

APARECIDA LEONIR DA SILVA

**EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (SNP) NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H. S. Irwin & Baneby SOB
ESTRESSE SALINO**

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
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e
2015
Silva, Aparecida Leonir da, 1991-
Efeito do Nitroprussiato de Sódio (SNP) na germinação
de sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H. S.
Irwin & Baneby sob estresse salino / Aparecida Leonir da
Silva. - Viçosa, MG, 2015.
xii, 45f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 36-42.

1. Sementes. 2. Germinação. 3. Nitroprussiato de Sódio.
4. Sementes - Efeito do sal. 5. *Senna macranthera*.
6. Cianetos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fisiologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.862

APARECIDA LEONIR DA SILVA

**EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (SNP) NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H. S. Irwin & Baneby SOB
ESTRESSE SALINO**

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: 17 de junho de 2015

Eduardo Euclides de Lima e Borges

Dimas Mendes Ribeiro

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

Ao meu pai Izidio Pereira da Silva
A minha mãe Leonor Dadon da Silva

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, porque sem Ele nada seria possível.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio e concessão da bolsa.

À professora, pesquisadora e orientadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela orientação, carinho, dedicação e apoio.

Aos meus pais (Leonor Dadon da Silva e Izidio Pereira da Silva) e minha irmã (Andréia Pereira da Silva), pelo amor e apoio.

Ao Marcelo Rogalski, pela dedicação, orientação, carinho e ensinamentos nos momentos mais difíceis.

Ao meu coorientador Dimas Mendes Ribeiro, pelo apoio e orientação na pesquisa.

Agradecer em especial ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, pelos conselhos, carinho, amizade, dedicação e confiança.

Agradecer a minha orientadora de iniciação científica Glaucia Almeida de Moraes, pelos primeiros ensinamentos na área científica, dedicação, amor e carinho.

Agradecer ao Douglas de Araujo, pois se hoje estou concluindo esta etapa da minha vida foi graças ao seu incentivo. Obrigada pelo carinho, paciência, dedicação e amor.

Aos meus amigos do Grupo de Estudos em Sementes (GSem), Daniel Teixeira Pinheiro, Dalcionei Pazzin, Paola Andrea Hormaza Martinez, Eduardo Pacca Luna Mattar, Thais de Castro Moraes, Marcelo Coelho Sekita, Tiago Viana, Gisela Chipenete, Antônio César Batista Matos, Lucian Alex Santos e Rafaela Marques de Miranda, pelo apoio nos momentos difíceis. Em especial ao Paulo César Hilst e ao professor Laércio Junio da Silva e ao técnico José Mauro pela ajuda na execução do trabalho e o apoio.

Aos alunos de iniciação científica: Guilherme, Joyce, Hamilton, Maicon, Larissa, Rômulo, Kamila, Marcus Júnior e Carol, que me auxiliaram na condução da quebra de dormência de aproximadamente 50 mil sementes de *Senna macranthera*, lixadas manualmente, semente por semente. Valeu galera!

Aos professores Fábio M. DaMatta, Marcelo Rogalski, Adriano Nunes Nesi, Marcelo E. Loureiro, José Cambraia, Carlos Raimundo, Camila Caldana, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos Talita, Raquel, Lilian, Sarah e Helton, pelos dias de estudos, incentivo, amizade, carinho e compreensão. Aos amigos Antônio (tchuco), Diego, e as minhas amigas que conviveram comigo por dois anos em casa, Isabela, Claudinéia e Laura.

Aos técnicos e amigos José Custódio, Leacir, Mercês, José Maurício e a secretária da pós-graduação Luciene.

Agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	4
Determinação das concentrações salinas que causam estresse moderado na germinação de sementes de <i>Senna macranthera</i>	5
Determinação da concentração adequada do doador de óxido nítrico (SNP) e ferrocianeto.	5
Curvas de embebição	75
Determinação do melhor período de aplicação do doador de óxido nítrico	6
Curvas de embebição	7
Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade de enzimas antioxidativas.	8
Determinação da atividade da superóxido dismutase	8
Determinação da atividade da catalase.....	9
Determinação da atividade da peroxidase	9
Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato.....	9
Quantificação das proteínas solúveis totais.....	9
Avaliação da peroxidação de lipídios (MDA)	10
Análise estatística.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A: Porcentagem de germinação (G), B: índice de velocidade de germinação (IVG), C: porcentagem de plântulas normais (PN), D: comprimento de parte aérea (CPA), E: comprimento de sistema radicular (CSR), F: massa seca de parte aérea (MSPA) e G: massa seca de sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas e colocadas para germinar em diferentes potenciais osmóticos com NaCl (0,0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 MPa) a 25°C.....12
- Figura 2.** A: Porcentagem de germinação (G), B: índice de velocidade de germinação (IVG), C: porcentagem de plântulas normais (PN), D: comprimento de parte aérea (CPA), E: comprimento de sistema radicular (CSR), F: massa seca de parte aérea (MSPA) e G: massa seca de sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar no potencial osmótico com NaCl -0,3 MPa em conjunto com diferentes concentrações de SNP e ferrocianeto (100, 200, 300 e 400 µM) a 25°C.....16
- Figura 3.** Porcentagem de germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em potencial osmótico com NaCl -0,4 MPa em conjunto com concentrações de SNP e ferrocianeto (100, 200, 300 e 400 µM) a 25°C.....17
- Figura 4.** Massa (g) de sementes de *Senna macranthera*, com e sem escarificação mecânica, após diferentes tempos de embebição em água.....19
- Figura 5.** Massa (g) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, após diferentes tempos de embebição em diferentes soluções: estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).....27
- Figura 6.** Massa (g) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, após diferentes tempos de embebição em diferentes soluções: estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).28
- Figura 7.** Atividade da superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C) e peroxidase do ascorbato (D) durante a germinação de sementes de *Senna macranthera* submetidas a diferentes soluções: estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).....30
- Figura 8.** Atividade da superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C) e peroxidase do ascorbato (D) durante a germinação de sementes de *Senna macranthera* submetidas a diferentes soluções: estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).....31
- Figura 9.** Peroxidação de lipídios (MDA) no embrião de sementes de *S. macranthera* submetidas a diferentes soluções: estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).....32

Figura 10. Proteínas solúveis totais presente em embriões de sementes de *Senna macranthera* durante a germinação, submetidas a diferentes soluções: **A:** estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água) e **B:** estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de plântulas normais (PN) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes tratamentos com embebição por 24 horas (água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo) e transferidas para os estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa), SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.....20

Tabela 2. Comprimentos de parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massas secas de parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes tratamentos com embebição por 24 horas (água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo) e transferidas para os estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa), SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.....21

Tabela 3. Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de plântulas normais (PN), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) por 24 horas e posteriormente transferidas para tratamentos com água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo e nos SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.....22

Tabela 4. Comprimentos de parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massas secas de parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) por 24 horas e posteriormente transferidas para tratamentos com água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo e nos SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.....23

Tabela 5. Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de plântulas normais (PN), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) em conjunto com soluções de SNP, ferrocianeto e SNP inativo, a 25°C.....24

Tabela 6. Comprimentos de parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massas secas de parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) em conjunto com soluções de SNP, ferrocianeto e SNP inativo, a 25°C.....25

RESUMO

SILVA, Aparecida Leonir da. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2015. **Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) na germinação de sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H. S. Irwin & Baneby sob estresse salino.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O estresse salino afeta um dos principais processos do ciclo de vida da planta, ou seja, a germinação das sementes, ocasionando redução e atraso na germinação, não só por dificultar a absorção de água, mas também por facilitar a entrada de quantidades tóxicas de íons nas sementes durante a embebição. Dentre os fatores que favorecem a germinação o óxido nítrico (ON) vem se destacando como estimulador do processo para muitas espécies. No entanto, ainda há poucos estudos que avaliam o efeito doador de óxido nítrico sob estresse salino, principalmente na germinação de espécies nativas. Diversos estudos demonstram o efeito positivo do doador de óxido nítrico (SNP) no processo germinativo das sementes, contudo não há relatos de qual íon presente no SNP causaria esses efeitos em sementes sob estresse salino, também sendo escassos estudos sobre a resposta do sistema de defesa das sementes de *Senna macranthera* a essa molécula. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do SNP na germinação de sementes de *S. macranthera* sob estresse salino. Em todos os ensaios os tratamentos receberam fungicida CAPTAN a 0,2%. A germinação foi conduzida em câmara de germinação a 25°C, com fotoperíodo de 8 horas. A germinação e a porcentagem de plântulas normais foram avaliadas diariamente, sendo considerada germinada a semente cuja raiz primária apresentou-se com, no mínimo, 2 mm de comprimento. Foram avaliados: a porcentagem de germinação (G), o índice de velocidade de germinação (IVG), a porcentagem de plântulas normais (PN), o comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR). Inicialmente as sementes de *S. macranthera* foram colocadas para germinar sob diferentes concentrações salinas de NaCl (0,0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 MPa), selecionando-se os potenciais de -0,3 e -0,4MPa aplicando diferentes concentrações (100, 200, 300 e 400 μ M) do doador de óxido nítrico (SNP) e ferrocianeto. Com base nos resultados, foram realizadas curvas de embebição, onde sementes foram não escarificadas (controle) e escarificadas mecanicamente, foram dispostas em papel toalha, umedecidos com água, até ocorrer à protrusão da radicular de 50% das sementes, para determinar o período da fase I da

germinação e assim avaliar o efeito do tempo de embebição mais adequado para aplicação do doador de óxido nítrico (SNP), SNP inativo e ferrocianeto. Com base nos resultados foram selecionados os tratamentos com melhores efeitos na recuperação do estresse salino (-0,4 e -0,5 MPa) em conjunto com SNP, SNP inativo, controle (água) e as contraprovas (SNP, SNP inativo). Com esses tratamentos foram realizadas curvas de embebição, e no embrião foram determinadas a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX) e a superóxido dismutase (SOD), teor de proteínas e peroxidação de lipídios. O estresse salino com NaCl é prejudicial a germinação de sementes de *S. macranthera*. As concentrações de SNP utilizadas se mostraram eficientes na recuperação do estresse salino, sendo a concentração de 100 µM a mais eficaz para esta espécie. A melhor forma de aplicar o doador de óxido nítrico é em conjunto com o estresse salino. Efeitos similares aos provocados pelo tratamento com SNP, também foram constatados nos tratamentos com SNP inativo e ferrocianeto, indicando que os efeitos observados estariam relacionados à liberação do cianeto presente no SNP e não ao óxido nítrico. O SNP melhora a germinação de *S. macranthera* em condições de estresse salino, via liberação de cianeto. O SNP ou o cianeto favorecem a germinação de *S. macranthera* diminuindo a peroxidação de lipídios e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

SILVA, Aparecida Leonir da. Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Effect of sodium nitroprusside (SNP) on germination of *Senna macranthera* seeds (DC. Ex Collad.) HS Irwin & Baneby under salt stress.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Salt stress affects one of the main processes of cyclic plant life, ie germination of the seeds, causing reduction and delay in germination, not only complicate the absorption of water, but also to facilitate the entry of toxic amounts of ions the seeds during soaking. Among the factors that favor the germination nitric oxide (NO) has been highlighting as a stimulator of the process for many species. However, there are few studies that evaluate the nitric oxide donor effect under salt stress, especially in the germination of native species. Several studies have demonstrated the positive effect of nitric oxide donor (SNP) on the germination of seeds, however there are no reports of which ion in the SNP would cause these effects in seeds under salt stress, and is also scarce studies on the defense system response of *Senna macranthera* seed to this molecule. Given the above, this study aimed to evaluate the effects of SNP in *S. macranthera* seed germination under salt stress. All assays receive CAPTAN 0.2% fungicide treatment. Germination test was conducted in germination chamber at 25°C with 8 hours photoperiod. The germination and the percentage of normal seedlings were evaluated daily, and was considered the seed germinated primary root whose presented with at least 2 mm long. Were evaluated: the percentage of germination (G), the germination speed index (GSI), the percentage of normal seedlings (PN), the length of the shoot (CPA) and roots (CSR), dry mass of the part air (MSPA) and root (MSR). Initially the seeds of *S. macranthera* were germinated under different salt concentrations of NaCl (0.0, -0.1, -0.2, -0.3, -0.4 and -0.5 MPa), selecting the potentials of -0.3 and -0.4 MPa applying different concentrations (100, 200, 300 and 400 mM) of nitric oxide donor (SNP) and ferrocyanide. Based on the results, soaking curves were performed, with non-scarified (control) and mechanically scarified, were arranged in towel moistened with water, until occur the protrusion of the roots 50% of the seeds to determine the period of Phase I germination and thus evaluate the effect of soaking longer suitable for application of nitric oxide donor (SNP) and SNP inactive ferrocyanide. Based on the results, the treatments with the best effect on the recovery stress (-0.4 and -0.5 MPa) were selected together with SNP, inactive SNP, water control

(water) and SNP controls (SNP, inactive SNP). With these soaking treatments, curves were performed, and with the embryos were determined the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), protein content and lipid peroxidation. The salt stress with NaCl is harmful to germination of *S. macranthera*. The SNP concentrations used were efficient in the recovery of salt stress, and the concentration of 100 μ M is the most effective for this species. The best way to apply nitric oxide donor is in conjunction with salt stress. Effects similar to those caused by treatment with SNP were also observed in treatments with inactive SNP and ferrocyanide, indicating that the observed effects are related to the release of cyanide present in the SNP and not from nitric oxide. The SNP improves germination of *S. macranthera* in salt stress conditions, by releasing cyanide. The SNP or cyanide contribute for the germination of *S. macranthera* decreasing lipid peroxidation and increasing the activity of antioxidant enzymes.

INTRODUÇÃO

Senna macranthera é uma espécie arbórea, pertencente à família Fabaceae-Caesalpinoideae, popularmente conhecida como fedegoso (Lorenzi, 2000). A espécie é muito utilizada em paisagismo, devida suas características ornamentais e o pequeno porte, ideal para arborização urbana. Sendo uma espécie pioneira e de crescimento rápido, é recomendada para realização de plantios em áreas degradadas (Lorenzi, 2000).

A demanda por mudas de espécies florestais nativas tem sido crescente, em função da necessidade de recuperação ambiental. Visto que a grande maioria destas espécies é propagada por sementes, o sucesso na formação das mudas depende do conhecimento sobre o processo germinativo de cada espécie e da qualidade da semente utilizada (Rego et al., 2009).

A germinação é um evento fisiológico que depende da qualidade da semente e das condições do ambiente, como o suprimento de água e oxigênio, adequação de temperatura, luz e substrato (Borges e Rena, 1993). Pozzobon (2007) destaca que, além da viabilidade das sementes, as taxas de germinação podem ainda refletir o potencial de uso das espécies para a produção de mudas com a finalidade de restauração ambiental.

As plantas são frequentemente expostas a vários estresses ambientais que interferem negativamente na germinação (emissão de radícula), no desenvolvimento vegetativo, na produtividade e, nos casos mais graves, a morte das plântulas. O estresse salino afeta um dos principais processos do ciclo de vida da planta, ou seja, a germinação das sementes (Cesur e Tabur 2011; Zheng et al., 2009), ocasionando redução e atraso na taxa de germinação (Singh et al., 2012).

Segundo Braga et al. (2009), o período de tempo necessário para a germinação é importante para a sobrevivência das espécies florestais, principalmente nos locais onde a disponibilidade de água é limitada durante determinado período do ano. Neste processo deve-se observar o grau de tolerância ao estresse salino, o qual depende da capacidade das plantas de minimizarem os efeitos da salinidade através de mecanismos específicos de adaptação (Larcher, 2000). Um dos métodos mais difundidos para determinação da tolerância das plantas ao estresse salino é a observação da porcentagem de germinação em substratos salinos (Lima e Torres, 2009).

A salinidade afeta a germinação, não só por dificultar a absorção de água, mas também por facilitar a entrada de quantidades tóxicas de íons nas sementes durante a embebição (Amorim et al., 2002; Simaei et al., 2012). Destas interferências na

germinação a hidratação da semente é a mais importante, pois a água constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos que resultam na protrusão da raiz primária (Moraes et al., 2005). Ocorre mudança na fisiologia das plantas, devido à toxicidade iônica, estresse osmótico e aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mittler, 2002), levando à gradual peroxidação dos lipídios e inativação das enzimas antioxidantes (Tanou et al., 2009). Fan et al. (2013) ressaltam a necessidade e importância de mais estudos para entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na germinação de sementes sob estresse salino e desenvolver medidas adequadas para aliviar o efeitos negativos da salinidade na germinação.

As EROs são representadas pelos radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (O_2), quando produzidos em alta quantidade leva ao estresse oxidativo (Tamás et al., 2004). Isso ocorre quando há quantidades excessivas de EROs, ultrapassando a capacidade dos organismos neutralizá-las com seus sistemas naturais (Kuss, 2005). O estresse oxidativo é a consequência da alteração química das principais classes de biomoléculas, causando injúrias severas, como alterações estruturais e funcionais em proteínas, fragmentação de DNA, extravasamento de íons, peroxidação de lipídios e morte celular (Moller et al., 2007). A resposta das sementes e plantas ao estresse oxidativo esta relacionada ao aumento da produção e ativação de metaloenzimas, que são mecanismos de defesa, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , posteriormente a desintoxicação do H_2O_2 é realizado pelas enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) (Gratão et al., 2005). Além disso, para a desintoxicação de H_2O_2 fitofenólicos as peroxidases dependentes de guaiacol (GPOX) agem como antioxidantes (Sakihama et al., 2002).

Há vários relatos na literatura do efeito prejudicial do estresse salino na germinação de sementes. Em sementes de espécies florestais já foram constatado esse efeito para as espécies *Schizolobium amazonicum* (Braga et al., 2008), *Enterolobium schomburgkii* (Braga et al., 2009), *Chorisia speciosa* (Fanti e Perez, 2004), *Dimorphandra mollis* (Masetto et al., 2014), *Gliricidia sepium* (Farias et al., 2009) e para *Zizyphus joazeiro* (Lima e Torres, 2009).

Dentre os fatores que favorecem a germinação sob estresse, o óxido nítrico (ON) vem se destacando como estimulador do processo para muitas espécies. O ON é um radical livre produzido a partir do L-arginina, gás tóxico, inorgânico, incolor, com sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio e é um dos mais importantes mediadores dos processos intracelulares e extracelulares (Dusse et al., 2003). Até a década de 1980, o

ON era considerado apenas como um membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos.

Um dos fatores limitantes na realização de estudos sobre as possíveis ações do ON em plantas se deve a ausência de mutantes com produção diferencial de ON além do desconhecimento das moléculas capazes de perceber e traduzir os sinais fornecidos pelo ON (Ederli et al., 2009). Portanto, tem sido muito utilizado em estudos substâncias doadoras e sequestradoras de ON para elucidar suas funções. Os reagentes mais utilizados como doadores de ON são o nitroprussiato de sódio (SNP) e o S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) (Cao e Reith, 2002). No entanto, o SNP, cuja fórmula química é: $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, possui estrutura molecular complexa, constituída pelo ferro que se encontra no estado ferroso (Fe^{2+}), ligado a cinco ânions de cianeto (CN^-) e um íon de nitrosila (ON^+) (Feelisch 1998, Yamamoto e Bing, 2000).

Diversos estudos vêm mostrando o efeito positivo do óxido nítrico na recuperação da germinação de sementes sob diferentes tipos de estresse, no entanto ainda há poucos estudos que avaliam o efeito doador de óxido nítrico sob estresse salino e não há relatos em espécies nativas. Foi constatado em sementes de *Lupinus luteus* que o SNP foi eficaz na reversão do impacto negativo de NaCl na germinação (Kopyra e Gwózdz', 2003), essa reversão também foi constatada em sementes de *Cucumis sativus* (Fan et al., 2013) e *Ocimum basilicum* (Saeidnejad et al., 2013).

O ON em plantas sob estresse salino modula a produção de EROs e reforça a atividade das enzimas antioxidantes (Singh et al., 2008). Ele é considerado um importante regulador de crescimento, que desenvolve nas sementes e nas plantas a tolerância ao estresse hídrico e salino. Isto é devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Kopyra; Gwózdz', 2003). De acordo com Guo et al. (2009), a tolerância das plantas ao estresse salino depende do aumento da ação do sistema antioxidante, enzimático e não enzimático.

No entanto, alguns autores contestam que o efeito causado por doadores de óxido nítrico seja propriamente do óxido nítrico, como relatado em sementes de *Arabidopsis*, onde foi utilizado o SNP para superar a dormência, porém, os autores constataram que o efeito seria do cianeto presente no SNP (Bethke et al., 2006). Em um trabalho com *Clitoria ternatea* e *Rhynchosia minima* a germinação das duas espécies aumentou com a utilização do cianeto (Mullick e Chatterji, 1967). De acordo com Egley e Duke (1985) um dos possíveis efeitos provocados pelo cianeto seja disponibilização

do O₂ para a via oxidativa das pentoses fosfatadas. Na via das pentoses fosfatadas, há produção de eritrose-4-fosfato que, ao ser desviado para o metabolismo secundário, entra na via do ácido chiquímico, induzindo à síntese de reguladores de crescimento que afetam a germinação (Taiz e Zeiger, 2013).

Diversos estudos demonstram o efeito positivo do doador de óxido nítrico (SNP) no processo germinativo das sementes, contudo não há relatos de qual íon presente no SNP causaria esses efeitos em sementes sob estresse salino, também não consta na literatura a resposta do sistema de defesa das sementes de *S. macranthera* à essa molécula. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP) na germinação de sementes de *S. macranthera* sob estresse salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de germinação

O estudo foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa – UFV. As sementes de *Senna macranthera* (fedegoso) foram coletadas na região de Viçosa, Minas Gerais, no ano de 2012.

Em todos os ensaios germinativos descritos a seguir, contaram com sementes de *Senna macranthera* escarificadas mecanicamente com lixa e receberam fungicida CAPTAN a 0,2%. As sementes foram escarificadas mecanicamente com lixa número 100 do lado oposto ao hilo e dispostas em rolos de papel toalha, tipo Germitest®, umedecidos com água ou as respectivas soluções 2,5 vezes o peso do papel seco, posteriormente os rolos foram colocados em sacos plásticos. A germinação foi conduzida em câmara de germinação a 25°C (Cassaro-Silva, 2001), com fotoperíodo de 8 horas.

A germinação e a normalidade de plântulas foram avaliadas diariamente, sendo considerada germinada a semente cuja raiz primária apresentar-se com no mínimo 2 mm de comprimento. A normalidade das plântulas tiveram como padrão de normalidade as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Foram avaliados: a porcentagem de germinação (G) e de plântulas normais (PN) e, o índice de velocidade de germinação (IVG).

Ao final dos testes germinativos mediu-se o comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), com o auxílio de um paquímetro e os resultados foram expressos em milímetros por plântula (Nakagawa, 1999). As determinações da massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR), foram realizadas pelo método de estufa de ar forçado a 70°C até atingirem peso constante (Nakagawa, 1999).

Determinação das concentrações salinas que causam estresse moderado na germinação de sementes de *Senna macranthera*: As sementes foram dispostas em rolos de papel toalha, tipo Germitest®, umedecidos com água (controle) ou com solução salina de cloreto de sódio (NaCl, P.M. 58,44) nos seguintes potenciais osmóticos: -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 MPa. As concentrações dos sais, para cada potencial osmótico, foram obtidas com base na equação de J.H.van't Hoff, citada por Salisbury e Ross (1992): $\psi_{os} = -RTC$, em que:

ψ_{os} = potencial osmótico (atm);

R= constante geral dos gases perfeitos (0,082 atm. l . mol⁻¹ k⁻¹);

T= temperatura (°K); e

C= concentração (mol/l) (N⁰ de moles/l).

Cada tratamento constou de quatro repetições de 50 sementes. A partir dos resultados de porcentagem de germinação e plântulas normais e, o índice de velocidade de germinação, foram selecionadas duas concentrações salinas, as quais causaram estresse moderado, com germinação em torno de 50%. As concentrações selecionadas foram -0,3 e -0,4 MPa que foram utilizadas nos experimentos seguintes.

Determinação da concentração adequada do doador de óxido nítrico (SNP) e ferrocianeto: As sementes foram colocadas para germinar sob os potenciais osmóticos -0,3 e -0,4 MPa de NaCl conforme descrito acima. Para cada potencial, foram aplicadas soluções de nitroprussiato de sódio (SNP) ou de ferrocianeto nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 µM. Cada tratamento contou com quatro repetições de 50 sementes. Foram avaliadas porcentagem de germinação e plântulas normais e IVG. Com base nos resultados obtidos, a concentração de SNP e de ferrocianeto que favoreceu a germinação e o índice de velocidade de germinação, foi utilizada para os demais testes.

Curvas de embebição: Para seleção de um período de embebição da Fase I, foram realizadas curvas de embebição. As sementes foram escarificadas mecanicamente e sem escarificação (controle), dispostas em papel toalha, tipo Germitest®, umedecidos

com água, na proporção 2,5 vezes o peso do papel seco. Os testes foram realizados em quatro repetições de 25 para sementes lixadas e o controle. O peso das sementes foi monitorado a cada 60 minutos até 12 horas, a cada três horas até 84 horas, de seis em seis horas até 108 horas, até ocorrer a protrusão da radicular de 50% das sementes.

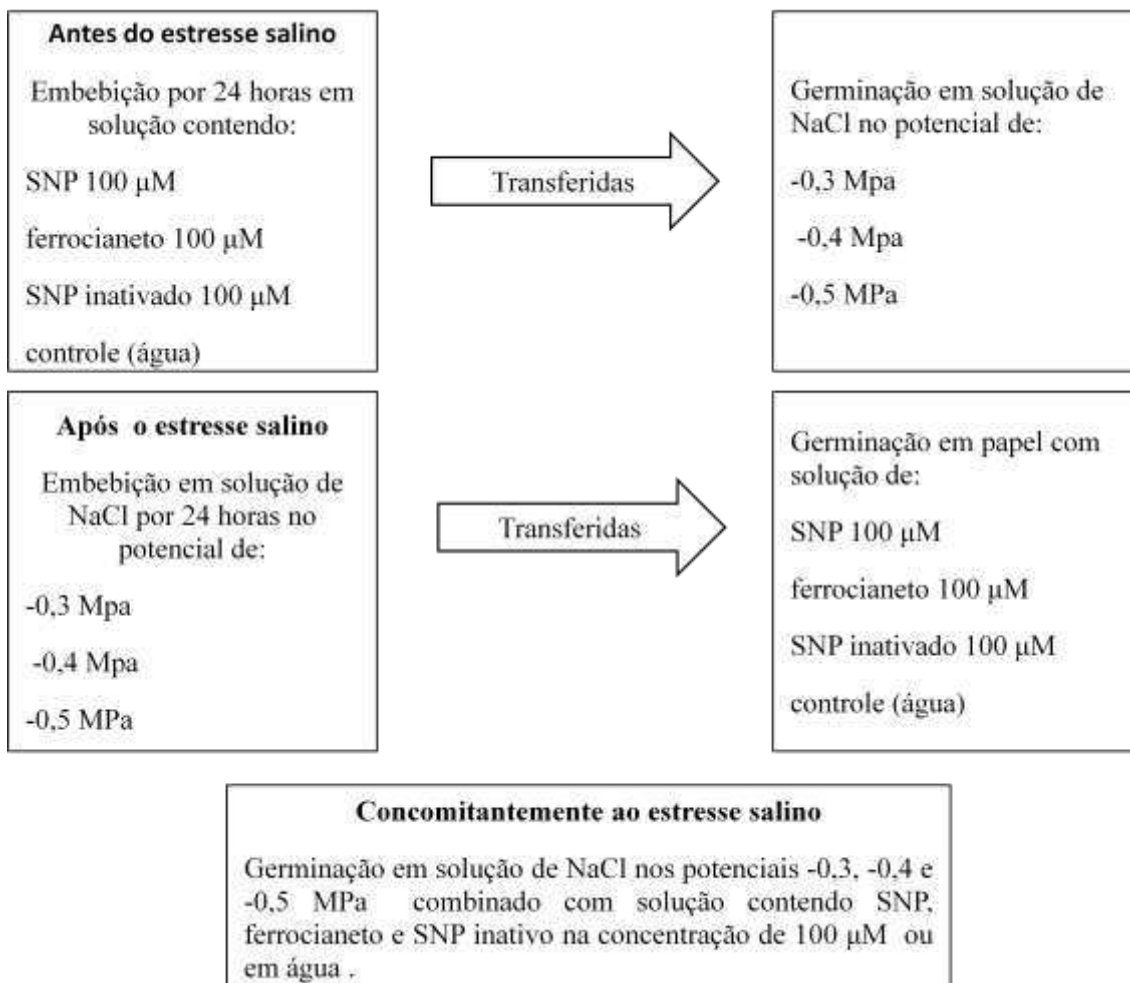
Determinação do melhor período de aplicação do doador de óxido nítrico e ferrocianeto: O período de embebição foi estabelecido com base na curva de embebição com 24 horas, considerada como fase I, pois é a fase da germinação onde ocorre absorção de água rápido, até atingir determinado teor de água, onde a embebição é estabilizada.

Os períodos de aplicação foram:

- 1- **Antes do estresse salino:** as sementes foram embebidas em SNP 100 μM , ferrocianeto 100 μM , SNP inativo por luz 100 μM (48 horas de exposição à luz) ou em água por 24 horas, em papel toalha umedecido com os respectivos sais. Posteriormente, as sementes foram transferidas para os estresses salinos de -0,3, -0,4 ou -0,5 MPa em papel toalha umedecido com os respectivos sais.
- 2- **Após o estresse salino:** as sementes foram embebidas em soluções de NaCl nos potenciais osmóticos de -0,3, -0,4 e -0,5 MPa por 24 horas em papel toalha umedecido com os respectivos sais, seguido de lavagem das sementes em água destilada para retirar o excesso de sal e transferidas para papel toalha umedecido com SNP 100 μM , ferrocianeto 100 μM , SNP inativo por luz 100 μM e água (controle).
- 3- **Concomitantemente ao estresse salino:** as sementes foram dispostas para germinar em soluções contendo o estresse salino (-0,3, -0,4 ou -0,5 MPa) em conjunto com as soluções de SNP 100 μM , ferrocianeto 100 μM , SNP inativo por luz 100 μM ou água (controle) em papel toalha umedecido com os respectivos sais.

Para todos os períodos de aplicação foram comparados com as contraprovas: SNP, SNP inativo, água e os respectivos estresses puros (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) para comprovar a eficiência da recuperação da germinação.

Fluxograma da determinação do melhor período de aplicação do óxido nítrico e ferrocianeto



Com base nos resultados dos parâmetros avaliados dos diferentes períodos de aplicação do óxido nítrico, o período que proporcionou a melhor recuperação da germinação de sementes de *S. macranthera* sob estresse salino, foi a aplicação em conjunto do doador do óxido nítrico, com dois potenciais salinos (-0,4 e -0,5 MPa) em conjunto com SNP, SNP inativo, controle (água) e as contraprovas (SNP, SNP inativo). Após a seleção do melhor período de aplicação do SNP, esses tratamentos foram selecionados para os testes a seguir.

Curvas de embebição

As curvas de embebição foram estabelecidas para os seguintes tratamentos: -0,4 MPa, -0,4 MPa em conjunto com SNP, -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, -0,5 MPa, - 0,5 MPa em conjunto com SNP, -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP, SNP inativo e a água (controle). As curvas foram realizadas de acordo com a metodologia citada anteriormente. O peso das sementes foi monitorado a cada 60 minutos até 12 horas, a cada três horas até 84 horas, de seis em seis horas até 108 horas, de 12 em 12 horas até 216 horas, até ocorrer à protrusão da radicular de 50% das sementes.

Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade de enzimas antioxidativas

As determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX) e da superóxido dismutase (SOD), foram realizadas a partir de um único extrato. Foram feitas as atividades enzimáticas nos seguintes tratamentos: -0,4 MPa, -0,4 MPa em conjunto com SNP, -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, -0,5 MPa, -0,5 MPa em conjunto com SNP, -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP, SNP inativo e a água (controle). As sementes foram colocadas para germinar como descrito anteriormente. As amostras foram retiradas em quatro tempos do processo germinativo, sendo o primeiro o tempo zero de embebição, 24, 48 e 72 horas após a semeadura, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -4°C.

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos de quatro repetições de 0,1g de embrião cada (cotilédones + eixo embrionário) com nitrogênio líquido e adicionados 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C.

Determinação da atividade da superóxido dismutase

A determinação da atividade da SOD foi feita pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto e 2,97 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após a exposição de 5 minutos à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela medição da absorbância a 560 nm, em espectrofotômetro. O branco foi obtido nas mesmas condições, porém, sem a presença de luz (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada com adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, foi mantida a 25°C e medido o decréscimo na absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kar e Mishra, 1976). Para determinação da produção de purpurogalina, foi utilizada a absorbância durante um minuto de reação a 420 nm, em espectrofotômetro a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato

A atividade da APX foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Observou-se o decréscimo na absorbância a 290 nm, em espectrofotômetro a 25°C, durante o primeiro minuto de reação (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Quantificação das proteínas solúveis totais

Os teores de proteínas foram quantificados a partir dos extratos enzimáticos, determinados pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro, utilizando BSA como padrão.

Avaliação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,2 g de embrião de sementes de *S. macranthera* foram homogeneizadas com 2 mL de TCA 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos. De cada amostra foram retiradas 1 mL do sobrenadante e adicionado 3mL de TBA 0,5% (p/v) e TCA 20% (p/v). A mistura foi incubada em água fervente a 90°C por 35 minutos, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 5 minutos e com o sobrenadante foi realizada a leitura em espectrofotômetro, em dois comprimentos de onda, de 532 nm e 600 nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹cm⁻¹ para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em nmol MDA g⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

Análise estatística

Os dados da determinação das concentrações salinas foram submetidos à análise de variância. Os dados obtidos para as concentrações salinas foram expressos pela média ± o desvio padrão.

O experimento de determinação da concentração do SNP e ferrocianeto foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados de germinação e de plântulas normais foram transformados pela função arcoseno $\sqrt{x/100}$. Os dados foram submetidos a análise de variância, o SNP e ferrocianeto foram comparados pelo teste de F a 5% de probabilidade. Os dados obtidos para as concentrações foram expressos pela média ± o desvio padrão.

Os dados de determinação do melhor período de aplicação do doador de óxido nítrico e ferrocianeto foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas nos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade.

Os dados da atividade enzimática, teor de proteínas e peroxidação de lipídios foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes do tratamento com controle (água) apresentaram alta porcentagem de germinação (87%), o que está de acordo com o resultado encontrado por Lemos Filho et al. (1997), onde a escarificação mecânica foi o método mais eficiente para superação da dormência da espécie.

Houve decréscimo gradativo na germinação das sementes com a redução do potencial osmótico (Figura 1A), observando-se que a germinação das sementes sob potencial 0,0 MPa foi de 87% para 36% no potencial -0,5 MPa. Houve efeito mais drástico da salinidade no índice de velocidade de germinação, porcentagem de plântulas normais, e comprimentos da parte aérea e do sistema radicular, à medida que aumentou o estresse salino (Figura 1B, C, D e E), não ocorrendo formação de plântula nos potenciais salinos de -0,4 e -0,5 MPa. A matéria seca da parte aérea aumentou nos potenciais de -0,3 e -0,4 MPa e da raiz se manteve nas concentrações de -0,1, -0,2 e -0,3 MPa em relação ao controle (Figura 1F e G).

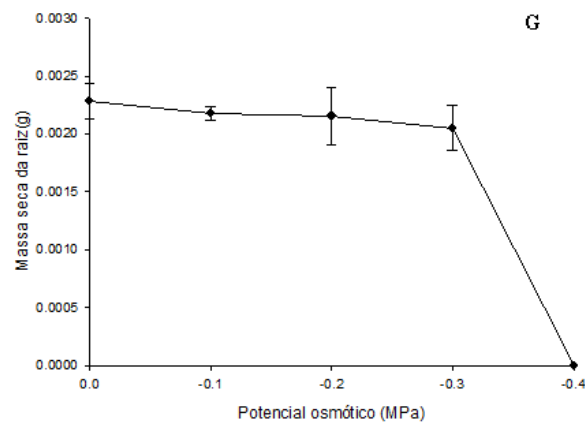
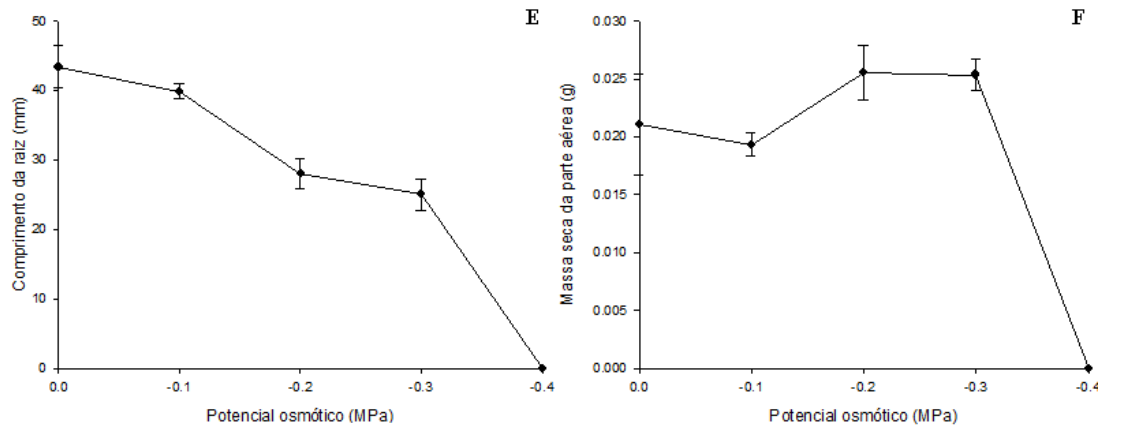
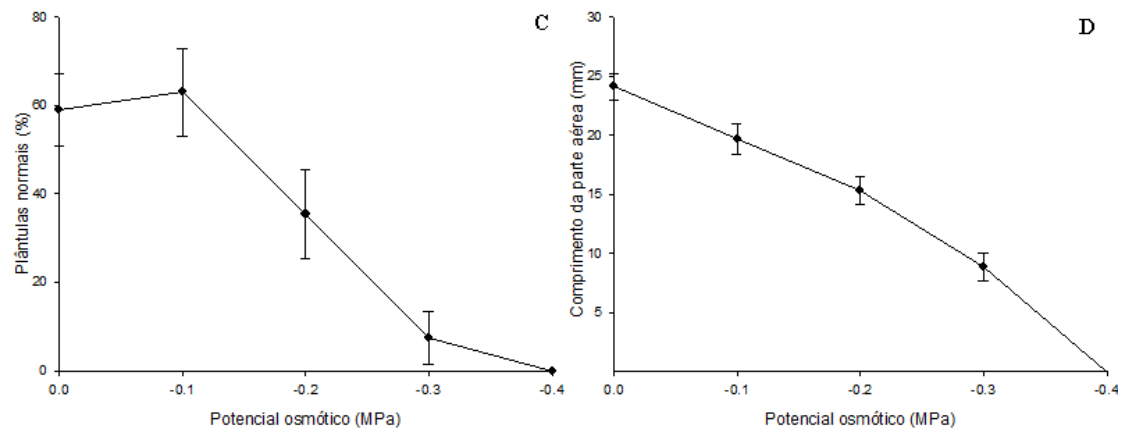
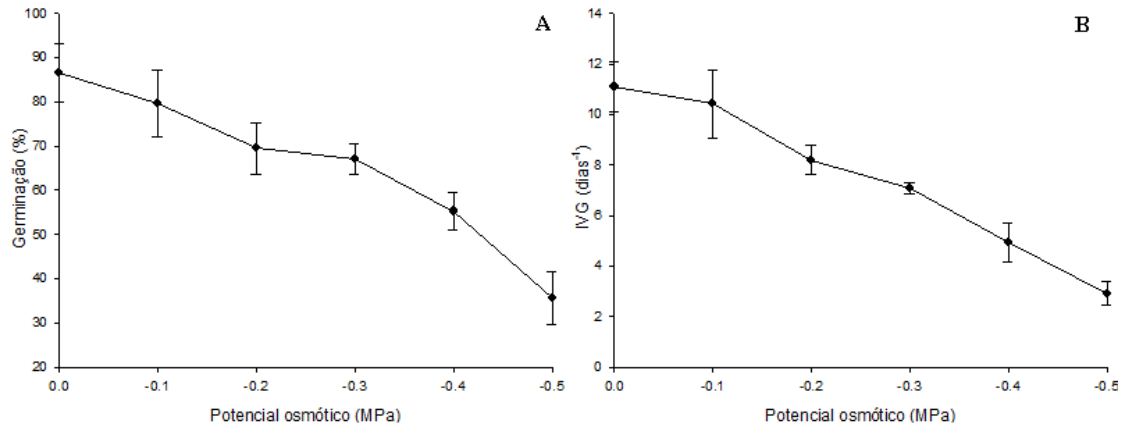


Figura 1. A: Porcentagem de germinação (G), B: índice de velocidade de germinação (IVG), C: porcentagem de plântulas normais (PN), D: comprimento de parte aérea (CPA), E: comprimento de sistema radicular (CSR), F: massa seca de parte aérea (MSPA) e G: massa seca de sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas e colocadas para germinar em diferentes potenciais osmóticos com NaCl (0,0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 MPa) a 25°C.

Em sementes de outras espécies florestais também tem sido constatado o efeito prejudicial do estresse salino, como para *Schizolobium amazonicum* (Braga et al., 2008) e *Enterolobium schomburgkii* (Braga et al., 2009), onde a porcentagem de germinação diminuiu sob o estresse salino, apresentando decréscimos significativos a partir dos potenciais a -0,2 MPa em solução de NaCl. Em estudos realizados por Fanti e Perez (2004) com sementes de *Chorisia speciosa*, não foram observados decréscimos significativos na porcentagem de germinação até o potencial osmótico de -0,4 MPa, mas a partir de -0,6 MPa, foram registradas reduções significativas na viabilidade. Para *Gliricidia sepium* (Farias et al., 2009) a germinação só foi significativamente afetada em potenciais osmóticos acima de -1,0 MPa. Em *Zizyphus joazeiro* todas as concentrações salinas utilizadas (-0,3, -0,6, e -0,9 MPa) diminuíram a germinação significativamente (Lima e Torres, 2009).

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, as sementes de *S. macranthera* apresentaram maior decréscimo na germinação a partir do potencial osmótico -0,4 MPa, para outras espécies esse potencial também se mostrou prejudicial, como para *Senna occidentalis* (Norsworthy e Oliveira, 2005), *Senna obtusifolia* (Pereira et al., 2014) e *Dimorphandra mollis* (Masetto et al., 2014).

Um dos fatores responsáveis pela redução na germinação pode ter sido o excesso dos íons Na^+ e Cl^- , visto que causam diminuição da intumescência protoplasmática, ou seja, inicialmente as soluções com íons tendem a diminuir a intumescência, somente após a absorção e acumulação nos vacúolos e apoplasto é que a taxa de absorção de água é normalizada (Ferreira e Borghetti, 2004). Outro fator pode ter sido o excesso de sais solúveis, provocando redução do potencial hídrico, ou seja, menor capacidade de absorção de água pelas sementes. Esta redução do potencial hídrico e os efeitos tóxicos dos sais interferem inicialmente no processo de absorção de água pelas sementes, influenciando no vigor, afetando a velocidade e conseqüentemente o tempo de germinação destas sementes em níveis não tóxicos de salinidade (Cavalcante e Perez, 1995).

Bewley e Black (1994) destacaram que o grau moderado de resistência ao estresse salino é útil na tentativa de utilização de solos salinos em regiões secas, visto que 6% dos continentes terrestres constituem-se de solos salinos. O conhecimento das espécies capazes de suportar essas condições pode auxiliar na adequada recomendação de espécies para o plantio, principalmente para as nativas, onde há escassez de informações, existindo a necessidade de mais estudos direcionados a essa linha de pesquisa (Rego et al., 2011).

As espécies podem ser halófilas ou glicófilas quanto sua tolerância ao estresse salino, ambas respondem de maneira semelhante ao estresse salino, sendo a porcentagem e a velocidade de germinação inversamente proporcionais ao aumento da salinidade, variando apenas o limite de tolerância ao sal (Jeller e Perez, 2001). As espécies halófilas são altamente tolerantes, germinando em meio com até 8% de NaCl (Ungar, 1978), e as pouco tolerantes têm sua germinação inibida a 1,5% de NaCl. A maioria das glicófilas não germinam em meio com concentrações superiores a 1,5% de NaCl. Neste estudo, *S. macranthera* pode ser incluída entre as glicófilas pouco tolerantes ao sal, pois não apresentam um limite elevado de tolerância (-0,4MPa), e não apresentam respostas de recuperação nos potenciais osmóticos mais negativos, resultados semelhantes foram encontrados para *Senna spectabilis* incluída também entre as glicófilas pouco tolerantes ao sal, com limite de -1,6MPa (Jeller e Perez, 2001).

Os potenciais osmóticos de -0,3 e -0,4 MPa, por promoverem níveis de estresse moderado na germinação de sementes de *S. macranthera* (67 e 55%, respectivamente), foram utilizados nos experimentos seguintes. Neste ensaio, procurou-se determinar qual a concentração ideal de SNP e ferrocianeto para promover a recuperação do potencial fisiológico das sementes em dois potenciais salinos (-0,3 e -0,4 MPa).

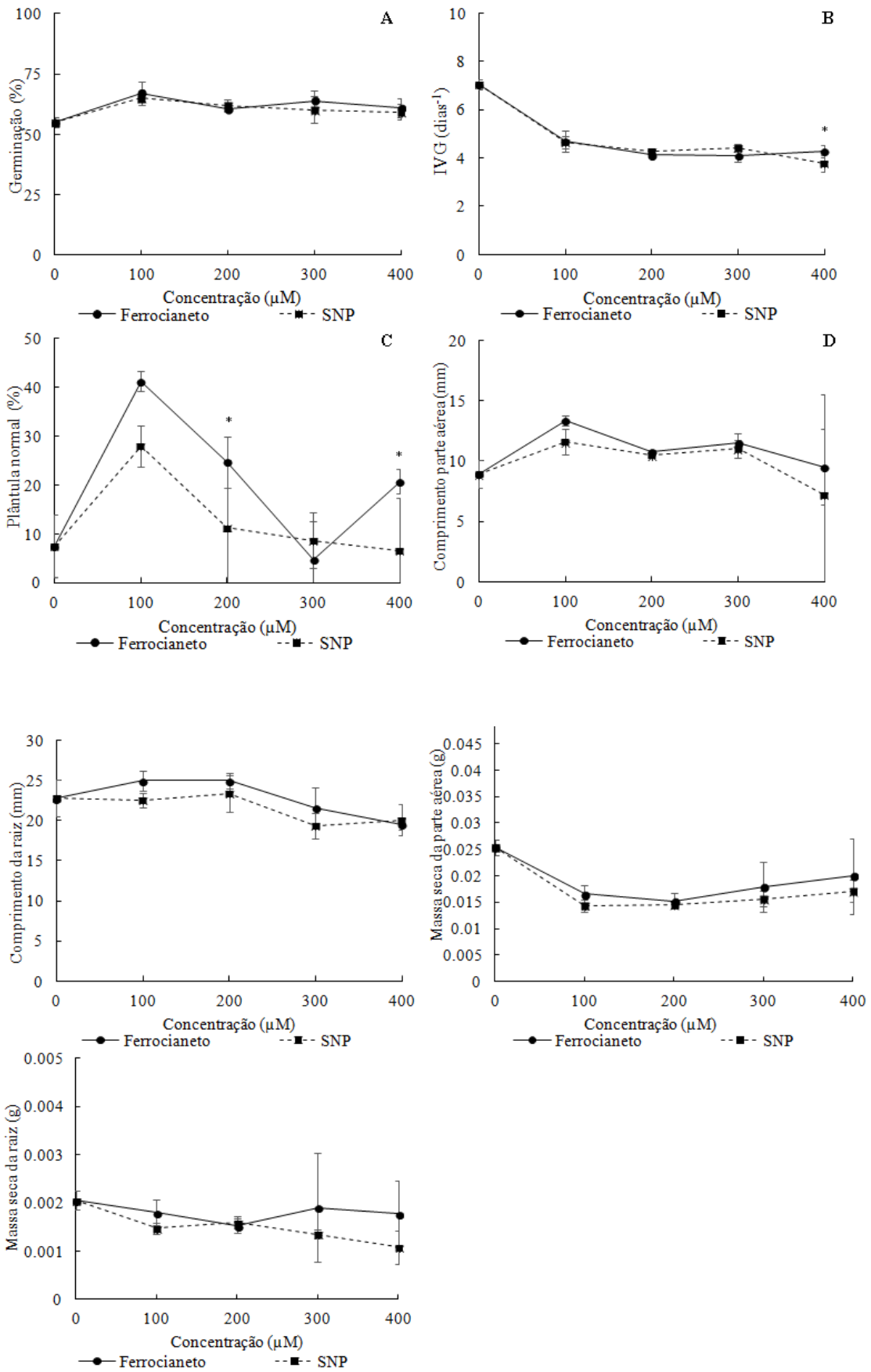
Houve aumento na germinação e diminuição no índice de velocidade de germinação, para todas as concentrações de SNP e ferrocianeto testadas (100, 200, 300 e 400 μ M) no estresse salino com potencial osmótico de -0,3 MPa (Figura 2 A e B). A germinação apresentou aumento de 18 e 22% e as plântulas normais de 225 e 413%, em relação ao controle (-0,3 MPa), nos tratamentos com SNP e ferrocianeto na concentração de 100 μ M, respectivamente (Figura 2). No entanto, a massa seca da parte aérea e do sistema radicular foi menor em relação ao controle (Figura 2).

Não existem relatos na literatura do comportamento germinativo de espécies nativas com a aplicação de doador de óxido nítrico na reversão do estresse salino. No entanto, em sementes de *Lupinus luteus*, espécie pertencente à família Fabaceae, o SNP

também se mostrou eficaz na reversão da diminuição da germinação causa pelo NaCl (Kopyra e Gwóz'dz', 2003). Para *Cucumis sativus*, a recuperação dos estresses salinos foi mais eficaz na concentração de 50 μM de SNP, no entanto houve diminuição na germinação na maior concentração de SNP (400 μM) (Fan et al., 2013). Em sementes de *Triticum aestivum* houve aumento significativo na germinação, após sete dias de germinação de sementes com SNP sob estresse salino com NaCl (Zheng et al., 2009). Para sementes de *Ocimum basilicum* não houve aumento na germinação com o doador de óxido nítrico, provavelmente por ser um aliviador do estresse salino, através das mudanças nas propriedades fisiológicas e sistema antioxidante (Saeidnejad et al., 2013).

Os dados de plântulas normais diferiram entre o SNP e o ferrocianeto, nas concentrações de 200 e 400 μM , sendo melhores os tratamentos com ferrocianeto (Figura 2). Para o índice de velocidade de germinação houve diferença somente na concentração de 400 μM , apresentando o melhor resultado no tratamento com o ferrocianeto. Contudo, para os dados de comprimento de sistema radicular, massa seca da parte aérea e do sistema radicular não foi observada diferença significativa entre o ferrocianeto e o SNP (Figura 2).

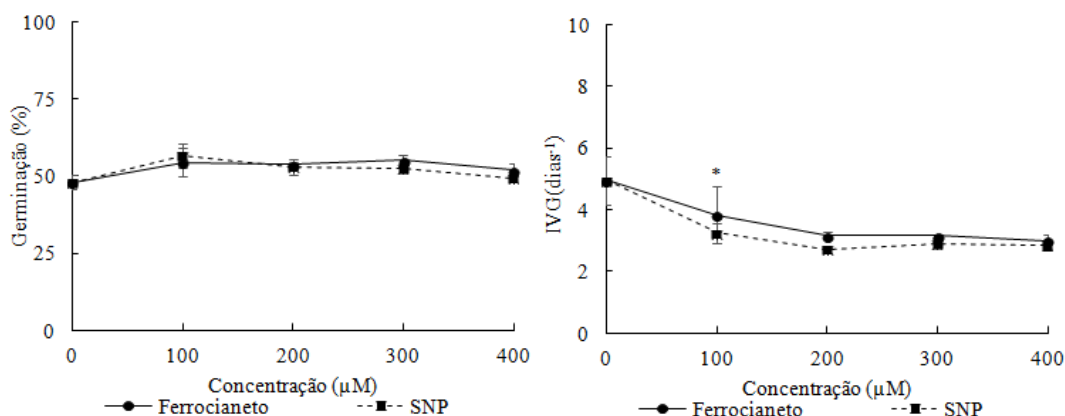
No entanto, segundo Pagnussat et al. (2002), Correa-Aragunde et al. (2004) e Lombardo et al. (2006) o óxido nítrico está envolvido na regulação da morfologia da raiz. Correa-Aragunde et al. (2004) verificaram que o óxido nítrico afeta o crescimento de raízes de tomate de forma dose-dependente, onde o SNP em baixas concentrações estimula o crescimento das raízes, enquanto as altas concentrações têm um efeito inibitório sobre o crescimento.



*Diferença estatística nas médias de cada solução (SNP e ferrocianeto), comparadas pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade dentro de cada concentração (100, 200, 300 e 400 μM).

Figura 2. A: Porcentagem de germinação (G), B: índice de velocidade de germinação (IVG), C: porcentagem de plântulas normais (PN), D: comprimento de parte aérea (CPA), E: comprimento de sistema radicular (CSR), F: massa seca de parte aérea (MSPA) e G: massa seca de sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar no potencial osmótico com NaCl -0,3 MPa em conjunto com diferentes concentrações de SNP e ferrocianeto (100, 200, 300 e 400 μ M) a 25°C.

Houve aumento na germinação em relação ao controle (-0,4 MPa) nas concentrações de 100 (15 e 17%), 200 (10 e 10%) e 300 μ M (17 e 8%) de SNP e de ferrocianeto, respectivamente (Figura 3). O índice de velocidade de germinação diminuiu em todas as concentrações (100, 200, 300 e 400 μ M), tanto nas soluções de SNP, quanto no ferrocianeto, em relação ao controle (-0,4 MPa). No entanto, somente na concentração de 100 μ M, o IVG teve diferença significativa entre o ferrocianeto e o SNP, sendo o tratamento com ferrocianeto maior (Figura 3). Houve formação de plântulas normais (22%), comprimento da parte aérea (10,32 mm), comprimento do sistema radicular (20,41 mm), massa seca da parte aérea (0,008g) e massa seca do sistema radicular (0,001g), somente na presença de ferrocianeto na concentração de 100 μ M com diferença significativa em relação aos demais tratamentos e controle (dados não apresentados).



*Diferença estatística nas médias de cada solução (SNP e ferrocianeto), comparadas pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade dentro de cada concentração (100, 200, 300 e 400 μ M).

Figura 3. Porcentagem de germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em potencial osmótico com NaCl -0,4 MPa em conjunto com concentrações de SNP e ferrocianeto (100, 200, 300 e 400 μ M) a 25°C.

A aplicação de diferentes concentrações de SNP ou ferrocianeto em conjunto com os estresses salinos de -0,3 e -0,4 MPa se mostraram eficientes na recuperação do potencial fisiológico das sementes de *S. macranthera*, onde a melhor germinação em ambos os estresses foi na concentração de 100 μ M, tanto para SNP quanto para o

ferrocianeto. No entanto, observa-se tendência dos melhores resultados de recuperação de germinação sob estresse salino serem no tratamento com ferrocianeto, como observado para as plântulas normais em ambos os estresses salinos (-0,3 e -0,4 MPa) (Figuras 2 e 3, respectivamente).

Avaliando o estresse salino com potencial osmótico de -0,3 MPa nos diferentes sais (SNP e ferrocianeto), verificaram-se diferenças significativas nos parâmetros de índice de velocidade de germinação (400 μM) e plântulas normais (200 e 400 μM) (Figura 2). No entanto, para o estresse salino com potencial osmótico de -0,4 MPa, a concentração de 100 μM tanto de ferrocianeto como de SNP, apresentaram diferenças significativas no índice de velocidade de germinação, porcentagem de plântulas normais, comprimento da parte aérea e radicular, massa seca da parte aérea e radicular, onde os melhores resultados foram no tratamento com ferrocianeto (Figura 3).

De acordo com a curva de embebição em sementes escarificadas, a primeira fase foi de rápida absorção de água (Fase I), seguido de uma fase mais estável (Fase II), e de uma retomada no aumento do conteúdo de água (Fase III), onde ocorre a germinação, que teve início com 60 horas de embebição, atingindo 50% de germinação em 81 horas, enquanto no controle (sementes intactas) houve discreto incremento no conteúdo de água das sementes (Figura 4). Para sementes de *S. macranthera*, a fase I foi observada nas primeiras 24 horas, uma alta velocidade de absorção de água e ganho em massa, sendo esse período (quando as sementes estavam com teor de água de 29%) considerado ideal para as aplicações dos tratamentos de embebição.

Segundo Lemos Filho et al. (1997) a curva de embebição da espécie *S. macranthera*, sem escarificação apresentou aumento de 20% no peso das sementes, com 24 horas de embebição e relatam a existência da dormência tegumentar.

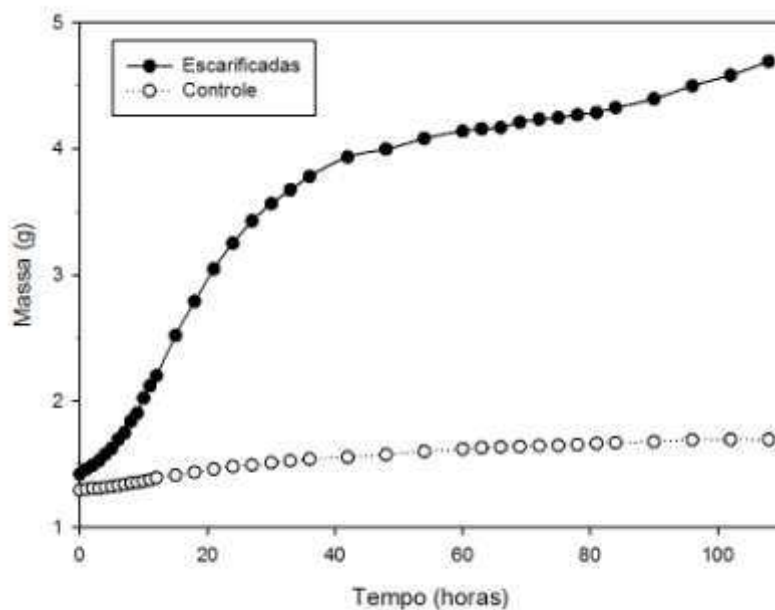


Figura 4. Massa (g) de sementes de *Senna macranthera*, com e sem escarificação mecânica, após diferentes tempos de embebição em água.

Entre as fases I e II de embebição ocorre a ativação enzimática, onde na fase I, há início da hidratação, mudanças estruturais como a reparação de membranas e do DNA, início e aumento da respiração e acúmulo de ATP (Bewley e Black, 1994).

Nos diferentes tratamentos com embebição em SNP e ferrocianeto, seguido de transferência para os estresses salinos de -0,3, -0,4 e -0,5 MPa (Tabelas 1 e 3, respectivamente), foi possível observar que as maiores porcentagens de germinação foram nos tratamentos com embebição em ferrocianeto e SNP inativo, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 1). Não houve formação de plântula nos estresses salinos puros de -0,4, -0,5 MPa e nos tratamentos com embebição em água e transferência para os estresses salinos de -0,4, -0,5 MPa, porém, nos demais tratamentos com transferência para o potencial osmótico salino de -0,4 MPa apresentaram formação de plântula (Tabela 1). Não houve formação de plântulas normais em todos os tratamentos com transferência para o estresse salino de -0,5 MPa. Houve aumento significativo na porcentagem de plântulas normais em todos os tratamentos (SNP, SNP inativo, ferrocianeto e água) com transferência para o potencial salino de -0,3 MPa em relação ao estresse salino puro de -0,3 MPa (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação (G) e plântulas normais (PN) e índice de velocidade de germinação (IVG), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes tratamentos com embebição por 24 horas (água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo) e transferidas para os estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa), SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.

Tratamento	G	IVG	PN
H ₂ O→-0,3 MPa	82 C	9,11 D	30 D
H ₂ O→-0,4 MPa	77 D	7,49 F	0 E
H ₂ O→-0,5 MPa	60 F	5,09 H	0 E
SNP→-0,3 MPa	83 C	9,60 C	30 D
SNP→-0,4 MPa	79 D	8,14 E	4 E
SNP→-0,5 MPa	60 F	5,14 H	0 E
ferrocianeto→-0,3 MPa	88 B	10,05 C	31 D
ferrocianeto→-0,4 MPa	86 B	8,40 E	4 E
ferrocianeto→-0,5 MPa	73 D	6,41 G	0 E
SNP inativo→-0,3MPa	90 B	12,26 B	43 C
SNP inativo→-0,4 MPa	83 C	9,14 D	5 E
SNP inativo→-0,5 MPa	77 D	7,24 F	0 E
SNP	86 B	6,64 G	62 B
Ferrocianeto	89 B	7,28 F	72 A
SNP inativo	96 A	14,21 A	67 A
Controle	89 B	13,58 A	70 A
- 0,3MPa	67 E	7,06 F	8 E
- 0,4MPa	55 F	4,95 H	0 E
- 0,5MPa	36 G	2,91 I	0 E
CV (%)	5,43	6,06	20,11

O índice de velocidade de germinação diminuiu com o aumento da concentração salina (Tabela 1), onde os maiores IVG, foram nos tratamentos com SNP inativo e controle (água), não diferindo entre si. Os maiores índices de velocidade de germinação em comparação com os diferentes tratamentos foram obtidos naqueles tratamentos embebidos em solução de SNP inativo, seguido de transferência para os estresses salinos (Figura 1). Em sementes de *Plathymania reticulata* pré-embebidas em solução de SNP por 24 horas na concentração de 100 µM resultaram em maiores valores de índices de velocidade de germinação (Pereira et al., 2010).

Os maiores comprimentos da parte aérea foram em SNP inativo, ferrocianeto, SNP e controle (água), não diferindo estatisticamente entre si. Entre os tratamentos, o SNP inativo apresentou os maiores comprimentos da parte aérea e do sistema radicular (Tabela 2).

As massas secas da parte aérea dos tratamentos seguidos do estresse salino de -0,3 MPa, não diferiram do estresse salino puro (-0,3 MPa), no entanto as maiores massas secas da parte aérea, foram nos tratamentos seguidos de transferência para o estresse salino de -0,4 MPa, onde o SNP inativo e ferrocianeto foram os que

apresentaram as maiores médias, mas não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2). A massa seca do sistema radicular foi maior nos tratamentos com embebição em SNP inativo com transferência para o estresse salino de -0,4 MPa, diferindo dos demais tratamentos com transferência para o mesmo estresse (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimentos de parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massas secas de parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes tratamentos com embebição por 24 horas (água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo) e transferidas para as soluções de NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa), SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.

Tratamento	CPA (mm)	CSR (mm)	MSPA (mg)	MSSR (mg)
H ₂ O→-0,3 MPa	12,21 B	23,12 C	32,46 A	3,25 B
H ₂ O→-0,4 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
H ₂ O→-0,5 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
SNP→-0,3 MPa	13,78 B	26,76 C	31,46 A	3,28 B
SNP→-0,4 MPa	4,73 D	11,58 D	14,33 B	1,75 D
SNP→-0,5 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
ferrocianeto→-0,3 MPa	12,66 B	25,46 C	30,88 A	3,32 B
ferrocianeto→-0,4 MPa	8,60 C	17,78 C	24,88 A	2,94 B
ferrocianeto→-0,5 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
SNP inativo→-0,3MPa	14,45 B	31,94 B	29,69 A	3,97 A
SNP inativo→-0,4 MPa	12,55 B	24,79 C	33,96 A	3,67 A
SNP inativo→-0,5 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
SNP	35,66 A	34,91 B	28,81 A	3,62 A
Ferrocianeto	36,26 A	36,69 B	30,41 A	4,02 A
SNP inativo	37,02 A	43,03 A	31,56 A	4,43 A
Controle	34,74 A	41,30 A	34,80 A	4,68 A
- 0,3MPa	8,91 C	25,04 C	25,38 A	2,05 C
- 0,4MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
- 0,5MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 C	0,00 E
CV (%)	20,94	25,91	31,62	33,21

Comparando-se os tratamentos de embebição em diferentes potenciais osmóticos, seguida de transferência para água, SNP, ferrocianeto ou SNP inativo, a germinação foi aumentada nos potenciais de -0,3 e -0,4 MPa, com transferência para SNP inativo (Tabela 3). Houve formação de plântulas em todos os tratamentos, o que não ocorreu nos tratamentos de estresse salino de -0,4 e -0,5 MPa puros (Tabela 2 A).

O índice de velocidade de germinação foi maior nos tratamentos que foram transferidos para soluções de SNP inativo, para os estresses -0,3 e -0,4 MPa, na contraprova com SNP inativo e controle. O índice de velocidade de germinação em todos os tratamentos foram maiores que seus respectivos estresses salinos puros (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de germinação (G) e plântulas normais (PN) e índice de velocidade de germinação (IVG), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) por 24 horas e posteriormente transferidas para tratamentos com água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo e nos SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.

Tratamento	G	IVG	PN
- 0,3 MPa→H ₂ O	80 B	10,89 B	62 A
- 0,4 MPa→H ₂ O	85 B	10,74 B	56 A
- 0,5 MPa→H ₂ O	93 A	11,78 B	65 A
- 0,3 MPa→SNP	87 B	11,38 B	62 A
- 0,4 MPa→SNP	82 B	11,11 B	63 A
- 0,5 MPa→SNP	83 B	10,95 B	67 A
- 0,3 MPa→ferrocianeto	87 B	11,50 B	65 A
- 0,4 MPa→ferrocianeto	89 A	11,70 B	67 A
- 0,5 MPa→ferrocianeto	87 B	11,50 B	70 A
- 0,3 MPa→SNP inativo	92 A	13,47 A	74 A
- 0,4 MPa →SNP inativo	90 A	12,97 A	72 A
- 0,5 MPa →SNP inativo	86 B	12,39 B	67 A
SNP	86 B	6,64 C	62 A
ferrocianeto	89 A	7,28 C	72 A
SNP inativo	96 A	14,21 A	67 A
Controle	89 A	13,58 A	70 A
- 0,3 Mpa	67 C	7,06 C	8 B
- 0,4 Mpa	55 D	4,95 D	0 B
- 0,5 Mpa	36 E	2,91 E	0 B
CV (%)	5,42	7,52	12,50

Houve aumento nos comprimentos da parte aérea e do sistema radicular, das massas secas da parte aérea e do sistema radicular em todos os tratamentos com embebição em solução salina apresentaram em comparação com os respectivos estresses salinos (Tabela 4).

Tabela 4. Comprimentos de parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massas secas de parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) por 24 horas e posteriormente transferidas para tratamentos com água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo e nos SNP, SNP inativo e ferrocianeto, a 25°C.

Tratamento	CPA (mm)	CSR (mm)	MSPA (mg)	MSSR (mg)
- 0,3 MPa→H ₂ O	29,67 B	35,31 B	33,41 A	3,83 B
- 0,4 MPa→H ₂ O	25,00 C	29,50 C	34,37 A	3,40 C
- 0,5 MPa→H ₂ O	28,06 B	35,85 B	30,89 B	3,76 B
- 0,3 MPa→SNP	27,64 B	30,95 C	34,17 A	3,75 B
- 0,4 MPa→SNP	27,71 B	33,64 B	32,13 A	3,88 B
- 0,5 MPa→SNP	25,71 C	33,43 B	34,05 A	3,99 B
- 0,3 MPa→ferrocianeto	23,32 C	27,56 D	33,64 A	3,42 C
- 0,4 MPa→ferrocianeto	25,33 C	30,77 C	34,59 A	3,90 B
- 0,5 MPa→ferrocianeto	26,33 C	32,24 C	33,74 A	3,97 B
- 0,3 MPa→SNP inativo	30,80 B	37,15 B	34,17 A	3,86 B
- 0,4 MPa →SNP inativo	31,01 B	34,09 B	31,55 B	3,40 C
- 0,5 MPa →SNP inativo	29,76 B	36,76 B	36,73 A	3,98 B
SNP	35,66 A	34,91 B	28,81 B	3,62 C
ferrocianeto	36,26 A	36,69 B	30,41 B	4,02 B
SNP inativo	37,02 A	43,03 A	31,56 B	4,43 A
Controle	34,74 A	41,30 A	34,80 A	4,56 A
- 0,3 MPa	8,91 D	25,04 D	25,38 C	2,05 D
- 0,4 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 D	0,00 E
- 0,5 MPa	0,00 E	0,00 E	0,00 D	0,00 E
CV (%)	8,62	8,66	7,07	7,20

Os tratamentos com água, SNP, ferrocianeto e SNP inativo, em conjunto com os respectivos estresses salinos (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa), foram os que demonstraram o maior efeito do SNP, ferrocianeto e SNP inativo. Foi possível observar queda na germinação em todos os tratamentos, de acordo com o aumento do estresse salino, o que era esperado, visto que, ao aumentar o estresse à germinação tende a declinar, mesmo nos tratamentos com SNP, SNP inativo e ferrocianeto, onde houve recuperação da germinação (Tabela 5).

A maior porcentagem de germinação foi obtida no tratamento com SNP inativo em conjunto com os estresses salinos de -0,3 e -0,4 MPa (93 e 89%, respectivamente), onde o aumento foi de 39 e 62%, respectivamente, em relação aos controles de -0,3 e -0,4 MPa (67 e 55%, respectivamente) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 5).

No potencial de -0,5 MPa a germinação das sementes foi aumentada em todas as soluções (SNP, SNP inativo e ferrocianeto), onde o tratamento com -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo e SNP aumentaram em 81% e em conjunto com o ferrocianeto aumentou em 92%, diferindo estatisticamente em relação ao estresse salino

puro (-0,5 MPa), no entanto entre as soluções não teve diferença significativa (Tabela 5).

A formação de plântulas normais no potencial osmótico de -0,3 MPa foi estatisticamente maior nos tratamentos em conjunto com as soluções, onde o potencial -0,3 MPa em conjunto com ferrocianeto foi maior, apresentando um aumento de 463% em relação ao estresse salino puro, diferindo estatisticamente dos tratamentos em conjunto com SNP e SNP inativo, com aumento na formação de plântulas normais de 300 e 250%, diferindo significativamente em relação ao estresse salino puro, no entanto, não diferiram entre si. Houve formação de plântulas normais no potencial osmótico de -0,4 MPa somente em conjunto com ferrocianeto (22%) e SNP inativo (7%), porém, somente o tratamento em conjunto do ferrocianeto com -0,4 MPa diferiu estatisticamente do controle.

Tabela 5. Porcentagem de germinação (G) e plântulas normais (PN) e índice de velocidade de germinação (IVG), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) em conjunto com soluções de SNP, ferrocianeto e SNP inativo, a 25°C.

Tratamento	G	IVG	PN
H ₂ O + 0,3MPa	67 C	7,06 D	8 D
H ₂ O + 0,4 MPa	55 D	4,95 F	0 D
H ₂ O + 0,5 MPa	36 E	2,91 H	0 D
SNP + 0,3 MPa	82 B	4,46 F	32 C
SNP + 0,4 MPa	70 C	3,08 H	0 D
SNP + 0,5 MPa	65 C	5,76 E	0 D
ferrocianeto + 0,3 MPa	87 B	4,70 F	45 B
ferrocianeto + 0,4 MPa	66 C	3,83 G	22 C
ferrocianeto + 0,5 MPa	69 C	6,09 E	0 D
SNP inativo+0,3MPa	93 A	10,91 B	28 C
SNP inativo+0,4MPa	89 B	9,11 C	7 D
SNP inativo+0,5MPa	65 C	5,59 E	0 D
SNP	86 B	6,64 D	62 A
Ferrocianeto	89 B	7,28 D	72 A
SNP inativo	96 A	14,21 A	67 A
Controle	89 B	13,58 A	70 A
CV(%)	5,45	7,52	24,47

Os comprimentos de parte aérea em todos os tratamentos em conjunto com o estresse salino de -0,3 MPa, não diferindo entre si (Tabela 6), porém, os comprimentos da parte aérea e sistema radicular, massa seca da parte aérea e sistema radicular, no estresse salino de -0,4 MPa só foi observados nos tratamentos em conjunto com ferrocianeto e SNP inativo.

Tabela 6. Comprimentos de parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massas secas de parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, colocadas para germinar em diferentes estresses com NaCl (-0,3, -0,4 e -0,5 MPa) em conjunto com soluções de SNP, ferrocianeto e SNP inativo, a 25°C.

Tratamento	CPA (mm)	CSR (mm)	MSPA (mg)	MSSR (mg)
H ₂ O + 0,3MPa	8,91 B	25,04 D	25,38 D	2,05 E
H ₂ O + 0,4 MPa	0,00 C	0,00 F	0,00 F	0,00 G
H ₂ O + 0,5 MPa	0,00 C	0,00 F	0,00 F	0,00 G
SNP + 0,3 MPa	11,06 B	22,54 E	14,33 E	1,47 F
SNP + 0,4 MPa	0,00 C	0,00 F	0,00 F	0,00 G
SNP + 0,5 MPa	0,00 C	0,00 F	0,00 F	0,00 G
ferrocianeto + 0,3 MPa	12,76 B	24,96 D	16,52 E	1,80 E
ferrocianeto + 0,4 MPa	10,32 B	20,41 E	15,33 E	1,44 F
ferrocianeto + 0,5 MPa	0,00 C	0,00 F	0,00 F	0,00 G
SNP inativo+0,3MPa	12,37 B	28,80 C	30,97 B	3,65 C
SNP inativo+0,4MPa	10,88 B	24,43 D	31,48 B	3,32 D
SNP inativo+0,5MPa	0,00 C	0,00 F	0,00 F	0,00 G
SNP	35,66 A	34,91 B	28,81 C	3,62 C
Ferrocianeto	36,26 A	36,69 B	30,41 B	4,02 B
SNP inativo	37,02 A	43,03 A	31,56 B	4,43 A
Controle	34,74 A	41,30 A	34,80 A	4,68 A
CV(%)	15,19	11,48	10,52	11,75

Efeitos similares aos provocados pelo tratamento com SNP, também foram constatados nos tratamentos com SNP inativo e ferrocianeto, indicando que estariam relacionados à liberação do cianeto presente no SNP e não ao óxido nítrico. Estes resultados sugerem que o SNP melhora a germinação em condições de estresse salino via liberação de cianeto, sendo passível a aplicação tanto do SNP como do ferrocianeto como ferramenta para aumentar a germinação das sementes dessa espécie em condições de estresse salino. No entanto, os relatos sobre qual a molécula presente no doador de óxido nítrico (SNP) causaria seus efeitos, ainda são pouco conhecidos. Em espécies nativas em condições de estresse salino, ainda não há relatos na literatura, havendo assim, necessidade de estudar mais esta substância em condições de estresse. Entre os poucos relatos que constam na literatura com alguns doadores de óxido nítrico que avaliaram qual molécula causaria os efeitos benéficos, em diferentes aplicações em sementes para aumentar a germinação, onde houve comprovação que o efeito seria do cianeto liberado e não do óxido nítrico, como em sementes de *Amaranthus albus* e *Lactuca sativa*, onde verificaram que soluções de cianeto de potássio (KCN), em baixas concentrações, promovem a germinação de ambas às espécies (Hendricks e Taylorson, 1972).

Para sementes de *Panicum virgatum*, a germinação de sementes foi aumentada significativamente com o ferrocianeto e o ferrocianeto de potássio, em dois dias de embebição esse aumento foi 200% maior do que o observado para as sementes do controle (água) (Sarath et al., 2006). Os autores também avaliaram o sequestrador de óxido nítrico (PTIO), que reduziu a germinação, o qual estaria revertendo o efeito estimulante dessas substâncias, com base nesses resultados, esse sequestrador não seria contraprova eficiente para comprovar o efeito de qual molécula estaria atuando. De acordo com Sarath et al., 2006, possivelmente o cianeto induz à produção de óxido nítrico durante a germinação das sementes e esse, por sua vez, tem como alvo proteínas que favorecem o alongamento (emergência da radícula) e crescimento celular (extensão dos coleóptilos).

Um trabalho pioneiro com *Clitoria ternatea* e *Rhynchosia minima* mostrou que o cianeto aumentou a germinação das duas espécies em relação ao tratamento sem aplicação de cianeto (Mullick e Chatterji, 1967). Egley e Duke (1985) sugerem que um dos possíveis efeitos provocados pelo cianeto seria disponibilização do O₂ para a via oxidativa das pentoses fosfatadas. Nesta via há produção de eritrose-4-fosfato que ao ser desviada para o metabolismo secundário entra na via do ácido chiquímico, levando à síntese de reguladores de crescimento que afetam a germinação (Taiz e Zeiger, 2013). De acordo com Flematti et al. (2011) a queima da vegetação produz cianidrinhas que atuam liberando cianeto, e que esse cianeto atua estimulando a germinação de sementes de *Anigozanthos manglesii*.

Em outro estudo utilizando SNP para a quebra da dormência das sementes de *Arabidopsis*, também foi observado que o efeito seria causada pelo cianeto presente na solução (Bethke et al., 2006), ou seja, a utilização do SNP para outros fins, também foi possível observar que a molécula que estaria agindo seria o cianeto. Os autores relataram que sequestrador do óxido nítrico (cPTIO) utilizado como contraprova do SNP, bloquearia a quebra da dormência.

Com base nos resultados encontrados para sementes de *Panicum virgatum* (Sarath et al., 2006) e *Arabidopsis* (Bethke et al., 2006), onde os sequestradores de óxido nítrico PTIO e cPTIO, respectivamente, não foram eficientes como contraprovas e os resultados encontrados para o SNP inativo e ferrocianeto neste estudo apresentaram efeitos satisfatórios, podendo assim, essas duas substâncias serem indicadas como controles do efeito do SNP.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, os tratamentos que se mostraram mais promissores na recuperação da germinação sob estresse salino e seus respectivos estresses puros e soluções puras (estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP, SNP inativo e o controle (água)), foram selecionados para as demais análises, com intuito de responder onde estas substâncias estariam agindo para proporcionar essa recuperação.

De acordo com a curva de embebição a germinação no tratamento com SNP inativo foi iniciada em 54 horas de embebição, atingindo 50% de germinação em 60 horas, enquanto no controle e SNP, a germinação começou com 60 horas de embebição e com 66 horas as sementes atingiram 50% de germinação (Figura 5 e 6).

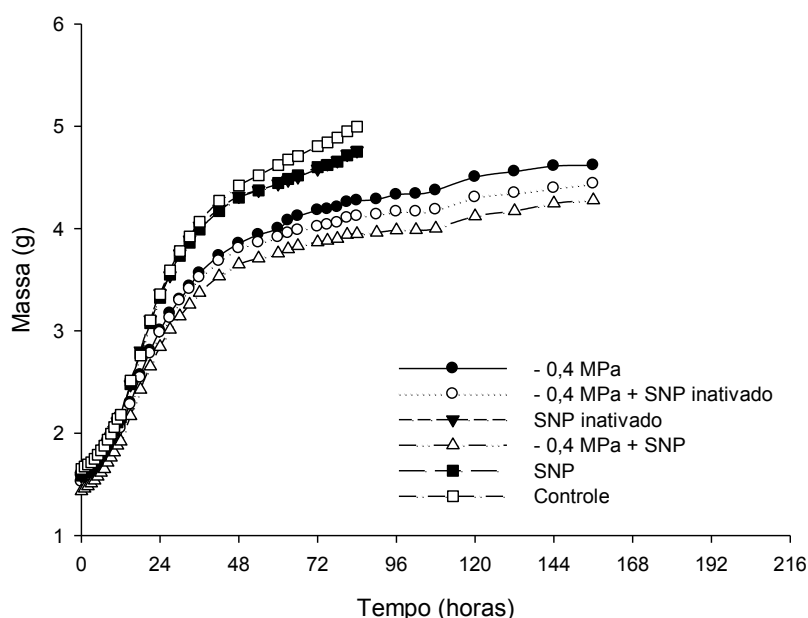


Figura 5. Massa (g) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, após diferentes tempos de embebição em diferentes soluções: estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

Para o tratamento com -0,4 MPa em conjunto com o SNP inativo e -0,4 MPa em conjunto com SNP a germinação ocorreu com 75 horas de embebição e atingiu 50% de germinação com 120 horas (Figura 2). Para os tratamentos com -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo e -0,5 MPa em conjunto com SNP começaram a germinar com 81 horas e atingiu 50% de germinação após 180 horas (Figura 6). Pode se observar que para ambos os estresses salinos e tratamentos (SNP ou SNP inativo) a embebição e

protrusão radicular aconteceram ao mesmo tempo, confirmando os resultados encontrados na germinação, onde o efeito poderia ser do cianeto e não do óxido nítrico.

Para as espécies *Clitoria ternatea* e *Rhynchosia minima*, a germinação e a promoção do crescimento inicial das plântulas são aceleradas com o cianeto na concentração de 100 ppm (Mullick e Chatterji, 1967). O autor ressalta que o melhor resultado foi obtido por imersão das sementes durante 24 horas em 100 ppm de cianeto de sódio. O autor ressalta que concentrações altas de cianeto causam efeito inibitório na germinação das sementes.

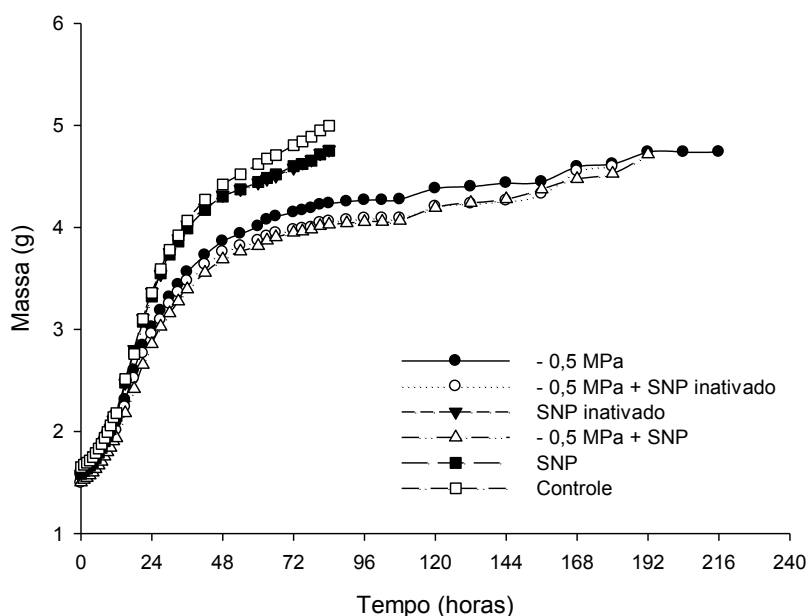


Figura 6. Massa (g) de sementes de *Senna macranthera*, escarificadas, após diferentes tempos de embebição em diferentes soluções: estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

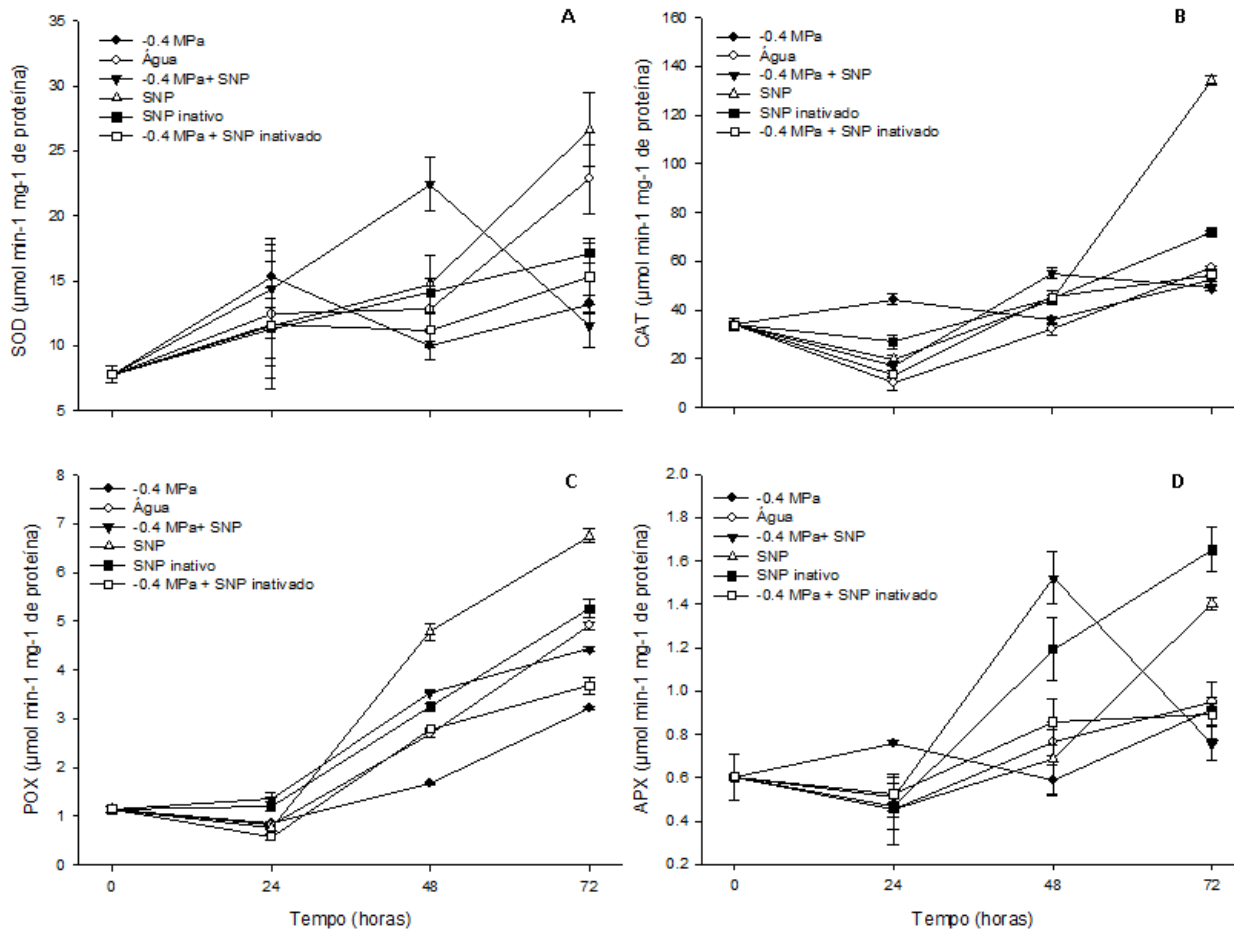
Nos estresses salinos -0,4 e -0,5 MPa a germinação iniciou após 84 e 90 horas, respectivamente, e atingiram em torno de 50% de germinação com 144 e 216 horas, respectivamente (Tabela 2 e 3, respectivamente). Em ambos os estresses salinos a embebição foi relativamente mais lenta devido à hidratação ocorrer de forma mais restrita na presença desse agente osmótico, tornando a segunda fase se torne mais longa, visto que ambos os estresses atrasaram a germinação.

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) apresentaram padrão semelhante de atividade nas sementes sob estresse salino puro de -0,4 MPa, onde nas primeiras 24 horas de embebição houve aumento de suas atividades (Figura 7 A, B e D). Houve diferença estatística

significativa na atividade da CAT entre os tratamentos, com maior atividade em -0,4 MPa. À partir de 48 horas a atividade diminuiu (Figura 7 A e Anexo 1). No estresse salino puro de -0,5 MPa, foram as enzimas SOD, POX e APX que nas primeiras 24 horas de embebição, também mostraram aumento da atividade, seguida de redução em 48 horas (Figura 8 A,C e D). No entanto, as atividades das enzimas POX e APX foram maiores no tratamento -0,5 MPa, onde a atividade da POX diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Anexo 1). Provavelmente em ambos os estresses salinos, o aumento da atividade destas enzimas nas primeiras horas seria uma via estratégica da semente para se proteger do estresse, evitando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

O tratamento de -0,4 MPa em conjunto com SNP provocou pico na atividade das enzimas SOD com 48 horas, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 7 A). Para a APX com 48 horas esse aumento também foi observado no tratamento de -0,4 MPa em conjunto com SNP, não diferindo do SNP inativo (Figura 7 D). O aumento na atividade da POX foi observado no tratamento com SNP, diferindo significativamente a atividade desta enzima dos demais tratamentos (Figura 7 C). Na CAT esse aumento foi mais significativo no tratamento com -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, mas não diferiu -0,4 MPa em conjunto com SNP. (Anexo 1).

Com 72 horas, a maior atividade da enzima CAT foi no tratamento SNP, diferindo dos demais tratamentos, e a menor atividade foi no tratamento -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, não diferindo dos tratamentos com -0,4 MPa em conjunto com SNP, -0,5 MPa e -0,4 MPa (Anexo 1). Houve aumento significativo na atividade da enzima APX no tratamento com SNP inativo, não diferindo do tratamento com SNP. Nas enzimas POX e CAT esse aumento foi no tratamento com SNP, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Anexo 1).



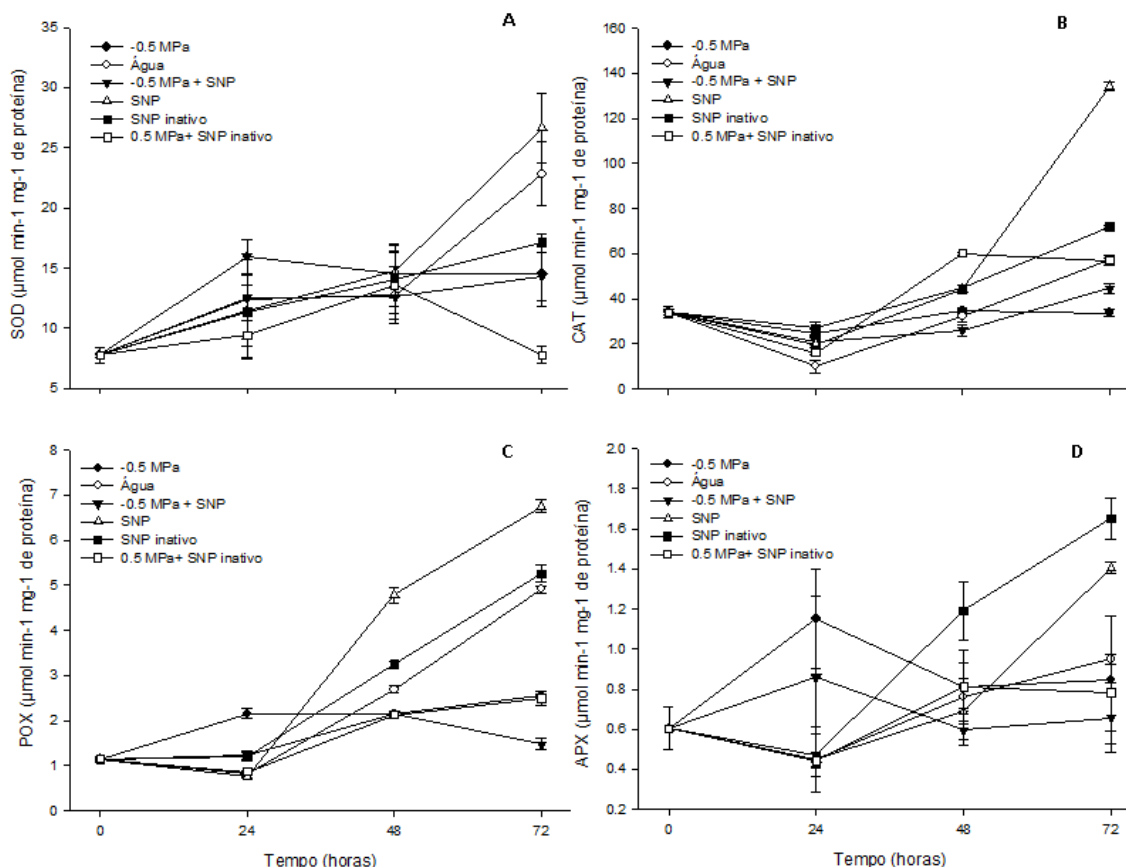


Figura 8. Atividade da superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C) e peroxidase do ascorbato (D) durante a germinação de sementes de *Senna macranthera* submetidas a diferentes soluções: estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

Observou-se aumento na atividade das enzimas antioxidantes de sementes *Lupinus luteus*, causado pelo SNP em diferentes condições de estresse por cádmio e salino, onde o SNP aumentou a atividade de SOD, CAT e POX (Kopyra e Gwóz'dz', 2003).

Em condições ambientais adversas, os vegetais podem apresentar capacidade de resposta por meio da alteração de seu metabolismo, principalmente quando o estresse induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse salino pode gerar EROs como os radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que quando produzidos em alta quantidade leva ao estresse oxidativo (Ribeiro et al., 2014). Dentre as formas de resposta antioxidativa, destaca-se a atividade da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de um radical superóxido a peróxido de hidrogênio, impedindo a atuação deste agente oxidante e nocivo, principalmente as membranas (Gratão et al., 2005). As enzimas POX, APX e

CAT estão associadas a mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos de plantas submetidas a estresses, onde estas enzimas fazem a desintoxicação do H_2O_2 produzido pela SOD (Gratão et al., 2005). O SNP e SNP inativo no presente trabalho seria um indutor da atividade das enzimas antioxidantes, o que reduziria a concentração de H_2O_2 nas sementes causada pelo estresse salino.

As sementes de *S. macranthera* apresentaram alta peroxidação de lipídios no tempo zero de embebição, diferindo estatisticamente dos demais tempos de embebição (Anexo 2). O conteúdo de malonaldeído (MDA) decresceu no decorrer do processo germinativo em todos os tratamentos (Figura 9). No entanto, foi possível observar que os estresses salinos de -0,4 e -0,5 MPa esse decréscimo foi menos acentuado em relação aos demais tratamentos (Anexo 1), diferindo estatisticamente do tratamento com SNP puro com 24 horas de embebição e com 48 horas essa diferença foi significativa entre o SNP e SNP inativo. O estresse salino foi prejudicial nas primeiras horas de embebição, posteriormente, com 72 horas, não foi observado diferença entre os tratamentos.

Essa toxicidade iônica dos estresses salinos pode causar danos às membranas, redução da atividade de enzimas hidrolíticas, aumento nos níveis de peroxidação de lipídios e estimular a formação de EROs (Essa, 2008). O NO estaria diminuindo a peroxidação de lipídios causada pelo estresse salino nas primeiras horas, aumento a atividade das enzimas antioxidantes, combatendo as EROs.

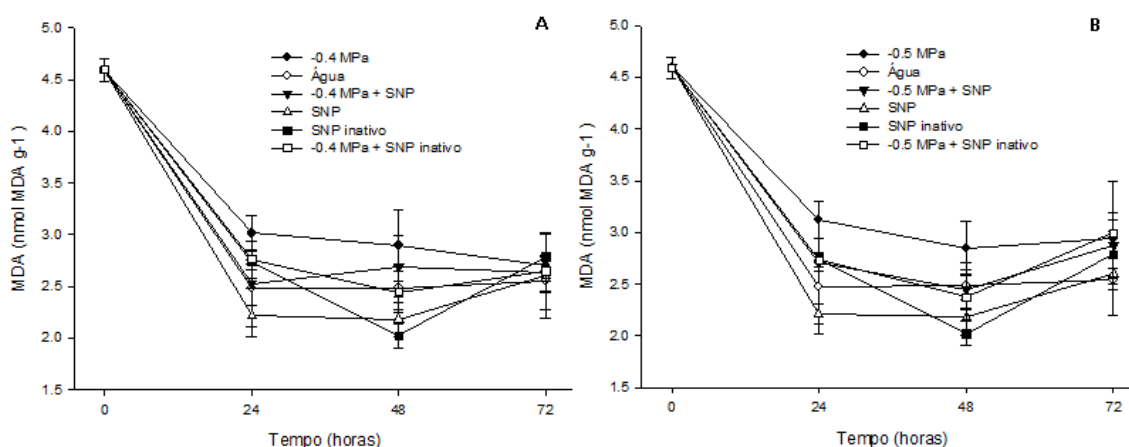


Figura 9. Peroxidação de lipídios (MDA) no embrião de sementes de *S. macranthera* submetidas a diferentes soluções: estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

Houve decréscimo no total de proteínas solúveis desde as primeiras horas após o início da embebição em todos os tratamentos (Anexo 2), até 72 horas (Figura 10).

Borges et al. (2002) constataram que para sementes de *S. macranthera* que o conteúdo de glicose é alto nas sementes secas e, após 72 horas, há aumento expressivo na sua concentração, esse aumento segundo os autores poderia ser creditado ao metabolismo de outras reservas, como lipídios ou proteínas. As reservas de carboidratos, lipídios e proteínas presentes nas sementes são utilizadas pelo embrião como fonte de energia e substrato para estruturas celulares (Pontes et al., 2002).

O teor de proteína reduziu significativamente nas primeiras 24 horas (Anexo 2). Após 24 horas de embebição observou-se que o decréscimo mais expressivo nas proteínas solúveis totais foi no tratamento -0,5 MPa, não diferindo dos tratamentos -0,4 MPa e -0,4 MPa em conjunto com SNP (Figura 10). Com 48 horas esse decréscimo foi observado nos tratamentos com -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP puro, SNP inativo puro e -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Anexo 1). Com 72 horas o decréscimo no teor de proteína foi observado em todos os tratamentos diferindo apenas do tratamento de -0,4 MPa, onde esse decréscimo foi menor.

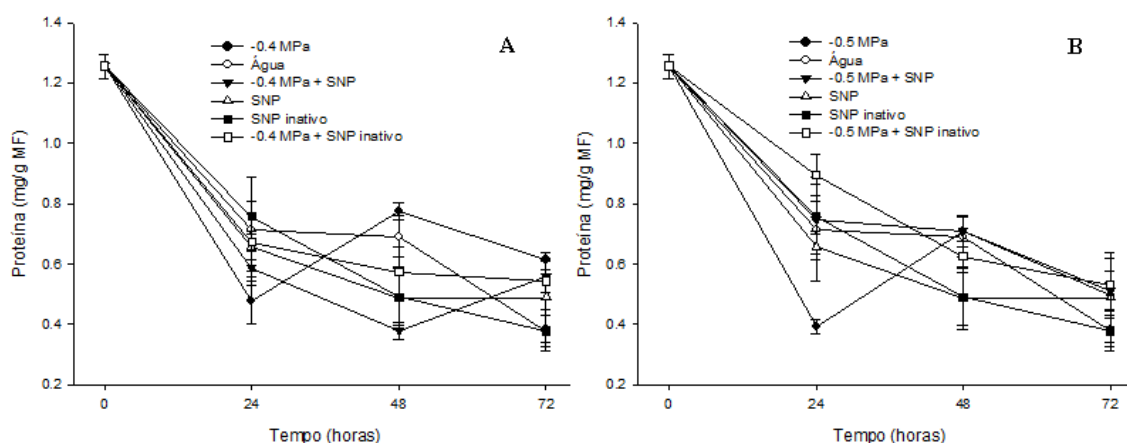


Figura 10. Proteínas solúveis totais presente em embriões de sementes de *Senna macranthera* durante a germinação, submetidas a diferentes soluções: **A:** estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água) e **B:** estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

Em sementes de leguminosas a mobilização de proteínas de reserva se inicia com o desenvolvimento do embrião, fornecendo o nitrogênio necessário para o crescimento das plântulas (Buckeridge et al., 2004). Redução nos teores de proteínas totais em todos os tratamentos ao longo da germinação foi observada no embrião de

sementes de *S. macrantera*, indicando que essa reserva estaria sendo utilizada na fase de germinação da espécie.

O teor de proteínas também diminui nas primeiras horas de embebição em sementes de *Sesbania virgata* germinadas em água (Tonini, 2008). No entanto, esse gasto inicial de reserva varia de espécie para espécie, como observado em *Caesalpinia peltophoroides* onde os teores de proteínas decresceram desde o início da embebição (Borges et al., 2005; Corte et al., 2006). Em sementes de *Schizolobium parahyba*, os teores de proteínas mantiveram-se constantes até dois dias após a embebição, diminuindo no quarto e sexto dias e aumentando levemente no oitavo dia (Magalhães et al., 2010).

CONCLUSÕES

O estresse salino com NaCl é prejudicial à germinação de sementes de *S. macranthera*, sendo que no potencial osmótico de -0,4 e -0,5 MPa não houve formação de plântulas.

As concentrações de SNP, SNP inativo e ferrocianeto utilizadas se mostraram eficientes na recuperação da germinação sob estresse salino, onde a concentração de 100 μ M foi mais eficaz.

O SNP melhora a germinação em condições de estresse salino, via liberação de cianeto, sendo possível a aplicação tanto do SNP como do ferrocianeto como ferramenta para aumentar a germinação dessa espécie em condições de estresse salino.

O SNP ou cianeto favorecem a germinação de *S. macranthera* diminuindo a peroxidação de lipídios e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes.

REFERÊNCIAS

AMORIM, J.R.A.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N.C. Efeito da salinidade e modo de aplicação da água de irrigação no crescimento e produção de alho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.2, p.167-176, 2002.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.

BALERONI, C. R. S.; M. L. L. FERRARESE, S. C. C.; SOUZA, N. E.; FERRARESE-FILHO, O. Isocitrato lyase activity and mobilisation of lipids and carbohydrates in cotyledons of canola. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 3, p. 189-192, 1997.

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

BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.3, p.517-526, 2006.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. (1994), **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 445p.

BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B.; PEREZ, S. C. J.G. A. Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barneby) durante a germinação. **CERNE**, v. 8, n. 1, p. 69-76, 2002.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**, Brasília: ABRATES, 1993. p.137-74.

BORGES, E. E. L.; REZENDE, S. T.; BORGES, R. C. G.; PEREZ, S. C. J. G. A. Caracterização de alfagalactosidase e sua relação com germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 525-533, 2005.

BRADFORD, M. M. 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.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; CESARO, A. S.; LIMA, G. P. P.; GONÇALVES, A. N. Germinação de sementes de pinho-cuiabano sob deficiência hídrica com diferentes agentes osmóticos. **Scientia Forestalis**, v.36, n.78, p.157-163, 2008.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; ALMEIDA, T. A. Germinação de sementes de *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) Benth. submetidas a estresse salino e aplicação de poliamina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.63-70, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. –Brasília: Mapa/ACS, 2009.399 p.

BUCKERIDGE, M. S., SANTOS, H.P., TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de reservas. In: A.G. Ferreira e F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. pp. 163-185. 2004.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Galactomanans from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, p. 109-112, 1990.

CAO, B.; REITH, M. E. A. Nitric oxide scavenger carboxy-PTIO potentiates the inhibition of dopamine uptake by nitric oxide donors. **European Journal of Pharmacology**, v. 448, p. 27–30. 2002.

CASSARO-SILVA, M. Efeito da temperatura na germinação de sementes de manduirana (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. - CAESALPINIACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, n. 1, p.92-99, 2001.

CAVALCANTE, A. M. B.; PEREZ, S. C. J. G. de A. Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.30, p. 281-289, 1995.

CESUR, A.; TABUR, S. Chromotoxic effects of exogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) in barley seeds exposed to salt stress. **Acta Physiology Plant**, v. 33, p.705–709. 2011.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v. 218, p. 900-905, 2004.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T.A.; VENTRELLA, M. C.; Mathias, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, 2006.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

- EDERLI, L.; REALE, L.; MADEO, L.; FERRANTI, F.; GEHRING, C.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B.; PASQUALINI, S. NO release by nitric oxide donors in vitro and in plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p. 42-48. 2009.
- ESSA, T.A. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. **Journal of Agronomy Crop Science**, v.188, p.86-93, 2008.
- FAN, H. F.; DU, C. X.; DING, L.; XU, Y. L. Effects of nitric oxide on the germination of cucumber seeds and antioxidant enzymes under salinity stress. **Acta Physiology Plant**, v.35, p. 2707-2719. 2013.
- FANTI, S. C.; PEREZ, S. C. J. G. A. Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.9, p.903-909, 2004.
- FARIAS, S. G. G.; FREIRE, A. L. O.; SANTOS, D. R.; BAKKE, I. A.; SILVA, R. B. Efeitos dos estresses hídrico e salino na germinação de sementes de *Gliricidia* [*Gliricidia sepium* (JACQ.) STEUD.]. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 152-157. 2009.
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv Pharmacol**, v. 358, p. 113–122, 1998.
- FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- FLEMATTI, G. R.; MERRITT, D. J.; PIGGOTT, M. J.; TRENGOVE, R. D.; SMITH, S. M.; DIXON, K. W.; GHISALBERTI, E. L. Burning vegetation produces cyanohydrins that liberate cyanide and stimulate seed germination. **Nature Communications**. p. 1-6. 2011.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, p. 481-494, 2005.
- GUO, Y.; TIAN, Z.; YAN, D.; ZHANG, J.; QIN, P. Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. **Life Science Journal**, v. 6, n. 1, 2009.
- HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A., ZHU, J. K., BOHNERT, J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant Physiology**, v. 51, p. 463-499. 2000.
- HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archieve Biochemystry and Byophysics**, v.125, p.189-198, 1968.

JELLER, H.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos dos estresses hídrico e salino e da ação de giberelina em sementes de *Senna spectabilis*. **Ciência Florestal**, v.11, n.1, p.93-104, 2001.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319. 1976.

KOPYRA M.; GWÓZDZ' E. A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology Biochemistry**, v.41, p. 1011-1017. 2003.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Sao Carlos: Rima, 2000. 531p.

LEMOS FILHO, J. P.; GUERRA, S. T.; LOVATO, M. B.; SCOTTI, M. R. M. M.L. Germinação de sementes de *Senna macranthera*, *Senna multijuga* e *Stryphnodendron polyphyllum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.32, n.4, 1997.

LIMA, B. G.; TORRES, S. B. Estresses hídrico e salino na germinação de sementes de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 93-99. 2009.

LOMBARDO, M. C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signaling & Behavior**, v.1, p.28-33, 2006.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2000, 352p.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.

KUSS, F. **Agentes oxidantes e antioxidantes**, p.1-10, 2005. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/ag_oxid_antioxid.pdf> Acesso em: 05 maio 2015.

MAGALHÃES, S. M.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 589-595, 2010.

MAGUIRE, J. D. Seeds germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176, 1962.

MASETTO, T. E.; SCALON, S. P. Q.; Rezende, R. K. S.; Oba, G. C.; Gambatti, M.; Patrício, V. S. Germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth.: efeito de salinidade e condicionamento osmótico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, p. 127-131, 2014.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MULLICK, P.; CHATTERJI, U.N. Effect of Sodium Cyanide on germination of two leguminous seeds. *Österreichische botanische Zeitschrift*, v. 114, n. 1, p. 88-91, 1967.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

MORAES, G. A. F.; MENEZES, N. L.; PASQUALLI, L. L. Bean seed performance under different osmotic potentials. **Ciência Rural**, v.35 n.4, p.776-780, 2005.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**. v. 25, p.239-250, 2002.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 2, p.1-24.

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

NORSWORTHY, J. K.; OLIVEIRA, M. J. Coffee senna (*Cassia occidentalis*) germination and emergence is affected by environmental factors and seedling depth. **Weed Science**, v. 53, n. 5, p. 657-662, 2005.

PAGNUSSAT, G. C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiology**, v.129, p.954-956, 2002.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

PEREIRA, M. R. R.; MARTINS, C. C.; MARTINS, D.; SILVA, R. J. N. Estresse hídrico induzido por soluções de peg e de NaCl na germinação de sementes de nabiça e fedegoso. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 687-696, 2014.

PEREIRA, B. L. C.; BORGES, E. E. L.; OLIVEIRA, A. C.; LEITE, H. G.; GONÇALVES, J. F. C. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Florestalis**, v.38, n.88, p.629-636, 2010.

PONTES, C. A.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n.5, p.593-601, 2002.

POZZOBON, M.; QUINTANI, I. J.; VOLKMANN, A.; BRAGHIROLI, F.; CEOLIN, L.; KNESS, A.; DREVECK, S.; UHLMANN, A. Avaliação da germinação, em casa de vegetação, de oito espécies arbóreas nativas da floresta ombrófila densa, com vistas a restauração de florestas fluviais. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu – MG. **Anais eletrônicos...** Caxambu: SEB, 2007. Disponível em: <<http://seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1638.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2015.

REGO, S. S.; NOGUEIRA, A. C. KUNIYOSHI, Y. S.; SANTOS, A. F. Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 31, n.2, p. 212-220, 2009.

REGO, S. S.; FERREIRA, M. M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F.; SOUSA, R. K.; BRONDANI, G. E. ; ARAUJO, M. A.; SILVA, A. L. L. Estresse hídrico e salino na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 2, n.4, p. 37-42, 2011.

SAEIDNEJAD, A. H.; PASANDI-POUR, A.; PAKGOHAR, N.; FARAHBAKHS, H. Effects of exogenous nitric oxide on germination and physiological properties of basil under salinity stress. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, v. 1, p. 103-113. 2013.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, London, v. 177, p.67-80, 2002.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.

SARATH, G.; BETHKE, P. C.; JONES, R.; BAIRD, L. M.; HOU, G.; MITCHELL, R. B. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, v. 223, p.1154–1164, 2006.

SIMAEI, M.; KHAVARI-NEJAD, R. A.; BERNARD, F. Exogenous Application of Salicylic Acid and Nitric Oxide on the Ionic Contents and Enzymatic Activities in NaCl-Stressed Soybean Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p.1495-1503, 2012.

SINGH, J.; SASTRY, E.V.D.; SINGH, V. Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. **Physiol Mol Biol Plants**, v.18, p. 45–50. 2012.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, G.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1-3, p. 158-167, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

- TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.281-288, 2004.
- TANOÛ, G.; MOLASSIOTIS, A.; DIAMANTIDIS, G. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2-3, p. 270-281, 2009.
- THIND, S. K.; MALIK, C. P. Carbohydrate metabolism in okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) seeds during germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, v.17, n. 4, p. 321-326, 1995.
- TONINI, P. P. Conexão entre os processos de degradação das reservas de proteínas e carboidratos e o efeito dos hormônios e açúcares em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2008.
- UNGAR, I.A. Halophyte seed germination. **Botany Review**, v.44, p.233-264, 1978.
- WEIDLICH, E. W. A.; PESCADOR, R.; UHLMANN, A. Alocação de recursos (carboidratos) no desenvolvimento inicial de plântulas de *Schizolobium parayba* (Vell.) S. F. Blake (Fabaceae-Caezalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 34, n. 4, p.627-635, 2010.
- YAMAMOTO, T.; BING, R. J. Nitric oxide donors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, p. 200-206, 2000.
- ZHENG, C.; JIANG, D.; LIU, F.; DAI, T.; LIU, W.; JING, Q.; CAO, W. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.222-227, 2009.

ANEXO 1

Comparação dos valores médios dentro dos tratamentos durante cada tempo (24, 48 e 72 horas) da germinação dos seguintes parâmetros: teor de proteínas, atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase, peroxidase do ascorbato e peroxidação de lipídios (MDA), durante a germinação de sementes de *Senna macranthera* submetidas a diferentes soluções: estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

Tempo (dias)	Tratamento	Proteína	SOD	APX	POX	CAT	MDA
24	-0,4 MPa	0,48 cd	14,22 a	0,76 abc	0,86 c	44,39 a	3.01 a
	-0,5 MPa	0,39 d	15,99 ab	1,15 a	2,16 a	25,01 bc	3.12 a
	Água	0,71 ab	12,40 ab	0,45 c	0,83 cd	10,02 g	2.48 ab
	-04 MPa+SNP	0,59 bcd	14,38 ab	0,51 bc	1,35 b	17,01 def	2.53 ab
	-0,5 MPa+SNP	0,75 ab	12,52 ab	0,86 ab	1,23 b	21,22 cd	2.71 ab
	SNP	0,66 bc	11,48 ab	0,45 c	0,76 cd	19,89de	2.21 b
	SNP inativo	0,76 ab	11,34 ab	0,47 bc	1,21 b	27,00 b	2.73 ab
	-0,4 MPa+SNP inativo	0,67 bc	11,60 ab	0,52 bc	0,58 d	13,48 fg	2.76 ab
	-0,5 MPa+SNP inativo	0,89 a	9,42 b	0,44 c	0,86 c	16,04 ef	2.73 ab
48	-0,4 MPa	0,77 a	9,94 b	0,59 c	1,67 f	36,16 c	2.90 a
	-0,5 MPa	0,71 a	14,54 b	0,81 bc	2,13 e	34,75 c	2.84 a
	Água	0,69 ab	12,76 b	0,76 c	2,69 d	32,13 c	2.49 abc
	-04 MPa+SNP	0,38 c	22,44 a	1,52 a	3,53 b	55,16 a	2.69 ab
	-0,5 MPa+SNP	0,71 a	12,60 b	0,60 c	2,16 e	26,05 d	2.44 abc
	SNP	0,49 bc	14,75 b	0,69 c	4,78 a	44,24 b	2.18 bc
	SNP inativo	0,49 bc	14,10 b	1,19 ab	3,25 c	44,60 b	2.02 c
	0,4+SNP inativo	0,57 abc	11,20 b	0,86 bc	2,78 d	45,27 b	2.45 abc
	0,5+SNP inativo	0,63 ab	13,57 b	0,81 bc	2,12 e	60,02 a	2.37 abc
72	-0,4 MPa	0,62 a	13,23 cd	0,91 b	3,22 f	52,18 cd	2.70 a
	-0,5 MPa	0,50 ab	14,52 cd	0,85 b	2,55 g	33,82 f	2.94 a
	Água	0,38 b	22,00 ab	0,95 b	4,92 c	57,21 c	2.54 a
	-04 MPa+SNP	0,56 ab	11,88 cd	0,76 b	4,43 d	49,01 de	2.63 a
	-0,5 MPa+SNP	0,51 ab	16,34 bc	0,66 b	1,48 h	44,55 e	2.87 a
	SNP	0,49 ab	24,64 a	1,40 a	6,75 a	134,45 a	2.60 a
	SNP inativo	0,38 b	17,12 bc	1,65 a	5,26 b	71,86 b	2.79 a
	-0,4 MPa+SNP inativo	0,54 ab	15,31 c	0,89 b	3,68 e	54,46 c	2.65 a
	-0,5 MPa+SNP inativo	0,53 ab	8,87 d	0,78 b	2,49 g	57,11 c	2.99 a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade.

ANEXO 2

Comparação dos valores médios dentro do mesmo tratamento durante os tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de germinação dos seguintes parâmetros: teor de proteínas, atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase, peroxidase do ascorbato e peroxidação de lipídios (MDA), durante a germinação de sementes de *Senna macranthera* submetidas à diferentes soluções: estresse salino de -0,4 MPa, estresse salino de -0,4 MPa em conjunto com SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, estresse salino de -0,5 MPa, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP inativo, SNP inativo, estresse salino de -0,5 MPa em conjunto com SNP, SNP e o controle (água).

Tempo (dias)	Tratamento	Proteína	SOD	APX	POX	CAT	MDA
0	-0,4 MPa	1,26 a	7,76 b	0,60 a	1,14 c	33,97 c	4.09 a
24	-0,4 MPa	0,48 c	14,22 a	0,76 a	0,86 d	44,39 b	3.01 b
48	-0,4 MPa	0,77 b	9,94 ab	0,59 a	1,67 b	36,16 c	2.90 b
72	-0,4 MPa	0,62 b	13,23 ab	0,91 a	3,22 a	52,18 a	2.70 b
0	-0,5 MPa	1,26 a	7,76 b	0,60 b	1,14 c	33,97 a	4.09 a
24	-0,5 MPa	0,39 c	15,99 a	1,15 a	2,16 b	25,01 b	3.12 b
48	-0,5 MPa	0,71 b	14,54 a	0,81 ab	2,13 b	34,75 a	2.84 b
72	-0,5 MPa	0,50 c	14,52 a	0,85 ab	2,55 a	33,82 a	2.94 b
0	Água	1,26 a	7,76 b	0,60 ab	1,14 c	33,97 b	4.09 a
24	Água	0,71 b	12,40 b	0,45 b	0,83 d	10,02 c	2.48 b
48	Água	0,69 b	12,76 b	0,76 ab	2,69 b	32,13 b	2.49 b
72	Água	0,38 c	22,00 a	0,95 a	4,92 a	57,21 a	2.54 b
0	-0,4 MPa+SNP	1,26 a	7,76 c	0,60 b	1,14 c	33,97 c	4.09 a
24	-0,4 MPa+SNP	0,59 b	14,38 b	0,51 b	1,35 c	17,01 d	2.53 b
48	-0,4 MPa+SNP	0,38 c	22,44 a	1,52 a	3,53 b	55,16 a	2.69 b
72	-0,4 MPa+SNP	0,56 bc	11,88 bc	0,76 b	4,43 a	49,01 b	2.63 b
0	-0,5 MPa+SNP	1,26 a	7,76 b	0,60 a	1,14 c	33,97 b	4.09 a
24	-0,5 MPa+SNP	0,75 b	12,52 ab	0,86 a	1,23 bc	21,22 c	2.44 b
48	-0,5 MPa+SNP	0,71 b	12,60 ab	0,60 a	2,16 a	26,05 c	2.44 b
72	-0,5 MPa+SNP	0,51 c	16,34 a	0,66 a	1,48 b	44,55 a	2.87 b
0	SNP	1,26 a	7,76 c	0,60 b	1,14 c	33,97 c	4.09 a
24	SNP	0,66 b	11,48 bc	0,45 b	0,76 d	19,89 d	2.21 b
48	SNP	0,49 b	14,75 b	0,69 b	4,78 b	44,24 b	2.18 b
72	SNP	0,49 b	24,64 a	1,40 a	6,75 a	134,45 a	2.60 b
0	SNP inativo	1,26 a	7,76 c	0,60c	1,14 c	33,97 c	4.09 a
24	SNP inativo	0,76 b	11,34 bc	0,47 c	1,21 c	27,00 d	2.73 b
48	SNP inativo	0,49 c	14,10 ab	1,19 b	3,25 b	44,60 b	2.02 b
72	SNP inativo	0,38 c	17,12 a	1,65 a	5,26 a	71,86 a	2.79 b
0	-0,4 MPa+SNP inativo	1,26 a	7,76b	0,60 a	1,14 c	33,97 c	4.09 a
24	-0,4 MPa+SNP inativo	0,67 b	11,60 ab	0,52 a	0,58 d	13,48 d	2.76 b
48	-0,4 MPa+SNP inativo	0,57 b	11,20 ab	0,86 a	2,78 b	45,27 b	2.45 b

72	-0,4 MPa+SNP inativo	0,54 b	15,31 a	0,89 a	3,68 a	54,46 a	2.65 b
0	-0,5 MPa+SNP inativo	1,26 a	7,76 b	0,60 a	1,14 c	33,97 b	4.09 a
24	-0,5 MPa+SNP inativo	0,89 b	9,42 ab	0,44 a	0,86 d	16,04 c	2.73 b
48	-0,5 MPa+SNP inativo	0,63 c	13,57 a	0,81 a	2,12 b	60,02 a	2.37 b
72	-0,5 MPa+SNP inativo	0,53 c	8,87 ab	0,78 a	2,49 a	57,11 a	2.99 b

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade.