altura

do resíduo, as plantas de azevém no tratamento de menor intervalo de desfolha (2 folhas) foram 12 cm mais baixas ( $P < 0.001$ ) do que as plantas submetidas ao tratamento de intervalo longo (3 folhas) antes da segunda desfolha (Tabela 1).

O nível de intensidade de desfolha que manteve 50% do resíduo resultou em colheita de forragem de alta qualidade. Seu uso significou que a forragem colhida foi constituída por 85% de lâminas (agrupadas entre os ciclos de colheita), o que foi 15% maior do que para o tratamento que manteve 0% do resíduo após a desfolha. A proporção de colmos colhidos foi maior no tratamento de 0% ( $P < 0,001$ ) do que para 25% e 50% de intensidade na desfolha. Houve efeito principal do fator intervalo sobre a colheita de lâminas foliares, que foi reduzido com a segunda desfolha. A proporção de colmos foi 35% maior ( $P < 0.001$ ) no intervalo de 3 folhas do que no intervalo de 2 folhas. Não foi verificado efeito principal do fator resíduo sobre a porcentagem de folhas senescentes. Uma maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de folhas senescentes foi observada usando uma segunda desfolha associada ao intervalo de 2 folhas.

Os benefícios do tratamento de intensidade 50% na qualidade da forragem, também foram verificados novamente para o resíduo após a desfolha (Tabela 1), com percentuais de lâmina foliar significativamente maiores ( $P < 0.01$ ) de 14% e 11% em comparação com os tratamentos de intensidade 0% e 25%, respectivamente. A escolha pela intensidade 0% causou um aumento significativo na proporção de colmos ( $P < 0.01$ ), mais precisamente 13% e 16% em relação aos valores para a intensidade intermediária do resíduo (25%) e a maior altura residual (50%), respectivamente. Para os constituintes da forragem, o rendimento da forragem colhida apresentou correlações negativas ( $P < 0,05$ ) com a proporção de lâminas foliares colhidas, bem como sua presença no resíduo (Figura 8).

Tabela 1 - Altura média das plantas (cm) e altura e comprimento da última lígula (cm), na condução da última desfolha (dsf), seguidos da produção de forragem (kg ha<sup>-1</sup>) e da proporção (%) ocupada por folhas, colmos e bainhas e material morto na massa de forragem total e no resíduo, juntamente com o número de perfilhos vivos e mortos após a última desfolha, nas combinações dos níveis de intervalo de desfolha (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda) e intensidade deste processo (0, 25 e 50% da estatura inicial das plantas)

	Uma dsf	Duas dsf-2f	Duas dsf-3f	Média	Uma dsf	Duas dsf-2f	Duas dsf-3f	Uma dsf
Resíduo	Altura na última desfolha (cm)				Altura da última lígula na última desfolha (cm)			
0%	26.6 Ba†	21.9 Cb***	31.9 Ab	26.8	8.8 Ca	12.3 Bc***	19.6 Ac	13.5
25%	26.7 Ba	25.6 Bb	40.9 Aa	31.0	8.7 Ca	15.6 Bb	25.5A b	16.6
50%	26.4 Ca	30.7 Ba	43.1 Aa	33.4	8.8 Ca	19.1 Ba	30.2 Aa	19.3
Média	26.5	26.0	38.6	30.4	8.7	15.6	25.1	16.4
CV	6.3 %				6.2%			
	Comprimento da última lígula na última desfolha (cm)				Massa seca total de forragem (kg ha <sup>-1</sup> )			
0%	10.3 Ca	13.4 Ba***	20.9 Aa	14.8	1689.6	3328.0	4093.0	3036.8 a***
25%	9.8 Ca	16.7 Bb	27.3 Ab	17.9	1202.1	3057.3	3711.4	2656.9 a
50%	10.0 Ca	20.2 Bc	31.5 Ac	20.5	739.4	2457.3	2418.4	1871.7 b
Média	10.0	16.7	26.5	17.7	1210.3 B	2947.3 A	3407.6A***	2522.8
CV	6.1%				23.9 %			
	Proporção de folhas na forragem total (%)				Proporção de colmos na forragem total (kg ha <sup>-1</sup> )			
0%	70.3	73.3	64.8	69.4 b	26.3	20	28.4	29.3 a***
25%	86.9	76.6	67.6	77.0 ab	9.1	16.6	27.1	23.9 b
50%	96.4	81.4	77.1	84.9 a***	0.5	10.9	17.8	13.9 c
Média	84.5 A***	77.0 AB	69.8 B	77.1	11.9 B	15.8 B	24.4 A***	22.3
CV	8.84 %				30.9 %			
	Proporção de folhas mortas na forragem total (%)				Proporção de folhas no resíduo (%)			
0%	3.4	6.8	6.8	5.6 ns	12.1	11.9	8.4	10.7 b
25%	3.9	6.7	5.3	5.3	17.8	12.3	10.4	13.4 b
50%	3.1	7.8	5.1	5.3	37.3	20.5	15.6	24.4 a**
Média	3.4 B	7.0 A*	5.7 AB	5.4	22.3 A*	14.8 AB	11.4 B	16.1
CV	44.6 %				46.3 %			
	Proporção de colmos no resíduo (%)				Proporção de folhas mortas no resíduo(%)			
0%	87.2	78.1	82.6	82.6 a**	0.7	10	9.0	7.0 ns
25%	80.6	77.7	80.5	79.5 b	1.6	10.1	9.0	7.7
50%	54.9	65.5	77.7	66.0 b	7.8	14	6.7	10.9
Média	74.2	73.0 ns	85.7	76.0	3.4 B	11.3 A**	8.2 AB	8.5
CV	12.8 %				52.4 %			
	Número de perfilhos após a desfolha				Número de perfilhos mortos após a desfolha final			
0%	6.0	7.6	7.3	7.0 a*	1.6	4	2.8	2.8 ns
25%	6.0	6.6	7.3	6.6 ab	1.8	3.3	3.3	2.8
50%	6.0	6.6	5.3	5.9 b	1.6	3.3	2.4	2.4
Média	6.0 B	6.9 A*	6.6 AB	6.5	1.7 B	3.5 A***	2.8 B	2.6
CV	10.3%				28.4%			

† Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os intervalos de desfolha e minúsculas entre os níveis de intensidade de desfolha ao nível de 0.05 \*, 0.01 \*\* ou 0.001 \*\*\*



A desfolha no estágio de duas folhas efetuada com elevada intensidade aumentou o número de perfilhos por planta em comparação com os outros tratamentos (Tabela 1). Valores mais elevados de perfilhos mortos foram observados nos tratamentos de desfolhação de menor intervalo (3,5 perfilhos), 50% maior do que quando apenas uma desfolha foi usada.

### 2.3.2 Produção e qualidade das sementes

#### 2.3.2.1 Produção de sementes

Nem o momento da desfolha, nem a altura do resíduo, exibiram efeitos significativos sobre a produção de sementes, quando examinados como efeitos principais. No entanto, efeito de interação entre frequência e intensidade ( $P < 0,05$ ), foi observado para o rendimento de sementes (Tabela 2). Valores mais altos de rendimento de sementes, maiores que  $1,7 \text{ ton} \cdot \text{ha}^{-1}$ , foram verificados com o uso de uma segunda desfolha. Isso ocorreu quando a desfolha foi realizada no estágio de 2 folhas com 0% ou 25% de resíduo e quando a desfolha ocorreu no estágio de 3 folhas com 50% de resíduo. Menores rendimentos de sementes foram observados com a utilização de apenas uma desfolha, bem como com uma segunda desfolha intensa (0% do resíduo retido), realizada no estágio de três folhas.

Tabela 2 - Produção de sementes ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) e peso de mil sementes (g) de azevém anual verificados com a combinação dos níveis de intervalo de desfolha (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda desfolha) e intensidade deste processo (0, 25 e 50% da estatura inicial das plantas)

Resíduo	Uma dsf	Duas dsf - 2F	Duas dsf - 3f	Média
Produção de sementes ( $\text{kg ha}^{-1}$ )				
0	1418.8 ABa†	1767.8 Aa*	1048.6 Bb	1411.7
25	1133.8 Ba	1819 Aa	1320.1 ABab	1424.3
50	1366.1 Aa	1484.6 Aa	1766.8 Aa	1539.1
Média	1306.2	1690.4	1378.5	1458.3
CV	18.2 %			
Peso de 1000 sementes (g)				
0	1.744 Ac	1.86 Ab***	1.742 Ab	1.782
25	2.292 Ab	1.969 Bab	1.862 Bab	2.041
50	2.089 Aa	2.037 Aa	1.9 Ba	2.008
Média	2.041	1.955	1.834	1.943
CV	3.0 %			

† Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os intervalos de desfolha e minúsculas entre os níveis de intensidade de desfolha ao nível de 0.05 \*, 0.01 \*\* ou 0.001 \*\*\*

Um efeito de interações, entre intensidade e momento, também, foi observado no peso médio das sementes (Tabela 2). O resíduo mais alto (50%) foi principalmente associado a sementes mais pesadas.

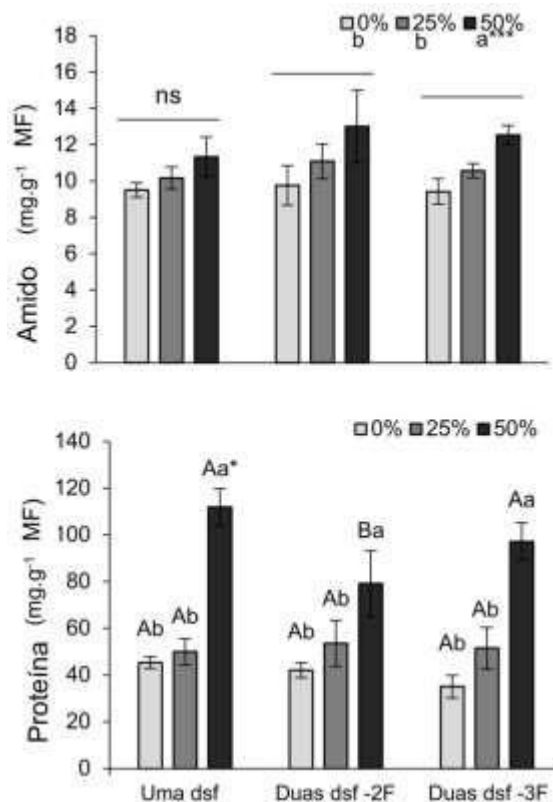


Figura 3 - Conteúdos de amido ( $\text{mg.g}^{-1}$  MF) (a) e proteína ( $\text{mg.g}^{-1}$  MF) (b) em sementes de azevém anual, Cultivar BRS Estações, produzidas a partir de plantas submetidas a combinação de níveis de frequência (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda desfolha) e de intensidade de desfolha (0, 25 e 50% de resíduo). \* e \*\*\* representam efeito significativo de ao menos uma das fontes de variação na análise de variância (ANOVA) aos níveis de 0.05 e 0.001, respectivamente. Quando diferentes, letras maiúsculas indicam diferenças entre os intervalos de desfolha, letras minúsculas entre os níveis de intensidade de desfolha segundo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). ns, não significativo. Valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão ( $n = 3$ ).

O resíduo de 0% (rente ao solo), reduziu significativamente ( $P < 0.001$ ) os valores de peso, independentemente do número de desfolhas realizadas. Mesmo, com a escolha de altura de resíduo intermediária ou superior (25% e 50%), a segunda desfolha - quando realizada após um longo intervalo (estágio

de 3 folhas) - reduziu o peso médio da semente, em comparação com apenas uma desfolha.

A análise de correlação mostra que valores mais elevados para o peso médio das sementes, foram associados a maiores proporções de lâminas foliares na forragem colhida e na massa residual (Figura 8).

#### 2.3.2.2 Composição bioquímica das sementes

A frequência de desfolha não influenciou o acúmulo de amido nas sementes de azevém anual (Figura 3a). No entanto, sementes de plantas com 50% do resíduo, apresentaram aumentos significativos ( $P < 0,001$ ) de 22% e 13,7% no teor de amido quando comparadas com os níveis 0% e 25%, respectivamente. O Resíduo de 50% também resultou em sementes com maior acúmulo de proteína ( $P < 0,05$ ). Teores de proteína significativamente maiores de 59%, 46% e 63% ocorreram com o aumento do resíduo de 0% a 50% em uma e duas desfolhas (estágio de 2 e 3 folhas), respectivamente (Figura 3b). Atributos de alta importância no desempenho fisiológico de sementes, amido e proteína foram positivamente correlacionados ( $P < 0,05$ ). As características morfológicas da forragem, refletidas no peso médio da semente, também apresentaram correlação com a qualidade da semente (Fig. 8). Quanto mais forragem colhida na desfolha, menor foi teor de proteína nas sementes produzidas. Maior proporção de colmos na forragem colhida, bem como, baixa participação de lâmina foliar no resíduo após a desfolha, variáveis associadas a sementes azevém anual com menor qualidade.

#### 2.3.2.3 Germinação das sementes

A porcentagem de germinação foi maior quando foi efetuada apenas uma desfolha. Houve, no entanto, efeito da interação frequência-intensidade sobre a porcentagem de germinação (G). A intensidade de desfolha afetou o nível de resposta entre os intervalos de desfolha (Figura 4d). A desfolha secundária com 0% de resíduo durante os estágios de 2 e 3 folhas, reduziu G ( $P < 0,001$ ) em 18% e 33%, respectivamente, em comparação com a desfolha única. Plantas com 25% do resíduo após a segunda desfolha produziram sementes com elevada germinação apenas quando o menor intervalo foi usado. Baixa germinação verificou-se, com o intervalo longo (estágio de 3 folhas). A intensidade da desfolha não afetou a porcentagem de germinação quando apenas uma desfolha foi usada. Um efeito adverso causado pelo baixo resíduo foi observado nos

valores de germinação cumulativa com desfolha secundária nos estágios de 2 e 3 folhas (Figura 4a-c).

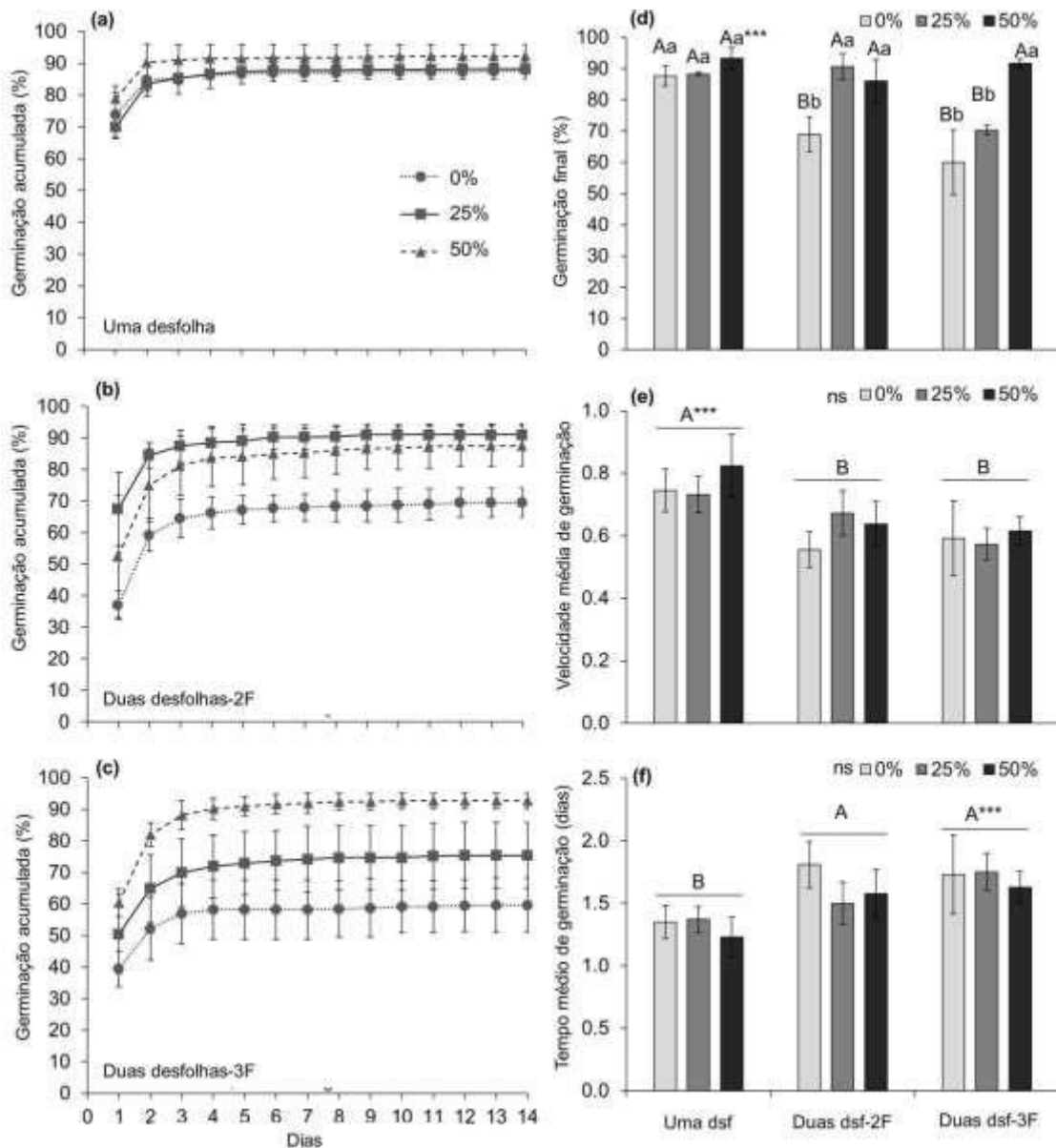


Figura 4 - Germinação acumulada (a,b,c), germinação final (d), índice de velocidade de germinação (e) e tempo médio de germinação de sementes de azevém anual, Cultivar BRS Estações, produzidas a partir de plantas submetidas a combinação de níveis de frequência (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda desfolha) e de intensidade de desfolha (0, 25 e 50% de resíduo – com base na estatura inicial da planta – mantido em cada desfolha).\*\*\* representa efeito significativo de ao menos uma das fontes de variação na análise de variância (ANOVA) ao nível de 0.001. Quando diferentes, letras maiúsculas indicam diferenças entre os intervalos de desfolha, letras minúsculas entre os níveis de intensidade de desfolha segundo teste

de Tukey ( $p < 0.05$ ). ns, não significativo. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ )

Houve um efeito principal da frequência de desfolha na velocidade média de germinação (VMG) e no tempo médio de germinação (TMG), ou seja, uma única desfolha resultou em sementes que germinaram mais rapidamente (Figura 4e, f). Sementes originadas de plantas que foram submetidas a apenas uma desfolhação, apresentaram (VMGs), 23% e 21% maiores ( $P < 0,001$ ), em comparação com aquelas oriundas de plantas submetidas a uma segunda desfolha nos estágios de duas e três folhas, respectivamente. Com resposta semelhante à do efeito do intervalo entre as desfolhações, a variável (TMG) apresentou correlação negativa com germinação (Figura 8) e correlação positiva com a forragem colhida ( $P < 0.05$ ). A porcentagem de germinação, que apresentou correlação positiva ( $P < 0.05$ ) com o peso médio da semente, pareceu se beneficiar de maior resíduo após o corte. A análise de correlação indica que quanto maior a proporção de lâminas foliares no resíduo, maior a qualidade da semente.

### 2.3.3 Vigor das sementes

#### 2.3.3.1 Atividade antioxidante, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em sementes após o envelhecimento acelerado

Sementes de plantas submetidas ao tratamento 50% de resíduo apresentaram maior atividade ( $P < 0.001$ ) da superóxido dismutase (SOD) após serem submetidas ao teste de (EA), independentemente, do número de folhas na segunda desfolha (Tabela 3). Valores de  $637 \text{ U g}^{-1}$ ,  $670 \text{ U g}^{-1}$  e  $899 \text{ U g}^{-1}$  MF foram constatados em sementes de plantas submetidas a uma e duas desfolhas, respectivamente, em combinação com 50% do resíduo. Benefícios dessa combinação também foram observados na expressão de isoformas dessa mesma enzima em bandas com maior intensidade, com destaque para a isoforma I (Figura 5a).

A desfolha menos intensa resultou em sementes com maior expressão e atividade ( $P < 0.01$ ) da catalase (CAT) (Figura 5b). No entanto, na avaliação da condição de 50% do resíduo, esta enzima foi mais ativa em sementes de plantas submetidas a uma desfolhação do que naquelas com desfolhamento secundário

nos estágios de duas e três folhas (28% e 29%, respectivamente) (Tabela 3). Sementes de plantas com alto resíduo após a desfolha apresentaram maior atividade de ascorbato peroxidase (APX) ( $P < 0.05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade dos teores de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e malondialdeído (MDA) em sementes anuais de azevém cv. BRS Estações, submetido ao teste de envelhecimento acelerado ( $41^\circ C$ , 48 h)

Resíduo	Uma Dsf	Duas dsf- 2F	Duas dsf -3F	Média
SOD ( $U \cdot g^{-1}$ MF)				
0	513.0 Aab*†	467.6 Ab	495.2 Ab	491.9
25	360.2 Ab	485.6 Ab	462.7 Ab	436.1
50	637.6 Ba	899.4 Aa	670.5 Ba	735.8
Média	503.6	617.5	542.8	554.6
CV		13.46%		
CAT ( $\mu mol H_2O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ MF)				
0	1.46 Ab**	1.27 Ab	0.91 Bc	1.22
25	1.47 Ab	1.48 Ab	1.46 Ab	1.47
50	2.68 Aa	1.91 Ba	1.89 Ba	2.16
Média	1.87	1.55	1.42	1.61
CV		8.19%		
APX ( $mmol ASA \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$ MF)				
0	31.15	34.15	33.62	32.9 b*
25	29.40	33.40	29.61	30.8 b
50	41.06	38.92	35.26	38.4 a
Média	33.87 ns	35.49	32.83	34.0
CV		11.01%		
$H_2O_2$ ( $\mu mol \cdot g^{-1}$ MF)				
0	4.54 Ca	5.22 Ba	6.23 Aa***	5.33
25	4.03 Ba	4.98 Aa	4.75 Ab	4.59
50	4.40 Ba	5.28 Aa	4.50 Bb	4.73
Média	4.32	5.16	5.16	4.88
CV		5.36%		
MDA ( $nmol \cdot g^{-1}$ MF)				
0	16.34	17.66	23.62	19.94 a**
25	13.66	19.87	21.69	18.85 ab
50	13.88	21.20	19.02	16.86 b
Média	14.63 B	19.58 A	21.4 A**	18.55
CV		9.54%		

† Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os intervalos de desfolha e minúsculas entre os níveis de intensidade de desfolha ao nível de 0.05 \*, 0.01 \*\* ou 0.001 \*\*\*

Correlações positivas com a atividade dessas enzimas antioxidantes foram verificadas para diversas variáveis ligadas à qualidade da semente, como peso médio, teor de proteína e amido (Figura 8).

Plantas submetidas a uma segunda desfolha com menor resíduo (0%), produziram sementes de qualidade inferior, evidenciada pela baixa germinação após o teste de (EA), e, esta, foi associada à baixa eficiência do sistema antioxidante e maior ( $P < 0.01$ ) acúmulo de  $H_2O_2$  (Tabela 3). Essas mesmas

sementes apresentaram maior peroxidação lipídica ( $P < 0.01$ ), 26,8% e 30,9% quando oriundas de plantas desfolhadas nos intervalos de 2 e 3 folhas em comparação com apenas uma desfolha, respectivamente (Tabela 3).

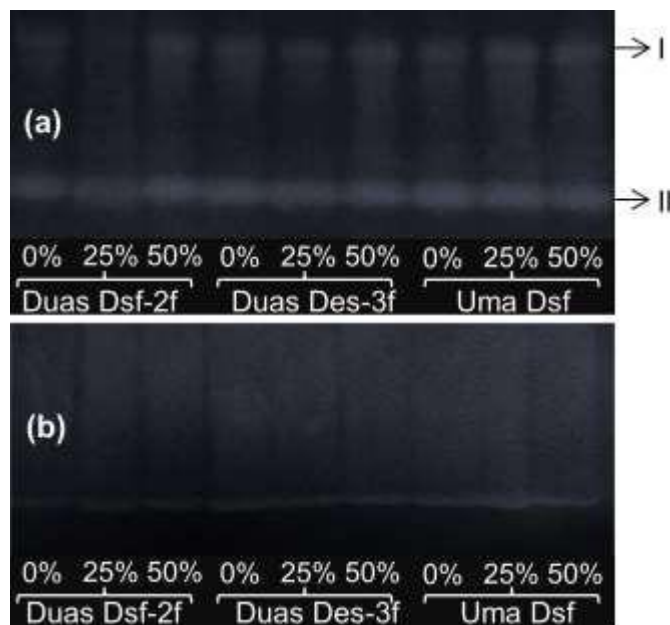


Figura 5 - Expressão de isoformas das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (a) e catalase (b) em sementes de azevém anual, Cultivar BRS Estações, submetidas ao envelhecimento acelerado ( $40^{\circ}\text{C} - 48\text{h}$ ). Os tratamentos avaliados resultam de sementes produzidas a partir de plantas submetidas a combinação de níveis de frequência (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda desfolha) e de intensidade de desfolha (0, 25 e 50% de resíduo)

Declínios nos teores de (MDA) foram verificados em sementes de plantas mantidas em 0 a 50% da altura inicial após a desfolha; no último nível, o (MDA) foi significativamente menor, do que, para as outras condições ( $P < 0.01$ ). Uma maior taxa de peroxidação pode estar relacionada à baixa qualidade da semente, uma vez que correlações negativas ( $P < 0,05$ ) foram encontradas entre o (MDA) e o peso médio da semente, teor de proteína e velocidade média de germinação (Figura 8).

### 2.3.3.2 Germinação das sementes e desempenho das plântulas após o envelhecimento acelerado

Um efeito de interação entre frequência e intensidade foi observado para a porcentagem de germinação de sementes (G), após a exposição ao teste de envelhecimento acelerado (Figura 6). Uma redução significativa ( $P < 0,001$ ) em G após o teste de (EA), foi observada em sementes de plantas submetidas a segunda desfolha (3 folhas), com um menor resíduo após a desfolha. Quando uma maior frequência de desfolha, combinada com maior resíduo (50% RSH), foi constatada uma porcentagem de germinação de 80%, estatisticamente semelhante à obtida com apenas uma desfolha.

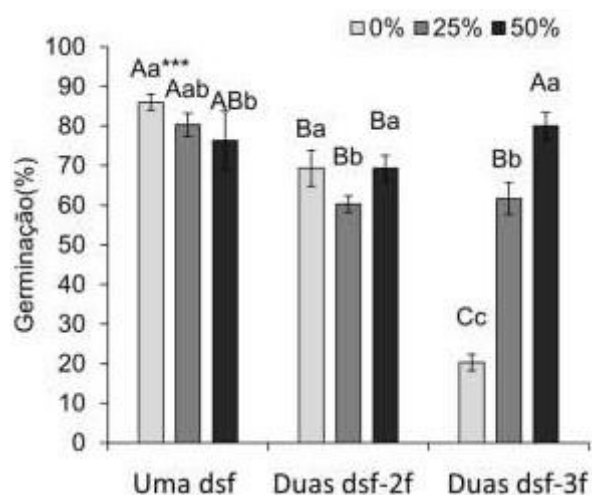


Figura 6 - Germinação de sementes de azevém anual, Cultivar BRS Estações, submetidas ao envelhecimento acelerado (40°C - 48h). Os tratamentos avaliados resultam de sementes produzidas a partir de plantas submetidas a combinação de níveis de frequência (uma desfolha, duas e três novas folhas para uma segunda desfolha) e de intensidade de desfolha (0, 25 e 50% de resíduo). \*\* representa efeito significativo de ao menos uma das fontes de variação na análise de variância (ANOVA) ao nível de 0.01. Quando diferentes, as letras maiúsculas que estão nos intervalos de desfolha e as minúsculas que estão entre os níveis de intensidade deste processo significam diferença entre tratamentos a partir do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ )

Sementes de plantas com resíduo superior (manutenção de 50% da altura inicial) após mais de uma desfolha geraram plântulas com crescimento superior. Comparado com 0% de resíduo, aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) de 28% e 40% no comprimento da parte aérea resultaram de 50% do resíduo após uma única



desfolha e após uma segunda desfolha no estágio de 3 folhas, respectivamente (Figura 7a).

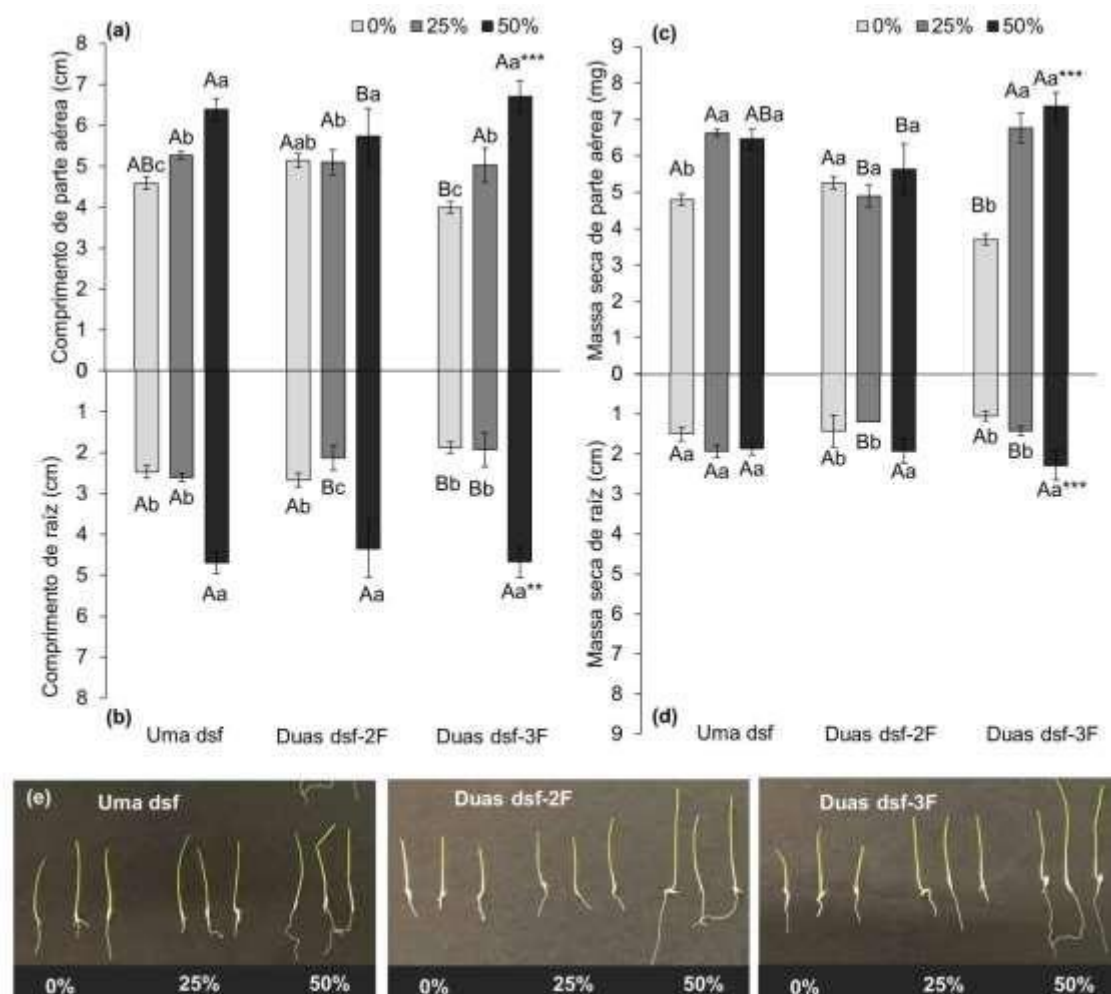


Figura 7 - Comprimentos (a-b) e massas (c-d) de parte aérea e raiz, seguidas da caracterização das plântulas de azevém anual, Cultivar BRS Estações, aos 5 dias após a submissão das sementes ao envelhecimento acelerado (40°C – 48h). Os tratamentos avaliados resultam de sementes produzidas a partir de plantas submetidas à combinação de níveis de frequência (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda desfolha) e de intensidade de desfolha (0, 25 e 50% de resíduo). (e, f e g) representam 2, 3 e 4 folhas, respectivamente. \*\* e \*\*\* representam efeito significativo de ao menos uma das fontes de variação na análise de variância (ANOVA) aos níveis de 0.01 e 0.001, respectivamente. Quando diferentes, as letras maiúsculas que estão nos intervalos de desfolha e as minúsculas que estão entre os níveis de intensidade deste processo significam diferença entre tratamentos a partir do teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ )

O crescimento da raiz teve um desempenho semelhante ao da parte aérea (Figura 7b, e), independentemente do número e intervalo de desfolha ( $P < 0,05$ ). Maiores valores de peso seco das porções de parte aérea das plântulas ocorreram para 25% e 50% do resíduo ( $P < 0,001$ ) após uma desfolha e após duas desfolhas com intervalo superior (Figura 7c).

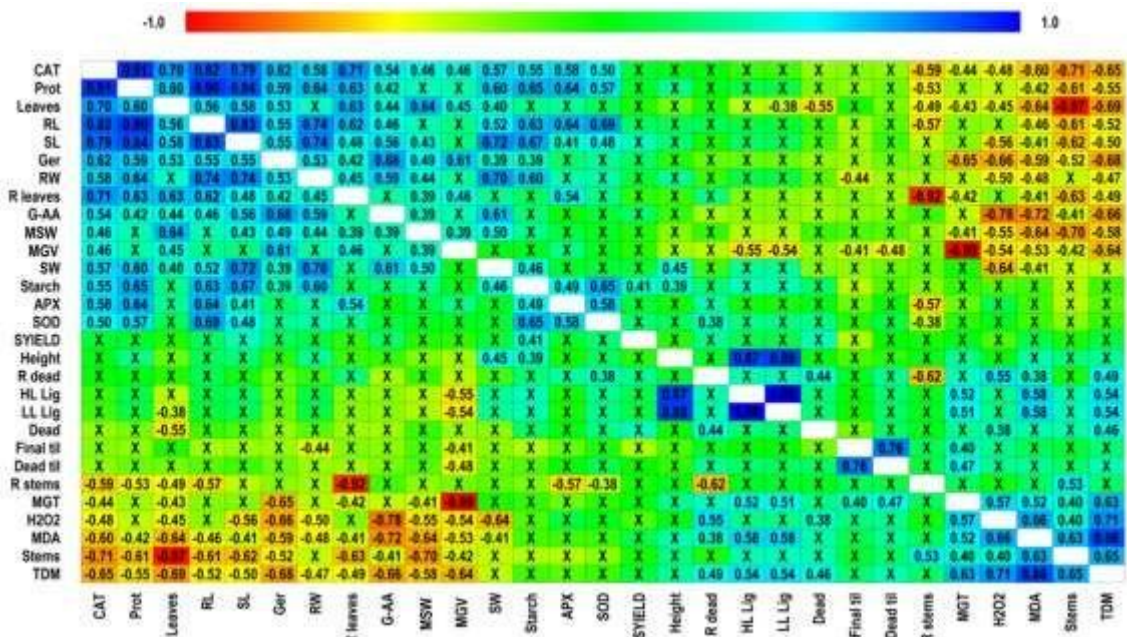


Figura 8 - Correlação simples de Pearson entre as variáveis vinculadas a qualidade de sementes de azevém anual, Cultivar BRS Estações, produzidas a partir de plantas submetidas a combinação de níveis de frequência (uma desfolha, 2 e 3 novas folhas para uma segunda desfolha) e de intensidade de desfolha (0, 25 e 50% de resíduo). Valores indicam a presença de significância ( $p < 0.05$ ) entre duas variáveis, X indica ausência de correlação significativa. Abreviações: (1000SW) peso de mil sementes, (APX) ascorbato peroxidase, (AUL) altura da última lígula, (CAT) catalase, (CUL) comprimento da última lígula, (Deadtil) perfilhos mortos após a desfolha, (Finaltil) perfilhos vivos após a desfolha, (GEA). Germinação após o envelhecimento acelerado, (G) germinação, (GSI) velocidade média de germinação, ( $H_2O_2$ ) peróxido de hidrogênio, (MDA) malondialdeído, (MGT) tempo médio de germinação, (Prot.) proteína, (SL-RL) comprimentos de raiz e parte aérea, (SOD) superóxido dismutase, (SW-RW) pesos de raiz e parte aérea, (SYIELD) produção de sementes, (TDM) massa seca total, Height altura, (folhas, perfilhos, mortos) proporção de folhas, colmos e material morto, somada a letra R, representa as respectivas proporções no resíduo

Quando a desfolha secundária ocorreu após um curto ou longo intervalo, o resíduo de 50% promoveu aumentos ( $P < 0,05$ ) de 25% e 53% nos pesos das raízes em comparação com 0% de resíduo, respectivamente. Não houve efeito de intensidade no comprimento da raiz quando foi efetuada apenas uma desfolha (Figura 7d).

O comprimento e o peso de raiz e parte aérea das plântulas apresentaram correlações positivas ( $P < 0,05$ ) com os teores de amido e proteína na semente. Correlações positivas dessas variáveis com o desempenho antioxidante em sementes (SOD, CAT e APX) também foram verificadas, e foram negativamente correlacionadas com os níveis de  $H_2O_2$  e MDA. Esses resultados enfatizam a importância do sistema antioxidante para sementes de alto desempenho (Figura 8).

#### 2.4 Discussão

A desfolha, o ato de remover a forragem, pode causar mudanças estruturais nas plantas e, ser usada para influenciar os rendimentos de sementes de azevém dos tipos anual e italiano (YOUNG et al. 1996; ROLSTON et al. 2010, 2012). A desfolha promove maior incidência de luz na base de gramíneas, e, maior número de perfilhos (GARAY; HODGSON 1999; MARTINIELLO; Da SILVA 2011; GASTAL; LEMAIRE 2015), um importante determinante da produtividade de sementes. Em nosso estudo, a desfolha intensa (redução para 0% da altura inicial da palha) promoveu o aumento de um perfilho por planta.

Os resultados indicam que o tempo entre desfolhas com base na expansão total de um certo número de folhas mostra potencial para influenciar a eficiência da produção de forragem em gramíneas temperadas, como azevém anual. Este método tem se mostrado útil para controlar o rendimento e a qualidade da forragem em outras gramíneas, como *Dactylis glomerata* L., azevém perene (*Lolium perenne* L.) e festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) (TURNER et al. 2006; LEE et al. 2009; RAWNSLEY et al. 2014; KAUFONONGA et al. 2017; LOAIZA et al. 2017). Em festuca, Donaghy et al. (2008) descobriram que a desfolha no estágio de 2 folhas maximizou a qualidade da forragem, permitiu a substituição de carboidratos solúveis em água (CSA) para níveis de pré-desfolha e resultou em uma taxa de rebrota satisfatória. Solomon et al. (2017) descobriram que a desfolha no estágio de 4 folhas e a retenção de um resíduo de 10 cm maximizaram a produtividade de azevém anual ao longo da

estação de crescimento. Desempenho inferior foi obtido com a manutenção de um resíduo de 5 cm. Os autores sugeriram que a altura residual e o intervalo de desfolha foram significativamente determinantes na produção de forragem.

A desfolha em espécies de gramíneas temperadas pode ser um fator importante na produção de sementes. Aplicada moderadamente, esta técnica pode promover um crescimento vigoroso, preservando as reservas de energia localizadas na base das plantas (FULKERSON; SLACK 1994; MARTINIELLO; Da SILVA 2011). No entanto, a frequência de desfolha também pode influenciar o rendimento de sementes. Cunha et al. (2015), por exemplo, descobriram que o uso de três desfolhas aumentou significativamente o peso seco de forragem colhida de azevém italiano (*L. multiflorum* L.), mas reduziu o rendimento de sementes em 70%, quando comparado com plantas submetidas a apenas uma desfolha.

A redução substancial na produção de sementes observada por Cunha et al. (2015) também foi observada em nosso estudo em que a intensa desfolha (menor altura do resíduo) combinada com maior intervalo de desfolha resultou em aumento significativo da proporção de colmos na forragem colhida e redução do rendimento de sementes. O aumento na proporção de colmos na forragem colhida não apenas reduz a qualidade da forragem, mas também reflete a remoção de reservas das plantas. A presença dessa reserva de energia foi anteriormente demonstrada como um importante contribuinte para a regulação do crescimento e desenvolvimento de gramíneas temperadas após a desfolha (SCHÄUFELE; SCHNYDER 2001; SOLOMON et al. 2017).

No estudo atual, a produção de sementes também foi influenciada pelo tratamento de desfolha. Os maiores rendimentos de sementes foram obtidos com o uso de uma segunda desfolha após um intervalo mais curto (2 folhas) em combinação com a manutenção de um resíduo moderado (25%), com rendimentos de sementes de 1,80 ton.ha<sup>-1</sup>. Esses valores são superiores aos valores máximos encontrados em estudos de desfolhação de azevém no sul do Brasil (CUNHA et al. 2015; BOHN et al. 2020). No entanto, o uso de uma segunda desfolha baseada no estágio de 3 folhas combinada com a retenção de um resíduo inferior reduziu significativamente o rendimento de sementes. Essa diferença entre os estágios de 2 e 3 folhas para a segunda desfolha pode ser decorrente da condição estrutural das plantas no momento em que foi realizada

a última desfolha. A segunda desfolha, no estágio de três folhas ocorreu quando as plantas atingiam cerca de 30 cm de altura após uma desfolha anterior na mesma intensidade (0%), o que gerou um aumento significativo na proporção de colmos na forragem colhida. Rolston et al. (2012) definiram a última desfolha, também chamada de data de fechamento, como crucial para o processo de produção de sementes, tradicionalmente utilizada no início do alongamento do colmo. Segundo esses autores, o fechamento tardio resulta na remoção de maior biomassa e pode reduzir a probabilidade de acamamento; no entanto, aumenta a remoção de inflorescências em desenvolvimento.

Enquanto a desfolha no estágio de três folhas, parece ter reduzido a produção de sementes - devido à retirada da forragem - os resultados do uso de apenas uma desfolha indicam que a redução da retirada da forragem não é benéfica para a produção de sementes de azevém anual. Isso indica a presença não apenas de um limite máximo de uso, mas também, de um limite mínimo para alto rendimento de sementes. No estudo conduzido por Rolston et al. (2012) na Nova Zelândia, o fechamento "atrasado" entre o início e o final de outubro teve um efeito positivo na produção de sementes de azevém irrigado. Realizada no intervalo de estágio de 3 folhas com a manutenção de um resíduo em 50%, a segunda desfolha realizada em nosso estudo ocorreu quando as plantas tinham altura média de 43 cm; isso aumentou a produção de sementes ( $1,76 \text{ t ha}^{-1}$ ) sem afetar sua qualidade.

O rendimento e a qualidade das sementes não foram otimizados pelos mesmos tratamentos de desfolha. Apesar dos benefícios no rendimento de sementes, maiores intensidades de desfolha reduziram significativamente o peso médio das sementes e os níveis de proteína e amido, bem como a porcentagem de germinação. Em uma revisão recente, Aguirre et al. (2018) relataram que o processo de formação de sementes é influenciado pela partição e remobilização de carbono. Em sementes de gramíneas temperadas, o teor de carboidratos solúveis em água (CSA), propriedade que pode ser afetada pelo uso de desfolhamento, parece desempenhar um papel importante na fase reprodutiva das plantas. Durante esse mesmo estágio no azevém perene, Trethewey; Rolston (2009) encontraram altas concentrações de CSA nos internódios após o surgimento das inflorescências. Os mesmos autores constataram que as concentrações de CSA nas inflorescências aumentaram

significativamente durante o enchimento das sementes, o que destaca a importância de avaliar a condição das plantas no momento da formação das sementes.

Os colmos desempenham um papel importante como reserva de energia nas plantas (SLEWINSKI, 2012). Em nosso estudo, a proporção de colmos aumentou após intensa desfolha; isso se correlacionou negativamente com o peso médio da semente. A importância das reservas de energia no enchimento de sementes de azevém anual foi avaliada no estudo de Griffith (1992), onde o autor descobriu que durante esta importante fase, os colmos mantiveram um gradiente de CSA na direção das inflorescências. Além disso, Holmes (2016) concluiu que os colmos contribuem para o enchimento de sementes de azevém italiano em condições onde a assimilação da oferta é limitada. O potencial de compensação de rendimento, quando as reservas contribuem para atender à energia, foi verificado em nosso estudo pelo alto rendimento de sementes mesmo na maior intensidade de desfolha, e também destacado pelo citado autor como um importante atributo desta espécie.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o peso médio das sementes correlacionou-se positivamente com variáveis ligadas à qualidade das sementes. Associação semelhante também foi medida por Simic et al. (2010) em um estudo para avaliar o impacto de práticas de manejo na qualidade de sementes de azevém (*subespécie itálico*). Os autores descobriram que o baixo peso médio das sementes obtido em um ano com condições de seca e alta temperatura resultou em uma diminuição na porcentagem de germinação em comparação com anos em que as condições climáticas eram mais favoráveis. Segundo Watts (2008), gramíneas com sementes maiores e com mais amido germinam e se estabelecem mais rapidamente após a semeadura.

A exposição de sementes a condições desfavoráveis é uma ferramenta importante para determinar a qualidade de sementes de gramíneas forrageiras (SCOTT; HAMPTON, 1985). A deterioração controlada (WANG et al. 2004) e os testes de EA (GARCIA; MENEZES, 1999) envolvem a exposição das sementes a um ambiente com alta temperatura e umidade. No azevém anual, o aprimoramento dessas técnicas por Tunes et al. (2011) permitiu aos pesquisadores identificar diferenças significativas entre lotes de sementes de qualidade variável. Em condições desfavoráveis proporcionadas por testes de

vigor, pode-se estudar o conhecimento não só da germinação, mas também da contribuição do sistema antioxidante na tentativa de manter a homeostase redox em sementes de gramíneas forrageiras. Em nosso estudo, os benefícios causados pela maior atividade das enzimas antioxidantes podem estar associados à menor peroxidação em sementes expostas ao teste de EA. Essas mesmas sementes apresentaram teores mais elevados de amido e proteína quando as plantas foram submetidas à desfolha; isso apoia a retenção de um resíduo mais alto.

Quando uma semente é exposta a condições desfavoráveis, as espécies reativas de oxigênio (ERO's) podem desencadear uma cascata de efeitos que limitam a viabilidade da semente (KUREK et al. 2019). Em certas espécies, o acúmulo de ERO's desempenha um papel importante na superação da dormência e no estímulo à germinação das sementes (JEEVAN KUMAR et al. 2015). No entanto, o acúmulo excessivo de ERO's pode ser prejudicial porque favorece a peroxidação lipídica (WOJTYLA et al. 2016; BARRETO; GARCIA, 2017; DENG et al. 2017). Em uma revisão recente, KUREK et al. (2019) concluíram que o envelhecimento da semente por meio da degradação dos fosfolipídios da membrana celular e da deterioração estrutural e funcional de proteínas e material genético está provavelmente relacionado às concentrações de ERO's. Acredita-se que a atividade antioxidante desempenhe um papel importante na manutenção do equilíbrio redox nas sementes (PAGANO et al. 2019).

Se o equilíbrio entre os processos pró e antioxidantes for perdido e a produção de ERO's prevalecer, o resultado é o estresse oxidativo, que pode induzir a morte celular e, por fim, a morte da semente (BAILLY, KRANNER, 2011). Na busca por esse equilíbrio, vale ressaltar que sementes com qualidade superior podem suportar essa condição desfavorável e manter seu alto desempenho em comparação com sementes de baixa qualidade, uma das principais conclusões verificadas em nosso estudo. De acordo com Wang et al. (2015), o nível de enzimas envolvidas na remoção de ERO's está correlacionado com o vigor da semente, característica que foi verificada por Wu et al. (2011), que observaram maior abundância de SOD em sementes de milho (*Zea mays* L.) com alto vigor. No entanto, em cereais, Yin et al. (2014) observaram que as

atividades CAT e APX foram reduzidas em sementes de arroz envelhecido (*Oryza sativa* L.).

Em nosso estudo, níveis mais baixos de peroxidação foram observados em sementes de azevém anual de plantas mantidas com 50% da altura inicial e submetidas a uma única desfolha. Esta variável foi negativamente correlacionada com a atividade de CAT. Segundo Corbineau (2012), a eficiência dos sistemas de defesa antioxidante tem o potencial de manter a condição das sementes. Nesta mesma revisão, a autora destacou a relevância de avaliar as condições de certas proteínas (subunidade B da globulina 11S, proteínas abundantes da embriogênese tardia, proteína de choque térmico) como um importante atributo de qualidade. Em nosso estudo, o teor de proteína das sementes apresentou correlação positiva não apenas com o sistema antioxidante, mas também com todas as variáveis avaliadas para o desempenho das plântulas. Após o teste de EA, as sementes com desempenho superior, a partir da desfolha realizada a 50% da altura inicial, proporcionaram maior porcentagem de germinação, plântulas com maior comprimento e maior massa seca. De acordo com Smith et al. (2003), o peso da semente, variável significativamente reduzida pela intensa desfolha em nosso estudo, teve efeito positivo no vigor de plântulas diplóides e tetraploides de azevém perene.

Os resultados obtidos mostram que a colheita da forragem duas vezes, com alta frequência e baixa intensidade, além de favorecer a qualidade da forragem colhida (principalmente lâminas de folhas vivas), também favorece a produção e a qualidade das sementes de azevém anual. O número de variáveis relacionadas à qualidade fisiológica das sementes verificadas em nosso estudo corrobora para justificar esta qualidade superior.

Detalhes da pastagem após a desfolha também são essenciais para enfatizar a importância do resíduo do limbo foliar para a consequente qualidade fisiológica das sementes produzidas, principalmente em plantas anuais como o azevém. Porém, para que haja progresso nessa linha de investigação, o conteúdo das reservas nas plantas (em raízes, colmos e folhas), como as CSA's, seria relevante. Explorar essa ideia experimental com o uso de animais seria um acréscimo científico interessante, pois o pastejo é bastante prevalente em todo o mundo e envolve outros fatores importantes a serem avaliados intrinsecamente como a presença dos animais na área. Os detalhes fenológicos dos



procedimentos deste estudo são fundamentais para a obtenção de resultados semelhantes em outros ambientes adequados para o azevém anual. Assim, validar esses resultados em outras localidades daria ainda mais força científica aos dados aqui obtidos.

### 3. Conclusão

O rendimento e a qualidade das sementes de azevém anual são maximizados pela combinação de uma segunda desfolha realizada no estágio de três folhas e a retenção de 50% de RSH, condição que favorece a manutenção de maior proporção de lâmina foliar no resíduo. Altos rendimentos de sementes e peso médio de sementes também foram alcançados no estágio de 2 folhas com desfolhamento mais intenso. O peso médio das sementes apresenta correlação positiva com a porcentagem de germinação e é maior nas sementes de plantas com maior altura residual após o corte (RSH; 50%). Isso associado a maiores teores de amido e proteína. O teste de envelhecimento acelerado permite detectar diferenças de qualidade entre as sementes obtidas nos diferentes tratamentos de desfolha. A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes pode ser utilizada como um importante indicador da qualidade de sementes de azevém anual.

### 4. Referências

AGUIRRE, M., KIEGLE, E., LEO, G., EZQUER, I. Carbohydrate reserves and seed development: an overview. **Plant Reproduction** v.31, p.263-290, 2018.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos.** Volume 2. (UFV: Viçosa), 2006.

AZEVEDO, R.A., ALAS, R.M., SMITH, R.J., LEA, P.J. Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalased eficiente mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.

BAILLY, C.; KRANNER I. Analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination. In '**Seed dormancy: methods and protocols**'. (Ed. AR Kermodé) p.343-367. (Humana Press: New York), 2011.

BARRETO, L.C.; GARCIA, Q.S. Accelerated ageing and subsecente imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidante system in macaw palm seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, n.72, 2017.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p.276-287, 1971.

BOHN, A., BORTOLIN, G.S.; CASTELLANOS, C.I.S.; REIS, B.B.; SUÑÉ, A.S.; BONOW, J.F.L.; PEDROSO, C.E.S.; MITTELMANN, A. Nitrogen fertilization of self-seeding Italian ryegrass: effects on plant structure, forage and seed yield. **Ciência Rural**, v.50, 2020.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. Interpretação de resultados de germinação. In **'Germinação: Do básico ao aplicado'**. (Eds AG Ferreira, F Borghetti) p. 209-222. (Artmed: Porto Alegre), 2004.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. **'Regras para Análise de Sementes.'** (MAPA/ACS: Brasília), 2009.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. ) Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.127-132, 1993.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v.22, S61-S68. 2012.

CUNHA, R.P.; PEDROSO, C.E.S.; MITTELMANN, A.; OLIVEIRA, R.C.; BOHN, A.; SILVA, J.D.G.; MAIA, M.S. Relationship between the morphogenesis of Italian ryegrass cv. 'BRS Ponteio' with forage and seed production. **Ciência Rural**, v.46, p.53-59, 2015.

DAS K, ROYCHOUDHURY A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v.2, p.53, 2014.

De OLIVEIRA, C.A.O.; BREMM, C.; ANGHINONI, I.; De MORAES, A.; KUNRATH, T.R.; De FACCIO CARVALHO, P.C. Comparison of an integrated crop-livestock system with soybean only: economic and production responses in southern Brazil. **Renewable Agriculture and Food Systems**, v.29, p.230-238, 2014.

DENG. B.; YANG, K.; ZHANG, Y.; LI, Z. Can antioxidant's reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity contribute to aged seed recovery? Contrasting effect of melatonin, ascorbate and glutathione on the germination ability of aged maize seeds. **Free Radical Research**, v.51, p.765-771, 2017.

DONAGHY, D.J.; TURNER, L.R.; ADAMCZEWSKI, K.A. Effect of defoliation management on water-soluble carbohydrate energy reserves, dry matter yields, and herbage quality of tall fescue. **Agronomy Journal**, v.100, p.122-127, 2008.

EICHELBERGER, L.; MAIA, M.S.; PESKE, S.T.; De MORAES, D.M. Immediate effect of drying delay on the physiological quality of annual ryegrass (*Lolium*

*multiflorum* Lam.) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, p.219-225, 2001.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FULKERSON, W.J.; SLACK, K. Leaf number as a criterion for determining defoliation time for *Lolium perenne*, 1. Effect of water-soluble carbohydrates and senescence. **Grass and Forage Science**, v.49, p.373-377, 1994.

GARAY, A.H.; HODGSON, M. Tiller size/density compensation in perennial ryegrass miniature swards subject to differing defoliation heights and a proposed productivity index. **Grass and Forage Science**, v.54, p.347-356, 1999.

GARCIA, D.C.; MENEZES, N.L. Accelerated ageing test for ryegrass, black oat grass and pearl millet seeds. **Ciência Rural**, v.29, p.233-237, 1999.

GASTAL, F.; LEMAIRE, G. Defoliation, shoot plasticity, sward structure and herbage utilization in pasture: Review of the underlying ecophysiological processes. **Agriculture**, v.5, p.1146-1171, 2015.

GILL SS, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GRIFFITH, S.M. Changes in post-anthesis assimilates in stem and spike components of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). I. Water soluble carbohydrates. **Annals of Botany**, v.69, p.243-248, 1992

HOLMES T **Seed yield and carbohydrate distribution in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) seed crops.** Doctoral dissertation, Lincoln University, New Zealand, 2016.

INSUA, J.R.; AGNUSDEI, M.G.; Di MARCO, O.N. Leaf morphogenesis influences nutritive-value dynamics of tall fescue (*Lolium arundinaceum*) cultivars of different leaf softness. **Crop & Pasture Science**, 68, 51-61. 2017.

JEEVAN KUMAR, S.P.; RAJENDRA PRASAD, S.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v.116, p.663-668, 2015.

KAUFONONGA, S.; DONAGHY, D.J.; HENDRIKS, S.J.; MATTHEW, C.; KEMP, P.D.; CRANSTON, L.M. Comparative response of tall fescue and perennial ryegrass swards to variation in defoliation interval and height. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.60, p.363-375, 2017.

KUNRATH, T.R.; De ALBUQUERQUE NUNES, P.A.; De SOUZA FILHO, W.; CADENAZZI, M.; BREMM, C.; MARTINS, A.P.; De FACCIO CARVALHO, P.C. Sward height determines pasture production and animal performance in a long-term soybean-beef cattle integrated system. **Agricultural Systems**, v.177, 102716. 2020.

KUREK, K.; PLITTA-MICHALAK, B.; RATAJCZAK, E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed ageing process. **Plants**, v.8, 174, 2019.

LEE, J.M.; DONAGHY, D.J.; SATHISH. P.; ROCHE, J.R. Interaction between water-soluble carbohydrate reserves and defoliation severity on the regrowth of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) dominant swards. **Grass and Forage Science**, v.64, p.266-275, 2009.

LOAIZA, P.A.; BALOCCHI, O.; BERTRAND, A. Carbohydrate and crude protein fractions in perennial ryegrass as affected by defoliation frequency and nitrogen application rate. **Grass and Forage Science**, v.72, p.556-567, 2017.

LOPES, R.R.; FRANKE, L.B.; NUNES, F.S. Alternative methodology of the accelerated ageing test for ryegrass seeds. **Scientia Agraria**, v.10, p.089-094, 2009.

MARTINIELLO, P.; Da SILVA, J.A.T. Physiological and bioagronomical aspects involved in growth and yield components of cultivated forage species in Mediterranean environments: a review. **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, v.5, p.64-98, 2011.

McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry** 22, 1156-1158, 1950.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

ORCHARD, T.J. Estimating the parameters of plant seedling emergence. **Seed Science and Technology** v.5, p.61-69, 1977.

PAGANO, A.; FORTI, C.; GUALTIERI, C.; BALESTRAZZI, A.; MACOVEI, A. Oxidative stress and antioxidant defence in germinating seeds. In '**Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signalling and defence mechanisms**'. (Eds M HASANUZZAMAN, V FOTOPOULOS, K NAHAR, M FUJITA) pp. 267-289. (Wiley: Pondicherry, India), 2019.

RAWNSLEY, R.P.; LANGWORTHY, A.D.; PEMBLETON, K.G.; TURNER, L.R.; CORKREY, R. DONAGHY, D.J. Quantifying the interactions between grazing interval, grazing intensity, and nitrogen on the yield and growth rate of dryland and irrigated perennial ryegrass. **Crop & Pasture Science**, v.65, p.735-746, 2014.

ROLSTON, M.P.; MCCLOY, B.L.; TRETHERWEY, J.A.K.; CHYNOWETH, R.J. Removing early spring emerged reproductive growing points enhances seed yield of Italian ryegrass. **Agronomy New Zealand**, v.40, p.133-139, 2010.

ROLSTON, M.P.; TRETHERWEY, J.A.K.; CHYNOWETH, R.J.; McCLOY, B.L. Italian ryegrass seed yield: trinexapac-ethyl and closing date interaction. **Agronomy New Zealand**, v.42, p.119-127, 2012.

SCHÄUFELE, R.; SCHNYDER, H. Carbon and nitrogen deposition in expanding tissue elements of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) leaves during non-steady growth after defoliation. **Plant, Cell & Environment**, v.24, p.407-417, 2001.

SCOTT, D.J.; HAMPTON, J.G. Aspects of seed quality. In '**Producing herbage seeds, grasslands research and practice series**'. (EdsMD Hare, JL Brock) pp. 43-52. (New Zealand Grassland Association: Palmerston North), 1985.

SIMIC, A.S.; VUCKOVIC, S.M.; CUPINA, B.T.; KRSTIC, ĐB.; STANISAVLJEVIC, R.S.; MILIVOJEVIC, M.S. Impact of management practices on Italian ryegrass seed quality. **Journal of Agricultural Sciences**, v.55, p.131-140, 2010.

SLEWINSKI, T.L. Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.4647-4670, 2012.

SMITH, K.F.; MCFARLANE, N.M.; CROFT, V.M.; TRIGG, P.J.; KEARNEY, G.A. The effects of ploidy and seed mass on the emergence and early vigour of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.43, p.481-486, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO). '**Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.**' Vol. 10. (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Porto Alegre), 2004.

SOLOMON, J.K.Q.; MACOON, B.; LANG, D.J. Harvest management based on leaf stage of a tetraploid vs. a diploid cultivar of annual ryegrass. **Grass and Forage Science**, v.72, p.743-756, 2017.

TIMÓTEO, T.S.; MARCOS-FILHO, J. Seed performance of different corn genotypes during storage. **Journal of Seed Science**, v.35, p.207-215, 2013.

TRETHEWEY, J.A.K.; ROLSTON, M.P. Carbohydrate dynamics during reproductive growth and seed yield limits in perennial ryegrass. **Field Crops Research**, v.112, p.182-188, 2009.

TUNES, L.M.; PEDROSO, D.C.; BADINELLI, P.G.; TAVARES, L.C.; RUFINO, C.A.; BARROS, A.C.S.A.; MUNIZ, M.F.B. Accelerated ageing of ryegrass seeds submitted to saturated salt solution. **Ciência Rural**, v.41, p. 33-37, 2011.

TURNER, L.R.; DONAGHY, D.J.; LANE, P.A.; RAWNSLEY, R.P. Effect of defoliation management, based on leaf stage, on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), prairie grass (*Bromus willdenowii* Kunth.) and cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) under dryland conditions. 1.Regrowth, tillering and water-soluble carbohydrate concentration. **Grass and Forage Science** 61, 164-174, 2006.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science** 151, 59-66, 2000.

WANG, Y.R.; YU, L.; NAN, Z.B.; LIU, Y.L. Vigor tests used to rank seed lot quality and predict field emergence in four forage species. **Crop Science**, v.44, p.535-541, 2004.

WANG, W.Q.; LIU, S.J.; SONG, S.Q.; MØLLER, I.M. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.86, p.1-15, 2015.

WATTS, K.A. Carbohydrates in forage: what is a safe grass? In **Advances in equine nutrition**. Vol. 4. (Ed. JD Pagan) pp. 29-42. (Proceedings Kentucky Equine Research: Kentucky, USA), 2008.

WOJTYLA, Ł.; LECHOWSKA, K.; KUBALA, S.; GARNCZARSKA, M. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 66, 2016.

WU, X.; LIU, H.; WANGW CHEN, S.; HUX, L.I.C. Proteomic analysis of seed viability in maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.181-191, 2011.

YIN, G.; XIN, X.; SONG, C.; CHEN, X.; ZHANG, J.; WU, S.; LI, R.; LIU, X.; LU, X. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. **Plant Physiology and Biochemistry**, p.80, p.1-9, 2014.

YOUNG III, W.C.; CHILCOTE, D.O.; YOUNGBERG, H.W. Annual ryegrass seed yield response to grazing during early stem elongation. **Agronomy Journal** 88, 211-215, 1996.