

TÁSSIA FERNANDA SANTOS NERI SOARES

**BRASSINOSTERÓIDES NA SUPERAÇÃO DO ESTRESSE CAUSADO POR
CHUMBO EM SEMENTES DE *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

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

T

S676b
2019
Soares, Tássia Fernanda Santos Neri, 1992-
Brassinosteróides na superação do estresse causado por
chumbo em sementes de *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. /
Tássia Fernanda Santos Neri Soares. – Viçosa, MG, 2019.
x, 46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 41-46.

1. Sementes. 2. Metais pesados. 3. Germinação. 4. Plantas -
Reguladores. 5. *Brassica juncea* - Crescimento. 6. Enzimas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 631.521

TÁSSIA FERNANDA SANTOS NERI SOARES

**BRASSINOSTERÓIDES NA SUPERAÇÃO DO ESTRESSE CAUSADO POR
CHUMBO EM SEMENTES DE *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de fevereiro de 2019.



Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias



Dimas Mendes Ribeiro



Ariadne Morbeck Santos Oliveira



Luiz Antônio dos Santos Dias
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos e me dar forças para nunca desistir.

Aos meus pais, Josenilda e José, por todo amor incondicional, vocês foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu companheiro de vida, Vinícius, por estar sempre presente. Palavras nunca serão suficientes para te agradecer.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Professor Luiz Antônio dos Santos Dias e à Professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias pela oportunidade, ensinamentos e orientação.

Aos Professores Dimas Mendes Ribeiro, Laércio Júnio da Silva e Juraci Alves Oliveira pelos ensinamentos, paciência e apoio.

A todos os integrantes do Grupo de Estudos em Tecnologia em Sementes (GSem) pela ajuda na condução dos experimentos e apoio.

Aos amigos Gabriela, Bruno, Geraldo, Juliana, Carolina, Camila, André, Ariadne, Lorena e Tainara pela amizade cultivada, incentivo e momentos de alegrias compartilhados.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	11
MATERIAL E MÉTODOS	7
Experimento 1: Germinação de sementes de <i>Brassica juncea</i> submetidas a diferentes concentrações de chumbo.....	7
Experimento 2: Efeito das diferentes concentrações do 24-epibrassinolídeo aplicadas na pré-embebição ou no teste de germinação de sementes de <i>Brassica juncea</i> sob estresse causado por chumbo.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
Experimento 1	14
Experimento 2	17
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito das concentrações de Pb na Germinação (G), Primeira Contagem da Germinação (PCG), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Protrusão Radicular (PR) e Índice de Velocidade de Protrusão Radicular (IVPR) em sementes de *B. juncea*.....15

Tabela 2. Efeito do Pb nos parâmetros de crescimento de plântulas, Índice de Tolerância e Índice de Vigor de *B. juncea*.....16

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Germinação de sementes de *B. juncea* em substrato umedecido com soluções de acetato de chumbo nas concentrações 0, 2, 4 e 6 mM.....14
- Figura 2.** Grau de umidade (%) de sementes de *B. juncea* após diferentes períodos de embibição em água.....18
- Figura 3.** Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na Germinação (A) e na Primeira Contagem da Germinação (B) de sementes de *B. juncea* sob estresse causado por Pb.....19
- Figura 4.** Padrão de plântulas normais (A) e anormais (B) obtidas no teste de germinação.21
- Figura 5.** Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Índice de Velocidade de Germinação (A) e no Tempo Médio de Germinação (B) de sementes de *B. juncea* sob estresse causado por Pb.....22
- Figura 6.** Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Protrusão Radicular (A) e da Índice de Velocidade de Protrusão Radicular (B) de sementes de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb.....23
- Figura 7.** Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Comprimento da Parte Aérea (A) e da Raiz (B) de plântulas de *B. juncea* sob estresse causado por Pb.25
- Figura 8.** Teste de germinação de sementes de *B. juncea* em papel umedecido com água (controle), na solução de Pb 3 mM e na solução conjunta de EBL 10^{-8} M e Pb 3 mM. 26
- Figura 9.** Aspecto das plântulas de *B. juncea* obtidas no teste de germinação em água (controle) e em Pb 3 mM após a pré-embibição das sementes em água (EBL 0) e em solução de EBL 10^{-8} M.....27

Figura 10. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Índice de Vigor das plântulas de <i>B. juncea</i> submetidas a estresse causado por Pb.....	28
Figura 11. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Índice de Tolerância da Parte Aérea (A) e da Raiz (B) das plântulas de <i>B. juncea</i> submetidas a estresse causado por Pb.....	29
Figura 12. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas CAT (A) e APX (B) em sementes de <i>B. juncea</i> sob estresse causado por Pb.....	30
Figura 13. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas POX e SOD em sementes de <i>B. juncea</i> submetidas a estresse causado por Pb.....	31
Figura 14. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas CAT e APX em plântulas de <i>B. juncea</i> submetidas a estresse causado por Pb.....	33
Figura 15. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas POX e SOD em plântulas de <i>B. juncea</i> submetidas a estresse causado por Pb.....	34
Figura 16. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no teor de Pb nas sementes (A) e plântulas (B) de <i>B. juncea</i> sob estresse causado por Pb.	37

RESUMO

SOARES, Tássia Fernanda Santos Neri, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Brassinosteróides na superação do estresse causado por chumbo em sementes de *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.** Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias.

O chumbo (Pb) é um metal pesado de grande relevância devido ao seu elevado potencial tóxico ao crescimento das plantas. A fitoremediação assistida por reguladores de crescimento como os brassinosteróides tem revertido os efeitos do estresse causado por metais pesados tanto na germinação como no crescimento das plantas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos brassinosteróides na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. sob condições de estresse causado por chumbo. Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Rotina de Sementes da Universidade Federal de Viçosa. No primeiro avaliou-se a germinação das sementes nas concentrações de acetato de chumbo 0 (água), 2, 4 e 6 mM. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão para se determinar a concentração adequada para causar estresse, mas que permitisse germinação $\geq 50\%$. Tal concentração foi utilizada nos testes de germinação no segundo ensaio, onde foram avaliadas duas formas de aplicação do 24-epibrassinolídeo (EBL), na pré-umedeção das sementes e durante o teste de germinação, utilizando-se 3 concentrações: 0 (água), 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M). As sementes foram colocadas para germinar sobre papel toalha umedecido com 4 mL da solução de acetato de chumbo (3 mM) em caixas gerbox a 20° C. O controle foi representado pelo teste de germinação em substrato umedecido com água. Foram realizadas as seguintes avaliações: porcentagem de germinação e protrusão radicular, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de protrusão radicular, índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação, comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas, índice de tolerância da parte aérea e da raiz e índice de vigor. Determinou-se ainda a atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX e o teor de chumbo nas sementes e nas plântulas. O experimento foi conduzido em DIC e analisado em esquema fatorial (4 concentrações do EBL x 2 formas de aplicação + controle (sem estresse)). Esses dados foram, a seguir submetidos a testes de normalidade e à análise de variância. As médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi aplicado o teste de Dunnett para comparação com o controle.

Houve efeito negativo do Pb na porcentagem e na velocidade de germinação das sementes. A partir da concentração de 3 mM de Pb houve redução de mais de 50% da germinação. O EBL na concentração de 10^{-8} M, aplicado em pré-embebição ou no teste de germinação, foi efetivo para a superação do estresse causado por Pb, proporcionando valores de porcentagem e velocidade de germinação similares aos obtidos sem estresse. Maior teor de Pb foi constatado nas plântulas do teste de germinação em acetado de Pb em relação ao controle (água), o que não ocorreu para as sementes. A aplicação do EBL nas doses de 10^{-8} e 10^{-6} M em pré-embebição foi eficiente para promover a recuperação da germinação e ativar o sistema de defesa das enzimas antioxidantes nas plântulas sob estresse por exposição ao chumbo.

ABSTRACT

SOARES, Tássia Fernanda Santos Neri, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Brassinosteroids to alleviate lead stress in *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. seeds.** Adviser: Luiz Antônio dos Santos Dias.

Lead (Pb) is a heavy metal with a huge relevance because of its high toxic potential for plant growth. Phytoemediation assisted by growth regulators, such as brassinosteroids, has suppressed the effects of heavy metal stress on germination and plant growth. This study aims to evaluate the effect of brassinosteroids on seed germination and seedling growth of *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. under stress conditions caused by Lead. Two experiments were carried out at the Laboratório de Sementes of Universidade Federal de Viçosa. In the Experiment 1, seed germination was evaluated using acetate of lead concentrations: 0 (water), 2, 4 and 6 mM. The experiment was conducted in a completely randomized design (DIC) with 4 treatments and 4 replicates. The data were submitted to analysis of variance and regression to determine the concentration for causing stress that allowed germination $\geq 50\%$. This concentration was used in the Experiment 2, which two forms of 24-epibrassinolide (EBL) application (pre-imbibition of the seeds and in the paper germination) and 4 EBL concentrations (0, 10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) were used. The seeds were placed to germinate on paper towels moistened with 4 mL of the solution of lead acetate (3 mM) in gerbox boxes at 20 ° C. The control was represented by the germination test in substrate wetted with water. The following evaluations were carried out: percentage of germination and root protrusion, first germination count, radicle protrusion speed index, germination speed index, mean germination time, shoot and root seedling length, tolerance index of shoot and root and vigor index. The enzymes activity of SOD, CAT, POX and APX and the Pb content in seeds and seedlings were also determined. The experiment was conducted in DIC and analyzed in a factorial scheme (4 EBL concentrations x 2 application forms + control (without Pb)). These data were submitted to the normality tests and analysis of variance. The means were compared by the Tukey test at 5% of probability. The Dunnett test was applied to compare to the control. There was a negative effect of Pb on the seed percentage and germination speed. There was a reduction of more than 50% of the germination from 3 mM Pb. The EBL 10^{-8} M, applied in pre-soaking or in germination paper test, was effective to overcome the stress caused by Pb, providing percentage values and germination speed similar to those obtained without stress. The content of Pb in the

seeds was lower than in the seedlings. Higher Pb content was observed in the seedlings of the germination test in Pb acetal compared to the control (water), which did not occur for the seeds. The EBL application using 10^{-8} and 10^{-6} M concentrations in pre-soaking seeds were efficient to promote the germination recovery and to activate the defense system of antioxidant enzymes in seedlings under Pb stress.

INTRODUÇÃO

Com o processo de industrialização e urbanização, a liberação de contaminantes tóxicos se tornou um problema em todo o mundo. A presença desses poluentes no solo limita o desenvolvimento vegetal, gerando problemas desde a germinação das sementes até o estabelecimento das plantas. Dentre os contaminantes tóxicos, destacam-se os metais pesados que além de provocar danos à saúde humana e animal, afeta também a produção agrícola (Sethy e Ghosh, 2013).

Dentre os metais pesados destaca-se o Chumbo (Pb), classificado como metal pesado não essencial, que diante do seu elevado poder de toxicidade e persistência, configura grave problema ambiental na contaminação do solo e das águas (Bertoli et al., 2011). A contaminação ambiental por Pb pode ser resultado de práticas poluentes, como as emissões de gases provenientes de automóveis, utilização e descarte inadequado de fertilizantes e pesticidas, podendo ainda fazer parte de tintas e produtos industriais como baterias e munições (Singh, 2016).

O Chumbo pode provocar disfunções no crescimento das plantas por causar danos celulares e ampliar a permeabilidade seletiva de membranas, permitindo maior fluxo desse metal para dentro das células. Sua fitotoxicidade provoca inibição da atividade enzimática, distúrbios na nutrição mineral, no balanço hídrico e no status hormonal. Em plantas estressadas com esse metal, as células-guarda tendem a serem menores e a plasticidade das células da parede diminui, reduzindo o potencial hídrico dentro da célula. Em casos de excesso de Pb, o aparato fotossintético pode ser afetado, gerando danos às atividades respiratórias das plantas (Ashraf et al., 2015; Sharma e Dubey, 2005)

Dado o potencial tóxico do Chumbo, ainda são poucos os estudos que abordam a atuação desse metal nas fases iniciais de desenvolvimento da planta, principalmente durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas (Moraes et al., 2014). Sabe-se que para a ocorrência do processo de germinação, a semente precisa encontrar condições ambientais favoráveis para que seja reativada a sua atividade metabólica, envolvendo uma série de reações relacionadas ao processo respiratório, digestão enzimática de reservas e atividades de biosíntese que culminam com a formação da plântula.

Considerando que a germinação de sementes e o crescimento das plântulas são etapas críticas do desenvolvimento das plantas, a presença de metais pesados no solo

durante esta fase pode prejudicar o crescimento ou até mesmo inviabilizar a formação da planta. Altas concentrações de metais pesados causam efeitos tóxicos em diferentes rotas do metabolismo das plantas, podendo acarretar os seguintes efeitos: bloqueio funcional de grupos de importantes moléculas como enzimas, polinucleotídeos; bloqueio do sistema de transporte de nutrientes na planta e inativação ou desbalanço das enzimas antioxidantes (Seneviratne et al., 2017; Sethy e Ghosh, 2013).

A germinação das sementes pode ser influenciada negativamente pelos metais pesados e os danos causado nesse processo podem variar conforme a espécie, o tempo de exposição e a concentração do metal. Sugere-se que os metais pesados afetam a germinação das sementes de duas formas: pela sua toxicidade geral e pela inibição da absorção de água. A distribuição dos metais pesados nos tecidos da semente pode variar de acordo com o tipo do metal, com a espécie e com a anatomia da semente. O envoltório da semente pode atuar na proteção contra a entrada do metal pesado, até que a germinação ocorra (Kranner e Colville, 2011; Wierzbicka e Obidzińska, 1998).

Recentes estudos têm evidenciado que os metais pesados, em geral, afetam negativamente a germinação e o desenvolvimento das plântulas por modificar os perfis protéicos que podem levar ao desbalanço osmorregulatório das células, afetando a atividade de proteínas de mobilização de reserva e degradação de atividades proteolíticas (Adrees et al., 2015; Karmous et al., 2015).

Da mesma forma, podem afetar também a atividade de defesa do sistema antioxidante, composto por enzimas como Catalase, Superóxido Dismutase, Ascorbato Peroxidase e Peroxidase, e a ação dos reguladores de crescimento, especialmente ácido abscísico e giberelina. Em geral, as plantas utilizam mecanismos como a ativação do sistema antioxidante, produção de prolina e de proteínas de choque térmico para superar a toxicidade induzida pelos metais pesados (Seneviratne et al., 2017).

As sementes, assim como os demais tecidos das plantas, possuem enzimas e proteínas que são ligadas às membranas e, dependendo da espécie, as sementes podem contar com maior acúmulo de proteínas de armazenamento. Dessa forma, os metais pesados podem provocar alterações oxidativas nas proteínas causadas pela reação com as espécies reativas de O₂ (EROs). Além disso, os lipídios podem ser alvo das EROs, resultando na peroxidação lipídica. Assim, espera-se que com exposição aos metais pesados, o sistema antioxidante seja induzido afim de atenuar esse estresse minimizando os danos causados ao metabolismo da planta (Kranner e Colville, 2011).

A fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas para despoluir ambientes contaminados, sendo considerada uma modificação da prática agrônômica, no qual o cultivo das plantas não é destinado para produção alimentícia. É uma abordagem de menor custo, ecologicamente correta e socialmente aceitável, que pode ser empregada em solos poluídos com metais pesados. A fitoextração é uma das técnicas de fitorremediação que pode ser aplicada com esse objetivo, na qual os contaminantes inorgânicos, como os metais pesados, são absorvidos pelas raízes e acumulados, principalmente, na parte aérea das plantas (Ashraf et al., 2015; Barbafieri e Tassi, 2011).

Para isso, é preciso a utilização de plantas que tenham a capacidade de alto acúmulo de metais pesados, elevada taxa de crescimento e alta produção de biomassa, chamadas de plantas hiperacumuladoras. Espécies da família *Brassicaceae*, tais como *Brassica napus*, *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. e *Raphanus sativus* são conhecidas pelo seu potencial hiperacumulador de metais pesados. Em geral, fatores como alta produção de biomassa e alta tolerância a metais pesados, possibilitam à família *Brassicaceae* extrair grandes quantidades de metais ocorrendo sua deposição na parte aérea e no sistema radicular (Kanwal et al., 2014; Sharma et al., 2012).

Em um programa de fitorremediação, o sucesso da germinação e do desenvolvimento das plântulas são as etapas iniciais para obtenção de plantas capazes de extrair esses contaminantes do solo. Assim, é preciso desenvolver tecnologias que possam tornar as espécies mais resistentes a esses estresses, ativando os mecanismos de tolerância. A fitorremediação assistida com reguladores de crescimento vegetal é considerada uma técnica nova e promissora por melhorar a eficiência e aplicabilidade da fitorremediação. Assim, os fitormônios podem beneficiar a fitorremediação com o aumento da tolerância das plantas aos efeitos tóxicos e da maior absorção e acumulação dos metais pesados na parte aérea para facilitar o descarte adequado do poluente (Ahammed et al., 2012; Barbafieri e Tassi, 2011).

Dentre os reguladores de crescimento, destacam-se os brassinosteróides (BR) que representam uma classe nova de fitormônios, que foram primeiramente isolados e em grãos de pólen de *Brassica napus* L.. Sabe-se que eles atuam em diversos aspectos do crescimento das plantas, principalmente no alongamento celular, sendo sintetizados em tecidos jovens em crescimento. Têm natureza esteroideal, são encontrados somente em plantas, sendo derivados do campesterol (Kanwar et al., 2013; Vadhini et al., 2010)

Os brassinosteróides são reconhecidos por promoverem a divisão e o alongamento celular, a diferenciação vascular, atuam no alongamento do tubo polínico, no processo de

senescência e na resistência a estresses (Bhardwaj et al., 2014; Clouse e Sasse, 1998). A aplicação exógena dos brassinosteróides sob condições de estresses é considerada uma abordagem promissora afim de obter ganhos em produtividade agrícola conjuntamente com a proteção ambiental (Shahzad et al., 2018).

Em sementes de *Arabidopsis*, Jiang et al. (2013) verificam que os brassinosteróides têm importante função na determinação do tamanho, massa e forma das sementes, apresentando diminuição do endosperma das sementes provenientes de plantas mutantes. Nomura et al. (2007) observaram que existe influência dos brassinosteróides (BRs) no desenvolvimento de sementes de ervilha, nas quais o nível máximo de BRs ativos ocorreu durante a fase de rápido crescimento das sementes. Há relatos também de aumento do teor de lipídios em grãos de trigo devido à ação dos BRs (Hnilicka et al., 2009).

Na literatura tem sido reportado o efeito dos brassinosteróides na germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas em condições de diversos estresses como o salino (Larré et al., 2015), térmico (Gornik e Lahuta, 2017), hídrico (Mahesh et al., 2013; Shahana et al., 2015) e com metais pesados como o Cádmio (Anusha et al., 2015), Arsênio (Raghu et al., 2014), Alumínio (Madhan et al., 2014), Cromo (Sharma et al., 2011b), Níquel (Lukatkin et al., 2013; Sharma et al., 2011a) e Chumbo (Anuradha e Rao, 2011).

A aplicação exógena de brassinosteróides em plantas submetidas a estresse causado por metal pesado ativa o sistema de defesa antioxidante e diminui o conteúdo do componente tóxico na planta. Isso ocorre devido a capacidade dos brassinosteróides de regular a permeabilidade da membrana celular e a sua ligação com as proteínas de membrana. Assim, aumenta-se a atividade metabólica e enzimática afim de promover a desintoxicação nas plantas submetidas ao estresse (Shahzad et al., 2018; Vadhini et al., 2010).

Os brassinosteróides provocam diversos efeitos positivos em plantas sob estresse causado por metais pesados. Destaca-se a melhoria de parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos do desenvolvimento das plantas, como por exemplo o incremento na germinação, matéria seca, comprimento da parte aérea e da raiz, produção de antioxidantes, biossíntese das enzimas, conteúdo de clorofila e de água nos tecidos celulares (Shahzad et al., 2018).

Desde 1979, com a identificação do brassinolideo em pólen de *Brassica napus*, o uso dos brassinosteróides no incremento da produtividade agrícola tem sido verificado na agricultura. A síntese do brassinolideo e de seus análogos possibilitou elucidar o seu

mecanismo de ação e suas interações com outros hormônios de crescimento vegetal. Assim, o brassinolídeo e seus compostos são reconhecidos coletivamente como brassinosteróides (Mandava, 1988). Os brassinolídeo, 28-homobrasinolídeo e o 24-epibrassinolídeo são os brassinosteróides mais ativos e amplamente usados em estudos experimentais (Vardhini et al., 2006)

Em estudos relacionados à germinação de sementes, a aplicação exógena de 24 e 28-epibrassinolideo na concentração 2 uM suprimiu a toxicidade causada pelo Arsênio na germinação de sementes de rabanete. Houve ainda aumento da germinação com o aumento das concentrações do EBL. O crescimento da radícula foi severamente reduzido pela ação do arsênio. No entanto, a aplicação do EBL durante o crescimento das plântulas sob níveis tóxicos de arsênio resultou em aumento da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e POX) e restauração do crescimento das plântulas (Raghu et al., 2014). Os autores concluíram que tais resultados indicam que a supressão do estresse causado por arsênio pela ação dos BRs foi mediada pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

Sob condições de estresse por metais pesados, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que provocam efeitos deletérios em nível celular, podendo ocorrer ruptura das membranas através da peroxidação lipídica. e as organelas podem ser completamente desintegradas induzindo ao estresse oxidativo (Shahzad et al., 2018).

Os efeitos do estresse causado por alumínio foram relatados por Madhan; Mahesh; Rao (2014), onde a aplicação do 24-EBL reverteu os efeitos do estresse, aumentando a germinação e o crescimento de plântulas *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Além disso, promoveu incremento na atividade das enzimas antioxidantes por limitar os níveis das EROs.

A germinação de sementes de trigo foi negativamente afetada pelo estresse causado por Cádmio. No entanto, esse efeito inibitório foi significativamente reduzido após a adição do homobrasinolídeo (HBL). Resultado semelhante ocorreu com as plântulas, que apresentaram maior crescimento nos tratamentos com soluções conjuntas de Cd e HBL, comparado ao tratamento somente com o Cd. O estresse oxidativo também foi significativamente aliviado com redução dos níveis de H₂O₂, MDA e nos valores de condutividade elétrica. Além disso, o aumento dos níveis dos produtos enzimáticos e não enzimáticos após o tratamento com HBL conferiu tolerância ao estresse que foi constatado pelo incremento do crescimento e da produção de biomassa (Anusha et al., 2015).

A germinação e o crescimento das plântulas de *Brassica juncea* foram significativamente reduzidos após o tratamento com Níquel. No entanto, após o pré-tratamento por 8 horas em solução de HBL, verificou-se aumento nos valores dos parâmetros germinativos avaliados. Comportamento similar foi observado para o conteúdo de proteína e atividade as enzimas do sistema antioxidante, CAT, POX, APX e SOD avaliadas nas plântulas com 7 dias de idade. Sugere-se que os brassinosteróides aumentam a resistência ao estresse devido à sua ligação com proteínas de membranas para combater o estresse oxidativo (Sharma et al., 2008).

Diante da problemática ambiental ocasionada pelo Chumbo, devido a sua presença em diversos produtos e à sua alta toxicidade, e considerando-se o potencial fitorremediador da espécie *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss., objetivou-se, neste estudo, avaliar o efeito dos brassinosteróides na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas submetidas a condições de estresse causado pelo chumbo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG). Foram utilizadas sementes de mostarda crespa, *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss., produzidas pela empresa Agristar Brasil Ltda. Foram conduzidos dois experimentos descritos a seguir.

Experimento 1: Germinação de sementes de *Brassica juncea* submetidas a diferentes concentrações de chumbo

As sementes, em quatro repetições de 50, foram colocadas para germinar sobre duas folhas de papel toalha, umedecidas com 4 mL de água (controle) ou com soluções de acetato de chumbo ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$) nas concentrações de 2, 4 e 6 mM, em caixas gerbox. As caixas foram tampadas e mantidas em germinador à temperatura constante de 20 °C por sete dias (Brasil, 2009). Foram realizadas as seguintes avaliações:

Primeira contagem de germinação: consistiu da porcentagem de plântulas normais obtidas aos 5 dias após a semeadura.

Germinação e Protrusão radicular: representada pela porcentagem de sementes que emitiram radícula e de plântulas normais, respectivamente, aos 7 dias após a semeadura (Brasil, 2009).

Índice de Velocidade de Protrusão Radicular (IVPR) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG): foram obtidos realizando-se contagens diárias do número de sementes que emitiram radícula e do número de plântulas normais, respectivamente, conforme a fórmula proposta por Maguire (1962).

Tempo Médio de Germinação: calculado pela fórmula $\text{TMG} = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$, onde: n_i = número de plântulas normais por dia; t_i = tempo de incubação; i = 7 dias (Laboriau, 1983).

Comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas: adotou-se a metodologia descrita para o teste de germinação, mas utilizando-se 4 repetições de 20 sementes. A determinação do comprimento das plântulas foi realizada aos 5 dias após a semeadura por meio da análise computadorizada de imagens com o auxílio do software ImageJ®. As plântulas foram colocadas em um scanner modelo HP Scanjet para obtenção das imagens. Os resultados foram expressos em cm/plântula.

Índice de tolerância da parte aérea e da raiz: utilizou-se o comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas (cm/plântula) obtidos no quinto dia após o início do teste de germinação para o cálculo do índice proposto por Turner e Marshall (1972):

$$\text{Índice de Tolerância} = \frac{\text{média do comprimento na solução com Pb}}{\text{média do comprimento no controle}}$$

Índice de Vigor: utilizou-se o comprimento das plântulas obtidos no quinto dia após a semeadura para o cálculo deste índice conforme proposto por Sako et al. (2001).

A partir dos resultados do percentual de germinação obtido no quinto dia após a semeadura, foi selecionada a concentração de acetato de chumbo capaz de causar estresse moderado, ou seja, considerando-se como critério a obtenção de valores de germinação em torno de 50% (P50), conforme Souza et al. (2012). Esta concentração será utilizada nos experimentos seguintes.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos (0, 2, 4 e 6 mM de acetato de chumbo), com 4 repetições. Cada repetição foi composta por 50 sementes. As variáveis germinação, crescimento de plântulas e vigor foram calculadas por meio da utilização da função Germcalc e PlantCalc do pacote do software R (Silva et al., 2018). Os dados foram submetidos a testes de normalidade e à análise de variância. As médias comparadas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi ajustada a equação de regressão para as médias da porcentagem de germinação, utilizando o *software* R (R Development Core, 2015). Os coeficientes de regressão foram avaliados pelo *teste t*, a 1% e a 5% de probabilidade.

Experimento 2: Efeito das diferentes concentrações do 24-epibrassinolídeo aplicadas na pré-embebição ou no teste de germinação de sementes de *Brassica juncea* sob estresse causado por chumbo

Inicialmente, foi determinado o grau de umidade nas sementes secas segundo metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Foram utilizadas duas repetições de 50 sementes, utilizando-se o método da estufa a 105 °C ± 3 °C por 24 horas, sendo os resultados expressos em porcentagem (base úmida).

Em seguida, foi obtida a curva de embebição das sementes em água com o objetivo de se identificar do período de embebição necessário para que as sementes tenham sua atividade metabólica pré-germiantiva ativada, ou seja, atinjam a fase II da germinação conforme descrito por Bewley et al. (2013), sem alcançar a fase 3 que é representada pela emissão da radícula, segundo o padrão trifásico de absorção de água descrito por estes autores.

Para tanto, quatro repetições de 50 sementes foram inicialmente pesadas e colocadas para embeber sobre duas folhas de papel de germinação umedecido com 4 mL de água. As caixas foram tampadas e mantidas em germinador à temperatura constante de 20 ° C. Foram realizadas pesagens das sementes após os seguintes períodos de embebição: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 30 e 48 horas.

Para determinação do grau de umidade atingido pelas sementes após cada período de embebição foi utilizada a equação proposta por Cromarty et al. (1985) :

$$GU_f = 100 - \left(P_i \cdot \left(\frac{100 - GU_i}{P_f} \right) \right)$$

Em que:

GU_f = grau de umidade final (%);

GU_i = grau de umidade inicial (%);

P_f = peso no grau de umidade final (g);

P_i = peso inicial das sementes (g).

Com base no teor de água atingido pelas sementes nos diferentes períodos de embebição, estabeleceu-se o tempo necessário para a embebição das sementes nas soluções de EBL, de modo a terem o seu metabolismo pré-germinativo ativado.

Para a condução do experimento 2, foram preparadas as soluções do regulador 24-epibrassinolídeo (EBL). Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de EBL na concentração 4,16 10⁻⁴ M. A partir desta solução, foram feitas diluições para a obtenção das soluções nas concentrações a serem utilizadas no experimento 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M.

Para avaliar o efeito do EBL aplicado em pré-embebição, as sementes foram pré-embebidas em soluções de EBL nas concentrações: 0 (água), 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M durante período de tempo definido conforme os resultados obtidos a partir da curva de embebição. Após isso, foram colocadas para germinar sobre duas folhas de papel toalha, umedecidas com 4 mL da solução de acetato de chumbo (3 mM) em caixas gerbox.

O EBL foi aplicado ainda no papel toalha utilizado como substrato para o teste de germinação. Para isso, as sementes foram colocadas para germinar em papel toalha

umedecido com 4 mL da solução conjunta de acetato de chumbo (3 mM) e EBL nas seguintes soluções concentrações: 0 (sem EBL), 10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M. As soluções conjuntas foram preparadas pesando a quantidade de $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$ necessária para obtenção da solução na concentração 3 mM e diluindo da solução estoque as concentrações de EBL definidas anteriormente (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M).

O tratamento controle consistiu na germinação das sementes sobre duas folhas de papel toalha umedecidas com 4 mL de água. Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes, em caixas gerbox que foram mantidas em germinador à temperatura constante de 20 ° C.

Durante o teste de germinação foram realizadas as seguintes avaliações:

Primeira contagem de germinação: consistiu da porcentagem de plântulas normais obtidas aos 5 dias após a semeadura.

Germinação e Protrusão radicular: representada pela porcentagem de sementes que emitiram radícula e de plântulas normais, respectivamente, aos 7 dias após a semeadura (Brasil, 2009).

Índice de Velocidade de Protrusão Radicular (IVPR) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG): foram obtidos realizando-se contagens diárias do número de sementes que emitiram radícula e do número de plântulas normais, respectivamente, conforme a fórmula proposta por Maguire (1962).

Tempo Médio de Germinação: calculado pela fórmula $\text{TMG} = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$, onde: n_i = número de plântulas normais por dia; t_i = tempo de incubação; $i = 7$ dias (Laboriau, 1983).

Comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas: adotou-se a metodologia descrita para o teste de germinação, mas utilizando-se 4 repetições de 20 sementes. A determinação do comprimento das plântulas foi realizada aos 7 dias após a semeadura medidas manualmente com auxílio de régua graduada. Os resultados foram expressos em cm.plântula^{-1} .

Índice de tolerância da parte aérea e da raiz: utilizou-se o comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas (cm/plântula) obtidos no sétimo dia após o início do teste de germinação para o cálculo do índice proposto por Turner e Marshall (1972):

$$\text{Índice de Tolerância} = \frac{\text{média do comprimento na solução com Pb}}{\text{média do comprimento no controle}}$$

Índice de Vigor: utilizou-se o comprimento das plântulas obtidos no sétimo dia após a semadura para o cálculo deste índice conforme proposto por Sako et al. (2001).

Atividade das enzimas antioxidantes nas sementes e nas plântulas

A atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (POX) e Ascorbato Peroxidase (APX) foi determinada nas sementes e nas plântulas. Para avaliação nas sementes, foi estabelecido o tempo de 24 h (controle) e 96 h (demais tratamentos com o chumbo) após o início do teste de germinação, para que todas elas apresentassem grau de umidade em torno de 40 %. Para avaliação nas plântulas, foi determinada a atividade das enzimas antioxidantes ao final do teste de germinação (7 dias).

Foram obtidos os extratos enzimáticos brutos pela maceração de 0,2 g de sementes e plântulas, seguido da adição de 2 mL do meio de homogeneização composto pelo tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 15.000 g por 15 minutos a 4 °C.

Determinação do teor proteínas

O teor de proteínas foi determinado por meio do método de Bradford (1976), na qual foi utilizada a curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA) como proteína de referência. Para isso, foram adicionados 10 e 25 µL do extrato enzimático das sementes e das plântulas, respectivamente, a 1 mL do reagente de Bradford e agitados. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, após 20 minutos

Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada a partir da adição de 100 µL do extrato enzimático bruto das sementes/plântulas a 2,90 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação ocorreu em câmara de reação iluminada com lâmpada fluorescente de 15 W a 25 °C por cinco minutos. Após isso, a fotorredução do NBT foi medida pela absorbância a 560 nm. A absorbância do meio de reação mantido na ausência da iluminação durante o mesmo período de tempo foi obtida e utilizada como branco, sendo a subtraído da leitura das demais amostras (Giannopolitis e Ries, 1977). Um unidade de SOD foi definida como

a quantidade de enzima requerida para inibir a fotoredução do NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em $U \text{ min}^{-1} \cdot \mu \text{ g}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada por meio da adição de 50 e 100 μL do extrato enzimático bruto das sementes e das plântulas em 2,95 e 2,90 mL, respectivamente, do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM. A redução na absorbância foi avaliada por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm a 25 °C durante o primeiro minuto da reação (Havir e McHale, 1987). Para isso, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e os resultados expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade das peroxidases (POX)

A atividade da POX foi determinada pela adição de 50 e 100 μL do extrato enzimático bruto das sementes e das plântulas em 2,95 e 2,90 mL, respectivamente, do 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). O incremento da absorbância no comprimento foi avaliado por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento onda de 420 nm a 25 °C no primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e os resultados expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada por meio da adição de 100 μL do extrato enzimático bruto das sementes/plântulas a 2,90 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H_2O_2 0,3 mM. A redução da absorbância no comprimento foi avaliada por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento onda de 210 nm a 25 °C no primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e os resultados expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação do teor de chumbo nas sementes e nas plântulas

De forma similar a análise das enzimas antioxidantes, o teor de chumbo foi determinado nas sementes com 24 h (controle) e 96 h (demais tratamentos com Pb) após o início do teste de germinação. Nas plântulas a determinação do teor de chumbo foi ao final do teste de germinação (7 dias). As sementes e plântulas foram secas em estufa com ventilação forçada a 65 °C até peso constante. Posteriormente, as amostras foram

adicionadas a 3 ml de solução nitroperclórica 2:1 e mantidas em placa digestora com temperatura controlada até a completa digestão da matéria orgânica (Bataglia et al., 1983). As amostras foram filtradas, utilizando papel filtro e a solução final diluída para estimar a concentração de Pb por espectrofotometria de absorção atômica. O conteúdo de Pb foi expresso em mg.g^{-1} de matéria seca.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e analisado em esquema fatorial, com 4 concentrações do EBL (0, 10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) x 2 formas de aplicação do EBL (na pré-embebição e no teste de germinação de sementes) + controle (sem estresse). Foram utilizadas 4 repetições com 50 sementes cada. As variáveis de germinação, crescimento de plântulas e vigor foram calculadas por meio das funções Germcalc e PlantCalc (Silva et al., 2018) do *software* R (R Development Core, 2015). Os dados foram submetidos a testes de normalidade e à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi aplicado o teste de Dunnett para comparação com o controle. Para essas análise utilizou-se o *software* R. (R Development Core, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

A germinação das sementes de *B. juncea* foi negativamente influenciada pelo aumento da concentração de Pb (Figura 1). A equação de melhor ajuste foi a linear, na qual a concentração 3 mM reduziu a germinação em torno de 50 % (P50). Essa concentração de Pb (3 mM) foi definida para ser utilizada no experimento 2.

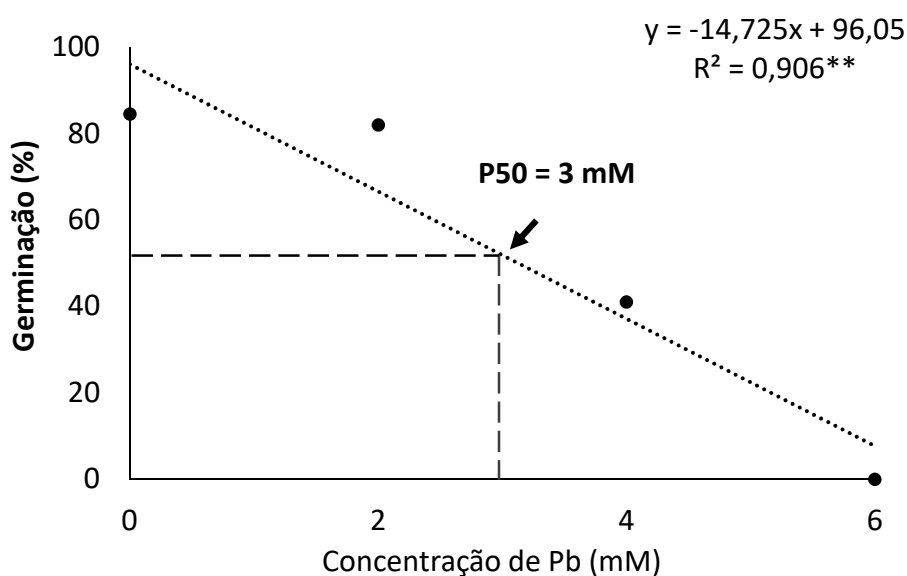


Figura 1. Germinação de sementes de *B. juncea* em substrato umedecido com soluções de acetato de chumbo nas concentrações 0, 2, 4 e 6 mM.

O chumbo aplicado na concentração de 2 mM não provocou redução significativa na germinação (Tabela 1) em relação à germinação em substrato umedecido com água (controle). No entanto, com o aumento da concentração para 4 mM o percentual de germinação diminuiu significativamente de 88 % (controle) para 41%. A germinação foi totalmente inibida com a utilização de Pb na concentração de 6 mM.

A tolerância das sementes ao Pb na semente pode variar de acordo com as diferentes espécies. Em sementes de rúcula, a germinação não foi significativamente influenciada por concentrações de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ até 5,5 mM (Zhi et al., 2015). Já em sementes de lentilha, a germinação decresceu de 98 para 33 % após o tratamento com $\text{Pb}(\text{Cl}_2)$ na concentração 4,5 mM (Cokkizgin e Cokkizgin, 2010). Em sementes de trigo, a germinação foi reduzida pelo Pb 3 mM de 98 % para 71 %, comparado ao controle (Lamhamdi et al., 2011).

Em sementes de alface, a germinação foi drasticamente reduzida apenas em concentrações de $Pb(NO_3)_2$ acima de 4 mM, o que pode ser explicado pela presença de pericarpo que atua dificultando a entrada do metal no interior da semente. No entanto, o aparecimento de plântulas anormais foi evidenciado a partir da concentração de 1 mM, com redução significativa do sistema radicular (Pereira et al., 2013 b)

O chumbo na concentração 4 mM reduziu significativamente os valores de PCG e IVG em relação ao controle (Tabela 1). No entanto, houve aumento no TMG a medida que aumentou a concentração de Pb até 4 mM, proporcionando atraso de aproximadamente um dia na germinação, comparado ao controle. De forma contrária ao percentual de germinação, menores valores de TMG expressam positivamente a germinação em menor tempo. Assim, o aumento na concentração de chumbo causou a redução da velocidade da germinação que refletiu no maior tempo para ocorrência desse processo.

De forma similar em sementes de lentilha, o $PbCl$ reduziu a velocidade de germinação. Houve ainda aumento do TMG com o aumento nas concentrações de Pb (Cokkizgin e Cokkizgin, 2010).

Tabela 1. Efeito das concentrações de Pb na Germinação (G), Primeira Contagem da Germinação (PCG), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Protrusão Radicular (PR) e Índice de Velocidade de Protrusão Radicular (IVPR) em sementes de *B. juncea*.

Concentração Pb	G (%)	PCG(%)	TMG (Dias)	IVG	PR (%)	IVPR
0 mM	88 a	84 a	3,92 b	12,15 a	92 a	38,62 a
2 mM	87 a	83 a	4,33 ab	11,16 a	89 a	18,23 b
4 mM	41 b	28 b	4,90 a	4,43 b	96 a	21,10 b
6 mM	0 c	0 c	0 c	0 c	84 a	5,98 c
Média	54	48	3,28	6,93	91	20,98
CV (%)	10,36	13,96	11,47	15,49	6,24	12,66

Letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar da germinação ter sido negativamente afetada pelo Pb, na protrusão radicular não foi observado decréscimo significativo com o aumento das concentrações de Pb. No entanto, a velocidade de ocorrência da protrusão radicular foi sensivelmente afetada nas concentrações a partir de 2 mM.

É provável que o efeito do chumbo na germinação varie conforme as estruturas da semente, principalmente o envoltório. Em sementes de *Brassica napus*, o tegumento se mostrou permeável aos íons de Pb. No entanto, o grau de permeabilidade ao Pb mudou

durante a embebição. No final do período de embebição, quando a absorção de água já era relativamente baixa, o tegumento das sementes se tornou mais permeável ao Pb. Dessa forma, maior quantidade de Pb atingiu a semente e causou inibição acentuada da sua germinação (Wierzbicka e Obidzińska, 1998). Sugere-se que durante a germinação, o chumbo atue de forma similar nas sementes de *B. juncea*. Esse metal provocou atraso no processo da emissão da radícula das sementes, mas não houve influência no percentual final da protrusão radicular.

O crescimento das plântulas de *B. juncea* foi negativamente influenciado com o aumento das concentrações de chumbo, sendo o comprimento das raízes mais afetado que o da parte aérea (Tabela 2). Na concentração 2 mM houve redução de 0,3 e 1,75 cm do comprimento da parte aérea e raiz, respectivamente, em relação ao controle. Em plântulas de *Sinapis arvensis* L. (mostarda-dos-campos), o chumbo causou maior inibição do crescimento radicular comparado ao da parte aérea, reduzindo significativamente esses parâmetros nas concentrações superiores a 0,3 mM, comparado ao controle (Heidari e Sarani, 2015).

O alongamento das raízes é o indicador mais sensível da ação inibitória do chumbo. A absorção de Pb ocorre rapidamente pelas raízes e quanto mais alta a concentração, maior é a inibição. Sua ação é principalmente no alongamento celular, mas pode ser acompanhado também pelo decréscimo da atividade mitótica. Acredita-se que o chumbo se distribui de forma desigual nas raízes, sendo encontrado em maior quantidade nos tecidos meristemático e parenquimáticos do cortex primário. No entanto, encontra-se menor quantidade no centro quiescente e na coifa da raiz (Wierzbicka, 1988).

Tabela 2. Efeito do Pb nos parâmetros de crescimento de plântulas, Índice de Tolerância e Índice de Vigor de *B. juncea*

Concentração de Pb	Comprimento (cm.plântula ⁻¹)		Índice de Tolerância		Índice de Vigor
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	
0 mM	1,01 a	2,64 a	1,00 a	1,00 a	338,95 a
2 mM	0,71 ab	0,89 b	0,81 b	0,34 b	284,90 ab
4 mM	0,65 b	0,40 bc	0,64 c	0,16 c	273,40 b
6 mM	0,02 c	0,01 c	0,02 d	0,01 c	11,85 c
Média	0,60	0,98	0,62	0,38	227,27
CV (%)	26,07	24,73	9,89	21,76	11,39

Letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A tolerância das plântulas de *B. juncea* ao chumbo diminuiu com o aumento da concentração desse metal. A tolerância foi maior na parte aérea (0,81) do que nas raízes (0,34) das plântulas na concentração 2 mM. Nessa concentração, houve decréscimo do crescimento da parte aérea e das raízes em 19 % e 66 %, respectivamente, comparado ao tratamento controle. De acordo com Lux et al. (2004), as plantas que apresentam índice de tolerância acima de 0,60 são consideradas altamente tolerantes ao metal pesado, de 0,60 a 0,35 são de média tolerância e menor que 0,35, sensitivas.

Houve redução no índice de vigor com o aumento da concentração de chumbo, com maior índice no tratamento controle (338,95) e menor na concentração de Pb 6 mM (11,85). Observa-se que não houve diferença significativa entre o controle e a concentração de 2 mM quanto ao índice de vigor, mas na concentração de 4 mM já se observa redução significativa em relação ao controle. Resultado similar foi encontrado por Cokkizgin e Cokkizgin (2010) em sementes de lentilha, em que a concentração de Pb e o índice de vigor estavam inversamente relacionados.

Experimento 2

Na figura 2 estão os valores do grau de umidade obtidos a cada pesagem após cada período de embebição das sementes *B. juncea*. O teor de água inicial era de 6,5%. A absorção de água foi mais rápida nas quatro primeiras horas de embebição, em que as sementes se encontravam na fase I de embebição de acordo com o padrão trifásico de absorção de água pelas semente proposto por Bewley et al. (2013). Segundo este padrão, a fase I é caracterizada pela rápida absorção de água pela semente devido a diferença acentuada entre o potencial hídrico da semente e do substrato úmido, ou seja, ao baixo potencial hídrico da semente seca. Nesta fase, ocorre reativação do metabolismo da semente. A fase I é seguida por uma fase estacionária (Fase II), onde ocorrem os processos metabólicos pré-germinativos, especialmente digestão de reservas. Ao entrar na fase II, ocorre a estabilização da absorção de água, resultando na síntese de enzimas e do início de degradação e mobilização das reservas (Marcos-Filho, 2015). Observa-se pela Figura 1 que a Fase II ocorreu entre 4 e 24 horas. A partir deste período nota-se o aumento na absorção de água concomitante à protrusão radicular iniciando-se a fase III.

Assim, a emissão da radícula das sementes de *B. juncea* começou a partir de 24 horas após o início do processo de embebição, quando o grau de umidade das sementes era em torno de 43 %. Conforme os resultados obtidos com a curva de embebição, foi

estabelecido o tempo de 8 horas, quando as sementes apresentaram cerca de 39 % de umidade, como suficiente para promover a ativação de eventos metabólicos pré-germinativos sem haver o risco de ocorrer protrusão da radícula, mesmo das sementes com germinação mais rápida. Este período foi considerado adequado para os tratamentos de pré-embebição das sementes em água e nas soluções de EBL.

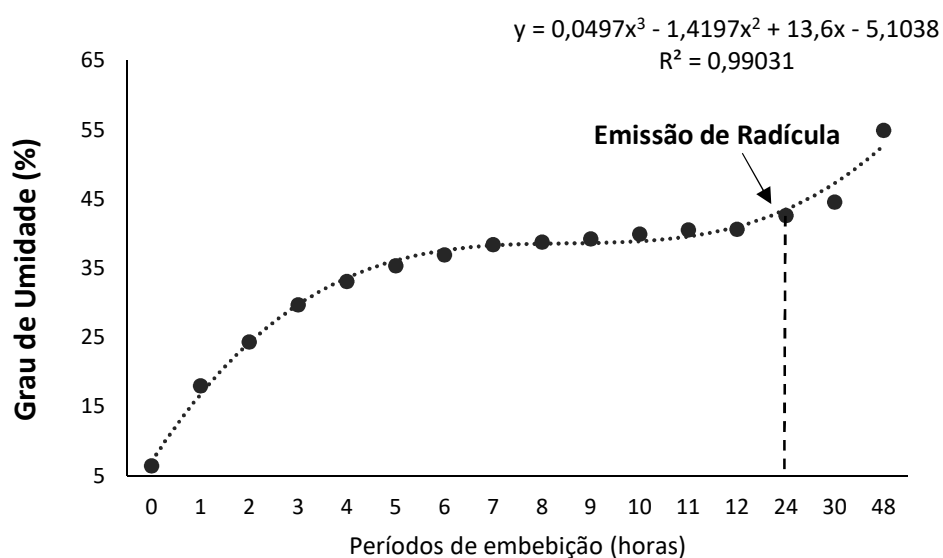


Figura 2. Grau de umidade (%) de sementes de *B. juncea* após diferentes períodos de embebição em água.

Houve efeito significativo do Pb e do EBL na germinação das sementes (Figura 3). Quando o EBL foi aplicado na pré-embebição das sementes, a germinação na concentração 10^{-8} M foi superior à obtida no tratamento EBL 0, sem a presença dos brassinosteróides. No entanto, nota-se que não houve diferença significativa entre as concentrações de EBL utilizadas. Ao se comparar com o controle (tratamento sem chumbo), não houve diferença entre este tratamento e os tratamentos EBL 10^{-8} M e EBL 10^{-6} M. Isso indica que o EBL nessas concentrações contribuiu para reversão do efeito do estresse provocado pelo Pb na germinação, já que os resultados foram estatisticamente iguais ao do controle.

Quando o EBL foi aplicado no papel do teste de germinação, utilizando soluções conjuntas com o Pb, a germinação foi maior nos tratamentos EBL 10^{-10} e 10^{-8} M comparado ao EBL 10^{-6} M que não diferiu significativamente do tratamento EBL 0 (Figura 3). Comparando com o controle, novamente a concentração de EBL 10^{-8} M apresentou germinação semelhante ao tratamento sem o Pb, como observado no

tratamento com pré-embebição. Além do tratamento EBL 10^{-8} M, o EBL 10^{-10} M também não diferiu do controle e, neste caso, o EBL 0 e EBL 10^{-6} M foram inferiores ao controle.

Ao avaliar as formas de aplicação do EBL, na pré-embebição das sementes e no papel do teste de germinação, as melhores doses para reverter o estresse causado pelo chumbo na germinação foram as mais concentradas (10^{-6} e 10^{-8} M) quando utilizadas na pré-embebição e as doses de 10^{-10} e 10^{-8} M no teste de germinação (Figura 3). Contudo, observa-se que para ambas as formas de aplicação o tratamento EBL 10^{-8} M foi benéfico se igualando ao controle.

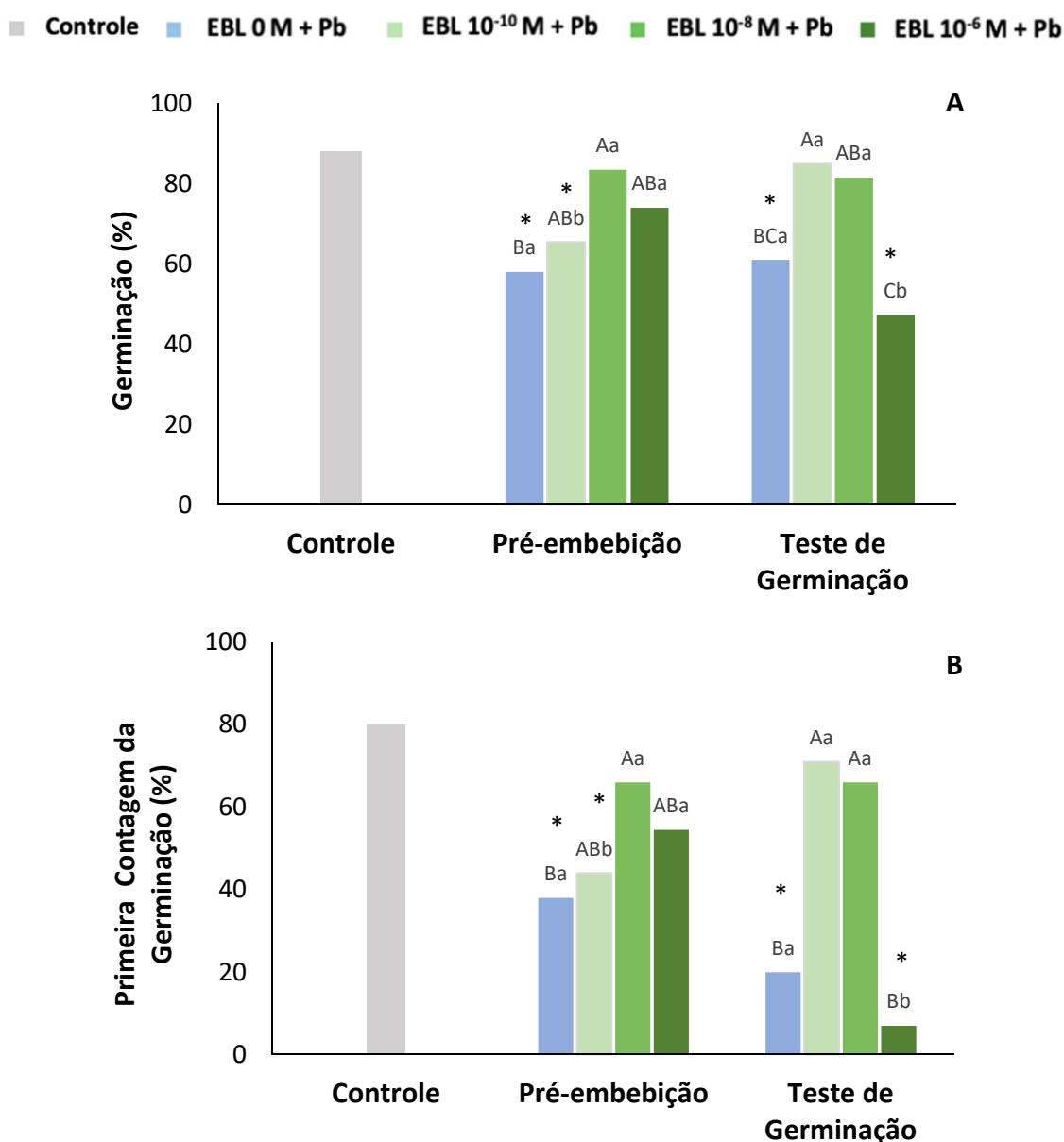


Figura 3. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na Germinação (A) e na Primeira Contagem da Germinação (B) de sementes de *B. juncea* sob estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. *Difere do controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Como os brassinosteróides são conhecidos por estimular a expansão e divisão celulares, sugere-se que estes atuem na germinação por estimular o desenvolvimento do embrião, sendo necessário para a ocorrência das divisões mitóticas pelo megásporo (Taiz et al., 2017). Sharma et al. (2008) relataram que o tratamento das sementes com 28-homobrassinolideo aumentou a germinação e o crescimento de plântulas de *B. juncea* sob estresse causado por níquel.

Em sementes de tomate, a pré-embebição em soluções de EBL aumentou a germinação nos tratamentos submetidos ao estresse causado por fenantrano, composto orgânico poluente. A concentração de EBL 10^{-9} M foi a mais eficiente para superação da toxicidade desse poluente na germinação, seguidas pelas concentrações 10^{-7} e 10^{-12} M (Ahammed et al., 2012). Efeito similar ocorreu na germinação de sementes de arroz na presença de Cromo, onde a pré-embebição em EBL 10^{-8} M reduziu o estresse em 5,4 % (Sharma et al., 2016)

A suplementação com 24-epibrassinolideo reduziu a toxicidade causada pelo alumínio em plântulas de feijão-guandu. A germinação das sementes tratadas com esse hormônio se aproximou do tratamento controle, sem estresse, indicando a capacidade dos brassinosteróides de superação do estresse (Madhan et al., 2014). Em sementes de milho submetidas a estresse causado por zinco e níquel, também houve aumento da germinação nos tratamentos com EBL, sendo as concentrações 10^{-8} e 10^{-9} M mais eficientes para reversão desse estresse (Lukatkin et al., 2013).

A primeira contagem da germinação é considerada um indicativo do vigor das sementes refletindo a velocidade da germinação. Ao avaliar a germinação no quinto dia, os resultados seguiram a mesma tendência da germinação (Figura 3). Quando o EBL foi aplicado na pré-embebição, novamente, a concentração 10^{-8} M foi superior as demais e as duas doses de EBL mais concentradas proporcionaram resultados de velocidade de germinação similares ao do controle. Já quando o EBL foi aplicado no teste de germinação, as concentrações 10^{-10} e 10^{-8} M se destacaram em relação as demais, igualando os resultados aos do tratamento controle.

A Figura 4 mostra o padrão adotado para distinção das plântulas normais e anormais. Nas plântulas normais, pode-se observar a raiz primária e a parte aérea com os cotilédones já visíveis. Nota-se que o maior problema relacionado à anormalidade das plântulas foi o sistema radicular atrofiado ou até inexistente.

Vale ressaltar que apesar do chumbo ter limitado consideravelmente o crescimento das plântulas, estas quando presentes as suas estruturas essenciais (parte aérea e raiz),

mesmo que em tamanho reduzido, mas com proporções adequadas, foram consideradas normais por apresentar potencial para formação de uma planta em condições de campo.

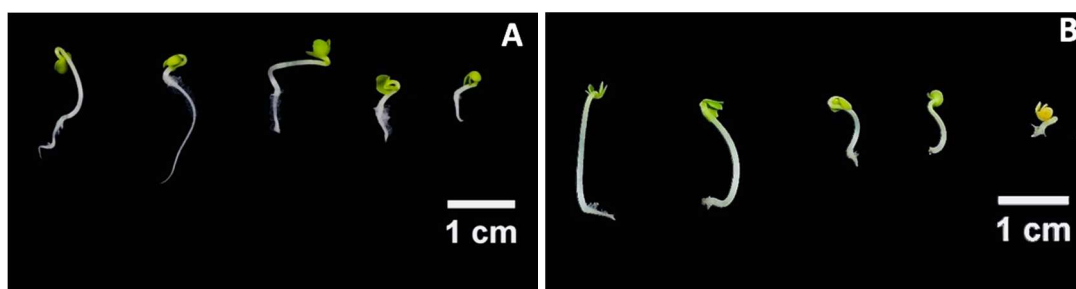


Figura 4. Padrão de plântulas normais (A) e anormais (B) obtidas no teste de germinação.

Segundo Pereira et al. (2013b), em plântulas anormais de alface causadas pela presença de Pb, as deformações nas raízes podem ser explicadas por anormalidades cromossômicas resultantes de efeitos aneugênicos. Além disso, a medida que aumentou a concentração de Pb, diminuiu o índice mitótico, o que implica na inibição da divisão celular na região meristemática das raízes. Em raízes de *Echinodorus grandiflorus*, sugere-se que acúmulo de Pb pode estar relacionado ao espessamento da endoderme e do córtex. Tal fato consiste em um mecanismo de defesa para impedir que esse metal iniba a atividade fotossintética nas folhas e reduza o crescimento das plantas (Ribeiro et al., 2015).

Ao avaliar o Índice de Velocidade de Germinação - IVG (Figura 5), não houve diferença significativa entre as concentrações de EBL quando este foi aplicado na pré-embebição das sementes. No entanto, na aplicação realizada no papel do teste de germinação, as concentrações de EBL 10^{-10} e 10^{-8} M se mostraram superiores a 10^{-6} M, que não diferiu do tratamento EBL 0. Comparando com o tratamento controle, em ambos os tipos de aplicação, a concentração EBL 10^{-8} M obteve resultados iguais estatisticamente ao tratamento sem o Pb.

Houve aumento significativo do TMG em todos os tratamentos com Pb (Figura 5). A aplicação do EBL na pré-embebição não houve diferença entre as concentrações. No entanto, com a sua aplicação no teste de germinação, os valores do TMG foram significativamente menores nas concentrações 10^{-10} e 10^{-8} M em relação às demais doses. Comparando-se as doses entre as formas de aplicação do EBL, somente na concentração 10^{-6} M o TMG foi maior quando o EBL foi aplicado no teste de germinação.

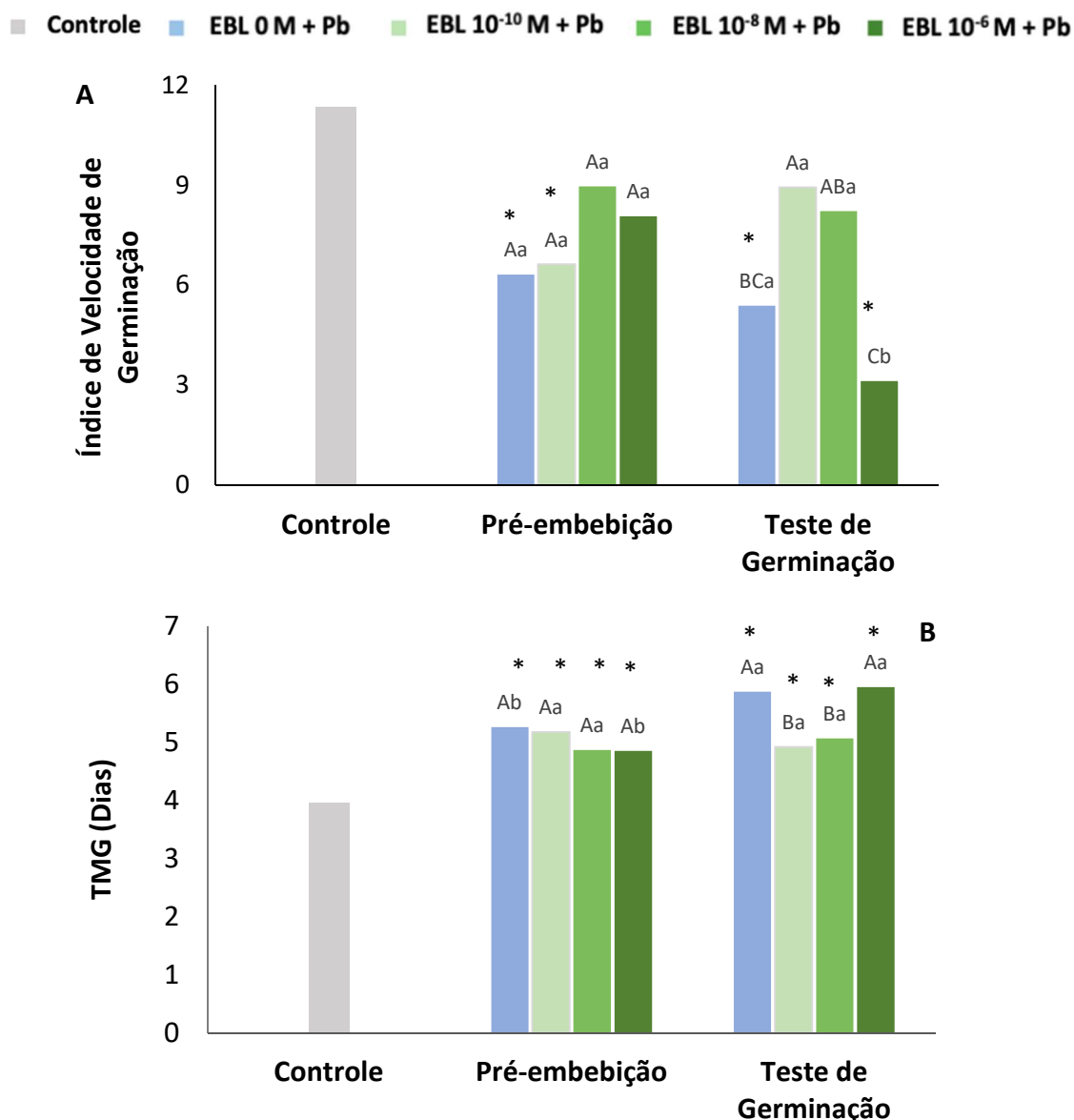


Figura 5. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Índice de Velocidade de Germinação (A) e no Tempo Médio de Germinação (B) de sementes de *B. juncea* sob estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Em relação ao percentual de protrusão radicular não houve interação significativa entre os dois fatores e não houve diferença entre as concentrações de EBL e formas de aplicação utilizadas. Também não houve diferença entre os tratamentos com EBL e o controle pelo teste de Dunnett (Figura 6). Já quanto à velocidade de protrusão radicular, apenas o tratamento EBL 10⁻⁶ M, quando aplicado no papel do teste de germinação, foi inferior aos demais. Em todos os tratamentos que envolveram a aplicação de chumbo, tanto com e sem EBL, a velocidade de protrusão radicular foi inferior ao controle.

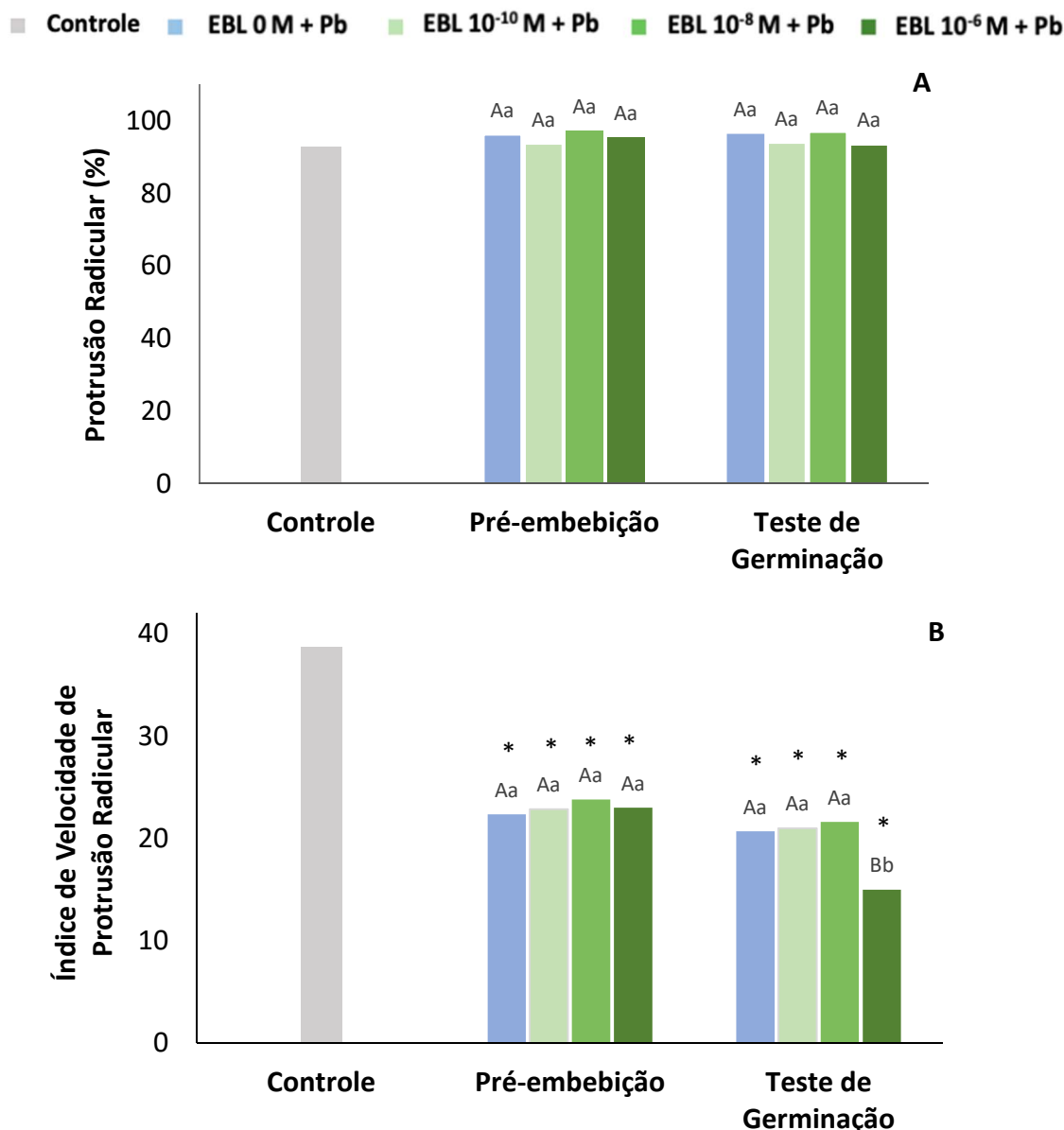


Figura 6. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Protrusão Radicular (A) e da Índice de Velocidade de Protrusão Radicular (B) de sementes de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Verifica-se que o chumbo não afetou o percentual de sementes que emitiram radícula, mas reduziu a velocidade de ocorrência desse processo. Assim, ao avaliar a protrusão radicular, o EBL não teve efeito significativo logo no início do processo de germinação. Sugere-se que nas primeiras horas de embebição a absorção de água pelas sementes do tratamento controle tenha sido mais rápida do que a embebição das sementes submetidas às soluções contendo EBL e Pb. Isto pode ter favorecido os processos de alongamento e divisão celular responsáveis pela protrusão da radícula que foi mais rápido no tratamento controle quando comparado aos demais tratamentos. Após certo tempo de

embebição, este efeito já não foi tão significativo de modo que a % de protrusão radicular se igualou em todos os tratamentos.

Wierzbicka e Obidzińska (1998) sugerem que o envoltório das sementes seja seletivamente permeável aos íons de chumbo e não penetrem internamente com a mesma velocidade que a água. No entanto, esse grau de permeabilidade tende a mudar durante o processo de embebição.

Destaca-se que, embora não tenha havido diferença quanto à % de protrusão radicular, com o decorrer da germinação alguns tratamentos com EBL não foram eficientes para reverter o efeito do estresse causado pelo Pb, originando plântulas com radículas atrofiadas como pode ser observado nas plântulas anormais da Figura 4. Ou seja, a porcentagem de protrusão radicular foi similar ao controle, mas nem todas as radículas se desenvolveram satisfatoriamente em presença de Pb. Pela Figura 3, observa-se que o tratamento EBL 10^{-8} M, nas duas formas de aplicação, em geral, foi mais eficiente que os demais para não reduzir a germinação em relação ao controle.

Em *Arabidopsis*, na presença de determinadas concentrações de Pb, a radícula das sementes se desprende da testa, mas em seguida houve a interrupção do crescimento do embrião. No entanto, a inibição do crescimento das plântulas ocorreu em baixas concentrações de chumbo. O mesmo não aconteceu para a emissão da radícula que foi observada mesmo em elevadas concentrações (~100 mM). Tal fato indica que o tegumento pode influenciar na permeabilidade seletiva dos íons de chumbo, sendo os embriões isolados mais sensíveis ao metal pesado do que as sementes intactas (Li et al., 2005).

Não houve diferenças entre o comprimento da parte aérea das plântulas quando o EBL foi aplicado em pré-embebição (Figura 7). Somente com a concentração 10^{-8} M foi possível igualar estatisticamente os valores ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. De forma similar, quando o EBL foi aplicado no papel do teste de germinação, novamente a concentração 10^{-8} M foi a única que proporcionou a superação dos efeitos causados pelo Pb, sendo seus resultados equivalentes ao do controle. Esta concentração de EBL foi superior às demais aplicadas. Estes resultados concordam com os obtidos no teste de germinação (Figura 3), onde o tratamento EBL 10^{-8} M, independente da forma de aplicação, foi similar ao controle, destacando-se entre os tratamentos mais eficientes para reverter o efeito do estresse por chumbo.

O EBL na concentração 10^{-8} M aplicado na pré-embebição de sementes de *Brassica juncea* reduziu consideravelmente o efeito inibitório do cromo no desenvolvimento das

plantas, principalmente no comprimento da parte aérea (Arora et al., 2010). Em rabanete, houve declínio significativo na altura da planta sob estresse causado por 2,5 mM de Pb. No entanto, o impacto do estresse foi revertido nos tratamentos que tiveram a pré-embebição das sementes em brassinosteróides, possibilitando crescimento ainda maior, comparado ao tratamento sem o Pb (Anuradha e Rao, 2011).

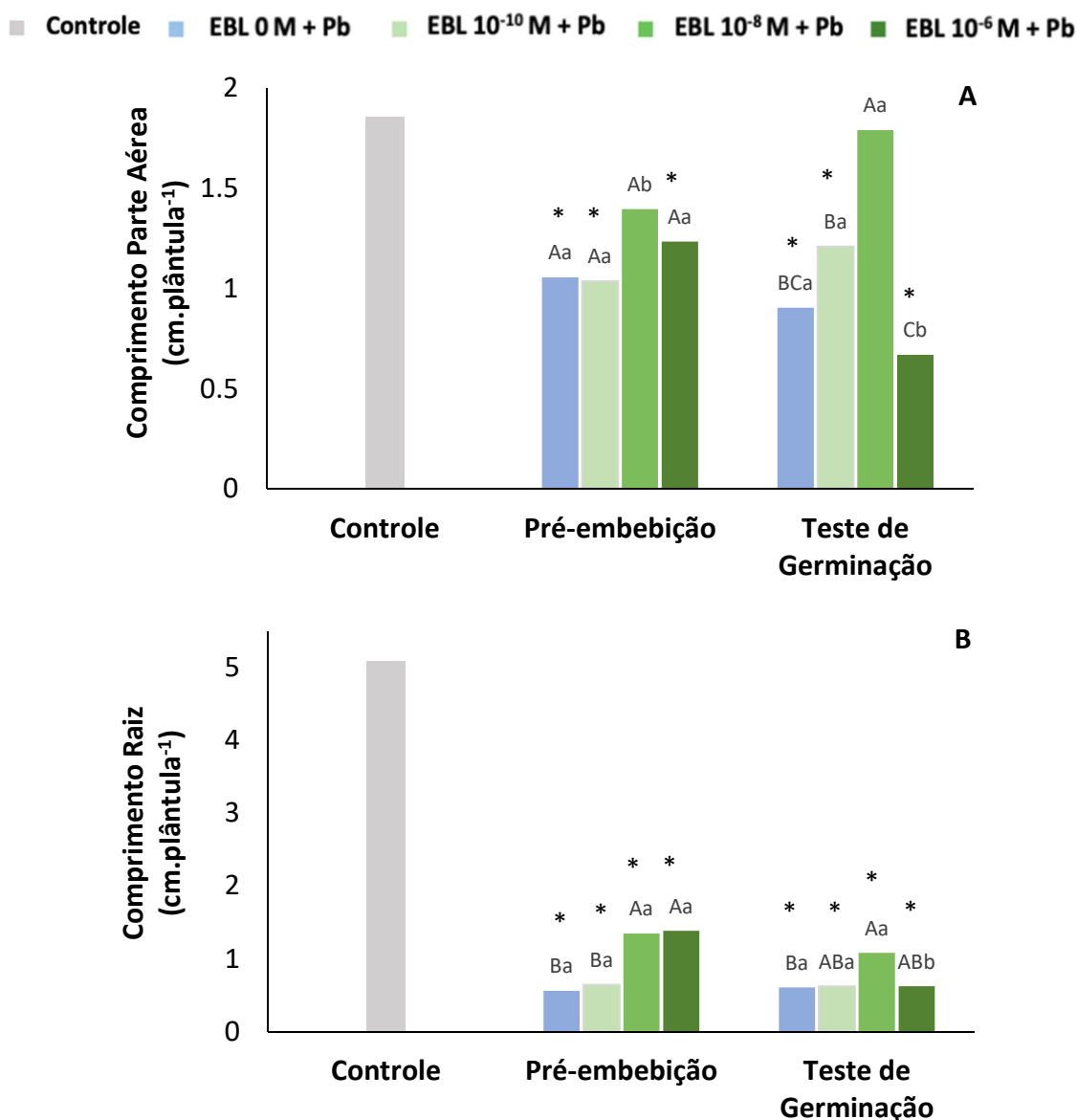


Figura 7. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Comprimento da Parte Aérea (A) e da Raiz (B) de plântulas de *B. juncea* sob estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

O comprimento das raízes das plântulas foi significativamente reduzido pelo Pb e o tratamento com EBL não foi eficiente para reverter completamente o efeito desse estresse, comparado ao controle (Figura 7). Quando o EBL foi aplicado na pré-embebição

de sementes, as concentrações de EBL 10^{-8} e 10^{-6} M favoreceram o crescimento da raiz em 141 % e 146%, respectivamente, comparadas ao EBL 0. Já quando o EBL foi aplicado no papel do teste de germinação, apenas a concentração 10^{-8} M se mostrou superior ao tratamento sem o EBL, aumentando o crescimento da raiz em 77 %.

O crescimento da parte aérea e da raiz de plantas de *B. juncea* foram significativamente afetados pelos tratamentos com cobre e homobrassinolideo (HBL). Houve redução total do efeito tóxico da menor concentração de Cu independente da concentração de HBL utilizada. O HBL 10^{-6} M aumentou o crescimento da parte aérea e da raiz em 58 e 109 %, respectivamente, quando comparado ao tratamento sem o HBL (Fariduddin et al., 2009). Em sementes de arroz, o pré-tratamento com EBL favoreceu o crescimento das plântulas e reduziu os efeitos tóxicos do cromo na parte aérea e na raiz em 51 e 24 %, respectivamente (Sharma et al., 2016).

Observa-se que o chumbo visivelmente reduziu a germinação (Figura 8) e o crescimento das plântulas (Figura 9) em relação ao tratamento controle sem esse metal. Resultados semelhantes foram obtidos por Kuriakose e Prasad (2008) que observaram inibição do crescimento da radícula e coleóptilo em plântulas sob estresse por cádmio. Segundo os autores, o metal pesado parece causar inibição da hidrólise de carboidratos e da translocação dos açúcares hidrolisados, resultando em redução do crescimento das plântulas.

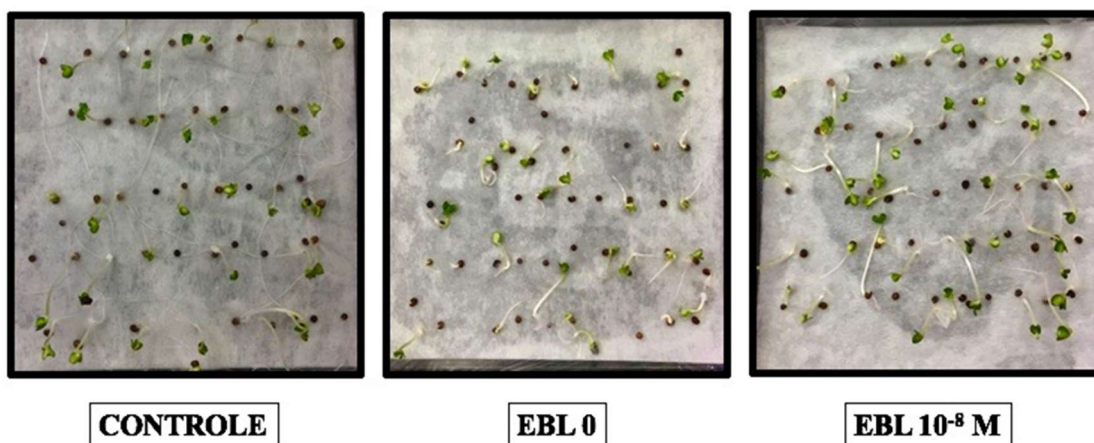


Figura 8. Teste de germinação de sementes de *B. juncea* em papel umedecido com água (controle), na solução de Pb 3 mM e na solução conjunta de EBL 10^{-8} M e Pb 3 mM.



Figura 9. Aspecto das plântulas de *B. juncea* obtidas no teste de germinação em água (controle) e em Pb 3 mM após a pré-embebição das sementes em água (EBL 0) e em solução de EBL 10^{-8} M.

Acredita-se que o chumbo é basicamente assimilado pelas raízes e pouco é absorvido pelas folhas. Nas raízes, em grande parte, se move apoplaticamente e acumula na endoderme que atua como barreira para o seu transporte da raiz para a parte aérea. Apesar do seu acúmulo ser maior nas raízes, parte pode ser translocada para a parte aérea (Sharma e Dubey, 2005).

No entanto, no presente estudo após a aplicação do EBL 10^{-8} M, nota-se a reversão desse estresse, principalmente no comprimento da parte aérea. Sabe-se que os brassinosteróides são necessários para o crescimento da parte aérea assim como da raiz. No alongamento celular, os BRs agem isoladamente e interagem com outros hormônios vegetais, demonstrando efeito aditivo com a giberelina e sinérgico com a auxina no alongamento do caule (Hayat e Ahmad, 2011).

Pela Figura 10, observa-se que o índice de vigor foi maior nos tratamentos com EBL 10^{-8} e 10^{-6} M aplicados em pré-embebição. Já quando o EBL foi aplicado no teste de germinação, o maior índice foi obtido na concentração 10^{-8} M. Contudo, independente da forma de aplicação do EBL, houve redução do Índice de Vigor para todos os tratamentos com Pb quando comparados com o controle, o que também foi observado ao se avaliar o comprimento de raiz (Figura 7B) e o índice de velocidade de protrusão radicular (Figura 6B).

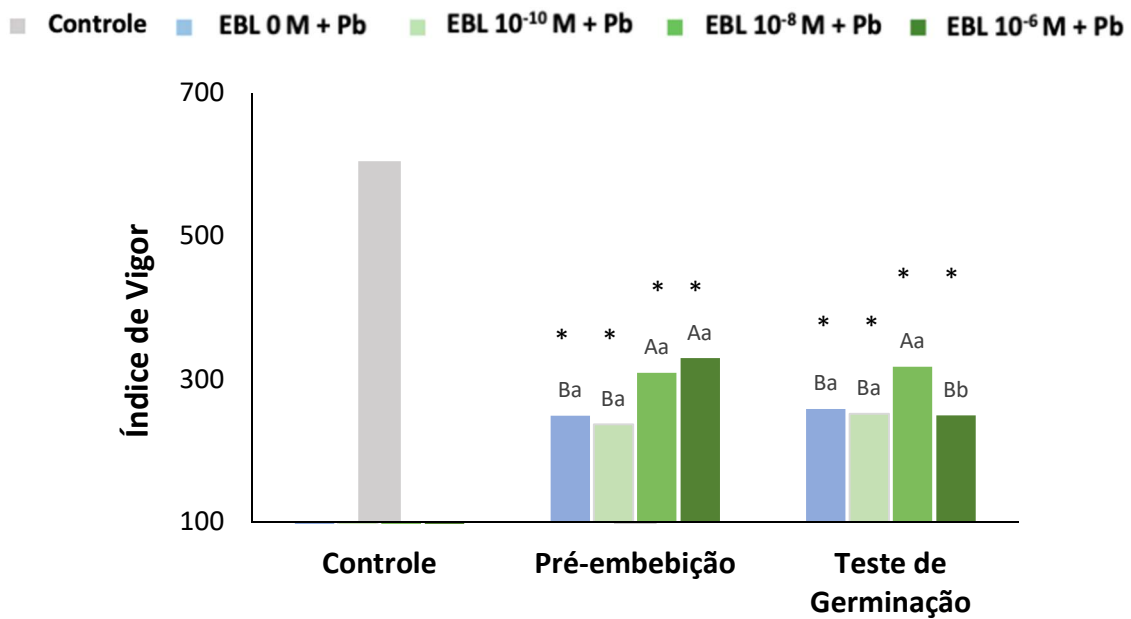


Figura 10. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Índice de Vigor das plântulas de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

O índice de tolerância é tido como bom indicador da sensibilidade ao chumbo, sendo parâmetro relevante a ser considerado na fitorremediação por representar a relação entre o desenvolvimento da plântula sob estresse e o seu desenvolvimento sem estresse (Wierzbicka, 1999). Recentes estudos têm utilizado esse índice para a caracterização da tolerância aos metais pesados em plantas, o qual relaciona o crescimento no metal pesado e no controle (Malar et al., 2014; Rasafi et al., 2016; Wang et al., 2014).

Nesse estudo, o índice de tolerância da parte aérea das plântulas não foi influenciado pelas diferentes concentrações de EBL aplicadas na pré-embebição (Figura 11A). Quando o EBL foi aplicado no teste de germinação, a concentração 10⁻⁸ M promoveu maior tolerância ao Pb, comparado às demais concentrações. Da mesma forma, somente o EBL 10⁻⁸ M aplicado no teste de germinação possibilitou resultados iguais estatisticamente ao tratamento controle. Os demais tratamentos foram inferiores ao controle. O tratamento com EBL 10⁻⁸ M também teve destaque na recuperação do estresse causado por Pb conforme resultados do teste de germinação (Figura 3A) e comprimento da parte aérea de plântulas (Figura 7A).

Para o índice de tolerância da raiz das plântulas (Figura 11B) as concentrações de EBL 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M quando aplicadas na pré-embebição de sementes foi superior as demais.

Já a aplicação do EBL no teste de germinação, a concentração 10^{-8} M foi a única superior ao EBL 0. No entanto, todos os tratamentos com EBL foram estatisticamente inferiores ao controle, sem o Pb.

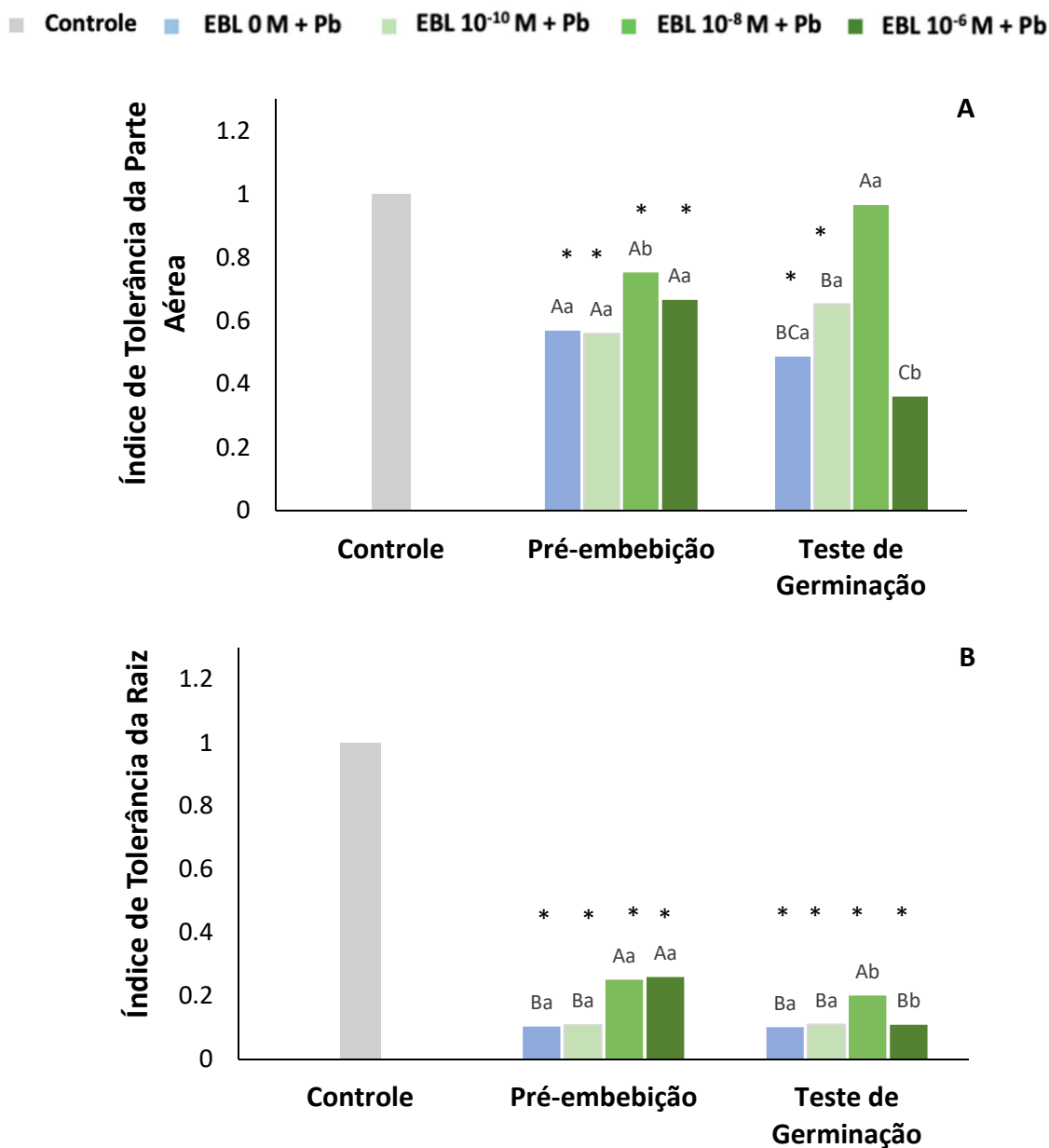


Figura 11. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no Índice de Tolerância da Parte Aérea (A) e da Raiz (B) das plântulas de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb.

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embrição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embrição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

O mecanismo de defesa das sementes (Figuras 12 e 13) e plântulas (Figuras 14 e 15) de *B. juncea* submetidas ao estresse por Pb foi avaliado por meio da atividade de enzimas antioxidantes. Observa-se que a atividade das enzimas CAT (Figura 12A) e APX

(Figura 12B) nas sementes não houve interação significativa entre os fatores e não houve diferenças entre as concentrações e formas de aplicação do EBL utilizados.

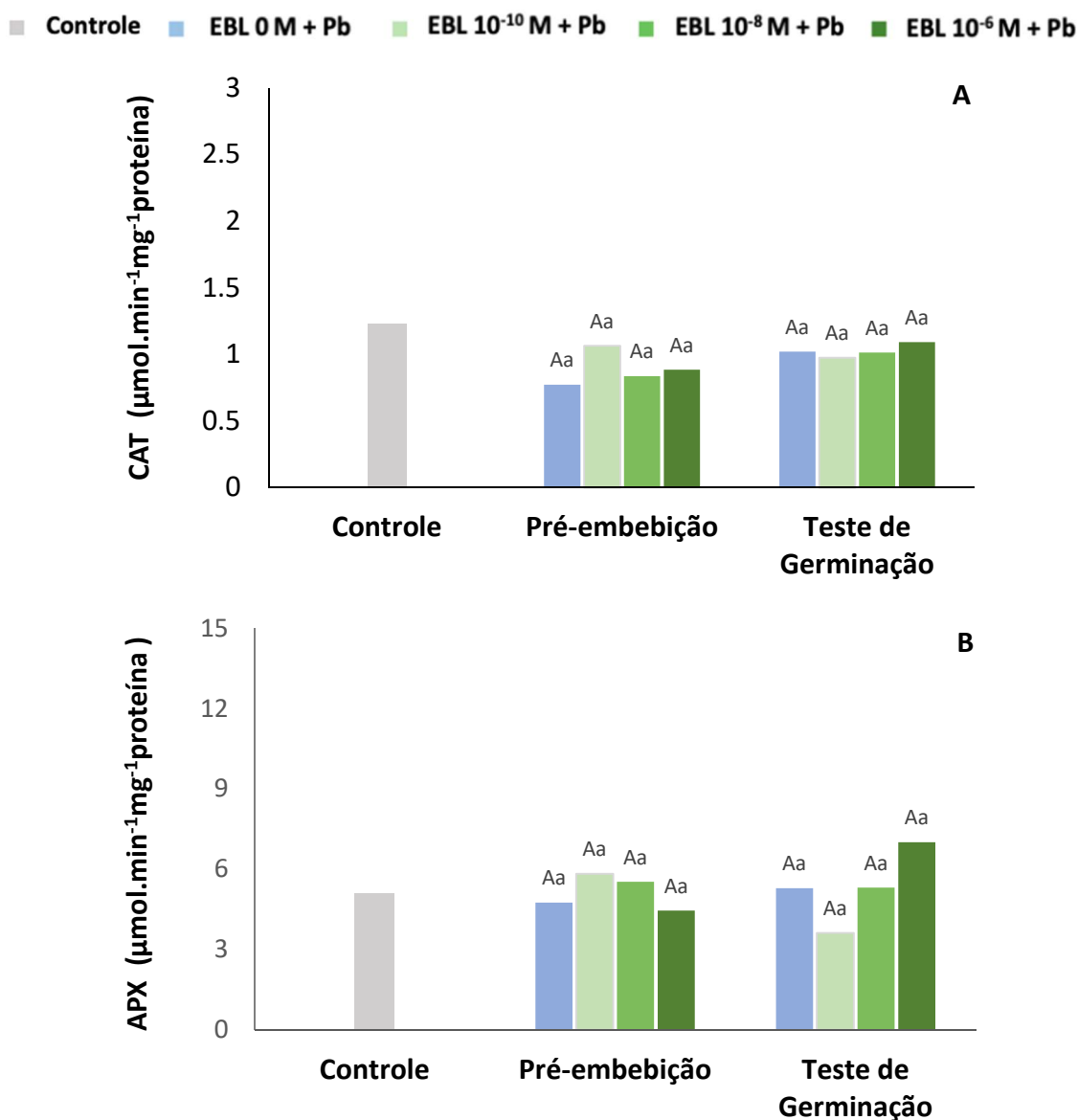


Figura 12. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas CAT (A) e APX (B) em sementes de *B. juncea* sob estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Não houve interação significativa entre os fatores e não houve efeito significativo entre as formas de aplicação do EBL na atividade da enzima POX determinada nas sementes de *B. juncea* (Figura 13A). No entanto, houve efeito entre as concentrações de EBL utilizadas, no qual foi observada maior atividade dessa enzima na concentração 10⁻⁸ M em relação ao ao tratamento sem EBL. Todos os tratamentos com a presença do EBL (10⁻¹⁰, 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M) não diferiram do controle, enquanto a atividade da POX nas

sementes do tratamento sem EBL foi inferior ao controle. Tal fato demonstra o possível efeito do EBL na reversão do estresse causado pelo Pb, através do aumento da atividade da POX.

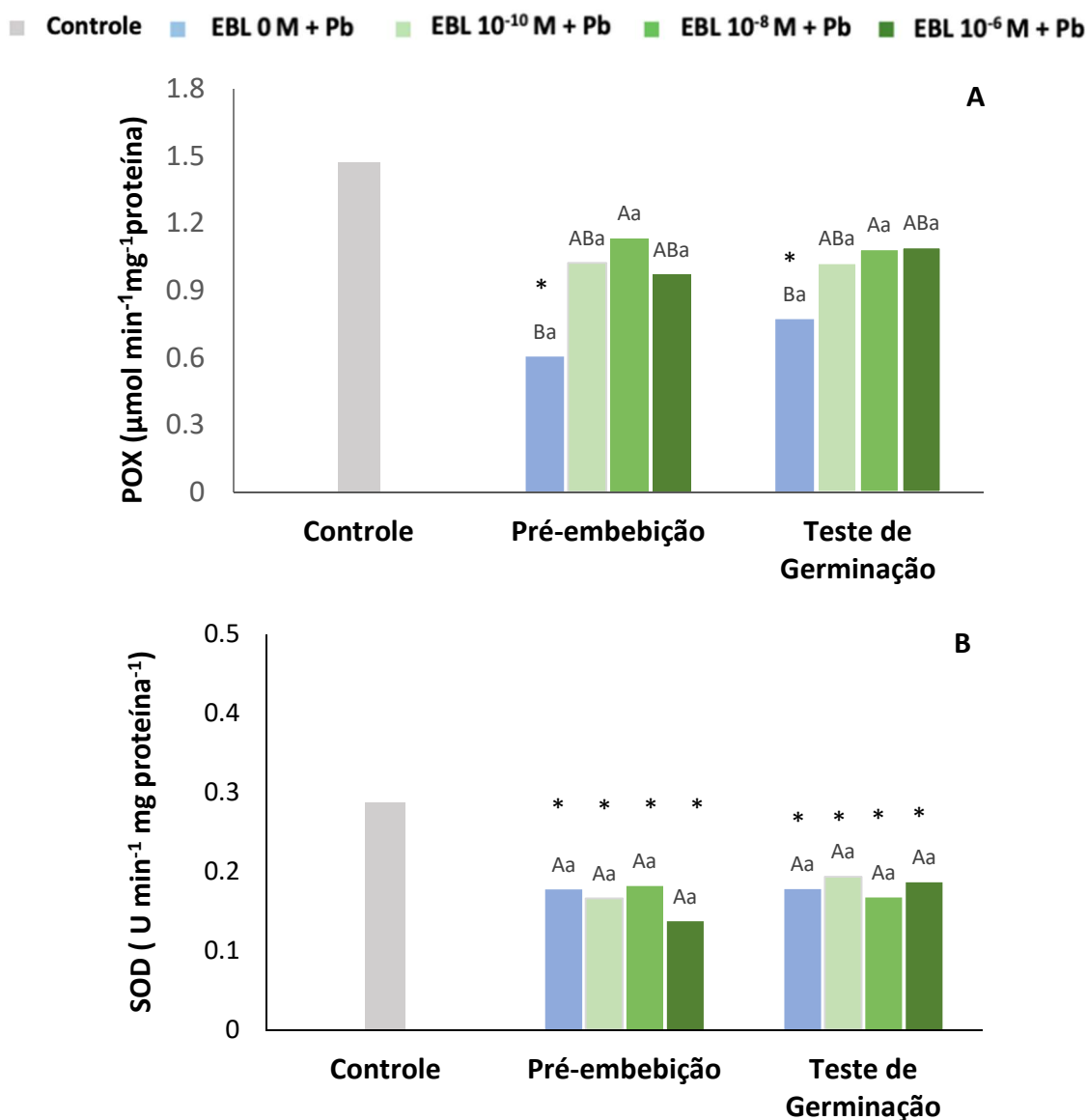


Figura 13. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas POX e SOD em sementes de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Observa-se que a aplicação do EBL não teve efeito significativo na atividade da SOD (Figura 13B), tendo em vista que não foi possível identificar interação significativa entre os fatores em estudo. Não houve ainda diferenças entre as duas formas de aplicação e entre as concentrações de EBL utilizadas. No entanto, observa-se que para todos os tratamentos com estresse causado pelo Pb houve redução da atividade dessa enzima nas

sementes, demonstrando, assim, o possível comprometimento do sistema de defesa causado por esse metal.

Sugere-se que a SOD atue na primeira linha de defesa, dismutando O_2^- em H_2O_2 e em seguida as enzimas CAT e APX atuam na destoxificação do H_2O_2 dentro da célula. No entanto, a APX e a CAT têm mecanismos de eliminação diferentes. A APX é responsável pela modulação fina da sinalização das EROs, enquanto que a CAT, que está exclusivamente nos peroxissomos. Essa enzima encarrega-se da remoção do excesso de EROs durante o estresse e é responsável pela quebra do peróxido em oxigênio e água (Mittler, 2002).

De forma similar a CAT, a POX também é responsável por quebrar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e juntamente com as demais enzimas protegem contra a formação das Espécies reativas de O_2 (ERO_2) (Madhan et al., 2014). As EROs podem afetar negativamente a germinação e o crescimento das plântulas devido a sua reação com ácidos nucleicos o que pode levar a modificações no código genético do embrião. Dessa forma, pode haver o comprometimento das proteínas de reserva e dos lipídios, que são essenciais para o desenvolvimento das plantas (Kranner e Colville, 2011).

Nas plântulas, a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX nos tratamentos com EBL em pré-embebição na concentração de 10^{-6} M foi superior ao tratamento EBL 0 (Figura 14 e 15), sendo que para a CAT acrescenta-se também o tratamento EBL 10^{-8} M como superior ao EBL 0 e EBL 10^{-10} M (Figura 14A). Assim, pode-se afirmar que o tratamento com EBL na concentração 10^{-6} M em pré-embebição contribuiu para aumentar a atividade de todas as enzimas antioxidativas avaliadas nas plântulas de *B. juncea*, permitindo superar os efeitos do estresse causado pela toxidez por Pb.

Em plântulas de arroz, a exposição aos íons de cromo diminuiu a atividade da SOD, comparada ao controle. No entanto, com o pré-tratamento das sementes em EBL, a atividade da SOD aumentou em 60% em relação às plântulas estressadas (Sharma et al., 2016). Ahammed et al. (2012) ao avaliarem plântulas de tomate submetidas ao estresse causado por fenantreno, um hidrocarboneto aromático contaminante ambiental, verificaram aumento no conteúdo de malonaldeído induzindo alta produção de EROs, provocando redução na atividade da SOD. Os autores sugerem que esta elevada concentração de EROs excedeu a capacidade de eliminação pela SOD.

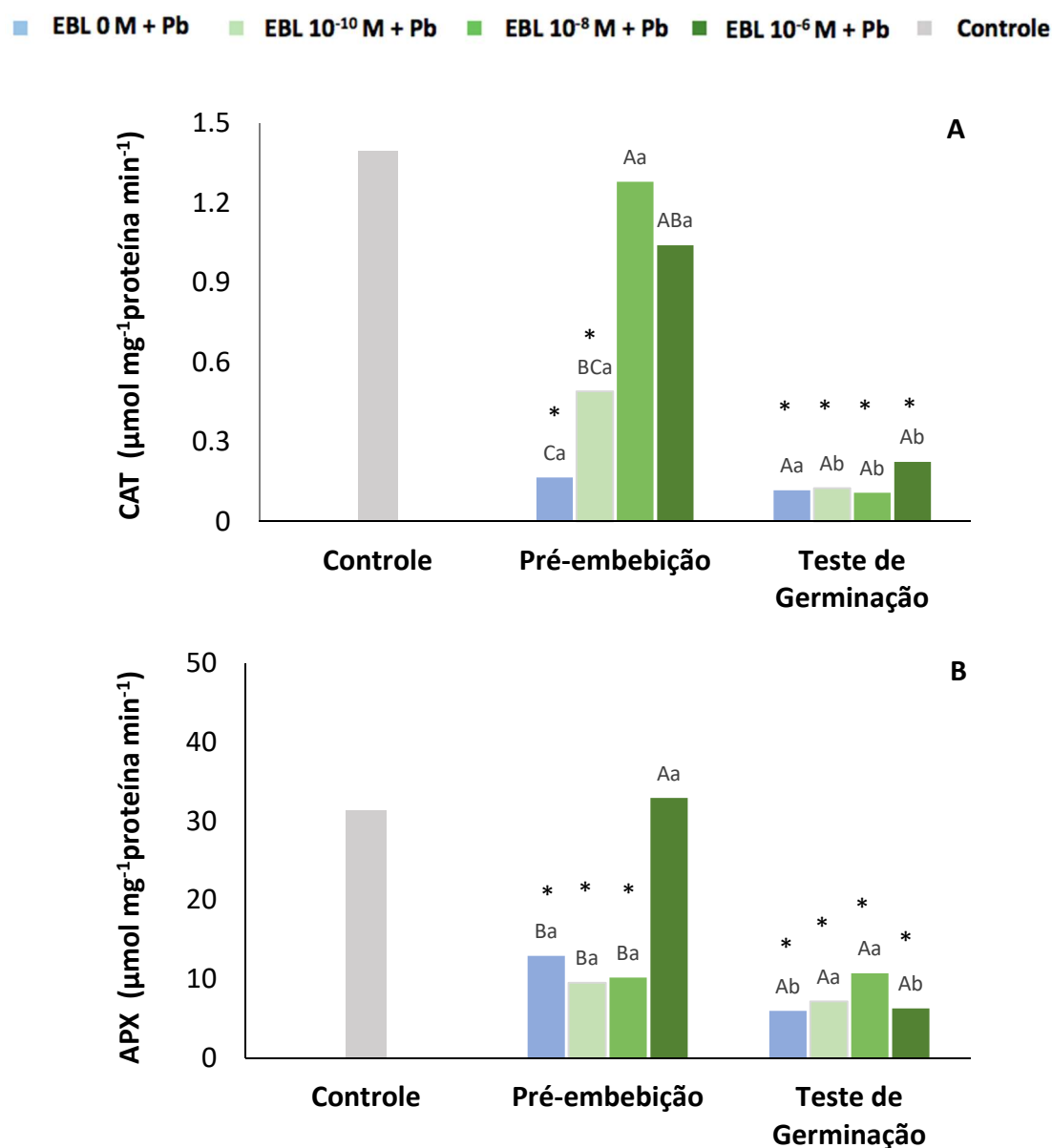


Figura 14. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas CAT e APX em plântulas de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb.

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Por outro lado, quando a aplicação do EBL foi realizada no teste de germinação, de modo geral, não foi possível detectar diferenças entre as concentrações utilizadas, observando-se atividade enzimática semelhante em todas elas, exceto para a enzima SOD em que a concentração EBL 10⁻⁸ M foi superior ao EBL 0 (Figura 14 e 15). Destaca-se também que todos os tratamentos com EBL aplicado no teste de germinação foram inferiores ao controle. Portanto, neste caso, o EBL não contribuiu para o aumento de atividade das enzimas do sistema antioxidante, as quais são relevantes para a superação do estresse por Pb como ocorreu quando a aplicação foi feita em pré-embebição.

Comparado-se as formas de aplicação do EBL (Figura 14 e 15), verificou-se menor atividade de todas as enzimas no tratamento EBL 10⁻⁶ M aplicado no teste de germinação quando comparado à sua aplicação em pré-embebição.

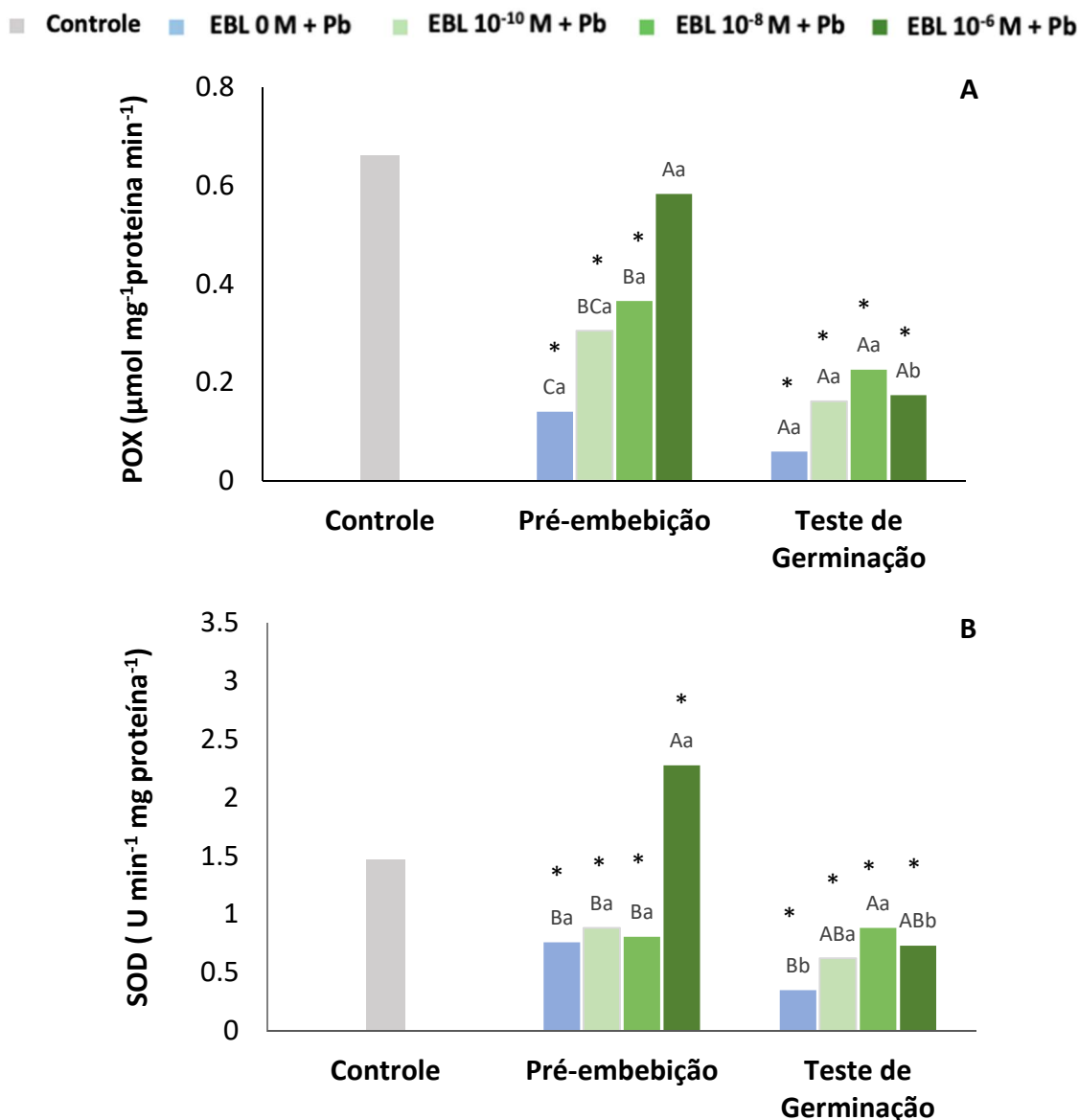


Figura 15. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL na atividade das enzimas POX e SOD em plântulas de *B. juncea* submetidas a estresse causado por Pb. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Em plântulas de rabanete, a toxicidade de Pb provocou redução na atividade da CAT. No entanto, com a aplicação dos BRs houve aumento na atividade dessa enzima (Anuradha e Rao, 2011). Em plantas de *Brassica juncea* estressadas com cobalto, a pré-embebição do EBL fortaleceu o sistema de defesa antioxidante por estimular a ação de

enzimas como a CAT, sendo a concentração de EBL 10^{-8} M a mais efetiva (Arora et al., 2012). A suplementação com EBL aumentou a atividade das enzimas antioxidantes CAT, POX, APX e SOD em plântulas de feijão guandu submetidas ao estresse causado por Alumínio (Madhan et al., 2014).

Assim, de modo geral, a utilização do EBL, especialmente na concentração de 10^{-6} M em pré-embebição, contribuiu para ativar o sistema de defesa antioxidante, uma vez que se verificou aumento da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX em relação aos demais tratamentos com EBL, equiparando-se ou superando aos valores obtidos para o controle. Estes resultados confirmam relatos de que os Brs podem atuar no aumento da produção de enzimas antioxidantes atenuando os efeitos do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Ahammed et al., 2012; Anusha et al., 2015; Fariduddin et al., 2009)

O aumento na produção de enzimas antioxidantes representa um mecanismo típico de defesa contra o acúmulo e toxidez de compostos tóxicos à célula. Embora muitos estudos mostrem as mudanças no sistema antioxidante em resposta ao estresse causado por metais pesados e à ação dos BRs, os mecanismos atuantes ainda têm sido pouco explorados (Seneviratne et al., 2017). O estresse causado por metais pesados pode levar a um aumento na produção de EROs, as quais interagem com diversas moléculas, gerando peroxidação e lipídios, desnaturação de proteínas, danos ao sistema de membranas celulares e mutações no DNA (Kumar et al., 2015).

Espera-se que com a exposição ao metal pesado o sistema antioxidante seja induzido. No entanto, nas sementes as alterações na atividade das enzimas antioxidantes (Figura 12 e 13) foram bem menos evidentes do que quando as avaliações foram feitas em plântulas (Figura 14 e 15). De fato, as mudanças no sistema antioxidante têm sido relatadas com maior frequência em plântulas após a germinação com efeitos negativos sobre o crescimento de plântulas na presença de metais pesados (Kranner e Colville, 2011). Destaca-se ainda que, nas plântulas houve efeito significativo das formas de aplicação e doses de EBL na atividade das enzimas, especialmente na concentração de 10^{-6} M em pré-embebição, na qual verificou-se maior atividade antioxidante não diferindo do controle (Figura 14 e 15).

É importante ressaltar que, também pelos resultados porcentagem e velocidade de germinação (Figura 3A e 3B) e comprimento de parte aérea de plântula (Figura 7A), os tratamentos com EBL em pré-embebição, especialmente nas doses de 10^{-8} e 10^{-6} M, foram efetivos para reverter o estresse causado pelo Pb, equiparando-se ao controle. Destaca-se

que também nestas concentrações houve aumento na atividade das enzimas antioxidantes, indicando a possível associação entre o EBL e a redução do estresse oxidativo.

Os BRs estão presentes em sementes e têm efeito sobre a germinação, o desenvolvimento inicial das plântulas e a tolerância a estresses (Divi e Krishna, 2010). O tratamento das sementes de *B. juncea* com 28-HBL provocou aumento na germinação e no crescimento das plântulas sob estresse por Níquel. Da mesma forma, houve o aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, APX e POX que estão associadas a proteção contra o estresse oxidativo causado pelo metal pesado (Sharma et al., 2008).

A aplicação exógena dos BRs pode estimular ao nível endógeno de BRs e, portanto, induzir maior tolerância a condições de estresse. É importante, assim, definir a concentração adequada para a aplicação exógena do BRs capaz de induzir tolerância a situações particulares de estresse ou reverter os seus efeitos. As alterações na atividade de enzimas antioxidantes têm sido um indicador eficiente em estudos sobre estresses abióticos em plantas e sementes (Nawaz et al., 2017; Rajewska et al., 2016; Shahzad et al., 2018; Vardhini e Anjum, 2015).

Observa-se com maior frequência a diminuição da atividade enzimática em concentrações mais altas ou períodos mais longos de exposição aos metais pesados. Tal fato indica que os efeitos tóxicos provavelmente superaram a capacidade antioxidante de defesa da planta. Contudo, existem situações que pode ocorrer o aumento da atividade dessas enzimas de defesa, induzido pela toxicidade do metal pesado. Dessa forma, os limites para essas determinações são tênues e dependem de vários fatores (Mourato et al., 2015).

O teor de Pb variou de forma diferente nas sementes e plântulas (Figura 16 A e B). Nas sementes (Figura 16 A), não houve diferença significativa no teor de Pb entre as concentrações de EBL independente da forma de aplicação. No entanto, quando a sua aplicação foi feita em pré-embebição a quantidade de Pb absorvida pelas sementes foi menor em relação à aplicação realizada no teste de germinação. Contudo, o teor de Pb nos tratamentos com EBL aplicado em pré-embebição não diferiu do controle, que é praticamente inexistente. Enquanto que o EBL ao ser aplicado no teste de germinação, verificou-se que as sementes apresentaram maior teor de Pb do que as do controle.

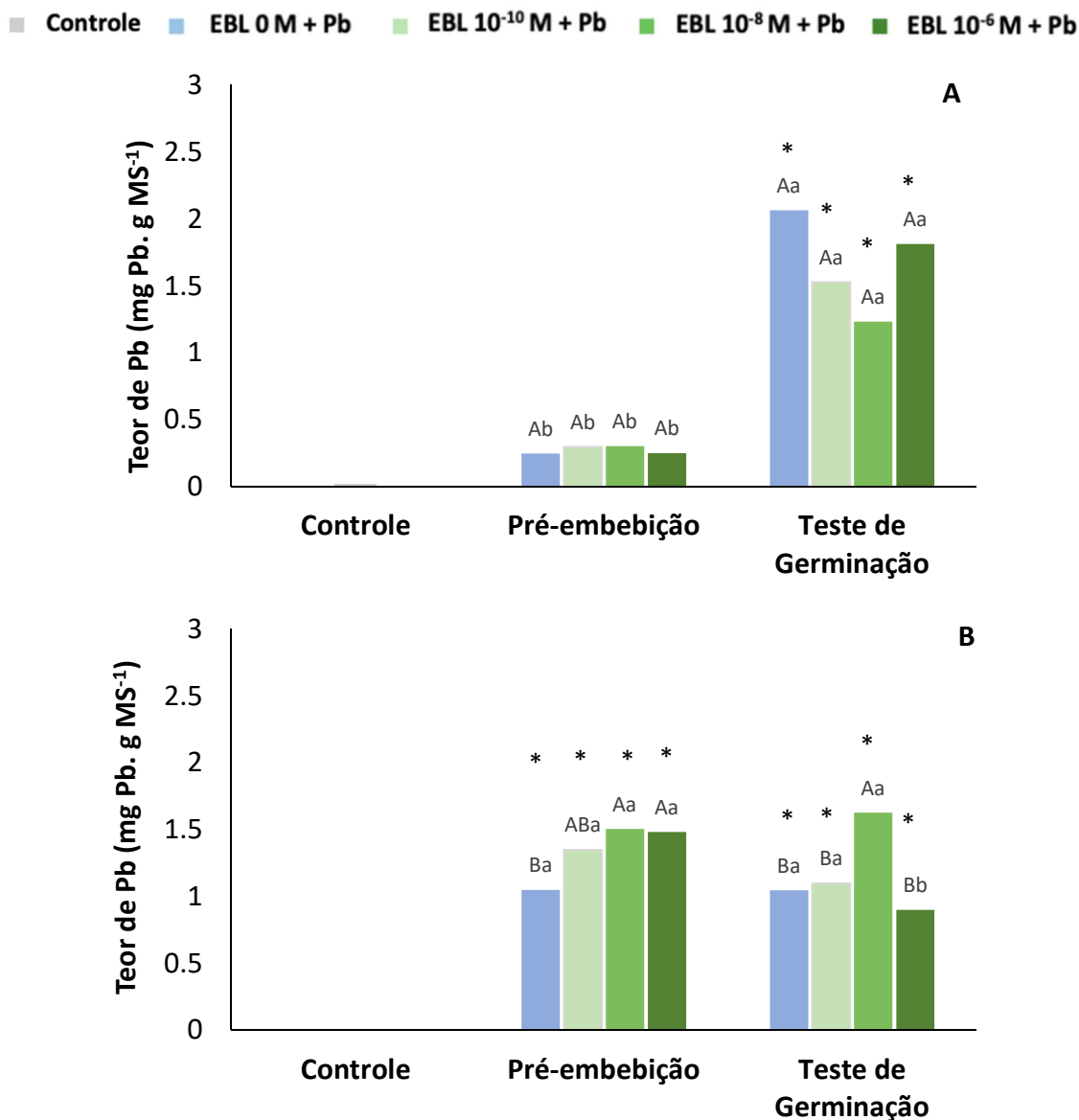


Figura 16. Efeito das concentrações e formas de aplicação do EBL no teor de Pb nas sementes (A) e plântulas (B) de *B. juncea* sob estresse causado por Pb.

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam doses de EBL dentro dos tratamentos de pré-embebição e teste de germinação. Letras minúsculas comparam doses de EBL aplicadas em pré-embebição e no teste de germinação. * Difere do controle pelo teste de Dunnett a 5%.

Nas plântulas (Figura 16 B), o teor de Pb quando o EBL foi aplicado na pré-embebição foi superior nas concentrações 10^{-8} e 10^{-6} M, comparado ao EBL 0. Novamente, a aplicação do EBL no teste de germinação na concentração 10^{-8} M foi superior ao tratamento sem EBL. Ao associar com os dados de germinação (Figura 3) e crescimento de plântulas (Figura 7), esses mesmos tratamentos apresentaram os maiores valores. Assim, verifica-se que nesses tratamentos, as plântulas de *B. juncea* possivelmente conseguiram absorver maior quantidade de Pb sem afetar o seu desenvolvimento, o que pode ser atribuído à ação do EBL. Nestes tratamentos também

foi detectada maior atividade de enzimas do sistema antioxidante CAT, APX, POX e SOD (Figuras 14 A, B e 15 A, B, respectivamente).

Verifica-se ainda que, as plântulas de todos os tratamentos com presença de Pb tiveram teores superiores desse metal em relação às do controle sem Pb (Figura 16 B), o que não ocorreu para o teor de Pb nas sementes, que houve diferença entre as formas de aplicação do EBL. Nas sementes que tiveram pré-embebição, o teor de Pb foi considerado igual estatisticamente ao do controle, sem Pb. Isso pode ser atribuído ao fato das sementes já estarem hidratadas ao serem colocadas para germinar em substrato umedecido com Pb. Ainda que as sementes de todos os tratamentos com Pb tenham sido avaliadas 96 h após o início do teste de germinação e após 24 h no tratamento controle, foi possível observar que houve baixa absorção de Pb nos tratamentos que utilizaram a pré-embebição (Figura 16 A).

Nas plântulas em ambas as formas de aplicação do EBL, o teor de Pb foi estatisticamente superior ao do controle, sem o Pb. Nota-se que nos tratamentos com a pré-embebição, a quantidade de Pb só aumentou significativamente após o rompimento do tegumento, com a emissão da radícula e subsequente formação da plântula. Sugere-se que, com o início da protrusão radicular, houve maior exposição ao Pb que foi absorvido em maior quantidade pelos tecidos da plântula.

A redução da germinação e do comprimento das raízes pode ser atribuído ao decréscimo das divisões celulares nos meristemas apicais ou devido as anormalidades cromossômicas ou até mesmo as modificações anatômicas. Recentes estudos relatam a modificações significativas na anatomia das raízes de plântulas expostas ao Pb (Pereira et al., 2013a; Pereira et al., 2013b; Ribeiro et al., 2015). Acredita-se que conteúdo de Pb nos tecidos das plantas tende a decrescer seguindo a seguinte ordem: raiz > folhas > caules (Sharma e Dubey, 2005). Em plântulas de *Eichhornia crassipes*, o maior acúmulo de chumbo foi nas raízes, mas apenas pequenas quantidades de Pb foram translocadas para a parte aérea (Malar et al., 2014).

Sabe-se que o chumbo afeta diferentes etapas do desenvolvimento das plantas, desde a germinação até o crescimento das plantas. A influencia negativa nesses processos deve-se, em grande parte, a alterações induzidas pelo Pb na composição e na permeabilidade de membranas aliado a alterações nas atividade de enzimas antioxidantes e acúmulo de EROs (Wójcik e Tukiendorf, 2014).

Em síntese, a aplicação de BRs em sementes de *B. juncea* sob estresse por Pb pode ser interessante para reverter os efeitos deste estresse na germinação e no crescimento

inicial da plântula, uma vez que o tratamento com BRs aumenta a atividade antioxidante nas células contribuindo para reduzir os efeitos deletérios ocasionados pelas EROs. Assim, o tratamento com BRs pode ser uma estratégia interessante para solucionar problemas relacionados à germinação e ao estabelecimento de plântulas em campo durante a fitoremediação.

CONCLUSÕES

- Houve efeito negativo do Pb na germinação das sementes e no desenvolvimento das plântulas de *B. juncea*.
- Aplicação do EBL tanto na pré-embebição das sementes como durante o teste de germinação mostrou efeito positivo na recuperação da germinação e no crescimento das plântulas, principalmente na concentração 10^{-8} M que foi superior nas duas formas de aplicação.
- O sistema de defesa das enzimas antioxidantes nas sementes e plântulas foi comprometido com a exposição ao chumbo. Contudo, os brassinosteróides aumentaram a atividade dessas enzimas no sentido de superar os efeitos tóxicos causados por esse metal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F.; FARID, M.; ... BHARWANA, S. A. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 8148–8162. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>.
- AHAMMED, G. J.; ZHANG, S.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. (a). Brassinosteroid improves seed germination and early development of tomato seedling under phenanthrene stress. *Plant Growth Regulation*, v. 68, p. 87–96. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9696-0>.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R.; ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of Catalase , Peroxidase , and Glutathione Reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, v. 109, p. 1247–1257. 1995.
- ANURADHA, S.; RAO, S. E. R. Amelioration of lead toxicity in radish (*Raphanus sativus* L.) plants by brassinolide. *Journal of Applied Biological Sciences*, v. 5, p. 43–48. 2011.
- ANUSHA, P.; SHAHANA, T.; SUJATHA, E. Germination , Growth and Oxidative Responses of Maize Seedlings to Salt and / or Cadmium Stress: Mechanism of Toxicity Amelioration by 28-Homobrassinolide. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, p. 442–453. 2015.
- ARORA, P.; BHARDWAJ, R.; KANWAR, M. K. Effect of 24-epibrassinolide on growth, protein content and antioxidative defense system of Brassica juncea L. subjected to cobalt ion toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 34, p. 2007–2017. 2012. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1002-2>.
- ARORA, P.; BHARDWAJ, R.; KUMAR, M. Presoaking Seed Treatment of 24-epiBL Modulates Cr Stress in Brassica juncea L . *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, v. 5, p. 14–18. 2010.
- ASHRAF, U.; KANU, A. S.; MO, Z.; HUSSAIN, S.; ANJUM, S. A.; KHAN, I.; ... TANG, X. Lead toxicity in rice: effects, mechanisms, and mitigation strategies - a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 18318–18332. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5463-x>.
- BARBAFIERI, M.; TASSI, E. Brassinosteroids for phytoremediation application. In *Brassinosteroids: a class of plant hormone* (p. 403–437). Netherlands: Springer. 2011. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0189-2_16.
- BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. Métodos de análise química de plantas. Campinas: Instituto Agrônômico. 1983. Boletim Técnico n. 78.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, p. 276–287. 1971.
- BERTOLI, A. C.; CARVALHO, R.; CANNATA, M. G.; BASTOS, A. R. R.; AUGUSTO, A. D. S. Toxidez do chumbo no teor e translocação de nutrientes em tomateiro. *Biotemas*, v. 24, p. 7–15. 2011. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2011v24n4p7>.
- BEWLEY, J.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. *Seeds physiology of development, germination and dormancy* (3 ed.). New York: Springer. 2013.
- BHARDWAJ, R.; SHARMA, I.; KAPOOR, D.; POONAM; GAUTAM, V.; KAUR, R.; ... 1. Brassinosteroids: Improving Crop Productivity and Abiotic Stress Tolerance. In *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment* (Vol. 2, p. 161–187). 2014. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8600-8>.

- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- BRASIL. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 2009.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v. 2, p. 764–775. 1955.
- CLOUSE, S. D.; SASSE, J. M. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 49, p. 427–451. 1998. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.427>.
- COKKIZGIN, A.; COKKIZGIN, H. Effects of lead (PbCl₂) stress on germination of lentil (*Lens culinaris* Medic.) lines. *African Journal of Biotechnology Vol.*, v. 9, p. 8608–8612. 2010. <https://doi.org/10.5897/AJB10.890>.
- CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. *Design of seed storage facilities for genetic conservation*. Rome: International Board of Plant Genetic Resources. 1985.
- DEL LONGO, O. T.; GONZALEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant Defences 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.
- DIVI, U. K.; KRISHNA, P. Overexpression of the Brassinosteroid Biosynthetic Gene AtDWF4 in Arabidopsis Seeds Overcomes Abscisic Acid-induced Inhibition of Germination and Increases Cold Tolerance in Transgenic Seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 29, p. 385–393. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00344-010-9150-3>.
- FARIDUDDIN, Q.; YUSUF, M.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in Brassica juncea plants exposed to different levels of copper. *Environmental and Experimental Botany*, v. 66, p. 418–424. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.001>.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, v. 59, p. 309–314. 1977. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- GORNIK, K.; LAHUTA, L. B. Application of phytohormones during seed hydropriming and heat shock treatment on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and changes in soluble carbohydrates. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, p. 1–12. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2413-x>.
- 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. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>.
- HAYAT, S.; AHMAD, A. *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone* (1 ed.). New York: Springer. 2011.
- HEIDARI, M.; SARANI, S. Effects of lead and cadmium on seed germination, seedling growth and antioxidant enzymes activities of mustard (*Sinapis arvensis* L.). *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, v. 6, p. 44–47. 2015.
- HNILICKA, F.; HNILICKOVA, H.; MARTINKOVA, J.; BLAHA, L.; KADLEC, P. Impact of 24-epibrassinolide on chemical structure and energy content in wheat grain. *Vagos*, v. 83, p. 17–22. 2009.
- JIANG, W. B.; HUANG, H. Y.; HU, Y. W.; ZHU, S. W.; WANG, Z. Y.; LIN, W. H. Brassinosteroid Regulates Seed Size and Shape in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.

- 162, p. 1965–1977. 2013. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217703>.
- KANWAL, U.; ALI, S.; SHAKOOR, M. B.; FARID, M.; HUSSAIN, S.; YASMEEN, T.; ... ABBAS, F. EDTA ameliorates phytoextraction of lead and plant growth by reducing morphological and biochemical injuries in *Brassica napus* L. under lead stress. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 9899–9910. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3001-x>.
- KANWAR, M. K.; BHARDWAJ, R.; CHOWDHARY, S. P.; ARORA, P.; SHARMA, P.; KUMAR, S. Isolation and characterization of 24-Epibrassinolide from *Brassica juncea* L. and its effects on growth, Ni ion uptake, antioxidant defense of Brassica plants and in vitro cytotoxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, p. 1351–1362. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1175-8>.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*, v. 57, p. 315–319. 1976. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>.
- KARMOUS, I.; BELLANI, L. M.; CHAOU, A.; EL FERJANI, E.; MUCCIFORA, S. Effects of copper on reserve mobilization in embryo of *Phaseolus vulgaris* L. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 10159–10165. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4208-1>.
- KRANNER, I.; COLVILLE, L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, v. 72, p. 93–105. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.005>.
- KUMAR, S. P. J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*, v. 116, p. 663–668. 2015. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv098>.
- KURIAKOSE, S. V.; PRASAD, M. N. V. Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regulation*, v. 54, p. 143–156. 2008. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9237-4>.
- LABORIAU, L. G. *A germinação de Sementes*. Washington: OEA. 1983.
- LAMHAMDI, M.; BAKRIM, A.; AARAB, A.; LAFONT, R.; SAYAH, F. Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *Comptes Rendus-Biologies*, v. 334, p. 118–126. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.006>.
- LARRÉ, C. F.; MARINI, P.; MORAES, C. L.; AMARANTE, L. DO; MORAES, D. M. DE. Influência do 24-epibrassinolídeo na tolerância ao estresse salino em plântulas de arroz estresse salino em plântulas de arroz. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, p. 67–76. 2015. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n1p67>.
- LI, W.; KHAN, M. A.; YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, v. 46, p. 45–50. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-6324-2>.
- LUKATKIN, A. S.; KASHTANOVA, N. N.; DUCHOVSKIS, P. Changes in maize seedlings growth and membrane permeability under the effect of epibrassinolide and heavy metals. *Russian Agricultural Sciences*, v. 39, p. 307–310. 2013. <https://doi.org/10.3103/S1068367413040125>.
- LUX, A.; SOTTNIKOVA, A.; OPATRINA, J.; GREGERC, M. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity Alexander. *Physiologia Plantarum*, v. 120, p. 537–545. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0275.x>.
- MADHAN, M.; MAHESH, K.; RAO, S. S. R. Effect of 24-epibrassinolide on aluminium stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of *Cajanus cajan*

- (L.) Millsp. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, p. 286–290. 2014.
- MAGUIRE, J. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, v. 2, p. 176–177. 1962.
- MAHESH, K.; BALARAJU, P.; RAMAKRISHNA, B.; SEETA, S.; RAO, R. Effect of Brassinosteroids on germination and seedling growth of Radish (*Raphanus sativus* L.) under PEG-6000 induced water stress. *American Journal of Plant Sciences*, v. 4, p. 2305–2313. 2013. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.412285>.
- MALAR, S.; SHIVENDRA VIKRAM, S.; JC FAVAS, P.; PERUMAL, V. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies*, v. 55, p. 54. 2014. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0054-6>.
- MANDAVA, N. B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annals Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v. 39, p. 23–52. 1988.
- MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. (ABRATES, Org.). Londrina. 2015.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 405–410. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- MORAES, C. L.; MARINI, P.; FERNANDO, J. A.; MORAES, D. M. DE; ANTÔNIO, L.; CASTRO, S. DE; LOPES, N. F. Alterações fisiológicas e ultraestruturais de plântulas de tomate induzidas por chumbo. *Iheringia*, v. 69, p. 313–322. 2014.
- MOURATO, M. P.; MOREIRA, I. N.; LEITÃO, I.; PINTO, F. R.; SALES, J. R.; MARTINS, L. L. Effect of heavy metals in plants of the genus Brassica. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 17975–17998. 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
- NAWAZ, F.; NAEEM, M.; ZULFIQAR, B.; AKRAM, A.; ASHRAF, M. Y.; RAHEEL, M.; ... AURANGZAIB, M. Understanding brassinosteroid-regulated mechanisms to improve stress tolerance in plants: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 15959–15975. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9163-6>.
- NOMURA, T.; UENO, M.; YAMADA, Y.; TAKATSUTO, S.; TAKEUCHI, Y.; YOKOTA, T. Roles of Brassinosteroids and Related mRNAs in Pea Seed Growth and Germination. *Plant Physiology*, v. 143, p. 1680–1688. 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093096>.
- PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and on the Activities of Enzymes of Oxidative Metabolism in Sorghum 1. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 11, p. 137–143. 1999.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; BARBOSA, F. F. C.; OLIVEIRA, C. DE; CASTRO, E. M. DE S. (a) Lead tolerance during germination and early growth of the Brazilian peppertree and the morpho-physiological modifications. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 56, p. 72–79. 2013.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. DE A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. (b). Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agro@ambiente On-line*, v. 7, p. 36–43. 2013.
- R DEVELOPMENT CORE. R: A language and environmet for statistical computing. Vienna,

- Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2015.
- RAGHU, K.; MAHESH, B.; PARSHAVANENI, B.; RAMAKRISHNA, B.; RAO, S. Effect of brassinosteroids on seed germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus* L.) under arsenic toxicity stress. *International Journal of Development Research*, v. 4, p. 1929–1933. 2014.
- RAJEWSKA, I.; TALAREK, M.; BAJGUZ, A. Brassinosteroids and Response of Plants to Heavy Metals Action. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1–5. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00629>.
- RASAFI, T. EL; NOURI, M.; BOUDA, S.; HADDIOUI, A. The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. *Ekologia Bratislava*, v. 35, p. 213–223. 2016. <https://doi.org/10.1515/eko-2016-0017>.
- RIBEIRO, E. S.; PEREIRA, M. P.; CASTRO, E. M. DE; BARONI, G. D. R.; CORRÊA, F. F.; PEREIRA, F. J. Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus* storage and tolerance to lead of *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 19, p. 605–612. 2015.
- SAKO, Y.; McDONALD, M. B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A. F.; BENNETT, M. A. A System for Automated Seed Vigor Assessment (df object). *Seed Science and Technology*, v. 29, p. 625–636. 2001.
- SENEVIRATNE, M.; RAJAKARUNA, N.; RIZWAN, M.; MADAWALA, H. M. S. P.; OK, Y. S.; VITHANAGE, M. Correction to: Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-0040-5>.
- SETHY, S. K.; GHOSH, S. Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, v. 4, p. 272–275. 2013. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>.
- SHAHANA, T.; ANUSHA RAO, P.; SEETA RAM, S.; SUJATHA, E. Mitigation of drought stress by 24-Epibrassinolide and 28-Homobrassinolide in *Pigeon Pea* seedlings. *International journal of multidisciplinary and current research*, v. 3, p. 904–911. 2015.
- SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; CHE, Z.; REHMAN, A.; CHEEMA, S. A.; SHARMA, A.; ... ZHAORONG, D. Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 147, p. 935–944. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066>.
- SHARMA, I.; PATI, P. K.; BHARDWAJ, R. (a). Effect of 24-epibrassinolide on oxidative stress markers induced by nickel-ion in *Raphanus sativus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 33, p. 1723–1735. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0709-1>.
- SHARMA, I.; PATI, P. K.; BHARDWAJ, R. (b). Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant defence system in *Raphanus sativus* L. under chromium toxicity. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 862–874. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0650-0>.
- SHARMA, N.; HUNDAL, G. S.; SHARMA, I.; BHARDWAJ, R. Effect of 24-Epibrassinolide on Protein Content and Activities of Glutathione-S-Transferase and Polyphenol Oxidase in *Raphanus sativus* L. Plants under Cadmium and Mercury Metal Stress. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, v. 6, p. 1–7. 2012.
- SHARMA, P.; BHARDWAJ, R.; ARORA, N.; ARORA, H. K.; KUMAR, A. Effects of 28-homobrassinolide on nickel uptake, protein content and antioxidative defence system in *Brassica juncea*. *Biologia Plantarum*, v. 52, p. 767–770. 2008. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0149-6>.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*,

- v. 17, p. 35052. 2005.
- SHARMA, P.; KUMAR, A.; BHARDWAJ, R. Plant steroidal hormone epibrassinolide regulate - Heavy metal stress tolerance in *Oryza sativa* L. by modulating antioxidant defense expression. *Environmental and Experimental Botany*, v. 122, p. 1–9. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.005>.
- SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. SeedCalc: Seed Germination and Seedling Growth Indexes. R package. 2018.
- SINGH, P. Toxic effect of lead (Pb) in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Natural Resource and Development*, v. 11, p. 25–31. 2016.
- SOUZA, L. F. G. DE; MELLONI, M. L. G.; FERNANDES, A. C.; SANTOS, D. M. M. DOS. Adição de espermidina na germinação de sementes de duas forrageiras sob estresse osmótico. *Científica*, v. 40, p. 47–58. 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento Vegetal* (6 ed). Porto Alegre: Artmed. 2017.
- TURNER, R. G.; MARSHALL, C. The accumulation of zinc by subcellular fractions of roots of *Agrostis tenuis sibth.* in relation to zinc tolerance. *New Phytologist*, v. 71, p. 671–676. 1972. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1972.tb01277.x>.
- VADHINI, B. V.; VARDHINI, B.; ANURADHA, S.; SUJATHA, E.; RAO, S. S. R. Role of Brassinosteroids in alleviating various abiotic and biotic stresses. *Plant Stress*, v. 4, p. 55–61. 2010.
- VARDHINI, B. V.; ANJUM, N. A. Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontiers in Environmental Science*, v. 2, p. 1–16. 2015. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00067>.
- VARDHINI, B. V.; ANURADHA, S.; RAO, S. S. R. Brassinosteroids - a great potential to improve crop productivity. *Indian Journal of Plant Physiology*, v. 11, p. 1–12. 2006.
- WANG, S.; SHI, X.; SUN, H.; CHEN, Y.; PAN, H.; YANG, X.; RAFIQ, T. Variations in metal tolerance and accumulation in three hydroponically cultivated varieties of *Salix integra* treated with lead. *PLoS ONE*, v. 9. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108568>.
- WIERZBICKA, M. Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia*, v. 41, p. 143–160. 1988. <https://doi.org/10.1080/00087114.1988.10797856>.
- WIERZBICKA, M. The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L. *Protoplasma*, v. 207, p. 186–194. 1999.
- WIERZBICKA, M. S.; OBIDZIŃSKA, J. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science*, v. 137, p. 155–171. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00138-1).
- WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Accumulation and tolerance of lead in two contrasting ecotypes of *Dianthus carthusianorum*. *Phytochemistry*, v. 100, p. 60–65. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.008>.
- ZHI, Y.; DENG, Z.; LUO, M.; DING, W.; HU, Y.; DENG, J.; ... HUANG, B. Influence of Heavy Metals on Seed Germination and Early Seedling Growth in *Eruca sativa* Mill. *American Journal of Plant Sciences*, v. 6, p. 582–590. 2015.