

PRISCILA OLIVEIRA SILVA

**Inter-relações entre o estresse salino e a biossíntese de etileno no
controle da germinação de sementes de *Stylosanthes***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de “Magister Scientiae”

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586i
2013

Silva, Priscila Oliveira, 1986-

Inter-relações entre o estresse salino e a biossíntese de etileno
no controle da germinação de sementes de *Stylosanthes* /
Priscila Oliveira Silva. – Viçosa, MG, 2013.
vi, 40f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Raimundo Santos Barros

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-35

1. Sementes. 2. Etileno. 3. Sal. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 575.68

PRISCILA OLIVEIRA SILVA

**Inter-relações entre o estresse salino e a biossíntese de etileno no
controle da germinação de sementes de *Stylosanthes***

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de “Magister Scientiae”**

APROVADA: 27 de fevereiro de 2013

Dimas Mendes Ribeiro

Marcelo Rogalski

Prof. Raimundo Santos Barros

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus queridos pais, Sônia Mamédio de Oliveira e José de Fátima Silva, pelo carinho e incentivo

Aos meus irmãos e demais familiares

Ao Profº Raimundo Santos Barros e o Dr Dimas Mendes Ribeiro , pelos conhecimentos compartilhados

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo e à Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou os meios para a realização do Curso de Mestrado.

Aos colegas, professores e funcionários,

A todos que colaboraram

Meus agradecimentos!

BIOGRAFIA

Priscila Oliveira Silva, Filha de José de Fátima Silva e Sônia Mamédio de Oliveira, nasceu em Montes Claros, Estado de Minas Gerais, no dia 17 de abril de 1986. Graduando-se em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Estadual de Montes Claros, em 2011. Em 2011, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1 Material vegetal e condução dos experimentos	5
3.2 Inibição da germinação por NaCl	5
3.3 Efeito do estresse osmótico em relação à inibição da germinação pelo NaCl	6
3.4 Reversão do efeito do NaCl	6
3.5 Produção de etileno por sementes tratadas com NaCl	7
3.6 Quantificação do etileno	7
3.7 Efeito do NaCl nos níveis de ACC	8
3.8 Quantificação do sódio	9
3.9 Efeito do NaCl no crescimento das plântulas	10
3.10 Delineamento experimental	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

SILVA, Priscila Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Inter-relações entre o estresse salino e a biossíntese de etileno no controle da germinação de sementes de *Stylosanthes***. Orientador: Raimundo Santos Barros

Avaliou-se o efeito do estresse salino na germinação de sementes de três espécies de *Stylosanthes*, gênero de leguminosas tropicais forrageiras, examinando-se suas inter-relações com a rota biossintética do etileno, via produção de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC). A germinação e a produção de etileno de sementes escarificadas de *S. humilis* foram inibidas por soluções de NaCl, mas não por soluções isomóticas de PEG-6000. Os efeitos inibitórios do NaCl sobre a germinação e a biossíntese de etileno foram completamente revertidos, após a transferência das sementes para água desionizada. Ademais, o ACC reverteu a inibição da germinação provocada por solução de NaCl, resultado que se correlacionou com a produção de etileno. Assim, a inibição por NaCl na germinação daquelas sementes parece uma consequência da condição de estresse provocada pelas altas concentrações do Na, por inibição da produção de etileno. Sob a ação do NaCl a capacidade de biossíntese de etileno mostrou-se maior em sementes de *S. guianensis* do que em sementes de *S. humilis* e *S. capitata*, o que se mostrou correlacionado com as respectivas taxas de germinação. Plântulas de *S. guianensis* também exibiram maiores taxas de crescimento e de sobrevivência do que plântulas de *S. humilis* e *S. capitata*, sob o estresse do sal. As diferentes habilidades de biossintetizar etileno entre as sementes de *S. guianensis*, *S. humilis* e *S. capitata* podem explicar diferenças na tolerância à salinidade das três espécies

ABSTRACT

SILVA, Priscila Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Inter-relationships between salt stress and ethylene biosynthesis in the control of germination of *Stylosanthes* seeds.** Advisor: Raimundo Santos Barros

The effect of salt stress on germination of scarified seeds of *Stylosanthes*, a tropical forage legume genus was evaluated by examining their interrelationships with the ethylene biosynthetic pathway via production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). Germination and ethylene production of seeds of *S. humilis* were inhibited with NaCl solutions, but not with isosmotic solutions of PEG-6000. The inhibitory effects of NaCl on both germination and ethylene biosynthesis were fully reversible following seed transfer to deionised water. Moreover, ACC reversed the inhibition of germination induced by NaCl, a result positively that correlated with the production of ethylene. Thus, inhibition of seed germination by NaCl seems to be a consequence of a stressing condition triggered by a high concentrations of Na inhibiting ethylene production. The ability of ethylene biosynthesis showed much larger in *S. guianensis* seeds treated with NaCl than in *S. humilis* and *S. capitata* seeds, which was also reflected in their germination levels. *S. guianensis* seedlings also exhibited higher growth and survival rates than *S. humilis* and *S. capitata* under salt stress. Furthermore, different quantitative abilities to synthesize ethylene by *S. humilis*, *S. capitata* and *S. guianensis* seeds could explain the differences in tolerance to NaCl stress by the three species.

INTRODUÇÃO

O gênero *Stylosanthes* da família Fabaceae contem aproximadamente 48 espécies, encontradas em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e sudeste da Ásia (Costa e Ferreira, 1984; Costa, 2006). O Brasil é o mais importante centro de diversidade do gênero, sendo encontrado em suas regiões central e nordeste (Stace e Cameron, 1984; Costa, 2006). *Stylosanthes humilis*, *S. guianensis* e *S. capitata* são espécies muito importantes de *Stylosanthes*, utilizadas em uma grande variedade de sistemas agrícolas (Grof *et al.*, 1979; Costa e Ferreira, 1984; Edye, 1987). Adaptam-se bem aos solos de baixa fertilidade e, assim, contribuem para melhoria da qualidade das pastagens em regiões tropicais e subtropicais (Lovato *et al.*, 1999; Noble *et al.*, 2000; Costa, 2006). Tal como acontece com outras leguminosas, a germinação das sementes de *Stylosanthes* é regulada pela impermeabilidade dos tegumentos a gases e água (Maass e Sawkins, 2004; Moïse *et al.*, 2005). A barreira tegumentar constitui um dos fatores fundamentais para persistência e regeneração dessa leguminosa forrageira em pastagens, garantindo a manutenção da espécie em condições adversas do meio ambiente (Vleeshouwers *et al.*, 1995; Murdoch e Ellis, 2000). Essa barreira pode ser quebrada por altas temperaturas ou escarificação mecânica ou química (Mott e McKeon, 1979; Anand *et al.*, 2010).

Além da dormência física, sementes de algumas espécies de *Stylosanthes* apresentam também dormência fisiológica (Costa, 2006). Em sementes de *S. humilis*, a dormência fisiológica é muito acentuada logo após sua maturação e vai sendo perdida gradualmente, até tornarem-se completamente germináveis, aos 12-15 meses de idade pós-colheita (Vieira e Barros, 1994). A dormência fisiológica de sementes de *S. humilis* pode ser superada com ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato do

etileno (Vieira e Barros, 1994) e o ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA), substância liberadora de etileno no interior das células (Burin *et al.*, 1987). O requerimento por etileno é confirmado pela inibição da germinação de sementes não-dormentes por inibidores da síntese e da ação do etileno, como a aminoetoxivinilglicina (AVG), Co^{2+} e Ag^+ (Pelacani *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2006). O etileno, portanto, seria um dos princípios requeridos para a quebra da dormência fisiológica e germinação das sementes de *S. humilis*.

O etileno tem-se mostrado essencial para a germinação de diversas outras espécies, como *Chenopodium album* (Saini *et al.*, 1986, Machabée e Saini, 1991), *Xanthium pennsylvanicum* (Katoh e Esashi, 1975), *Hordeum vulgare* (Locke *et al.*, 2000), *Amaranthus caudatus* (Bialecka e Kępczyński, 2003) e várias outras. As sementes daquelas espécies germinam quando adquirem a capacidade de sintetizar etileno ou quando têm a sensibilidade a esse regulador aumentada (Whitehead e Sutcliffe, 1995). Além de o etileno contribuir para a germinação das sementes de diversas espécies, tem-se proposto que a produção desse regulador gasoso durante os processos de embebição pode antagonizar a inibição da germinação promovida por estresse do ambiente, tais como alta temperatura, metais pesados e salinidade (Kępczyński e Kępczyńska, 1997; Calvo *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

A salinidade é considerada um dos fatores abióticos que limita a produção vegetal. Vários estudos têm mostrado que aproximadamente 20 % do total das terras agricultáveis estão contaminadas por altas concentrações de sal (FAO, 2007). Em recentes anos, muitos esforços têm sido envidados para elucidarem-se os mecanismos de tolerância das plantas à toxicidade dos solos salinos (Munns e Tester, 2008). Em contraste, estudos diretos sobre o efeito do estresse salino na germinação das sementes são pouco explorados. Apesar disso, alguns estudos de caracterização de efeitos regulados pelo estresse salino durante a germinação de sementes têm produzido resultados interessantes. Por exemplo, Wang

et al. (2011) verificaram que sementes de pepino (*Cucumis sativus*) exibiram aumento da germinação sob condição de estresse salino, quando expostas ao etileno em conjunto com soluções de brassinosteróides. Ademais, o etileno, em combinação com as poliaminas, também reverteu parcialmente os efeitos inibitórios do NaCl na germinação de sementes de alface (Zapata *et al.*, 2003). Até o momento, no entanto, não são conhecidos os efeitos do estresse salino no metabolismo do etileno e suas inter-relações no controle da germinação de sementes, particularmente em espécies de sementes tropicais. Neste trabalho, sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* cv. Mineirão foram utilizadas para investigarem-se as ações integrativas entre o estresse salino e o metabolismo de etileno no controle da germinação das sementes.

Em solos salinos, a toxicidade do íon sódio é o fator limitante do crescimento vegetal, sendo inicialmente expressa por uma diminuição do crescimento radicular (Zhu, 2003; Chaves *et al.*, 2009). *Stylosanthes humilis* ocorre em solos salinos no Nordeste do Brasil, onde populações naturais mostram ampla variação na tolerância ao estresse salino durante a germinação das sementes e o crescimento das plântulas (Lovato *et al.*, 1994; Lovato *et al.*, 1999). No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos que determinam a germinação das sementes e a tolerância das plântulas de *S. humilis* à condição de estresse salino. Por outro lado, *S. guianensis* é a espécie de *Stylosanthes* de maior distribuição geográfica e extensa variedade genética, ocorrendo em áreas com diferentes tipos de solo, incluindo-se solos extremamente salinos (Williams *et al.*, 1984; Vieira *et al.*, 1993; Santos-Garcia *et al.*, 2012). *Stylosanthes capitata* mostra uma distribuição restrita em comparação a espécies *S. guianensis* e *S. humilis* (Costa, 2006). Alguns poucos estudos têm mostrado que o etileno pode aumentar a tolerância das plantas contra o estresse salino (Cao *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008). Assim, a participação do etileno na proteção de plântulas de *Stylosanthes* contra o estresse salino foi também investigada no presente trabalho.

2 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou investigar os possíveis efeitos do estresse salino na germinação de sementes de *S. humilis*, examinando-se suas inter-relações com a rota biossintética do etileno, via produção de ACC. Propôs-se ainda investigar as ações integrativas entre o estresse salino e o etileno no controle da germinação de sementes e no crescimento das plântulas de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condução dos experimentos

As plantas de *S. humilis* H.B.K. e *S. guianensis* Aubl. cv. Mineirão foram cultivadas em casa de vegetação em Viçosa (20° 45'S, 42° 15'W), Minas Gerais, Brasil. Os frutos maduros foram coletados em abril de 2011 e armazenados em laboratório (25-30 °C). Os frutos de *S. capitata* Vogel foram coletados em abril de 2011, a partir de uma população natural em Campo Grande (20° 26'S, 54° 38'W), Mato Grosso do Sul, Brasil. Para realização dos experimentos, as sementes foram escarificadas por meio de leve fricção entre duas lixas finas (lixa d'água nº 150), submetidas ao tratamento com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 10 min, e lavadas exaustivamente com água desionizada (Burin *et al.*, 1987). Em seguida, as sementes foram enxugadas com papel absorvente e transferidas para placas de petri de vidro (90 ou 150 mm de diâmetro) ou para frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo, ao fundo, duas camadas de papel de filtro Whatman nº 1. As placas de petri e os frascos, juntamente com o papel de filtro, foram previamente semi-esterilizados em estufa, a 105 °C, por 4 h.

As placas de petri e os frascos Erlenmeyer contendo as sementes receberam 10 e 3,0 mL das soluções-teste respectivamente, e foram mantidas no escuro, em câmara de crescimento noite/dia (Forma Scientific Inc, Ohio, USA), a 30° C. A protrusão da radícula foi o critério utilizado para considerar-se uma semente como germinada.

3.2 Inibição da germinação por NaCl

Os efeitos do estresse salino na inibição da germinação foram investigados expondo-se sementes não-dormentes de *S. humilis* a soluções de NaCl, sob concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200 mM. A concentração considerada ótima foi a que promoveu a

mais alta taxa de inibição da germinação, sem causar efeitos tóxicos aparentes. Após o terceiro dia de incubação, as sementes foram lavadas com água desionizada e colocadas em outra placa de petri contendo água desionizada (pH 7,0). A toxicidade dos íons sobre a germinação foi avaliada após 72 h de incubação, quando a solução inicial foi substituída por água desionizada. Ao final do experimento, o número de sementes germinadas foi registrado para inferir-se sobre a condição de vitalidade das sementes.

3.3 Efeito do estresse osmótico em relação à inibição da germinação pelo NaCl

Para avaliar-se o efeito do estresse osmótico sobre o processo de germinação, sementes não dormentes de *S. humilis* foram expostas a soluções de polietileno glicol 6000 (PEG), formuladas com potenciais osmóticos idênticos aos das soluções de NaCl. Os potenciais osmóticos das soluções foram determinados com auxílio de um osmômetro Wescor-5500 (Wescor, Logan, UT, EUA), correspondentes a - 0,23, - 0,46 e - 0,68 MPa [NaCl 50, 100 e 150 mM; PEG 8, 15 e 21% (m/v)]. A germinação e a produção de etileno pelas sementes foram determinadas nos períodos de 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h após exposição das sementes ao meio de incubação.

3.4 Reversão do efeito do NaCl

Para avaliar-se se o estresse salino promove a redução na germinação por inibir à produção de etileno, sementes não dormentes de *S. humilis* foram expostas a soluções de NaCl, às concentrações variáveis entre 0 e 200 mM, contendo também CEPA, à concentração de 0,1 mM. A associação causal entre a inibição da germinação provocada pelo estresse salino e a inibição da biossíntese de etileno foi examinada tratando-se as sementes não-dormentes com solução de NaCl (150 mM), contendo também ACC, às

concentrações de 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 μM . A germinação foi registrada diariamente até o terceiro dia do experimento.

3.5 Produção de etileno por sementes tratadas com NaCl

Para investigar-se se o efeito do estresse salino na germinação das sementes de *Stylosanthes* se processava via biossíntese de etileno, sementes não dormentes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram expostas a soluções de NaCl, às concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175 mM. O etileno emanado pelas sementes e a germinação foram analisados 48 h após o início da incubação das sementes nas soluções de NaCl.

3.6 Quantificação do etileno

Como o acúmulo de etileno na atmosfera dos frascos Erlenmeyer selado aumenta a sua própria biossíntese pelas sementes, estimulando a germinação das sementes tratadas com NaCl (ver Tabela 1A, Anexo), o etileno foi quantificado seguindo-se a técnica descrita por Ribeiro e Barros (2004a, b). Tampas semi-flexíveis de polipropileno, forradas com duas camadas de papel de filtro, foram inseridas dentro dos frascos Erlenmeyers de 50 mL de capacidade. Logo após, lotes de 50 sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram embebidas em 3 mL do meio de germinação e dispostas ao redor das tampas. Posteriormente, as tampas receberam 250 μL de solução de perclorato de mercúrio (0,25 M) e, os frascos foram imediatamente selados e mantidos no escuro em câmaras de crescimento noite/dia (Forma Scientific Inc, Ohio, USA), a 30 °C. O etileno fixado pela solução de perclorato foi liberado, injetando-se solução de NaCl 4,0 M sobre a solução de perclorato (Abeles, 1973). A atmosfera dos frascos foi homogeneizada utilizando-se de uma seringa de 3,0 mL, provida de agulha longa. Retirou-se uma amostra de 1,0 mL da atmosfera, dos frascos, utilizando-se de seringas *ultra-fine* (agulhas 29 G 1/2"). As

amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, serie II (USA), equipado com um detetor de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o dinitrogênio em fluxo de 30 mL min⁻¹; os fluxos do hidrogênio e do ar foram mantidos em 30 e 320 mL min⁻¹, respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detetor foram mantidas a 60, 110 e 150 °C, respectivamente. A determinação do etileno foi feita comparando-se as áreas das amostras obtidas no Software Peak-2 Simple com áreas de picos de uma mistura padrão de etileno de concentração conhecida.

3.7 Efeito do NaCl nos níveis de ACC

Os níveis de ACC nas sementes não-dormentes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram determinados seguindo-se a técnica descrita por Lizada e Yang (1979), com algumas modificações (Pinheiro *et al.*, 2008). Amostras de 150 sementes foram infiltradas com soluções de NaCl (100 e 150 mM) e incubadas em placas de Petri (150 mm de diâmetro), contendo, ao fundo, dois discos de papel de filtro Whatman nº 1 e mantidas em câmara de crescimento noite/dia, a 30°C, por 48 h. Ao final do período de incubação, as sementes foram lavadas com água desionizada, enxugadas com papel absorvente, pesadas e imersas em nitrogênio líquido e, então, estocadas em freezer a - 80°C.

Para os ensaios, as amostras foram extraídas por maceração em almofariz com pistilo em 10 mL de etanol (80%), acrescentando-se também polivinil-polipirrolidona (PVPP 5% m/v). O extrato foi centrifugado a 12000 g, por 20 min, a 4°C e o sobrenadante foi evaporado até securo, em evaporador rotativo, à temperatura de 45°C. O resíduo foi suspenso em 4,0 mL de água desionizada (extrato original), tomando-se a metade para quantificar-se o ACC livre.

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi levada a reagir com 0,1 mL de cloreto de mercúrio (5,0 μmol), completando-se o volume da reação para 0,8 mL, com água desionizada. O tubo de ensaio foi vedado com selador de látex e mantido em banho de gelo. Aproximadamente 0,2 mL de uma mistura resfriada de NaOCl (5%) e NaOH saturado (v/v 2:1) foram injetados no tubo, com auxílio de uma seringa. O tubo foi imediatamente agitado num misturador tipo vórtex, por um período de 5 s, e incubado em banho de gelo, por 2,5 min. Após nova agitação por 5 s, uma amostra gasosa de 1,0 mL da atmosfera do tubo de ensaio foi recolhida, com uma seringa, e o etileno produzido foi analisado por cromatografia gasosa.

A metade remanescente do extrato original foi utilizada para determinar-se o ACC total (ACC livre + ACC conjugado), após hidrólise ácida com HCl (2 N), a 100°C, por 3 h. Em seguida, o extrato foi neutralizado com NaOH saturado e evaporado a 45°C, até secar. O resíduo foi ressuspensão em 2,0 mL de água desionizada. A quantificação do ACC total seguiu os mesmos procedimentos para quantificação do ACC livre (Lizada e Yang, 1979).

3.8 Quantificação do sódio

Para quantificação do Na, lotes de 150 sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram infiltrados em 16 mL de água desionizada ou NaCl (100 e 150 mM) e então, mantidas em placa de petri, contendo, ao fundo, duas folhas de papel de filtro. As placas com as sementes foram mantidas no escuro em câmaras de crescimento, a 30 °C, por 24 h. Em seguida, as sementes foram lavadas exaustivamente em água desionizada, tiveram suas massas frescas determinadas, e secas em estufa a 70 °C, por 48 h. As amostras secas foram digeridas com HNO₃ sobre uma placa quente, e finalmente diluída com água

desionizada. Os níveis de Na nas amostras foram quantificados por espectrometria de emissão óptica em plasma (Perkin Elmer Optima 3000XL).

3.9 Efeito do NaCl no crescimento das plântulas

Sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram germinadas em placas de petri, contendo, ao fundo, dois discos de papel de filtro e 16 mL de água desionizada, pH 7,0. As placas com as sementes foram mantidas no escuro em câmara de crescimento a 30 °C, por um período de 24 h. Em seguida, lotes de 10 plântulas de tamanho uniforme ($\pm 0,3$ cm) foram transferidas para placas de petri (90 mm de diâmetro), contendo solução de NaCl, às concentrações de 0, 100 e 150 mM (ver Fig 2A, Anexo). As placas de petri, contendo as plântulas e as respectivas soluções-teste, foram mantidas em câmara de crescimento com um ciclo dia/noite de 16/8 h, a 30/25 °C, e intensidade de luz de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 48 h de incubação, os comprimentos da radícula e do hipocótilo das plântulas foram determinados com o auxílio de uma régua.

As plântulas de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* tratadas com soluções de NaCl apresentaram injúrias severas em decorrência da toxicidade do íon sódio, tais como escurecimento progressivo da raiz e do caule, assim como completa murcha dos cotilédones, seguida pela morte das plântulas. Assim, a sobrevivência de plântulas (número de plântulas sobreviventes ao fim do experimento) foi determinada sete dias após o período de exposição ao sal.

3.10 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de germinação e de determinação do etileno foi composta por 50 sementes por placa de petri ou frascos Erlenmeyer,

respectivamente, com cinco repetições por tratamento. Os resultados de porcentagem de germinação foram transformados em arco-seno $(\% G/100)^{1/2}$ antes da análise, e todos os dados foram verificados quanto à normalidade. Para quantificação do ACC e dos níveis de Na, as unidades experimentais foram compostas de amostras do extrato de 150 sementes, com cinco repetições por tratamento. A unidade experimental da análise de tolerância ao sal foi composta por 10 repetições constituídas de 10 plântulas cada. A análise de variância (ANOVA, $P < 0,05$) foi realizada para determinarem-se os efeitos dos tratamentos. Quando a ANOVA mostrou efeitos significativos, o teste de Tukey ($P < 0,05$) foi empregado para determinarem-se as diferenças entre os tratamentos. Todas as comparações entre médias foram realizadas com Software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O NaCl reduziu a germinação de sementes de *S. humilis* de maneira dependente da dose, inibindo a germinação a concentrações relativamente baixas como 50 mM (Fig 1). O efeito máximo na inibição da germinação das sementes foi induzido por solução, à concentração de 200 mM, sendo a germinação reduzida em 89 %, após 72 h de exposição. Lovato *et al.* (1994) observaram o efeito máximo de inibição da germinação

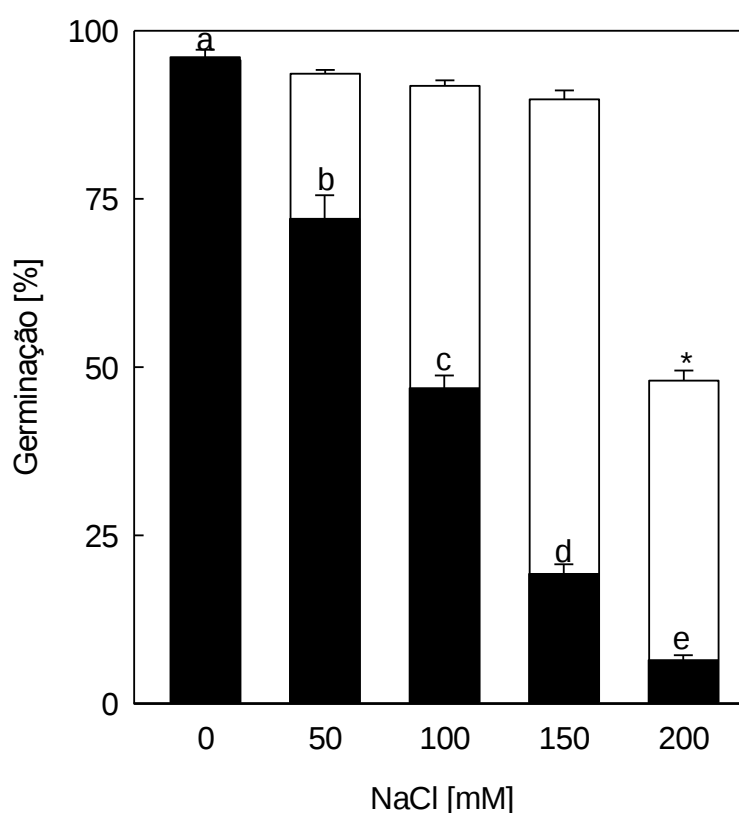


Figura 1. Efeito do NaCl sobre a germinação de sementes não dormentes (387 dias de idade pós-colheita). Germinação sob soluções-teste de NaCl (barras pretas) e posterior transferência para água desionizada (barras brancas). A transferência das sementes para água desionizada ocorreu 72 h após o início do experimento e a nova germinação foi avaliada após 48 h. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média. O asterisco indica diferença significativa, em nível de 5% pelo teste *t*, entre os efeitos das soluções-teste e do controle

à concentração de 268 mM. Entretanto, os autores não empregaram nenhum teste para avaliar a vitalidade das sementes exposta à solução de NaCl. Neste trabalho, quando as sementes foram transferidas para água desionizada para avaliar-se a viabilidade das sementes, observou-se que a concentração de 200 mM de NaCl foi tóxica ($P < 0,05$; teste t) (Fig 1). Por outro lado, a viabilidade das sementes não foi afetada por soluções de NaCl a concentrações entre 25 e 150 mM. Diante desses resultados, a concentração de 150 mM foi selecionada para os trabalhos posteriores com sementes de *S. humilis*, já que foi a concentração que mais inibiu a germinação sem mostrar-se tóxica.

O efeito do NaCl na inibição da germinação de sementes pode ser atribuído ao estresse osmótico ou à toxicidade específica do íon sódio (Bajji *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Assim, para examinar-se o mecanismo de ação do estresse salino na inibição da germinação de sementes de *S. humilis*, soluções de PEG-6000, um polímero osmótico, foram formuladas com idênticos potenciais osmóticos das soluções-teste de NaCl. A inibição da germinação das sementes foi aumentada com a diminuição do potencial osmótico das soluções de NaCl (Fig 2A). O sal promoveu maior inibição da germinação a - 0,68 MPa, sendo a germinação reduzida em 74 %, após 48 h de exposição à solução-teste. Contrariamente ao NaCl, as soluções de PEG-6000 não foram capazes de inibir a germinação de sementes de *S. humilis* (Fig 2C). Uma possível explicação para ação diferente entre os dois tipos de soluções-teste é que os íons sódio agiriam inibindo a biossíntese do etileno, enquanto o estresse osmótico não teria maior efeito sobre a biossíntese do regulador gasoso, que é requerido para a germinação de sementes de estilósante (Ribeiro e Barros, 2004; 2006). Assim, para testar-se o tipo de relação entre o etileno e a inibição da germinação promovida por íons sódio, a produção de etileno

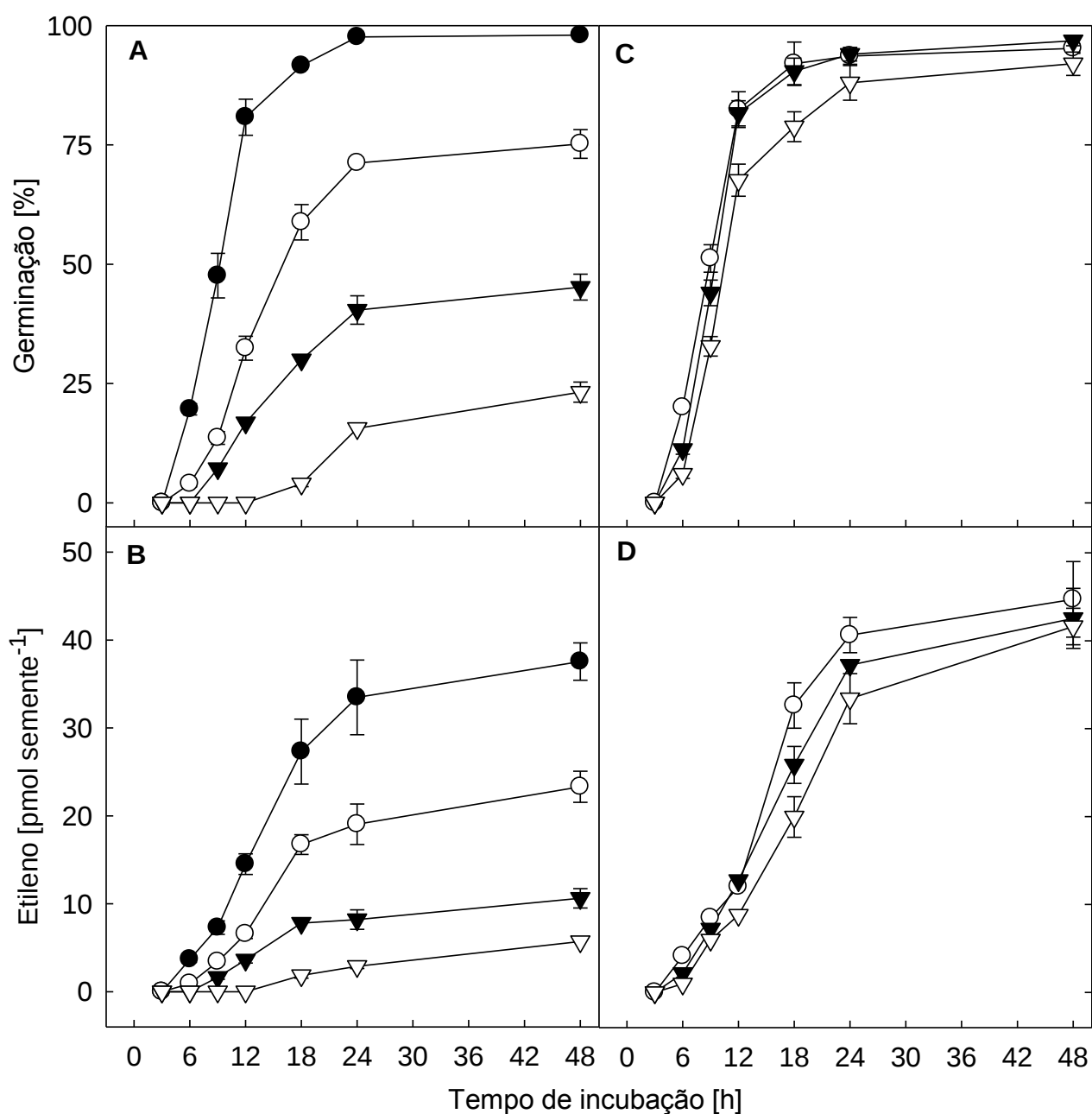


Figura 2. Germinação e produção de etileno de sementes de *S. humilis* tratadas com soluções iso-osmóticas de NaCl e PEG. (A, B) Efeitos da soluções de NaCl sobre a germinação e a produção de etileno por sementes. (1) círculo cheio, a água desionizada (controle), (2) círculo aberto, - 0,23 MPa NaCl, (3) triângulo cheio, - 0,46 MPa NaCl, (4) triângulo aberto, - 0,68 MPa NaCl. (C, D) Efeitos da soluções de PEG na germinação e produção de etileno por sementes. (1) círculo aberto, - 0,23 MPa de PEG, (2) triângulo cheio, - 0,46 MPa de PEG, (3) triângulo aberto, - 0,68 MPa de PEG. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

foi quantificada em sementes não-dormentes embebidas em soluções de NaCl ou PEG-6000 com idênticos potenciais osmóticos. A produção de etileno por sementes de *S. humilis* foi inibida fortemente por soluções de NaCl, no intervalo avaliado (3-48 h) (Fig 2B). Sob a ação do NaCl, em níveis de - 0,23; - 0,46 e - 0,68 MPa, a biossíntese de etileno foi inibida em 38 %, 72 % e 85 %, respectivamente, em relação ao controle (água desionizada), ao final de 48 h de embebição. Os resultados da Figura 2 também indicam que a inibição da produção de etileno promovida por soluções de NaCl coincidiu com a redução da germinação das sementes. Por outro lado, os efeitos inibitórios causados por soluções de NaCl sobre a biossíntese de etileno e sobre a germinação não foram verificados quando as sementes foram embebidas em soluções de PEG-6000 (Fig 2C, D). Semelhantemente aos efeitos das soluções de PEG-6000, a germinação e a produção de etileno de sementes de *S. humilis* submetidas à solução de manitol, com potencial osmótico de - 0,68 MPa, não diferiu significativamente das sementes do controle (ver Fig 1A, Anexo). Assim, torna-se improvável que o estresse osmótico seja o disparador da inibição da biossíntese de etileno e da germinação de sementes de *S. humilis* tratadas com solução de NaCl.

A relação entre a inibição da germinação de sementes de *S. humilis* provocada pelo estresse salino e o efeito do etileno foi avaliada tratando-se as sementes apenas com solução de NaCl, ou após incubação por 12 h na solução salina, lotes de sementes foram transferidos para água desionizada, continuando-se a avaliação da germinação e da produção de etileno, por mais 36 h. Sementes embebidas em solução de NaCl (150 mM) apresentaram uma redução de 75% na germinação e de 86% na produção de etileno, ao fim do período de incubação (Fig 3A, B). Por outro lado, os efeitos inibitórios do NaCl sobre a germinação e a biossíntese de etileno foram completamente revertidos, seguindo-se a transferência das sementes para água desionizada. Assim, o efeito do NaCl na germinação

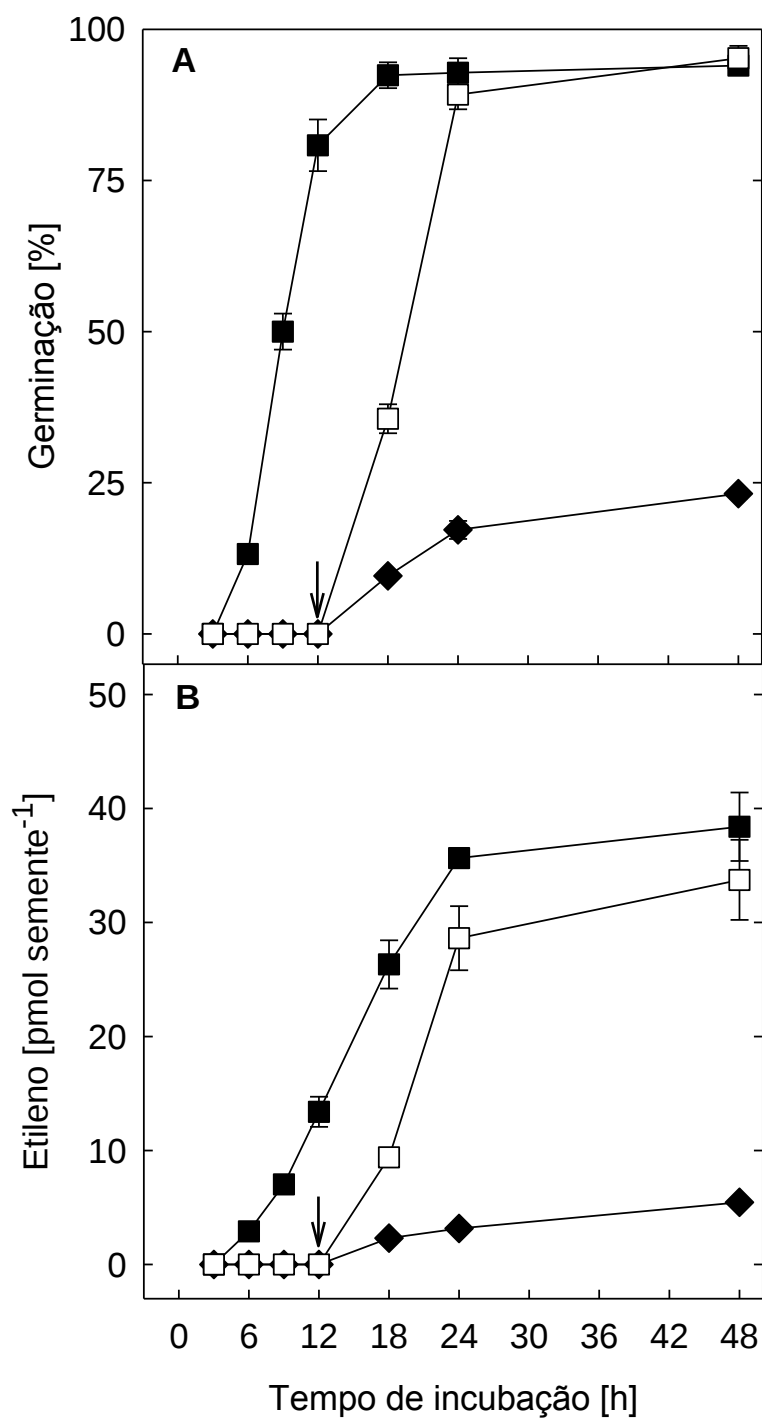


Figura 3. Germinação e produção de etileno por sementes de *S. humilis* após a transferência da solução de NaCl para água deionizada. (A) Germinação e (B) produção de etileno foram determinadas em sementes embebidas em água desionizada (quadrado cheio) (controle) ou incubadas durante 12 horas com NaCl (150 mM) (quadrado aberto) e, em seguida, transferidas para a água desionizada (indicado pela seta) ou em sementes tratadas apenas (losângulo cheio) com NaCl. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

de sementes de *S. humilis* foi provavelmente uma consequência da condição de estresse promovida pela alta concentração de Na, que disparou a inibição da biossíntese de etileno. Consistente com esses resultados, sementes incubadas em solução de NaCl (150 mM) apresentaram redução significativa nos níveis de ACC livre (80 %) e de ACC total (72 %) em relação às sementes do controle (Tabela 1). Ademais, os efeitos inibitórios provocados pelo NaCl na biossíntese do ACC e na germinação foram completamente revertidos após a transferência das sementes para água desionizada. Entretanto, após 12 h de incubação das sementes em solução de NaCl, se não mais observou incremento significativo nos níveis de ACC livre e total bem como na germinação nas sementes transferidas para solução de AVG, inibidor da atividade da sintase do ACC (Tabela 1). Juntos esses resultados indicam que o estresse salino inibiu a germinação de sementes de *S. humilis* por reduzir a biossíntese de etileno.

Tabela 1. Efeito do NaCl sobre a germinação e o acúmulo de ACC em sementes de *S. humilis*

Tratamento	Germinação [%]	ACC [pmol semente ⁻¹]	
		livre	Total
Água→ Água (controle)	95,3 ± 3,0 a	37,3 ± 4,0 a	131,1 ± 8,3 a
NaCl → NaCl	20,8 ± 2,9 b	7,5 ± 0,6 b	36,2 ± 3,3 b
NaCl → Água	91,5 ± 4,6 a	49,1 ± 4,3 a	143,6 ± 5,9 a
NaCl → AVG	4,3 ± 0,6 c	3,2 ± 0,3 b	18,5 ± 1,2 b

As sementes foram embebidas em água desionizada ou em solução de NaCl (150mM) por 12 horas, após o que foram transferidas para segundo meio, indicado após a seta (NaCl; 150 mM ou AVG 0,1 mM). A germinação e os níveis de ACC foram quantificados 12 h após a transferência das sementes para o segundo meio. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias de 5 repetições ± erro da média

O etileno, além de desempenhar um efeito promotor na germinação de sementes (Matilla, 2000; Matilla e Vázquez-Matilla, 2008) tem-se mostrado benéfico em antagonizar a inibição da germinação de algumas espécies por estresse salino (Khan e Huang, 1988; Calvo *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2010). Para avaliar-se o grau de envolvimento do etileno na germinação de sementes de *S. humilis* tratadas com solução de NaCl, buscou-se reverter a inibição da germinação devida ao estresse salino com solução de ACC ou CEPA. O ACC reverteu, de maneira dependente da dose, a inibição da germinação das sementes promovida pelo NaCl, resultado que também está correlacionado com a produção de etileno (Fig 4). Sob a ação do ACC, à concentração de 1 mM, verificou-se que a germinação das sementes foi 4,2 vezes maior do que as mantida em solução de NaCl puro, ao final de 48 h de embebição. A essa concentração de ACC houve um aumento de 26 vezes na produção de etileno das sementes mantidas em solução de NaCl+ACC, quando comparada as sementes sob a solução de NaCl pura. Esses resultados indicam que estresse salino inibe a germinação de sementes de *S. humilis* por reduzir ou inibir a biossíntese de etileno. Consistente com esses resultados, a inibição na germinação promovida por soluções de NaCl (150 Mm) foi completamente superada por CEPA (10 mM), 48 h após do início do experimento (Fig 5). Juntos os experimentos com ACC e CEPA sugerem que o etileno está envolvido na germinação de sementes de *S. humilis* sob condição de estresse salino.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm mostrado a importância do etileno como molécula-chave em várias cascatas de sinalização que levam à tolerância a vários fatores de estresse, incluindo-se o estresse salino (Achard *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013). Assim, torna-se provável que a capacidade de biossintetizar etileno por várias espécies de sementes possa estar relacionada com o nível de germinação em ambiente salino. Os resultados revestem-se de grande significado, já que a estratégia de germinação

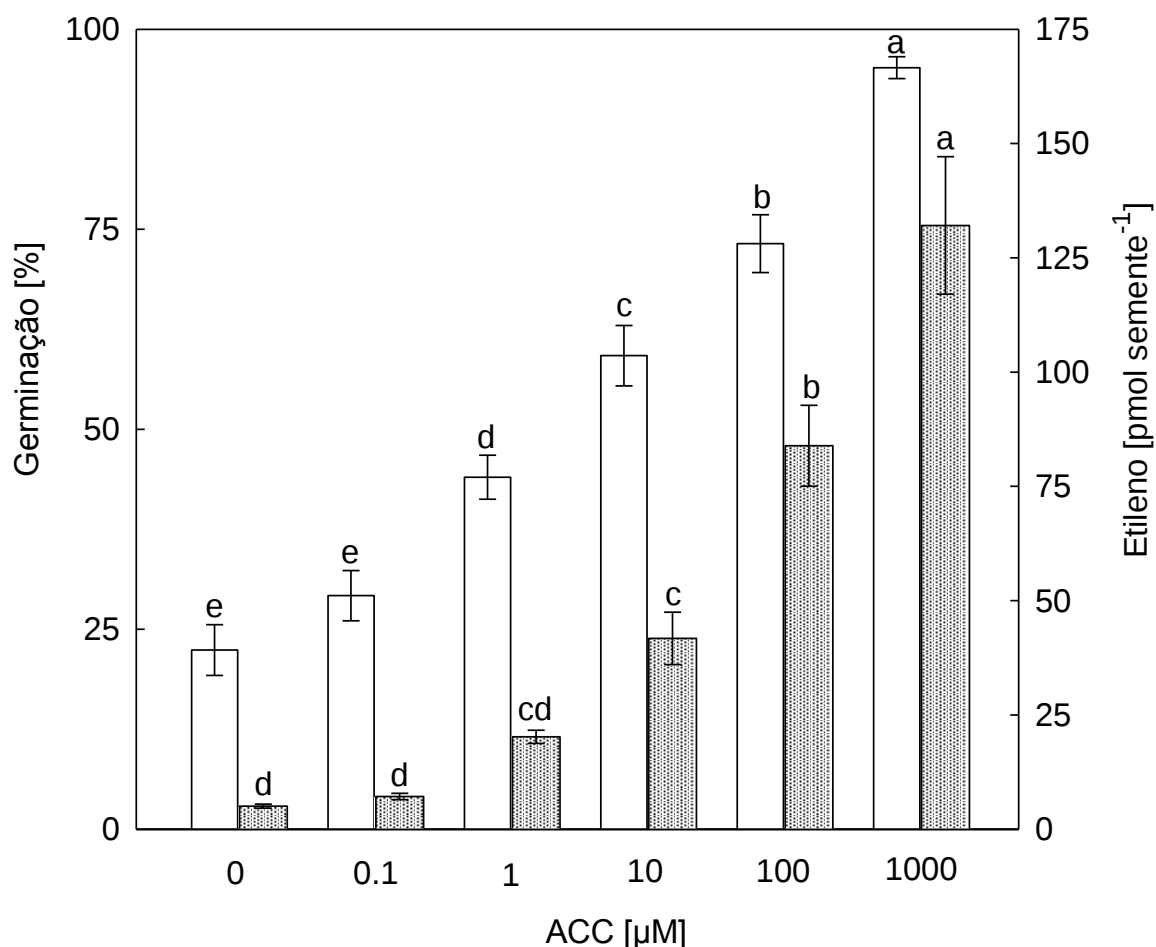


Figura 4. Efeitos da solução de NaCl (150 mM), suplementada com ACC, sobre a germinação e a produção de etileno de sementes de *S. humilis*. A germinação (barras brancas) e a produção de etileno (barras tracejadas) foram quantificadas 48 h após o início da embebição das sementes. A germinação de sementes e a produção de etileno em água desionizada foram $96,4 \pm 1,5$ % e $45,4 \pm 3,6$ pmol semente⁻¹, respectivamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

de sementes é um dos fatores mais importantes que determinam a sobrevivência das espécies, pois constitui uma das formas de suas populações serem mantidas em condição natural.

Para ampliar-se o conhecimento sobre o controle da germinação de sementes de algumas espécies do gênero *Stylosanthes* sob condição de estresse salino, sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram embebidas em soluções de NaCl e o etileno

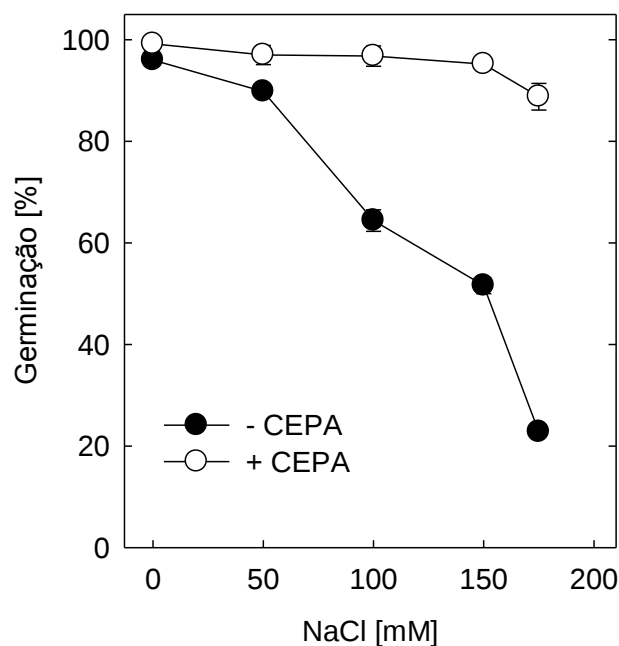


Figura 5. Efeito do CEPA fornecido em soluções de NaCl na germinação de sementes de *S. humilis*. Soluções de NaCl puro ou em conjunto com ethrel (0,1 mM) foram preparadas em água desionizada. A germinação das sementes foi determinada 48 h após o início da embebição. Médias de 5 repetições + erro da média

emanado pelas sementes foi quantificado. A germinação de sementes de *S. humilis* foi progressivamente inibida com o aumento da concentração de NaCl no meio de germinação (Fig 6A). O efeito máximo na inibição da germinação das sementes foi induzido por NaCl, à concentração de 175 mM, quando a germinação foi nula. Além disso, a síntese de etileno manteve uma estreita relação com a germinação das sementes, de modo que a produção de etileno foi completamente inibida por solução de NaCl, à concentração de 175 mM (Fig 6B). Entretanto, os efeitos inibitórios do NaCl, às concentrações entre 50-175 mM, sobre a germinação foram revertidos após a transferência das sementes de *S. humilis* para água desionizada (Fig 6C). Por outro lado, o NaCl causou uma redução significativa na germinação de sementes de *S. capitata* sob concentrações tão baixas quanto 25 mM (Fig 6D). A essa concentração, a germinação e a produção de etileno foram reduzidas a 67%

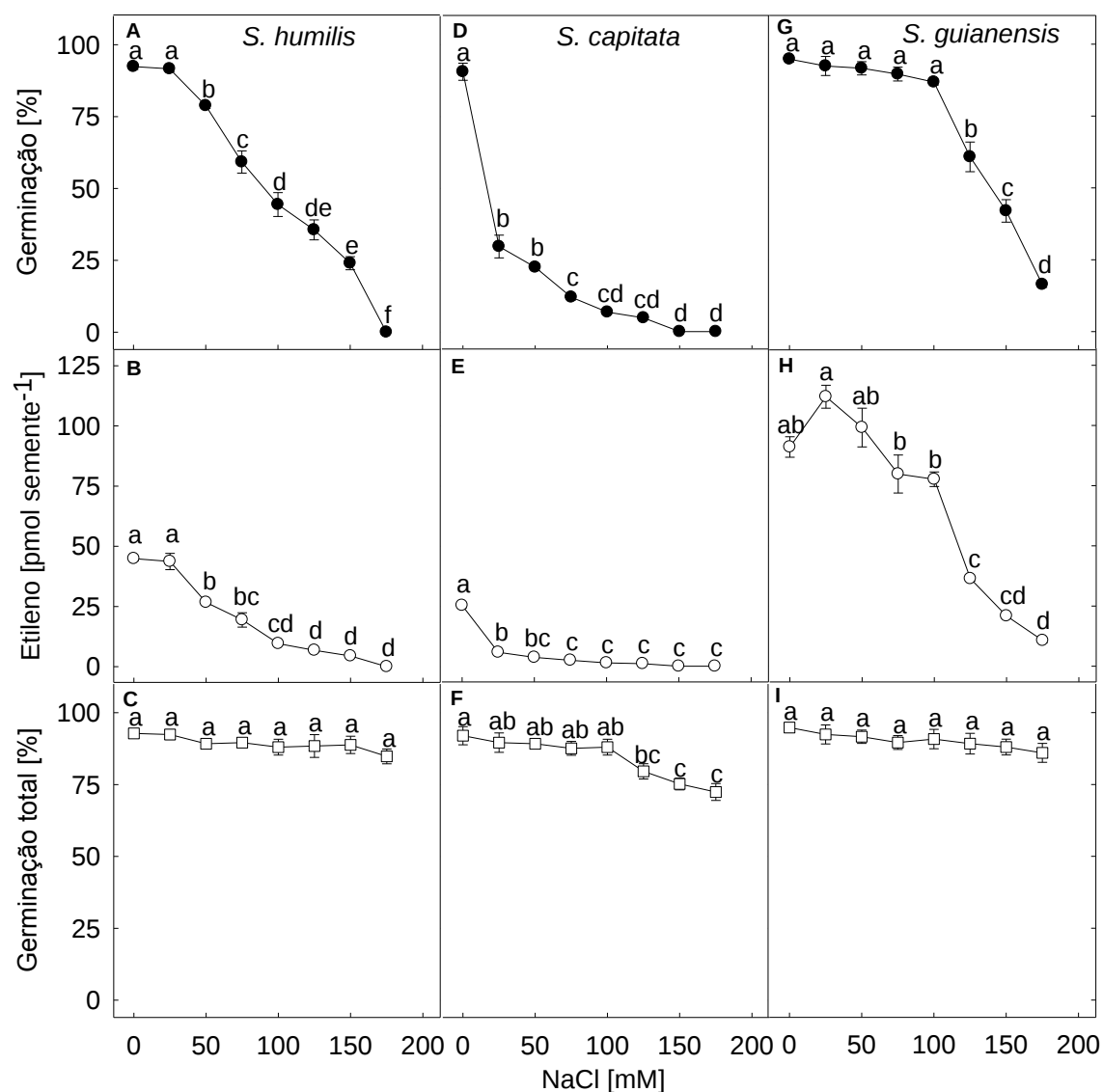


Figura 6. Germinação e produção de etileno em sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* incubadas em soluções de NaCl. A germinação e produção de etileno de sementes de *Stylosanthes* foram determinadas 48 h após o início da embebição. A germinação total foi registrada como a soma das porcentagens de sementes germinadas em soluções salinas e germinadas após a transferência das sementes para água desionizada por um período extra de 48 h. Médias seguidas de mesma letra, dentro de uma espécie, não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

e 75%, respectivamente, em comparação com as sementes do controle (Fig 6E). A inibição máxima da germinação foi induzida por NaCl 100 mM, quando foi reduzida em 92% em comparação às sementes controle. Além disso, o NaCl, à concentração de 100 mM, promoveu redução de 94% na emissão de etileno de *S. capitata*. Os efeitos inibitórios do NaCl, às concentrações entre 25-100 mM, sobre a germinação foram completamente revertidos após a transferência das sementes para água desionizada (Fig. 6F). Entretanto, sementes de *S. capitata* tratadas com concentrações de NaCl superiores a 100 mM não recuperaram totalmente a germinação, após transferência para a água desionizada. Em sementes de *S. guianensis*, não se observou redução significativa na germinação e na produção de etileno até à concentração de 100 mM de NaCl no meio de incubação. Entretanto, acima dessa concentração, verificou-se redução na germinação e na biossíntese de etileno (Fig 6G, H). Esses resultados indicam que das três espécies estudadas *S. guianensis* foi a mais tolerante ao sal. Ademais, os efeitos inibitórios do NaCl, às concentrações acima de 100 mM, sobre a germinação foram completamente revertidos após a transferência das sementes para água desionizada (Fig 6I). Os resultados da Figura 6 também mostram que a produção de etileno foi de 1,8 e 3,6 vezes maior em sementes de *S. humilis* e *S. guianensis* do que em sementes de *S. capitata*, em água desionizada (controle). Além disso, as três espécies de sementes responderam de modo distinto ao aumento da concentração de NaCl no meio de germinação. Juntos, os resultados acima fornecem evidências de que a capacidade de sintetizar etileno constitui um requisito importante na germinação e na tolerância de sementes de *Stylosanthes* ao de estresse salino.

Para avaliar-se o grau de envolvimento da rota do ACC de biossíntese de etileno na germinação de sementes de *Stylosanthes* sob condição de estresse salino, sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* foram embebidas em soluções de NaCl para a quantificação dos níveis de ACC. O NaCl promoveu alterações significativas nos níveis de

ACC livre e total nos tecidos das sementes de *Stylosanthes*, resultado que também mostrou-se correlacionado com a germinação das sementes (Fig 7A-C). O conteúdo de ACC livre foi reduzido em 79% e 87% nas sementes de *S. capitata* tratadas com solução de NaCl, às concentrações de 100 e 150 mM, enquanto os mesmos tratamentos resultaram em uma redução de 43% e 79% respectivamente no nível de ACC livre nas sementes de *S. humilis*, (Fig 7B). Por outro lado, em sementes de *S. guianensis* tratadas com NaCl, às concentrações de 100 e 150 mM, a redução do conteúdo de ACC livre foi somente de 9% e 57%, respectivamente. A germinação das sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* seguiu o mesmo comportamento dos níveis de ACC livre, resultado que também esteve correlacionado com conteúdo de ACC total das sementes. Juntos, esses dados fornecem evidência de que as sementes de *S. guianensis* são mais adaptadas às condições salinas, em razão de sua maior capacidade inata de produzir etileno.

A diferença na tolerância à salinidade entre as três espécies de *Stylosanthes* bem poderia ser resultado da absorção seletiva ou exclusão do Na, desde que existem algumas evidências de que o tegumento das sementes pode ter um papel importante na proteção contra os efeitos tóxicos do Na (Rehman *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2009). Assim, o acúmulo de Na nos tecidos das sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* previamente tratadas com solução de NaCl foi quantificado. A exposição das sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* às soluções de NaCl, às concentrações de 100 e 150 mM, levou a um aumento acentuado nos níveis de Na nos tecidos das sementes, sugerindo que a absorção seletiva ou exclusão de Na não estão associadas com as diferenças na tolerância à salinidade entre as três espécies (Fig 8). Na Figura 8, observa-se, também um pequeno aumento dos níveis de Na nas sementes de *S. guianensis* tratadas com solução de NaCl (100 e 150 mM), em relação as outras duas espécies estudadas. Assim, como a biossíntese de etileno em sementes daquela espécie também foi maior do

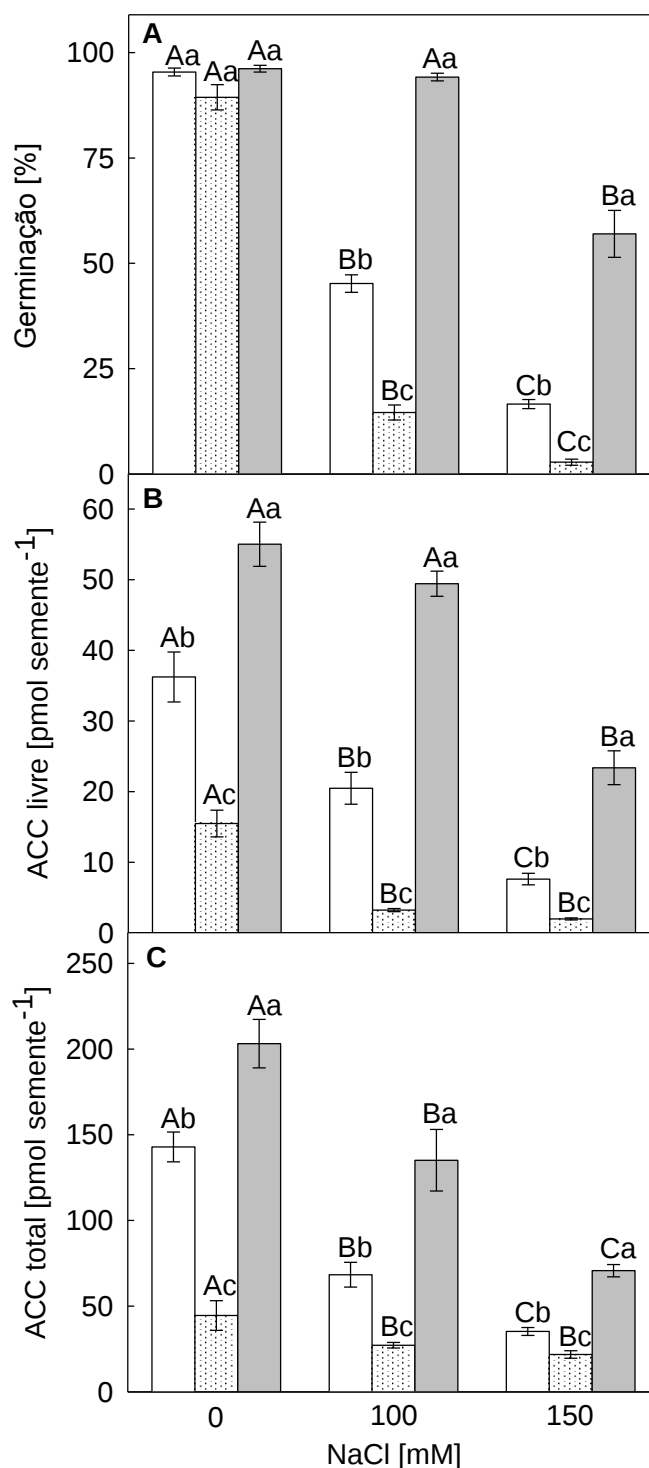


Figura 7. Germinação e níveis de ACC em sementes de *Stylosanthes* 24 h após a embebição. (A) Germinação e mudanças no conteúdo de ACC (B) livre e (C) total em sementes de *S. humilis* (barras brancas), *S. capitata* (barras pontilhadas) e *S. guianensis* (barras cinzas) tratadas com soluções de NaCl. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, entre os tratamentos, ou de mesma letra minúscula, entre as três espécies dentro do mesmo tratamento, não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

que em sementes das outras duas espécies, é bastante provável que o incremento na produção de etileno possa ter atenuado os efeitos do estresse salino provocados pelos elevados níveis de Na acumulados nos tecidos das sementes de *S. guianensis*.

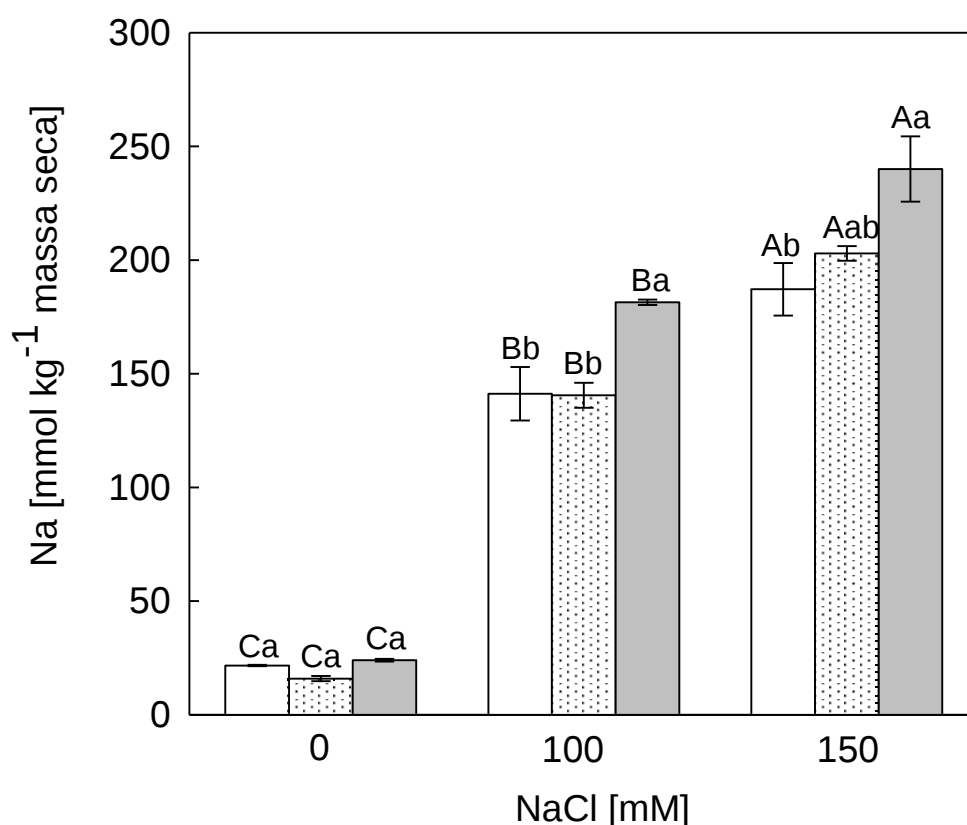


Figura 8. Acúmulo de Na em sementes de *S. humilis* (barras brancas), *S. capitata* (barras pontilhadas) e *S. guianensis* (barras cinzas) tratadas com soluções de NaCl. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, entre os tratamentos, ou de mesma letra minúscula, entre as três espécies dentro do mesmo tratamento, não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

As sementes de algumas espécies de halófitas, submetidas á alta salinidade, recuperam o nível de germinação após transferência para água desionizada (Huang *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005). Assim, a capacidade daquelas halófitas em restaurar a capacidade de germinação deve estar associada ao estabelecimento das plântulas em ambientes salinos, em particular quando a precipitação pluvial é suficiente para lavar os

sais da superfície do solo (Qu *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2009). Nesse contexto, dadas as diferenças observadas na tolerância ao estresse salino, durante a germinação das sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis*, seria importante investigarem-se, também, os efeitos do NaCl sobre o crescimento das plântulas das três espécies. Na Figura 9 (A, B) observa-se que os comprimentos da raiz e do hipocótilo das três espécies não diferiram significativamente 48 h, após incubação em água desionizada (controle). Por outro lado, o comprimento das raízes das plântulas de *S. humilis* tratadas com 100 e 150 mM de NaCl, reduziram-se 18% e 38%, respectivamente, enquanto os mesmos tratamentos promoveram uma redução no comprimento das raízes de *S. capitata* de 49% e 60%, respectivamente (Fig 9A). Em contraste, o comprimento da raiz de plântulas de *S. guianensis* foi reduzido em apenas 4% e 9%, após a incubação com 100 e 150 mM de NaCl, respectivamente. Da mesma forma, os efeitos inibitórios das soluções de NaCl também foram maiores no hipocótilo de plântulas de *S. capitata* em relação as plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* (Fig 9B). Analisando-se os efeitos do estresse salino no crescimento das plântulas, também se observou que os efeitos tóxicos do NaCl no crescimento da raiz, tal como o escurecimento da extremidade do órgão, foram bastante pronunciados em plântulas de *S. capitata* do que nas outras duas espécies (ver Fig 3A, Anexo). Todos esses resultados indicam que plântulas de *S. capitata* são mais sensíveis ao NaCl que as plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis*. Consistente com esses resultados, plântulas de *S. capitata* apresentaram menores taxas de sobrevivência do que as plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis*, sete dias após de incubação em soluções de NaCl (Fig 9C).

Das três espécies de *Stylosanthes* estudadas, o *S. guianensis*, também, apresentou um incremento significativo nos níveis de biossíntese de etileno (Fig 6H), os quais se correlacionaram com a tolerância das plântulas ao estresse salino (Fig 9). Juntos esses

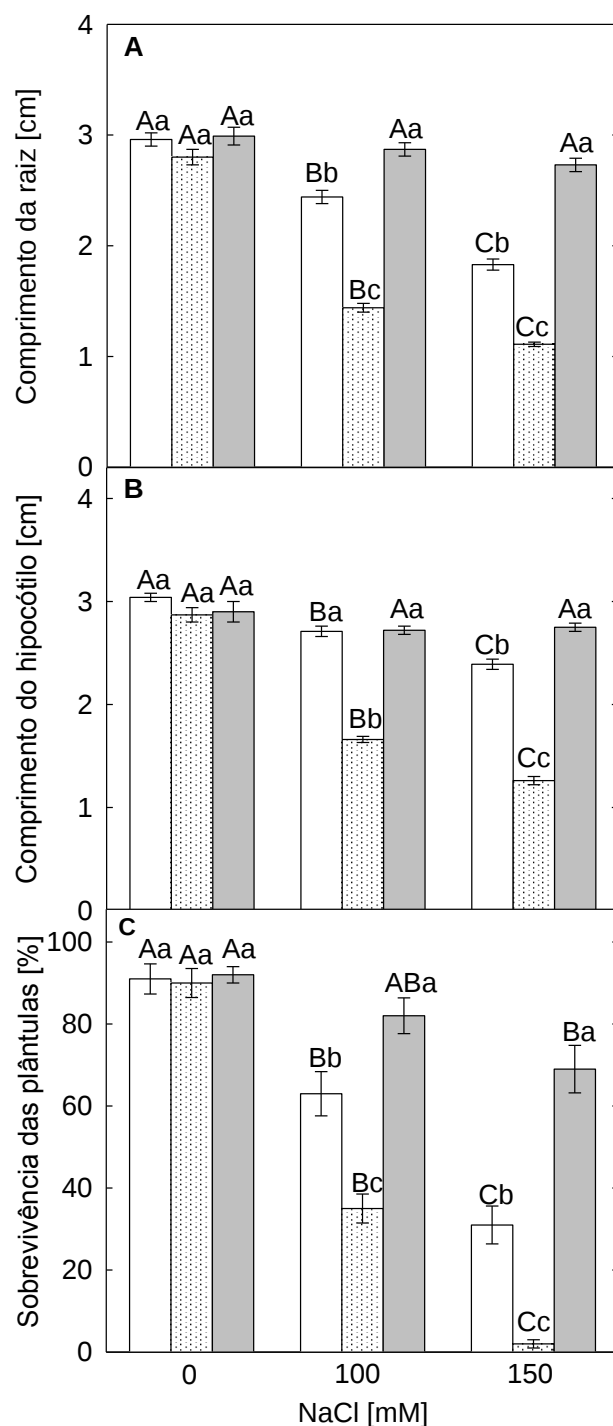


Figura 9. Efeito do NaCl no crescimento de plântulas de *Stylosanthes*. (A) Comprimento da raiz e (B) comprimento de hipocótilo de plântulas de *S. humilis* (barras brancas), *S. capitata* (barras pontilhadas) e *S. guianensis* (barras cinzas) cultivadas em água desionizada (controle) ou soluções de NaCl. (C) Sobrevivência de plântulas de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis*. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, entre os tratamentos, ou de mesma letra minúscula, entre as três espécies dentro do mesmo tratamento, não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey. Médias de 100 plântulas $\pm$ erro da média

dados sugerem que a capacidade das sementes de sintetizar etileno desempenharia um papel ecológico fundamental na distribuição das espécies de *Stylosanthes*. Apesar de o etileno ter sido, por muito tempo, reconhecido como um inibidor de crescimento (Abeles, 1992), sabe-se que esse hormônio gasoso também pode ser um indutor do crescimento e desenvolvimento das plantas (Pierik *et al.*, 2006). Além disso, nos últimos anos, alguns trabalhos têm mostrado que a ativação da cascata de sinalização do etileno é necessária para a tolerância ao sal (Achard *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013). Dessa forma, é bastante provável que o etileno atue como um sinal necessário para a germinação e a sobrevivência das plântulas de *Stylosanthes* sob condição de estresse salino.

5 CONCLUSÕES

A germinação e a produção de etileno de sementes escarificadas de *S. humilis* foram inibidas por soluções de NaCl, mas não por soluções de PEG-6000 de potenciais osmóticos idênticos. Nesse contexto, os efeitos inibitórios do NaCl sobre a germinação e a biossíntese de etileno foram completamente revertidos após a transferência das sementes para água desionizada. Ademais, o ACC reverteu a inibição da germinação das sementes promovida por solução de NaCl, o que também se mostrou correlacionado com a produção de etileno. Assim, o efeito do NaCl na germinação de sementes de *S. humilis* é, possivelmente, uma consequência da condição de estresse promovida pela alta concentração do Na, que induziu a inibição da biossíntese de etileno.

As sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* responderam de modo quantitativamente distinto ao aumento da concentração de NaCl no meio de germinação. Das três espécies, as sementes de *S. guianensis* mostraram-se as mais tolerantes ao estresse salino durante o processo de germinação. Ademais, a inibição da germinação das sementes de *S. humilis*, *S. capitata* e *S. guianensis* por solução de NaCl seguiu o mesmo comportamento da produção de etileno, resultado que também se mostrou correlacionado com os níveis de ACC livre e total. Esses resultados indicam que a maior capacidade inata de sintetizar etileno constitui um requisito importante na germinação das sementes de *Stylosanthes*, sob condição de estresse salino.

Analisando-se os efeitos do estresse salino no crescimento das plântulas das três espécies, foi também observado que os efeitos tóxicos do NaCl no crescimento da raiz e do hipocótilo foram maiores em plântulas de *S. capitata* do que nas plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis*. Dessa forma, o etileno funcionaria como um sinal necessário para a germinação e a sobrevivência das plântulas de *Stylosanthes* sob condição de estresse salino.

6 REFERÊNCIAS

- Abeles FB (1973) *Ethylene in plant biology*. New York: Academic Press
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992) *Ethylene in plant biology*, 2nd Edn. New York: Academic Press
- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94
- Anand A, Bhardwaj J, Nagarajan S (2011) Comparative evaluation of seed coat dormancy breaking treatments in *Stylosanthes seabraana*. *Grass and Forage Science* 66: 272-276
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S (2002) Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Canadian Journal of Botany* 80: 297-304
- Bialecka B, Kępczyński J (2003) Regulation of α -amylase activity in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, gibberellin A₃, benzyladenine and ethylene. *Plant Growth Regulation* 39: 51-56
- Burin ME, Barros RS, Rena AB (1987) Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. *Turrialba* 37: 281-285
- Calvo AP, Nicolas C, Lorenzo O, Nicolas G, Rodriguez D (2004) Evidence for positive regulation by gibberellins and ethylene of ACC oxidase expression and activity during transition from dormancy to germination in *Fagus sylvatica* L. seeds. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 44-53
- Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY, Zhang JS (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology* 143: 707-719

- Chang C, Wang B, Shi L, Li Y, Duo L, Zhang W (2010) Alleviation of salt stress- induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate. *Journal of Plant Physiology* 167:1152-1156
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560
- Costa N (2006) Revisão do gênero *Stylosanthes*. PhD Thesis, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal
- Costa NMS, Ferreira MB (1984) Some Brazilian species of *Stylosanthes*. In: Stace HM, Edye LA, eds. *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, p 53-101
- Edye LA (1987) Potential of *Stylosanthes* for improving tropical grasslands. *Outlook on Agriculture* 16: 124-130
- FAO (2007) AgriSTAT, <http://faostat.fao.org/>. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, accessed on 28 November 2012
- Grof B, Schultze-Kraft R, Muller F (1979) *Stylosanthes capitata* Vog., some agronomic attributes, and resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) *Tropical Grasslands* 13: 28-37
- Katoh H, Esashi Y (1975) Dormancy and impotency of cocklebur seeds I. CO₂, C₂H₄, O₂ and high temperature. *Plant and Cell Physiology* 16: 687-96
- Kępczyński J, Kępczyńska E (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum* 101: 720-726
- Khan AA, Huang XL (1988) Synergistic enhancement of ethylene production and germination with kinetin and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in lettuce seeds exposed to salinity stress. *Plant Physiology* 87: 847-852

- Lizada MCC, Yang SF (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry* 100:140-145
- Locke JM, Bryce JH, Morris PC (2000) Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1843-1849
- Lovato MP, Martins PS, Filho JPL (1994) Germination in *Stylosanthes humilis* populations in the presence of NaCl. *Australian Journal of Botany* 42:717-723
- Lovato MB, Lemos Filho JP, Martins PS (1999) Growth responses of *Stylosanthes humilis* (Fabaceae) populations to saline stress. *Environmental and Experimental Botany* 41:145-153
- Maass BL, Sawkins MC (2004) History, relationships and diversity among *Stylosanthes* species of commercial significance. In: Chakraborty S, ed. *High-yielding anthracnose-resistant Stylosanthes for agricultural systems*. Sydney: CSIRO, p 9-25
- Machabée S, Saini HS (1991) Differences in the requirement for endogenous ethylene germination of dormant and non-dormant seeds of *Chenopodium album* L. *Journal of Plant Physiology* 138: 97-101
- Matilla AJ (2000) Ethylene in seed formation and germination. *Seed Sci Res* 10: 111-126
- Mattila AJ, Mattila-Vázquez MA (2008) Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science* 175: 87-97
- Moïse JA, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BLA (2005) Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 41: 620-644
- Mott JJ, McKeon GM (1979) Effect of heat treatment in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. *Seed Science and Technology* 7: 15-25

- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-81
- Murdoch AJ, Ellis RH (2000) Dormancy, viability and longevity. In Fenner, M (Ed.) *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (2nd edition). Wallingford, UK, CABI Publishing. p 58-67
- Nichols PGH, Malik AI, Stockdale M, Colmer TD (2009) Salt tolerance and avoidance mechanisms at germination of annual pasture legumes: importance for adaptation to saline environments. *Plant and Soil* 315: 241-255.
- Noble AD, Orr DM, Middleton CH, Rogers LG (2000) Legumes in native pasture-asset or liability? A case history with stylo. *Tropical Grasslands* 34: 199-206
- Pelacani CR, Barros RS, Ribeiro DM, Frigeri RBC (2005) Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with low pH solutions. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 317-323
- Pinheiro FJA, Barros RS, Coelho TG, Souza BML (2008) Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with selenium compounds. *Seed Science Research* 18: 47-53
- Ribeiro DM, Barros RS (2004a) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as promoted by ethylene accumulation in closed environments. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 83-88
- Ribeiro DM, Barros RS (2004b) A technique devised for detecting the ethylene requirement for germination as illustrated with *Stylosanthes humilis* seeds. *Seed Science and Technology* 32: 863-866
- Ribeiro DM, Barros RS (2006) Sensitivity to ethylene as a major component in the germination of seeds of *Stylosanthes humilis*. *Seed Science Research* 16: 37-45

- Saini HS, Bassi PK, Spencer MS (1986) Use of ethylene and nitrate to break seed dormancy of common lambsquarters (*Chenopodium album*). *Weed Science* 34: 502-506
- Santos-Garcia MO, Karia CT, Resende RMS, Chiari L, Vieira MLC, Zucchi MI, Souza AP (2012) Identification of *Stylosanthes guianensis* varieties using molecular genetic analysis. *AOB Plants* doi: 10.1093/pls001
- Song J, Feng G, Tian C, Zhang F (2005) Strategies for adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a saline environment during seed-germination stage. *Annals of Botany* 96: 399-405
- Stace HM, Cameron DF (1984) Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In Stace HM and Edye LA (Eds). *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press. p 49 -72
- Vieira MLC, Aguiar-Perecin MLR, Martins PS (1993) A cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. *Cytologia* 58: 305–311
- Vieira HD, Barros RS (1994) Response of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. *Physiologia Plantarum* 92: 17-20
- Vleeshouwers LM, Bouwmeester HJ, Karssen CM (1995) Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology* 83: 1031-1037
- Wang B, Zhang J, Xia X, Zhang WH (2011) Ameliorative effect of brassinosteroid and ethylene on germination of cucumber seeds in the presence of sodium chloride. *Plant Growth Regulation* 65: 407-413
- Whitehead CS, Sutcliffe MA (1995) Effect of low temperatures and different growth regulators on seed germination in *Cyclopia* spp. *Journal of Plant Physiology* 147: 107-12

- Williams RJ, Reid R, Schultze-Kraft R, Souza Costa NM, Thomas BD (1984) Natural distribution of *Stylosanthes*. In Stace HM; Edye LA (Eds) *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press. p 73-101
- Wu L, Zhang Z, Zhang H, Wang XC, Huang R (2008) Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiology* 148: 1953–1963
- Yang L, Zu YG , Tang ZH (2013) Ethylene improves *Arabidopsis* salt tolerance mainly via retaining K^+ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na^+ content. *Environmental and Experimental Botany* 86: 60–69
- Zapata PJ, Serrano M, Pretel MT, Amorós A, Botella MA (2003) Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Science* 164: 557-563
- Zhang H, Irving LJ, McGill C, Matthew C, Zhou D, Kemp P (2010) The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. *Annals of Botany* 106: 1027-1035
- Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445

ANEXO

Tabela 1A. Comparação dos efeitos do perclorato de mercúrio na germinação e na produção de etileno de sementes não-dormentes de *S. humilis* tratadas com solução de NaCl

Tratamento	Germinação [%]		Etileno [nmol frasco ⁻¹]	
	- Perclorato	+ Perclorato	- Perclorato	+ Perclorato
Água (Controle)	96,0 ± 1,1	94,0 ± 1,4	6,8 ± 0,7	2,9 ± 0,2
NaCl	74,0 ± 3,0 *	19,2 ± 1,0 *	2,4 ± 0,1 *	0,2 ± 0,01 *

Tampas de polipropileno, forradas com duas camadas de papel de filtro, foram inseridas dentro dos frascos Erlenmeyers de 50 mL de capacidade. Logo após, lotes de 50 sementes de *S. humilis* foram embebidas em 3 mL do meio de germinação e dispostas ao redor das tampas. Em seguida, as tampas receberam 250 µL de água desionizada (- Perclorato) ou 250 µL de solução de perclorato de mercúrio (0,25 M) (+ Perclorato) e, os frascos foram imediatamente selados e mantidos no escuro, em câmaras de crescimento noite/dia, a 30 °C. O etileno fixado pela solução de perclorato foi liberado, vertendo-se solução de NaCl 4,0 M sobre a solução de perclorato. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle, em nível de 5% pelo teste *t*. Médias de 5 repetições ± erro da média

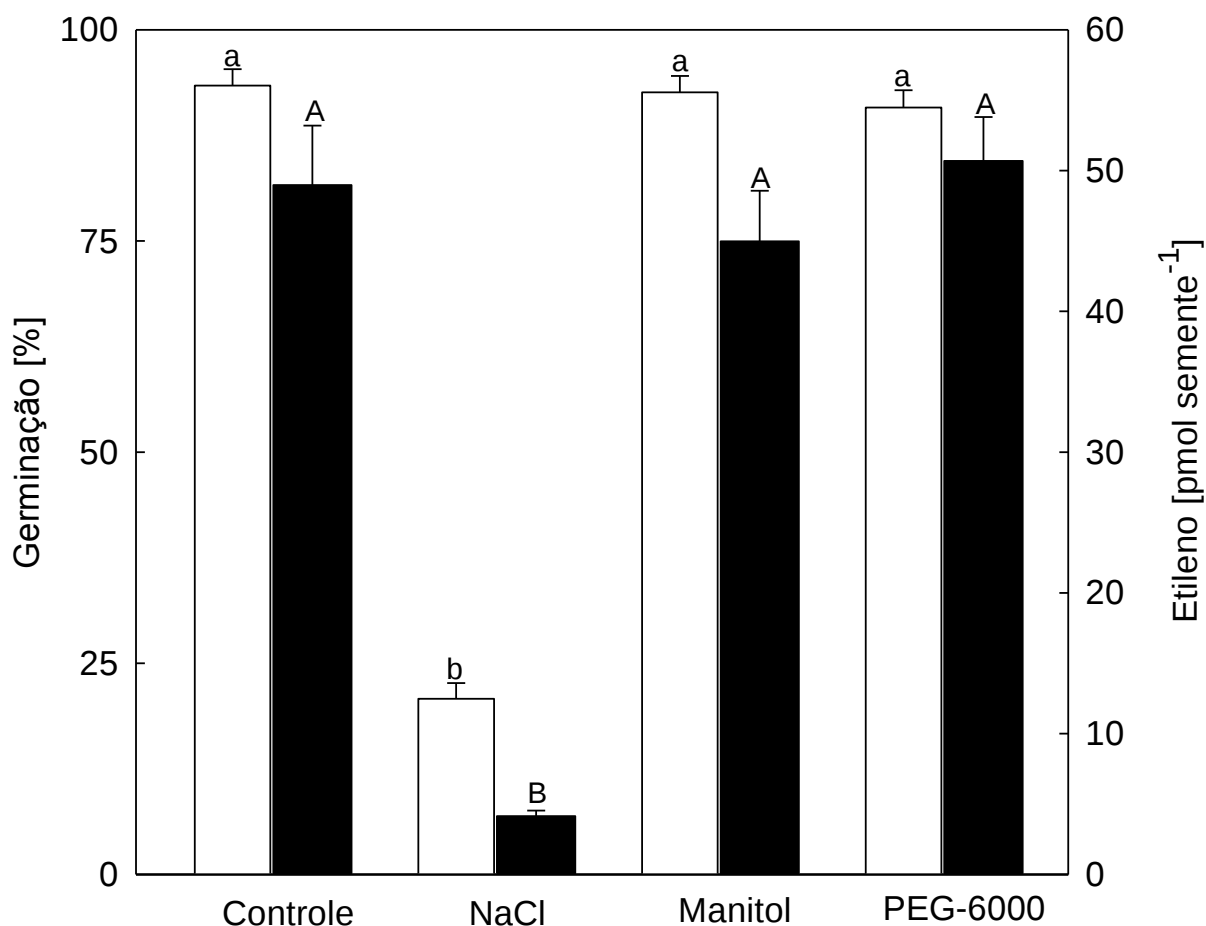


Figura 1A. Germinação (barras brancas) e produção de etileno (barras pretas) em sementes de *S. humilis* tratadas com soluções de NaCl, manitol e PEG-6000 com potencial osmótico de - 0,68 MPa. A germinação e a produção de etileno foram determinadas 48 h após a exposição das sementes às soluções-teste. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste Tukey. Médias de 5 repetições $\pm$ erro da média

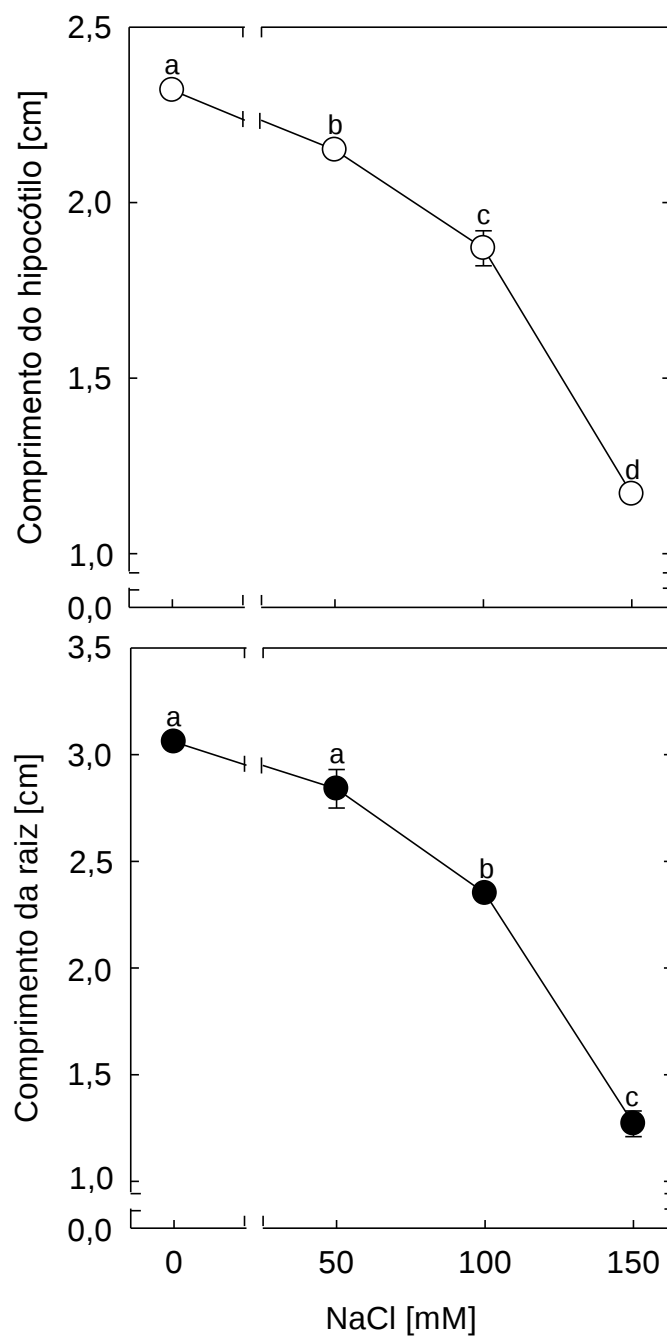


Figura 2A. Efeito do NaCl no crescimento da raiz e do hipocótilo de plântulas de *S. humilis*. As sementes foram germinadas em placas de petri contendo água desionizada. Após 24 h, plântulas de tamanho uniforme foram transferidas para as soluções-teste. Os comprimentos da raiz e do hipocótilo foram determinados 24 h após a exposição das plântulas às soluções-teste. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste Tukey. Os resultados representam a média de 100 plântulas por tratamento $\pm$ erro da média

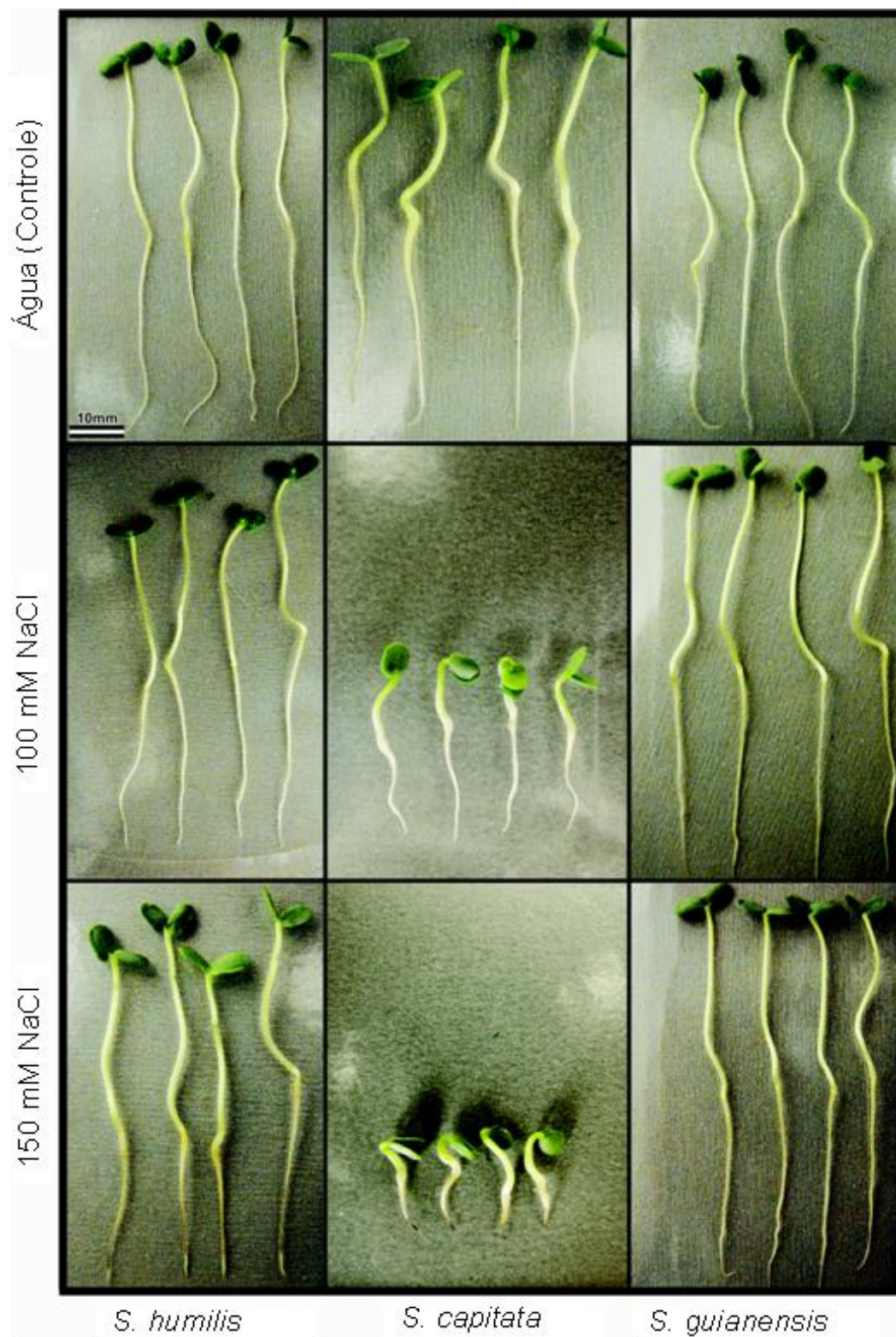


Figura 3A. Alterações morfológicas de plântulas de *Stylosanthes* provocadas por soluções de NaCl. As fotos foram tomadas 24 h após a exposição das plântulas às soluções-teste