

MARCELO COELHO SEKITA

EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE ERVILHA (*Pisum sativum* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

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

T

S463e
2013 Sekita, Marcelo Coelho, 1984-
Efeito do nitroprussiato de sódio na germinação de
sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.) / Marcelo Coelho Sekita.
– Viçosa, MG, 2013.
xiii, 66f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Pisum sativum* - Semente. 2. Germinação. 3. Sementes -
Qualidade. 4. Sementes - Fisiologia. 5. Ervilha - Semente.
6. Óxido nítrico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 635.656

MARCELO COELHO SEKITA

EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE ERVILHA (*Pisum sativum* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

ARPOVADA: 21 de agosto de 2013

Prof. Raimundo Santos Barros

Prof. Eduardo E. de Lima e Borges

Prof. Renato Mendes Guimarães

Dr. Dimas Mendes Ribeiro

Prof^ª. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

À Deus, fonte de bênçãos!

Dedico.

*À minha noiva, Larissa, aos
meus pais, Makoto e Amélia, e
todos familiares, cujo apoio e
incentivo nunca me faltaram,*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À professora, pesquisadora e orientadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela confiança, orientação, exemplo de dedicação à pesquisa, seriedade e competência.

Ao professor Rolf Puschmann por ser a primeira pessoa a confiar na minha capacidade e potencial.

Aos professores Fernando Luiz Finger e Fábio Murilo da Matta, por disponibilizar os próprios laboratórios para realização das análises bioquímicas.

Aos amigos Laércio Junio da Silva e Glauter Lima Oliveira, pela ajuda na execução dos trabalhos, amizade e por serem precursores de parte do meu crescimento pessoal e profissional.

À todos os amigos do GSem, em especial Antônio, Giuliana, Paulo H., Marcos, Paulo S., Pazzin, Rubens, Genáina, Kássia e Rafael pelo apoio, ajuda e agradável convívio.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Ana Carla, Diego, Neidiquele, Leandro, Kelem, Tania, Aline, Camilla, Maiana e Franklin pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários Zé Custódio, Luciene, Reginaldo e Zé Antônio, por toda ajuda prestada no decorrer do curso.

A toda minha família, incluindo tios, primos, avós, cunhados, demais agregados e principalmente aos meus pais Makoto e Amélia e aos meus irmãos Makotinho, Fernando e Ana Paula pela amizade, carinho e incentivo.

À minha noiva amada, Larissa, por todo apoio, incentivo e compreensão.

A todos que acreditaram no meu potencial e capacidade, incentivando os meus estudos, tornando possível a realização e conclusão deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
ANEXOS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
Capítulo I. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE ERVILHA (<i>Pisum sativum</i> L.)	7
Chapter I. NITRIC OXIDE EFFECT IN THE PHYSIOLOGICAL POTENCIAL OF PEA SEEDS (<i>Pisum sativum</i> L.)	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	11
Teste de germinação	11
Primeira contagem de germinação	11
Índice de Velocidade de Germinação	11
Teste de Frio	12
Comprimento de hipocótilo e radícula	12
Massa seca de hipocótilo e radícula	12
Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade das amilases	13
Determinação da atividade da α -amilase	13
Determinação da atividade da β -amilase	13
Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade de enzimas antioxidativas	14
Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	14
Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	14
Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)	15
Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)	15
Liberação de ânion superóxido	15
Quantificação do peróxido de hidrogênio	16

Avaliação da peroxidação de lipídios.....	16
Análise estatística	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
Capítulo II. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ERVILHA (<i>Pisum sativum</i> L.) SOB ESTRESSE HÍDRICO	33
Chapter II. NITRIC OXIDE EFFECT DURING THE GERMINATION OF PEA SEEDS (<i>Pisum sativum</i> L.) UNDER WATER STRESS.....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
Teste de germinação.....	37
Primeira contagem de germinação	37
Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	37
Comprimento de hipocótilo e radícula	38
Massa seca de hipocótilo e radícula	38
Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade das amilases.....	38
Determinação da atividade da α-amilase	39
Determinação da atividade da β-amilase	39
Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade de enzimas antioxidativas	39
Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	40
Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	40
Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC1.11.1.7).....	40
Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)	41
Liberação de ânion superóxido.....	41
Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	41
Avaliação da peroxidação de lipídios.....	42
Análise estatística	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES.....	49

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Percentagem de germinação (A), primeira contagem de germinação (B), índice de velocidade de germinação (C) e percentagem de germinação no teste de frio (D) de três lotes de sementes de *Pisum sativum* submetidas ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....17
- Figura 2.** Comprimento de hipocótilo (A), comprimento de radícula (B), massa seca de hipocótilo (C) e massa seca de radícula (D) de plântulas provenientes de três lotes de sementes de *Pisum sativum* submetidas ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....17
- Figura 3.** Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F, respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....19
- Figura 4.** Atividade da peroxidase do ascorbato e das peroxidases totais durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....20
- Figura 5.** Conteúdo de peróxido de hidrogênio e de ânion superóxido durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F, respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....20
- Figura 6.** Conteúdo de malonaldeído durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C, respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....21
- Figura 7.** Atividade enzimática da α -amilase e da β -amilase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.....22

Capítulo II

- Figura 1.** Porcentagem de germinação (A), primeira contagem de germinação (B) e índice de velocidade de germinação (C) de sementes, comprimento de hipocótilo (D), comprimento de radícula (E), massa seca de hipocótilo (F), massa seca de radícula (G) e massa seca de cotilédone (H) de plântulas de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μ M).....41
- Figura 2.** Atividade da superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase do ascorbato (C) e peroxidase (D) durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μ M).....42
- Figura 3.** Conteúdo de peróxido de hidrogênio (A), de ânion superóxido (B) e de malonaldeído (C) durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μ M).....43
- Figura 4.** Atividade da α (A) e da β -amilase (B) durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μ M).....44

ANEXOS

- Tabela 1.** Germinação (GER); primeira contagem de germinação (PCG); índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de frio (TF) dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....51
- Tabela 2.** Comprimento de hipocótilo (CH); comprimento de radícula (CR); massa seca de hipocótilo (MSH) e massa seca de radícula (MSR) dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....51
- Tabela 3.** Atividade da catalase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....52
- Tabela 4.** Atividade da peroxidase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....52
- Tabela 5.** Atividade da peroxidase do ascorbato durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....53
- Tabela 6.** Atividade da superóxido dismutase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....53
- Tabela 7.** Conteúdo de malonaldeído durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....54
- Tabela 8.** Liberação de ânion superóxido durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....54

Tabela 9. Conteúdo de peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	55
Tabela 10. Atividade da alfa-amilase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	55
Tabela 11. Atividade da beta-amilase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	56
Tabela 12. Germinação (GER); primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	57
Tabela 13. Comprimento de hipocótilo (CH); comprimento de radícula (CR); massa seca de hipocótilo (MSH); massa seca de radícula (MSR) e massa seca de cotilédone (MSC) de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	57
Tabela 14. Atividade da catalase durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	58
Tabela 15. Atividade da peroxidase durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	58
Tabela 16. Atividade da peroxidase do ascorbatodurante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	59

Tabela 17. Atividade da superóxido dismutase durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	59
Tabela 18. Conteúdo de malonaldeído durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	60
Tabela 19. Liberação de ânion superóxido durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	60
Tabela 20. Conteúdo de peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	61
Tabela 21. Atividade da alfa-amilase durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	61
Tabela 22. Atividade da beta-amilase durante a germinação de sementes de sementes de <i>Pisum sativum</i> embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.....	62

RESUMO

SEKITA, Marcelo Coelho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Efeito do nitroprussiato de sódio na germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.)**. Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-orientadores: Fernando Luiz Finger e Fábio Murilo da Matta

O óxido nítrico (ON) tem sido estudado por ser uma molécula multifuncional, que age diversos eventos fisiológicos tanto em animais como em vegetais. A aplicação de ON em sementes tem se mostrado promissora, uma vez que as sementes em contato com a solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doador de ON, em geral, germinam mais e com maior velocidade, tolerando melhor tanto estresses abióticos como a deterioração natural ocasionada pelo armazenamento. Assim, na presente pesquisa, teve-se como objetivo avaliar as principais alterações que ocorrem na durante a germinação de sementes de ervilha devido à aplicação do ON. Para tanto, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro experimento, três lotes de sementes de ervilha com diferentes níveis de qualidade fisiológica foram semeados em substrato umedecido com água (controle) ou com solução de SNP (50 μ M). Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram analisadas pelo teste F a 5% de probabilidade. No segundo experimento, sementes de ervilha foram semeadas em substrato umedecido com água (controle), solução de polietilenoglicol [PEG 6000 (-0,15 MPa)] e solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa; 50 μ M). O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Conclui-se que o ON não aumenta a germinação das sementes de ervilha, entretanto há aumento no vigor. Sementes com menor potencial fisiológico respondem melhor à aplicação do ON. O estresse hídrico diminui a germinação e o vigor das sementes de ervilha e causa desbalanço das espécies reativas de oxigênio. A aplicação do SNP promoveu maior germinação e maior velocidade de germinação em sementes sob estresse hídrico. Houve maior atividade das amilases, das enzimas antioxidativas e menor conteúdo de H_2O_2 , menor liberação de O_2^- e menor peroxidação de lipídeos em sementes tratadas com doadores de ON.

ABSTRACT

SEKITA, Marcelo Coelho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2013.
Sodium nitroprusside effects on the germination of pea (*Pisum sativum* L.) seeds.
Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisers: Fernando Luiz Finger and Fábio Murilo da Matta

The nitric oxide (NO) has distinguished itself as a multifunctional molecule, acting in various physiological events in animals and plants. The NO application in seeds has shown promising, because the seeds in contact with the sodium nitroprusside (SNP) solution, NO donor, usually germinates more and faster and are more tolerant to abiotic stresses such as natural deterioration caused by storage. Thus, it is interesting to know how the NO acts on the seeds germination to improve the early seedling development. Therefore, the research aimed to evaluate the main changes that occur during the germination of pea seeds due the NO application. Therefore, two experiments were conducted. In the first one, three lots of pea seeds with different physiological potential levels were sown in a substrate with water (control) or with SNP solution (50 μ M). It was adopted the completely randomized design with four replications. The data were subjected to variance analysis and the means were analyzed by F test at 5% of probability. In the second experiment, pea seeds were sown in a substrate with water (control), polietilenoglicol [PEG 6000 solution (-0,15 MPa)] and PEG 6000 + SNP solution (-0,15 MPa; 50 μ M). It was adopted the completely randomized design with four replications. The data were subjected to variance analysis and the means were analyzed by Tukey test at 5% of probability. To conclude, the NO does not increase the germination of pea seeds, but increase the seeds vigor. Seeds with lower physiological potential gives a better response to the NO application. Water stress decrease the germination and vigor of pea seeds and cause reactive oxygen species imbalance. The SNP application promoted a higher and faster germination in seeds under water stress. There were higher activity of the amylases, higher activity of the antioxidative enzymes, less H₂O₂ content, less O₂⁻ liberation and consequently less lipid peroxidation in seeds treated with NO.

INTRODUÇÃO GERAL

O óxido nítrico (ON) é um radical livre diatômico, gasoso, inorgânico e incolor composto por um átomo de oxigênio e um de nitrogênio (Dusse et al., 2003). Na década de 80, o ON era considerado apenas como mais uma molécula tóxica na lista de poluentes ambientais. Capaz de destruir a camada de ozônio, suspeito de ser carcinogênico e precursor de chuvas ácidas, esse gás possuía uma má reputação. Alguns anos depois, o ON foi introduzido na lista das moléculas mensageiras em diversos artigos publicados, provando sua atividade no sistema nervoso e imune, artérias, fígado, pâncreas, útero, e pulmões de mamíferos (Culotta e Koshland, 1992).

Com a descoberta de diversas outras funções fisiológicas da molécula, como a capacidade neurotransmissora, vasodilatadora, antitumor e antibacteriano, o ON foi eleito a molécula do ano pela *Science* em 1992 (Koshland, 1992). Posteriormente, em 1998, o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina foi concedido aos pesquisadores Ferid Murad, Robert Furchott e Louis Ignarro pela descoberta da função sinalizadora do óxido nítrico para o sistema cardiovascular (Nobelprize.org, 2013).

A presença do ON em plantas foi constatada em um trabalho pioneiro realizado por Klepper (1979) no qual observou que havia um aumento gradual da produção de ON em plantas de soja tratadas com herbicidas dependendo da dose aplicada. Houve uma rápida evolução nas pesquisas envolvendo o ON desde então.

Estudos recentes demonstram que o ON é uma molécula multifuncional, tendo ação em diversos processos celulares na planta. Uma vez que age no crescimento do tubo polínico (Prado et al., 2004), na divisão, expansão e diferenciação celular (Pagnussat et al., 2002; Ötvös et al., 2005; Gabaldón et al., 2005), lignificação da parede celular (Bohm et al., 2010) e na morte celular programada (Yamamoto et al., 2004). Outros processos fisiológicos como movimento estomático (Neill et al., 2002), floração (He et al., 2004), senescência de folhas e cotilédones (Hung e Kao, 2004; Jasid et al., 2009), crescimento vegetativo de parte aérea (Zhang et al., 2003), formação de raiz e desenvolvimento de raízes adventícias e pelos radiculares (Correa-Aragunde et al., 2004; Lombardo et al., 2006; Tewari et al., 2008) também são influenciados pela ação do ON.

Além dos processos celulares, o ON também está envolvido no aumento da tolerância de plantas a estresses bióticos (Delledone et al., 1998) e abióticos, por meio do aumento da tolerância a estresse por seca, calor e salinidade (García-Mata e Lamattina, 2001; Uchida et al., 2002; Zhao et al., 2007) e estresse oxidativo pela exposição a

concentrações tóxicas de ozônio (Velikova et al., 2005; Ederli et al., 2006), alumínio (Wang e Yang, 2005) e metais pesados (Kopyra e Gowózdź, 2003).

Muito pouco se sabe da forma como o ON age nas plantas, porém o seu efeito sobre o processo germinativo de sementes já foi comprovado em diversos trabalhos, demonstrando que o ON é eficiente na superação de dormência de várias espécies, entre elas a alface (Beligni e Lamattina, 2000), cevada (Bethke et al., 2004), *Arabidopsis* (Bethke et al., 2006; Libourel et al., 2006) e *Paulownia tomentosa* (Giba et al., 1998).

A aplicação de doadores de ON também faz com que as sementes germinem mais e mais rápido (Sarath et al., 2006; Liu et al., 2007), aumenta a atividade da α -amilase (Beligni e Lamattina, 2000; Beligni et al., 2002) e da β -amilase (Zhang et al., 2005), promovendo uma conversão maior e mais rápida de amido a açúcares solúveis (Zhang et al., 2003).

O ON também é capaz de diminuir os efeitos do envelhecimento das sementes armazenadas (Pereira et al., 2010) assim como aumenta a tolerância da semente a diversos estresses abióticos, como estresse salino (Zheng et al., 2009), hídrico (Zhang et al., 2003) e por metais pesados (Kopyra e Gowózdź, 2003; Singh et al., 2013). O estresse oxidativo, provocado pelo aumento da concentração de superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos de alquila, pode ser combatido pelo óxido nítrico, uma vez que o mesmo possui propriedades antioxidantes (Lamattina et al., 2003).

O ON pode participar de diversas reações químicas, como nitrosilar grupos tióis de cisteína de proteínas. Na presença do ânion superóxido, há rápida formação de peroxinitrito (ONOO^-) que pode levar a formação de dióxido de nitrogênio (NO_2) e um potente oxidante, o radical hidroxila (OH^\cdot). Além disso, o ONOO^- pode reagir com tirozinas pelo processo de nitração ou com os resíduos de tiol pela oxidação. Na presença de metais de transição, como ferro, cobre ou zinco, o ON pode interagir para formar complexos metal-nitrosil. Estes complexos podem estar relacionados aos efeitos regulatórios dos fatores de transcrição do ON e certas enzimas (Lamattina et al., 2003). A tolerância se dá pelo estímulo à atividade de uma ou mais enzimas do sistema antioxidativo como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX), diminuindo a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Liu et al., 2010; Singh et al., 2013). Contudo, não há relatos da ação do ON no sistema de defesa de sementes com diferentes níveis de vigor.

Diante do exposto, o objetivo no presente trabalho foi avaliar o efeito do óxido nítrico nas alterações fisiológicas de sementes de ervilha durante a germinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELIGNI, M.; FATH, A.; BETHKE, P.C.; LAMATTINA, L.; JONES, R.L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.
- BELIGNI, M.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide stimulates seed germination and cotyledon elongation, and inhibits hypocotyls elongation. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.
- BETHKE, P.C.; GUBLER, F.; JACOBSEN, J.V.; JONES, R.L. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, v.219, p.847-855, 2004.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.3, p.517-526, 2006.
- BÖHM, F. M. L. Z.; FERRARESE, M.L.L.; ZANARDO, D.I.L.; MAGALHAES, J.R.; FERRARESE FILHO, O. Nitric oxide affecting root growth, lignification and related enzymes in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32. p.1039-1046, 2010.
- CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v.218, p.900-905, 2004.
- CULOTTA, E.; KOSHLAND JR., D.E. NO news is good news. **Science**, v.258, p.1862-1865, 1992.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.
- EDERLI, L.; MORETTINI, R.; BORGOGNI, A.; WASTERACK, C.; MIERSCH, O.; REALE, L.; FERRANTI, F.; TOSTI, N.; PASQUALINI, S. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. **Plant Physiology**, v.142, p.595-608, 2006
- GABALDÓN, C.; ROS, L.V.G.; PEDREÑO, M.A.; BARCELÓ, A.R. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. **New Phytologist**, v.165, p.121-130, 2005.
- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology**, v.126, p.1196-1204, 2001.
- GIBA, Z.; GRUBIŠIĆ, D.; TODORVIĆ, S.; SAJC, L.; STOJAKOVIĆ, Đ.; KONJEVIĆ, R. Effect of nitric oxide – releasing compounds on phytochrome – controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.175-181, 1998.

- HE, Y.; TANG, R.H.; HAO, Y.; STEVENS, R.D.; COOK, C.W.; AHN, S.M.; JING, L.; YANG, Z.; CHEN, L.; GUO, F.; FIORANI, F.; JACKSON, R.B.; CRAWFORD, N.M.; PEI, Z.M. Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. **Science**, v.305, p.1968-1971, 2004.
- HUNG, K.T.; KAO, C.H. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.43-52, 2004.
- JASID, S.; GALATRO, A.; VILLORDO, J.J.; PUNTARULO, S.; SIMONTACCHI, M. Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. **Plant Science**, v.176, p.662-668, 2009.
- KLEPPER, L. Nitric oxide and nitrogen dioxide emissions from herbicide treated soybean plants. **Atmospheric Environment**, v.13, p.537-542, 1979.
- KOPYRA, M.; GWÓŹDŹ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1011-1017, 2003.
- KOSHLAND JR., D.E. The molecule of the year. **Science**, v.258, p.1861, 1992.
- LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 54, p.109-136, 2003.
- LIBOUREL, I.G.L.; BETHKE, P.C.; MICHELE, R.; JONES, R.L. Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds - use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. **Planta**, v.223, p.813-820, 2006.
- LIU, H.Y.; YU, X.; CUI, D.Y.; SUN, M.H.; SUN, W.N.; TANG, Z.C.; KWAK, S.S.; SU, W.A. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell Research**, v.17, p.638-649, 2007.
- LIU, Y.; XU, S.; LING, T.; XU, L.; SHEN, W. Heme oxygenase/carbono monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p.1371-1379, 2010.
- LOMBARDO, M.C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J.C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signaling and Behavior**, v.1, p.28-33, 2006.
- NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiology**, v.128, p.13-16, 2002.
- NOBELPRIZE.ORG, The Nobel prize in physiology or medicine 1998. In: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/press.html, acesso em 20 de julho de 2013.
- ÖTVÖS, K.; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZÚCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation

- but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. **Plant Journal**, v.43, p.849-860, 2005.
- PAGNUSSAT, G.C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiology**, v.129, p.954-956, 2002.
- PEREIRA, B.L.C.; BORGES, E.E.L.; OLIVEIRA, A.C.; LEITE, H.G.; GONÇALVES, J.F.C. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Florestalis**, v.38, n.88, p.629-636, 2010.
- PRADO, A.M.; PORTERFIELD, M.; FEIJÓ, J.A. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. **Development**, v.131, p.2707-2714, 2004.
- SARATH, G.; BETHKE, P.C.; JONES, R.; BAIRD, L.M.; HOU, G.; MITCHELL, R.B. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, v.223, p.1154-1164, 2006.
- SINGH, V. P.; SRIVASTAVA, P. K.; PRASAD, S. M.; Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged *Luffa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.71, p.155-163, 2013.
- TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. **Plant Cell Reports**, v.27, p.171-181, 2008.
- UCHIDA, A.; JAGENDORF, A.T.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in Rice. **Plant Science**, v.163, p.515-523, 2002.
- VELIKOVA, V.; PINELLI, P.; PASQUALINI, S.; REALE, L.; FERRATI, F.; LORETO, F. Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves to elevated ozone. **New Phytologist**, v.166, p.419-426, 2005.
- WANG, Y.S.; YANG, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Cassia tora* L.. **Plant and Cell Physiology**, v.46, p.1915-1923, 2005.
- YAMAMOTO, A.; KATOU, S.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. **Journal of General Plant Pathology**, v.70, p.85-92, 2004.
- ZHANG, H.; SHEN, W.B.; XU, L.L. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress. **Acta Botanica Sinica**, v.45, p.901-905, 2003.
- ZHANG, H.; SHEN, Q.B.; ZHANG, W.; XU, L.L. A rapid response of β -amilase to nitric oxide but not gibberellins in wheat seeds during the early stage of germination. **Planta**, v.220, p.708-716, 2005.
- ZHAO, M.G.; TIAN, Q.Y.; ZHANG, W.H. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.144, p.206-217, 2007

ZHENG, C.; JIANG, D.; LIU, F.; DAI, T.; LIU, W.; JING, Q.; CAO, W. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.222-227, 2009.

Capítulo I. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE ERVILHA (*Pisum sativum* L.)

RESUMO – O óxido nítrico (ON) tem ação em diversos processos celulares nas plantas, além de envolvimento no aumento da tolerância a diversos estresses bióticos e abióticos. Nas sementes, o ON também possui importante ação protetora, diminuindo os efeitos da deterioração ocasionado pelo armazenamento. Apesar dos relatos dos benefícios oferecidos pelo ON, não há informações a respeito da resposta desempenho das sementes, com diferentes níveis de qualidade, quando tratadas com essa molécula. Assim, nessa pesquisa teve-se como objetivo avaliar os efeitos do óxido nítrico na germinação e no vigor de sementes de ervilha com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Para tanto, três lotes de sementes de ervilha foram semeadas em substrato umedecido com água (controle) ou solução de SNP (50 μ M) para determinação dos seguintes parâmetros: germinação, primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG), germinação pelo teste de frio (TF), comprimento de hipocótilo (CH) e radícula (CR) e massa seca de hipocótilo (MSH) e radícula (MSR), além de quantificar a atividade da α e da β -amilase, das enzimas antioxidativas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases totais (POX), peroxidação de lipídeos através conteúdo de malonaldeído (MDA), de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a liberação de ânion superóxido (O_2^-). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. O ON não promoveu aumento significativo na germinação de nenhum dos lotes; contudo houve acréscimo significativo no vigor das sementes dos lotes 2 e 3 pelo teste de PC e de todos os lotes pelos testes de IVG e TF, além de aumentar a atividade das amilases, das enzimas do aparato antioxidativo e diminuir a liberação de O_2^- , a quantidade de H_2O_2 e a peroxidação de lipídeos.

Palavras-chave: SNP, vigor, germinação, sistema antioxidativo, deterioração.

Chapter I. NITRIC OXIDE EFFECT IN THE PHYSIOLOGICAL POTENTIAL OF PEA SEEDS (*Pisum sativum* L.)

ABSTRACT – The nitric oxide (NO) acts in several cell process in the plants, in addition to increase the tolerance to several biotic and abiotic stress. In the seeds, the NO has an important protective action, decrease the deterioration effects caused by the storage. Despite reports of the benefits offered by the NO, little is known how the defense system of seeds, with different quality levels, responds to this molecule. Therefore, the research aimed to evaluate the NO effect in the germination and vigor of different lots of pea seeds with different physiological potential. Therefore, three lots of pea seeds with different physiological potential levels were sown in a substrate with water (control) or with SNP solution (50 μ M) to determine the following parameters: germination (G), first count of germination (PC), speed germination index (IVG), germination on the cold test (TF), hypocotyl length (CH), radicle length (CR), dry mass of hypocotyl (MSH) and dry mass of radicle (DMR). It were quantifying the α and β -amylase activity, the antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and total peroxidase (POX) activity, lipid peroxidation by the malonaldehyde content (MDA), hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion liberation (O_2^-). It was adopted the completely randomized design with four replicates. The data were subjected to variance analysis and the means were analyzed by F test at 5% of probability. The NO did not increase significantly the germination of no seeds lots, but there were a significantly increased in the vigor of the seeds from lots 2 and 3 for the test PC and all of lots for the tests IVG and TF. The NO increase the amylases activity and the antioxidative enzymes activity, beyond decreasing the liberation of O_2^- , the content of H_2O_2 and the lipid peroxidation.

Keywords: SNP, vigor, germination, antioxidative system, deterioration.

INTRODUÇÃO

O potencial fisiológico das sementes é representado pelas suas características de viabilidade e vigor. O baixo potencial fisiológico das sementes pode influenciar indiretamente a produção da lavoura, ao afetar a velocidade de germinação, a percentagem de emergência das plântulas e o estande final, ou diretamente, por meio da influência no vigor da planta (Marcos Filho 2005).

O vigor das sementes está associado com várias alterações celulares, metabólicas e químicas, incluindo-se a perda da integridade celular, redução da energia metabólica e síntese de proteínas. Essas alterações são causadas pela deterioração natural das sementes e também por diversos fatores de estresse que acabam gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bewley et al., 2013). A formação das EROs acontece principalmente durante funções metabólicas normais nos peroxissomos, cloroplastos e mitocôndrias ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as sementes estão constantemente expostas (Breusegem et al., 2001; Kranner et al., 2010). As EROs ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas.

A produção de EROs em condições adequadas de germinação é baixa; entretanto, sementes de baixo vigor possuem menor eficiência de captura dessas moléculas, podendo assim gerar um estresse secundário, o estresse oxidativo (Bailly, 2004).

O estresse oxidativo é resultado da perda da capacidade da semente em manter a homeostase celular das EROs, ou seja, há um aumento na peroxidação de lipídeos e um declínio na atividade das enzimas sequestradoras das EROs (Yao et al., 2012). A intensidade dos danos celulares é determinada pela habilidade das sementes de eliminar essas espécies reativas pelo sistema enzimático ou não enzimático. O sistema antioxidativo enzimático requer várias enzimas que podem eliminar o excesso de EROs produzidas pela semente. A superóxido dismutase (SOD, catalase (CAT) e as peroxidases (APX e POX, por exemplo) são algumas das enzimas antioxidativas existentes no reino vegetal. A SOD catalisa a conversão do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A CAT remove o H_2O_2 convertendo-o a água e oxigênio. As POX são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos, o ascorbato no caso da APX, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula receptora de elétrons. A peroxidação do substrato orgânico resulta na liberação de água (Mittler, 2002).

Para que haja a ativação das enzimas antioxidativas, é necessário que ocorra a embebição da semente, que contribui para a reativação de diversas atividades metabólicas que, naturalmente, geram e acumulam EROs. Contudo, as EROs afetam negativamente o

processo germinativo, ou seja, a germinação é fortemente dependente dos mecanismos antioxidativos que operam durante todo o processo germinativo.

Estudos demonstram que o ON é uma molécula multifuncional, tendo ação em diversos processos celulares na planta, uma vez que age na divisão, expansão e diferenciação celular (Pagnussat et al., 2002; Ötvös et al., 2005; Gabaldón et al., 2005), lignificação da parede celular (Bohm et al., 2010), crescimento vegetativo de parte aérea (Zhang et al., 2003), formação de raiz e desenvolvimento de raízes adventícias e pelos radiculares (Correa-Aragunde et al., 2004; Lombardo et al., 2006; Tewari et al., 2008).

Além dos processos celulares, o ON também está envolvido no aumento da tolerância de plantas a estresses bióticos (Delledone et al., 1998) e abióticos por meio do aumento da tolerância a estresse por seca, calor e salinidade (García-Mata e Lamattina, 2001; Uchida et al., 2002; Zhao et al., 2007) e estresse oxidativo pela exposição a concentrações tóxicas de ozônio (Velikova et al., 2005; Ederli et al., 2006), alumínio (Wang e Yang, 2005) e metais pesados (Kopyra e Gwózdź, 2003; Singh et al 2013).

Muito pouco se sabe como o ON age nas plantas, porém o seu efeito sob o processo germinativo de sementes já foi comprovado por diversos trabalhos, demonstrando que o ON é eficiente na superação de dormência de várias espécies como a alface (Beligni e Lamattina, 2000), cevada (Bethke et al., 2004), *Arabidopsis* (Bethke et al., 2006; Libourel et al., 2006) e *Paulownia tomentosa* (Giba et al., 1998).

A aplicação de doadores de ON também faz com que as sementes germinem mais e mais rápido (Sarath et al., 2006; Liu et al., 2007), aumenta a atividade da α -amilase (Beligni e Lamattina, 2000; Beligni et al., 2002) e da β -amilase (Zhang et al., 2005), proporcionando uma conversão maior e mais rápida de amido a açúcares solúveis (Zhang et al., 2003).

O ON também é capaz de amenizar os efeitos do envelhecimento das sementes no armazenamento (Pereira et al., 2010), assim como aumentar a tolerância da semente a estresses abióticos como estresse salino (Zheng et al., 2009) e hídrico (Zhang et al., 2003). A tolerância a esses estresses se dá pelo estímulo à atividade de uma ou mais enzimas do sistema antioxidativo diminuindo a ação das EROs.

Diversos estudos demonstram o efeito positivo do ON nas sementes. Contudo, não há relatos a respeito da resposta do sistema de defesa das sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica à essa molécula.

Diante do exposto, o objetivo no trabalho foi avaliar os efeitos do óxido nítrico na germinação e vigor de sementes de ervilha com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Foram utilizadas três lotes de sementes de ervilha Itapuã 600, produzida por ISLA Sementes Ltda. com diferentes níveis de germinação e vigor. As sementes de cada lote foram submetidas a testes para avaliação da qualidade fisiológica (germinação e vigor) e determinações bioquímicas, que foram conduzidos com sementes embebidas em água e sem solução de nitroprussiato de sódio (SNP; 50 µM) conforme descrito abaixo para cada teste.

Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram distribuídas em rolos de papel filtro, tipo Germitest[®], umedecido com água (controle) ou com solução de SNP 50 µM na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador na temperatura de 20°C. O resultado consistiu na percentagem de plântulas normais obtidas no oitavo dia após a semeadura, como descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Primeira contagem de germinação

Foi realizado juntamente com o teste de germinação, consistindo na percentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a semeadura, como determinado nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Índice de Velocidade de Germinação

Adotou-se a metodologia descrita acima para o teste de germinação, realizando-se avaliações diárias, à mesma hora, a partir do dia em que surgiram as primeiras plântulas normais. As plântulas normais foram computadas e retiradas do rolo até o oitavo dia após a semeadura (Brasil, 2009). Foi calculado o índice de velocidade de germinação empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$$

Onde: IVG = índice de velocidade de germinação;

G_1, G_2, G_n = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem;

N_1, N_2, N_n = Número de dias da sementeira à primeira contagem, à segunda contagem e à última contagem.

Teste de Frio

As sementes foram distribuídas em papel toalha, tipo Germitest® e umedecidas conforme descrito acima para o teste de germinação. Os rolos foram colocados em sacos plásticos e mantidos em incubadora BOD à temperatura de 10 °C, durante sete dias. Depois removeu-se o saco plástico e os rolos foram transferidos para germinador a 20°C onde permaneceram por cinco dias, quando foi determinada a porcentagem de plântulas normais (Barros et al., 1999).

Comprimento de hipocótilo e radícula

As sementes, em quatro repetições de 10 sementes, foram semeadas de forma linear e equidistante em linha traçada no terço superior do papel toalha, umedecido conforme descrito acima para o teste de germinação. Foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador a 20 °C. No oitavo dia após a sementeira, foram efetuadas as medições do comprimento de hipocótilo e de radícula das plântulas normais com o auxílio de uma régua graduada em cm. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula (Nakagawa, 1999).

Massa seca de hipocótilo e radícula

Foi realizada conjuntamente com a determinação do comprimento de hipocótilo e radícula. As plântulas normais utilizadas na determinação do comprimento do hipocótilo e da radícula tiveram os seus cotilédones removidos. Os hipocótilos e radículas foram colocados separadamente em sacos de papel e colocados para secar em estufa de ar forçado, a 70 °C, até atingirem peso constante. Foram efetuadas pesagens e os resultados foram expressos em miligramas de hipocótilo por plântula e em miligramas de radícula por plântula (Nakagawa, 1999).

Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade das amilases

As sementes foram colocadas para germinar como descrito acima para o teste de germinação. À 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a semeadura, foram retiradas amostras para a realização das determinações enzimáticas.

As amilases foram extraídas e quantificadas pelos métodos propostos por Kishorekumar et al. (2008) e Térrado e Nicolás (1976). Cerca de 1 g de material vegetal foi macerado em 10 mL de água gelada (4°C). O extrato foi centrifugado a 15.000 g a 4°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado para a quantificação da atividade da α e da β -amilase.

Determinação da atividade da α -amilase

Cinco mililitros do extrato enzimático foram misturados com 3 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) 3 mM, e incubados a 70°C, durante 5 minutos. Colocou-se em um tubo de ensaio, 0,7 mL do extrato ainda quente e 2 mL de tampão citrato 0,1 mM (pH 5,0) contendo 2% de amido (p/v). Os tubos foram incubados a 30°C, por 5 minutos e, posteriormente, a reação foi paralisada pela adição de 2 mL de um reagente contendo 1,0 g de ácido 3',5-dinitrosalicílico em 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, e 30 g de tartarato de sódio e potássio, em 100 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 50°C durante 5 minutos acrescentando-se, então, água destilada até completar 10 mL. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

Determinação da atividade da β -amilase

A atividade da β -amilase foi mensurada depois da inativação da atividade da α -amilase, por meio de pH ácido (pH 3,4), com EDTA 0,1 M. Dois mL de tampão citrato (pH 3,4), contendo 2% de amido (p/v) foram adicionados a 0,7 mL do extrato enzimático tratado com EDTA mM em um tubo de ensaio. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 30°C. Foram adicionados 2 mL de reagente contendo 1 g de ácido 3',5-dinitrosalicílico, em 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, e 30 g de tartarato de sódio e potássio em 100 mL de água destilada, para a paralisação da reação. A mistura foi aquecida a 50°C

durante 5 minutos e então acrescentou-se água destilada até completar 10 mL. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

A atividade da α e da β -amilase foram expressas em unidades mg^{-1} de proteína, sendo que, uma unidade equivale à liberação de um miligrama de maltose do amido, por minuto pela enzima. A quantidade de proteínas solúveis nas sementes foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão.

Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade de enzimas antioxidativas

Para a obtenção dos extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da superóxido dismutase (SOD), as sementes foram liofilizadas e, posteriormente, macerados cerca de 0,3 g de sementes. Foram então adicionados 2 mL de meio de homogeneização, tampão fosfato de potássio 0,1M, pH6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 g por 15 min, a 4 °C.

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

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

Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a 25°C, foi medido o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

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

Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1,0 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm, à 25°C, durante o primeiro minuto de reação (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Liberação de ânion superóxido

Amostras de 0,2 g de sementes foram cortadas em pequenos segmentos e incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM , e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001) em tubos, tipo “penicilina”, hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, utilizando-se seringa

cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 1 minuto. Os segmentos foram removidos e, a partir do segundo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância a 480 nm, durante 1 minuto. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem material vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridoovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris, 1984).

Quantificação do peróxido de hidrogênio

Amostras de 0,2 g de sementes, trituradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a 10.000 g, por 15 min, 4°C, e coleta do sobrenadante (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 30 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. A determinação da absorvância a 560 nm e a quantificação de H_2O_2 foi realizada com base em curva de calibração, com a utilização de concentrações de peróxido como padrão. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

Avaliação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,3 g de sementes foram homogeneizadas com 2 mL de TCA 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 g, por 15 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5mL de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 30 min, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 min. A leitura da absorvância foi realizada a 532 nm e 600 nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} (Heath e Packer, 1968).

Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias dos

tratamentos foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade e as médias dos lotes foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de ervilha dos lotes 1, 2 e 3 apresentavam germinação inicial de 95, 86 e 70%, respectivamente. O ON não promoveu aumento significativo na germinação de nenhum dos lotes (Figura 1A). Contudo, quando as sementes foram embebidas em solução de SNP, houve acréscimo significativo de 16 e 50% nos valores de primeira contagem de germinação das sementes dos lotes 2 e 3 (Figura 1B), de 12, 10 e 26% no índice de velocidade de germinação para os lotes 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 1C) e de 11% para os lotes 1 e 2, e de 20% para o lote 3 no teste de frio (Figura 1D).

Verifica-se, então, que o ON apesar de não ter promovido aumento significativo na germinação das sementes de ervilha, contribuiu para melhorar a velocidade de germinação (Figuras 1B e 1C) e o desempenho das sementes submetidas a condições de estresse sob baixa temperatura, conforme resultados do teste de frio (Figura 1D). A aplicação de ON também aumentou a velocidade de germinação em Fabaceae como a *Plathymenia reticulata* em que, a pré-embebição das sementes durante 24 horas em solução de nitroprussiato de sódio (SNP; 10 μ M), promoveu aumento de 155% no IVG (Pereira et al., 2010). Kopyra e Gwózdź (2003) observaram que em sementes *Lupinus luteus*, a aplicação do ON aumentou em 20 a 40% a germinação depois de 18 e 24 horas. Contudo, após 48 horas a germinação se igualou em todas as concentrações testadas, com exceção da maior concentração (1000 μ M).

Na Figura 2A e B, verifica-se que não houve diferença significativa no crescimento de hipocótilo e de radícula entre os tratamentos no lote 1. Entretanto, o hipocótilo das plântulas oriundas de sementes tratadas com SNP do lote 2 e 3 foram respectivamente 8% e 46% maiores que as do controle, assim como a radícula das plântulas oriundas do lote 3 foi 48% maior para as sementes tratadas. As sementes tratadas com SNP originaram plântulas com maior matéria seca no hipocótilo em todos os lotes, sendo o acúmulo, em média, 20% maior quando comparadas ao controle, assim como a quantidade de matéria seca na radícula nos lotes 2 e 3 que também obtiveram maior acúmulo de massa seca (14 e 41%, respectivamente).

Segundo Amooghaie e Nikzad (2013), o ON induziu o crescimento das plântulas de tomate devido ao provável aumento da divisão e alongamento celular. Porém, Fernández-Marcos et al. (2012), estudando diretamente os efeitos do ON no crescimento de *Arabidopsis*, constataram que o ON afeta o meristema apical e o alongamento das células radiculares, inibindo o crescimento das radículas, sugerindo que, o maior

desenvolvimento das plântulas não foi devido ao efeito do ON sobre divisão e alongamento celular.

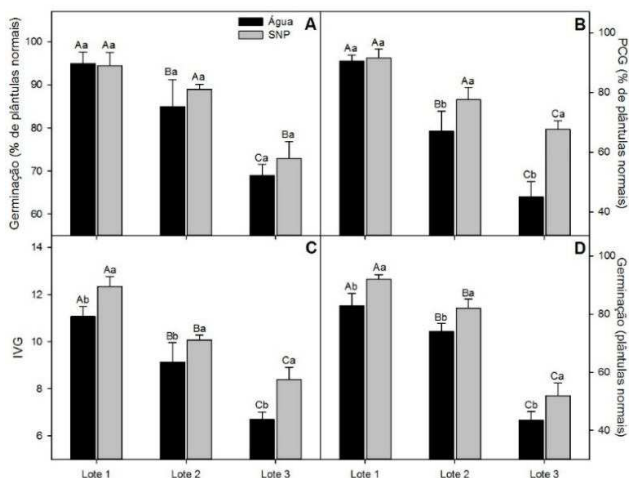


Figura 1. Percentagem de germinação (A), primeira contagem de germinação (B), índice de velocidade de germinação (C) e percentagem de germinação no teste de frio (D) de três lotes de sementes de *Pisum sativum* submetidas ou não à aplicação de SNP 50 μ M.

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre os lotes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre os tratamentos pelo teste F a 5% de probabilidade

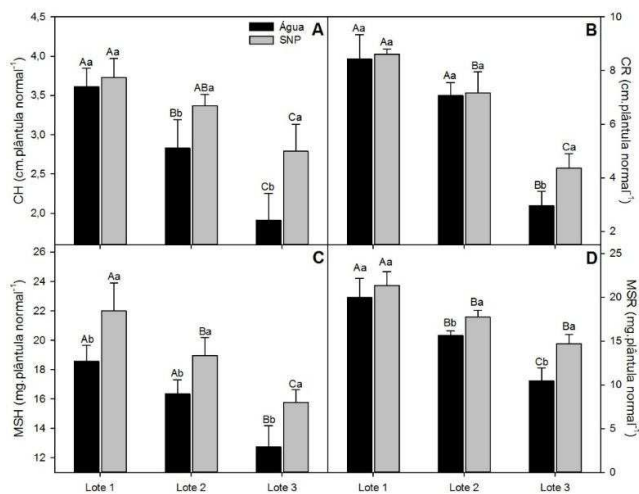


Figura 2. Comprimento de hipocótilo (A), comprimento de radícula (B), massa seca de hipocótilo (C) e massa seca de radícula (D) de plântulas provenientes de três lotes de sementes de *Pisum sativum* submetidas ou não à aplicação de SNP 50 μ M.

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre os lotes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre os tratamentos pelo teste F a 5% de probabilidade

O tratamento com ON aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidativas ao longo da germinação das sementes em todos os três lotes. As sementes tratadas apresentaram, no sétimo dia de germinação, maior atividade de todas as enzimas estudadas, quando comparadas ao controle. Houve aumento da atividade da SOD de 20, 40 e 37% (Figura 3A, B e C), da CAT de 19, 28 e 52% (Figura 3D, E e F), da APX de 34, 47 e 47% (Figura 4A, B e C) e da POX de 35, 27 e 26% (Figura 4D, E e F) nas sementes dos lotes 1, 2 e 3, respectivamente.

O conteúdo de H_2O_2 e a liberação de O_2^- foram menores ao longo da germinação nas sementes tratadas. A liberação de O_2^- teve um comportamento diferente ao longo do tempo. Em geral, houve aumento até o quarto dia e queda a partir de então. O tratamento com SNP reduziu a liberação de O_2^- em 34, 39 e 63%, no quarto dia e em 60, 65 e 33% no último dia de germinação para os lotes 1, 2 e 3 respectivamente. (Figura 5A, B e C). Durante a germinação, o H_2O_2 foi crescente. Contudo, a aplicação de SNP fez com que o conteúdo dessa ERO fosse reduzido, se comparado ao controle. No sétimo dia de germinação, a redução no conteúdo de H_2O_2 foi de 32, 34 e 35% para os lotes 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 5D, E e F).

Assim como o conteúdo de H_2O_2 , o conteúdo de MDA foi crescente durante o processo de germinação das sementes em todos os lotes; porém, houve maior peroxidação de lipídeos nos lotes menos vigorosos (2 e 3), tanto nas sementes tratadas como no controle. Sementes não tratadas dos lotes 1, 2 e 3 tiveram aumento de 165, 240 e 306%, respectivamente, no conteúdo de MDA, durante todo o período avaliado. O tratamento com SNP foi capaz de diminuir a peroxidação de lipídeos nas sementes de todos os lotes, apresentando valores crescentes durante todo o período avaliado de 140, 175 e 211% para os lotes 1, 2 e 3, respectivamente. A aplicação de SNP foi mais eficiente na conservação das membranas das sementes dos lotes de menor vigor, apresentando diferenças no conteúdo de MDA de 25, 65 e 95 pontos percentuais em relação ao controle nos lotes 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 6A, B e C).

Segundo Zheng et al (2009), a aplicação de doadores de ON pode ser efetivo na proteção de sementes em germinação, devido à maior proteção contra o estresse oxidativo. Yao et al (2012) observaram que há queda significativa na germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas oriundas de sementes de ervilha envelhecidas. Estes pesquisadores relacionaram a queda da germinação e do desenvolvimento inicial das plântulas ao substancial decréscimo na transcrição de genes relacionados a síntese de enzimas do aparato antioxidativo.

Xu et al (2011) e Zheng et al (2009), estudando os efeitos do ON em sementes de trigo, observaram que houve maior atividade das enzimas antioxidativas e menor conteúdo de EROs, além de menor peroxidação de lipídeos o que favoreceu a germinação. Lin et al (2012) observaram maior crescimento do hipocótilo e da radícula de plântulas de abóbora em presença de ON devido à maior atividade da CAT, SOD e APX e redução da concentração de H_2O_2 e de peroxidação de lipídeos.

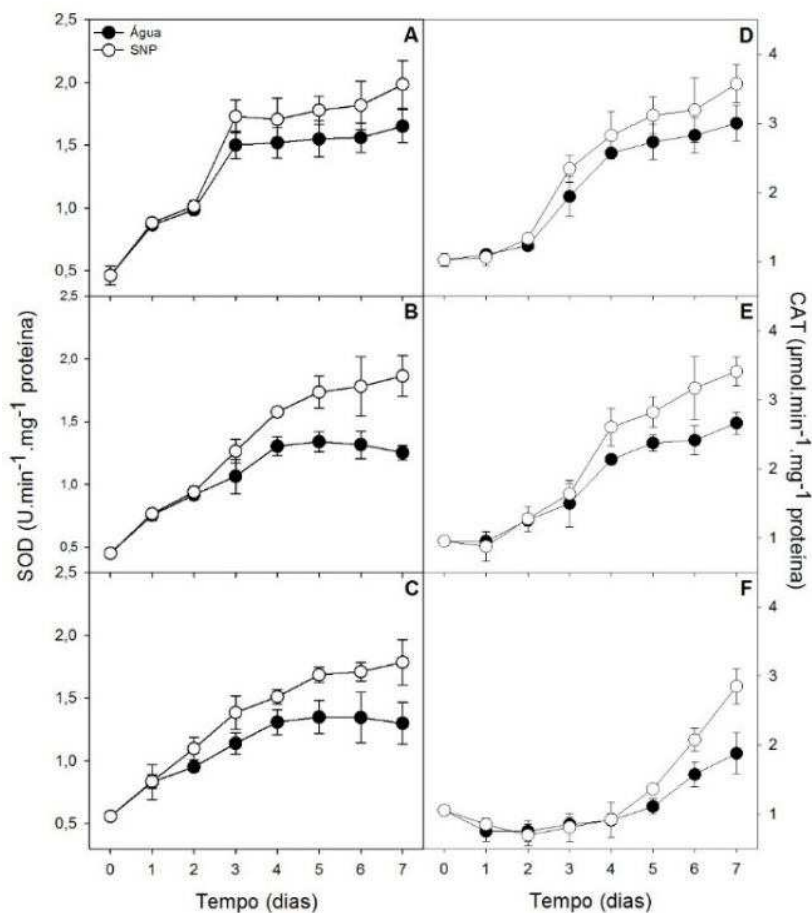


Figura 3. Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F, respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μM.

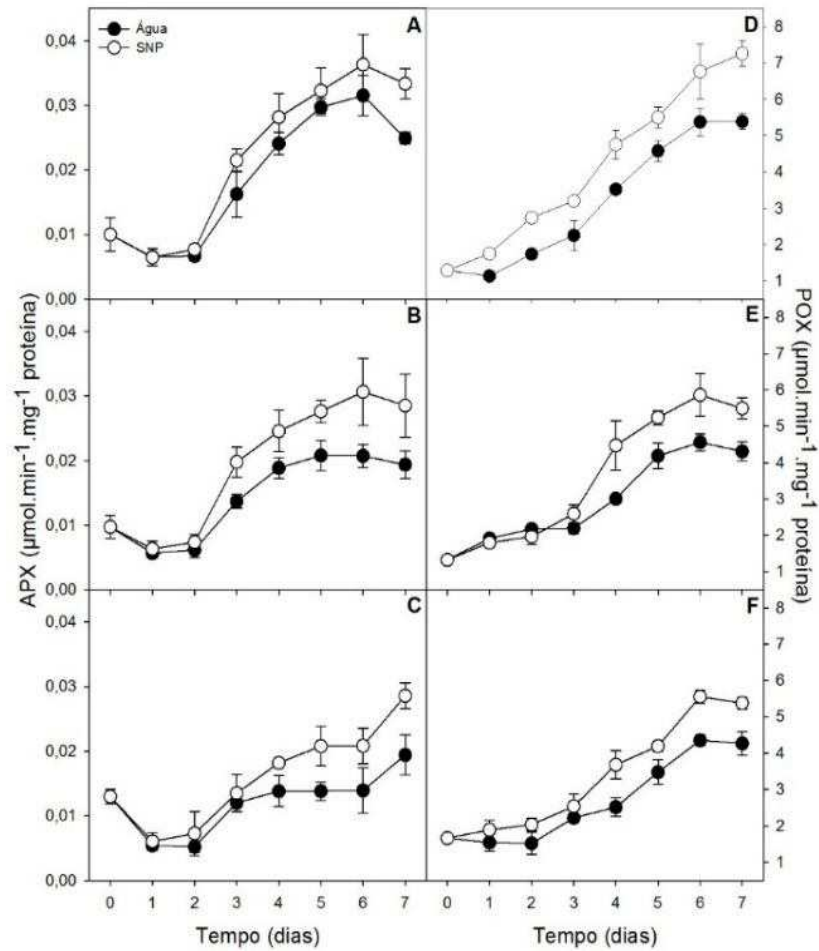


Figura 4. Atividade da peroxidase do ascorbato e das peroxidases totais durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.

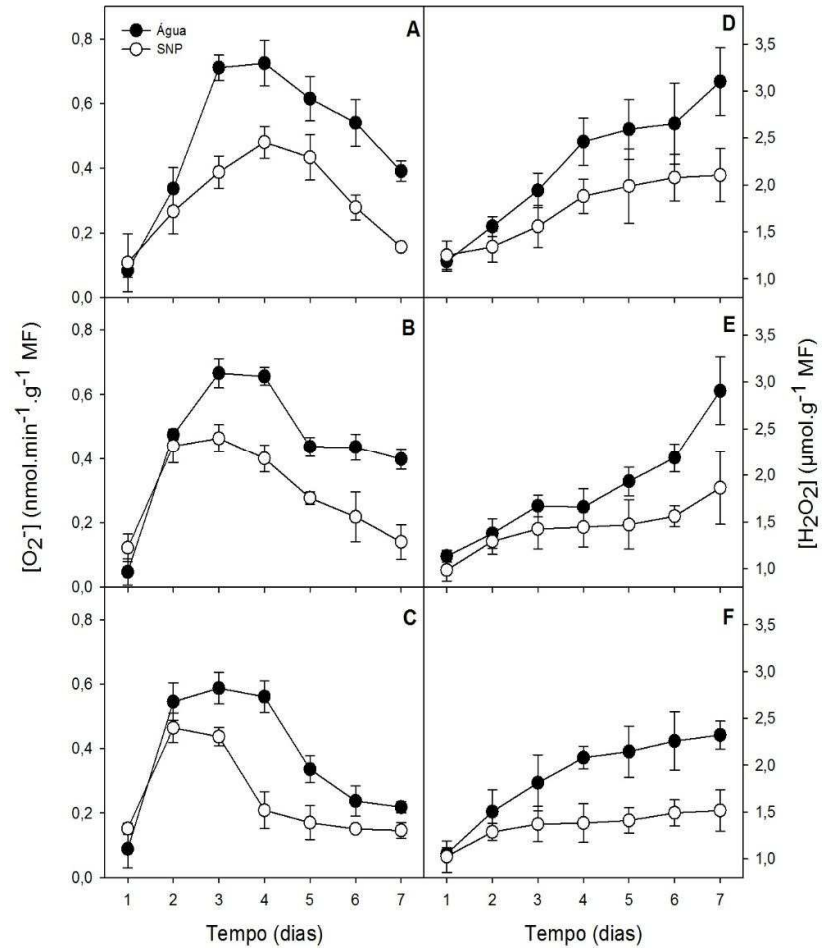


Figura 5. Liberação ânion superóxido e conteúdo de peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F, respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μM .

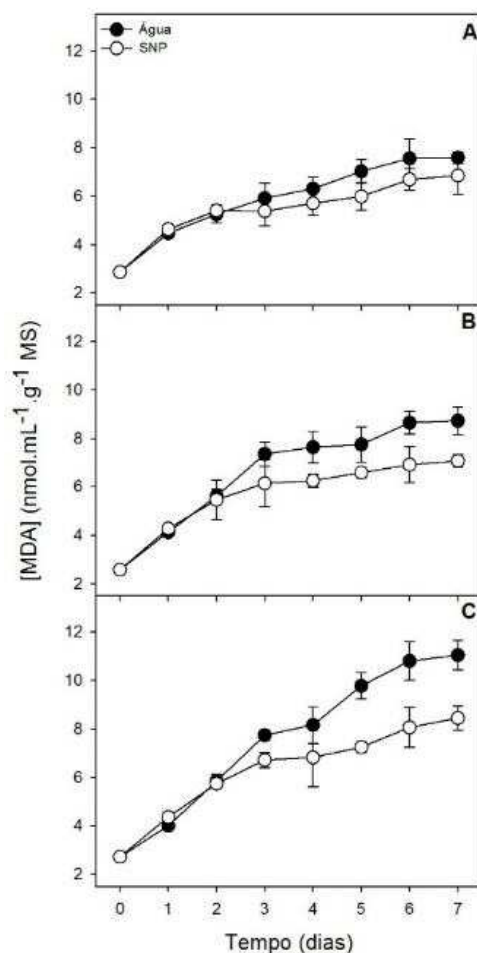


Figura 6. Conteúdo de malonaldeído durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C, respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.

Os açúcares solúveis são carboidratos prontamente disponíveis que servem como fonte energética e fonte de carbono para o perfeito funcionamento metabólico que ocorre durante a embebição das sementes, estimulando a germinação das sementes e o desenvolvimento inicial das plântulas. Para que ocorra um fornecimento adequado de açúcares solúveis para o eixo embrionário é necessário que haja a hidrólise do amido por meio da atividade das amilases (Kumari et al., 2010; Sfaxi-Bousbih et al., 2010).

A atividade das enzimas α e β -amilase apresentaram comportamento semelhante em todos os lotes e tratamentos; porém, os maiores valores foram obtidos nos lotes 1 e 2, tanto no controle, como nas sementes tratadas quando comparadas ao lote 3. A aplicação de SNP promoveu maior atividade da α -amilase em todos os lotes, apresentando aumento de 19% nos lotes 1 e 3, e de 16% para, o lote 2, ao sétimo dia de avaliação (Figura 7A, B e C). O tratamento com SNP também foi eficaz no aumento da atividade da β -amilase,

acrescendo 20, 39 e 32% no sétimo dia de avaliação nos lotes 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 7D, E e F).

O aumento da atividade da α e da β -amilase devido a aplicação de liberadores de ON durante a germinação também foi observado em outros trabalhos realizados com sementes de trigo (Hu et al., 2007 e Zheng et al., 2009) e de tomate (Amooaghaie e Nikzad, 2013), o que confirma a hipótese de que o ON aumenta a atividade das amilases nas sementes, facilitando a conversão do amido em açúcares solúveis.

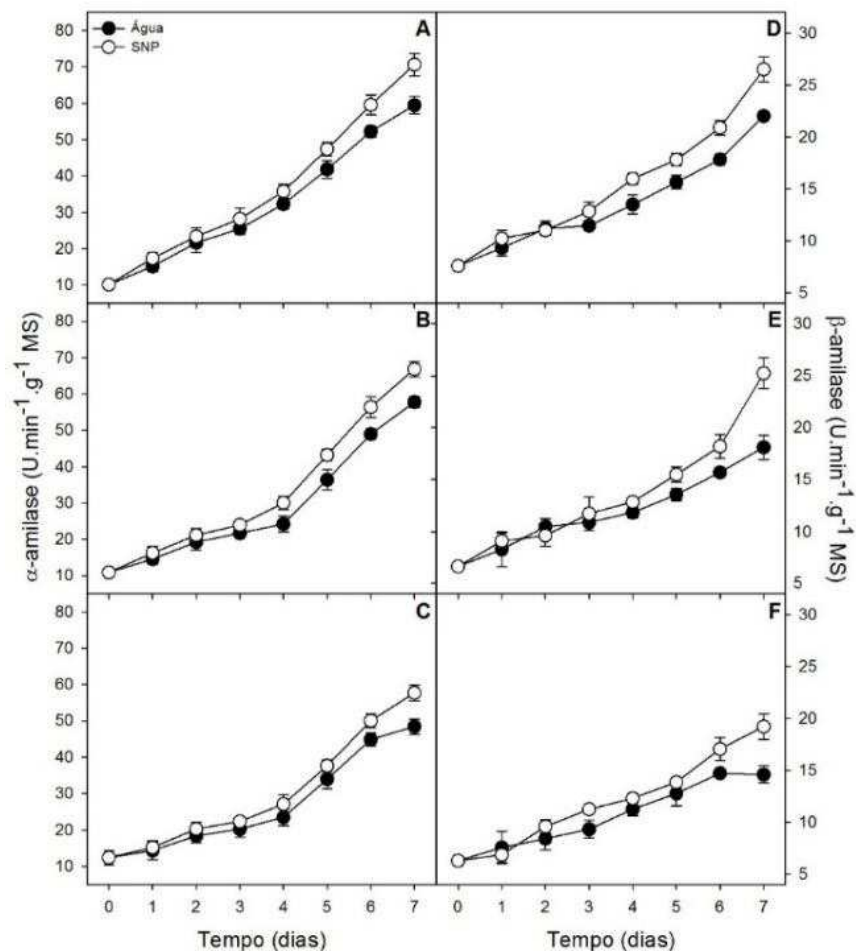


Figura 7. Atividade enzimática da α -amilase e da β -amilase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 (A, B e C e D, E e F respectivamente) de *Pisum sativum* submetidos ou não à aplicação de SNP 50 μ M.

Observa-se que os lotes com menor potencial fisiológico (lote 2 e 3) apresentam melhor resposta à aplicação do SNP, fato esse, comprovado pelos valores mais altos obtidos nos testes de PC, IVG, TF, CH, CR e MSR (Figura 1 e 2), nos tratamentos com SNP em relação ao controle. Diferenças mais pronunciadas entre os tratamentos também foram encontradas na atividade das enzimas antioxidativas, SOD, CAT e APX (Figura 3

e 4), na liberação de O_2^- , no conteúdo de H_2O_2 (Figura 5) e no conteúdo de MDA (Figura 6) nos lotes de menor vigor, o que sugere que sementes de maior vigor apresentam sistema antioxidativo mais eficiente.

CONCLUSÕES

Não houve aumento na germinação das sementes de ervilha com a aplicação do nitroprussiato de sódio, contudo, houve aumento no vigor.

A aplicação de nitroprussiato de sódio é mais eficaz em sementes de menor potencial fisiológico.

O óxido nítrico promove maior atividade das enzimas α e β -amilase, além das enzimas do aparato antioxidativo, favorecendo o processo germinativo das sementes devido à menor peroxidação de lipídeos.

O óxido nítrico apresenta potencial para ser utilizado no tratamento de sementes de ervilha visando aumento do vigor das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOOAGHAIE, R.; NIKZAD, K. The role of nitric oxide in priming-induced low-temperature tolerance in two genotypes of tomato. **Seed Science Research**, v.23, p.1-9, 2013.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, p.93-107, 2010.
- BARROS, A. S. R.; DIAS, M. C. L. L.; CICERO, S. M.; KRZYZANOWSKI, F. C. Testes de frio. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 5, p.1-15.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.
- BELIGNI, M.; FATH, A.; BETHKE, P.C.; LAMATTINA, L.; JONES, R.L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.
- BELIGNI, M.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide stimulates seed germination and cotyledon elongation, and inhibits hypocotyls elongation. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.
- BETHKE, P.C.; GUBLER, F.; JACOBSEN, J.V.; JONES, R.L. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, v.219, p.847-855, 2004.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.3, p.517-526, 2006.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, W. W. M.; NONOGAKI, H. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3^a ed. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. New York, 2013. 392p.
- BÖHM, F.M.L.Z.; FERRARESE, M.L.L.; ZANARDO, D.I.L.; MAGALHAES, J.R.; FERRARESE FILHO, O. Nitric oxide affecting root growth, lignification and related enzymes in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32. p.1039-1046, 2010.
- BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods in Enzymology**. v.105, p.429-435, 1984.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 2009. 399p.

- BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1995.
- CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v.218, p.900-905, 2004.
- DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.
- EDERLI, L.; MORETTINI, R.; BORGOGNI, A.; WASTERACK, C.; MIERSCH, O.; REALE, L.; FERRANTI, F.; TOSTI, N.; PASQUALINI, S. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. **Plant Physiology**, v.142, p.595-608, 2006.
- FERNÁNDEZ-MARCOS, M.; SANZ, L.; LEWIS, D. R.; MUDAY, G. K.; LORENZO, O. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v.108, p.18506-18511, 2011.
- GABALDÓN, C.; ROS, L.V.G.; PEDREÑO, M.A.; BARCELÓ, A.R. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. **New Phytologist**, v.165, p.121-130, 2005.
- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology**, v.126, p.1196-1204, 2001.
- GAY, C.; GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v.284, p.217-220, 2000.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GIBA, Z.; GRUBIŠIĆ, D.; TODORVIĆ, S.; SAJC, L.; STOJAKOVIĆ, Đ.; KONJEVIĆ, R. Effect of nitric oxide – releasing compounds on phytochrome – controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.175-181, 1998.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archieve Biochemistry and Byophysics**, v.125, p.189-198, 1968.
- HU, K.; HU, L.; LI, Y.; ZHANG, F.; ZHANG, H. Prprotective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. **Plant Growth Regulation**, v.53, p.173-183, 2007.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- KISHREKUMAR, A.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; SRIDHARAN, R.; MURALI, P.V.; PANNEERSELVAM, R. Comparative effects of different triazole compounds on antioxidant metabolism of *Solenostemom rotundifolius*. **Colloids and Surfaces**, v.62, p.307-311, 2008.
- KOPYRA, M.; GWÓŹDŹ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1011-1017, 2003.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.
- KRANNER, I.; ROACH, T.; BECKETT, R. P.; WHITAKER, C.; MINIBAYEVA, F. V. Extracellular production of reative oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p.805-811, 2010.
- KUMARI, A.; SINGH, V. K.; FITTER, J.; POLEN, T.; KAYASTHA, A. M. α -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds – Purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. **Phytochemistry**, v.71, p.1657-1666, 2010.
- KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v.46, p.149-152, 2003.
- LIBOUREL, I.G.L.; BETHKE, P.C.; MICHELE, R.; JONES, R.L. Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds - use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. **Planta**, v.223, p.813-820, 2006.
- LIN, Y.; LIU, Z.; SHI, Q.; WANG, X.; WEI, M.; YANG, F. Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v.142, p.118-127, 2012.
- LIU, H.Y.; YU, X.; CUI, D.Y.; SUN, M.H.; SUN, W.N.; TANG, Z.C.; KWAK, S.S.; SU, W.A. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell Research**, v.17, p.638-649, 2007.
- LOMBARDO, M.C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J.C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signaling & Behavior**, v.1, p.28-33, 2006.
- MAGUIRE, J.D. Seeds germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176, 1962.

- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ: Piracicaba, 2005. 495p.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v.246, p.6886-6890, 1971.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.
- MOHAMMADI, M.; KARR, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.1023-1029, 2001.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 2, p.1-24.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.
- ÖTVÖS, K.; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZÚCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. **Plant Journal**, v.43, p.849-860, 2005.
- PAGNUSSAT, G.C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiology**, v.129, p.954-956, 2002.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.
- PEREIRA, B. L. C.; BORGES, E. E. L.; OLIVEIRA, A. C.; LEITE, H. G.; GONÇALVES, J. F. C. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Florestalis**, v.38, p.629-636, 2010.
- SARATH, G.; BETHKE, P.C.; JONES, R.; BAIRD, L.M.; HOU, G.; MITCHELL, R.B. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, v.223, p.1154-1164, 2006.
- SFAXI-BOUSBIH, A.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. E. Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1123-1129, 2010.
- SINGH, V. P.; SRIVASTAVA, P. K.; PRASAD, S. M.; Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged *Luffa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.71, p.155-163, 2013.
- TÁRRAGO, J.F.; NICOLÁS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. **Plant Physiology**, v.58, p.618-621, 1976.

- TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. **Plant Cell Reports**, v.27, p.171-181, 2008.
- UCHIDA, A.; JAGENDORF, A.T.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v.163, p.515-523, 2002.
- VELIKOVA, V.; PINELLI, P.; PASQUALINI, S.; REALE, L.; FERRATI, F.; LORETO, F. Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves to elevated ozone. **New Phytologist**, v.166, p.419-426, 2005.
- WANG, Y.S.; YANG, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Cassia tora* L.. **Plant and Cell Physiology**, v.46, p.1915-1923, 2005.
- XU, S.; LOU, T.; ZHAO, N.; GAO, Y.; DONG, L.; JIANG, D.; SHEN, W.; HUANG, L.; WANG, R. Presoaking with hemim improves salinity tolerance during wheat seed germination. **Acta Physiologica Plantarum**, v.33, p.1173-1183, 2011.
- YAO, Z.; LIU, L.; GAO, F.; RAMPITSCH, C.; REINECKE, D. M.; OZGA, J. A.; AYELE, B. T. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p.1477-1488, 2012.
- ZHANG, H.; SHEN, Q.B.; ZHANG, W.; XU, L.L. A rapid response of β -amilase to nitric oxide but not gibberellins in wheat seeds during the early stage of germination. **Planta**, v.220, p.708-716, 2005.
- ZHANG, H.; SHEN, W.B.; XU, L.L. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress. **Acta Botanica Sinica**, v.45, p.901-905, 2003.
- ZHAO, M.G.; TIAN, Q.Y.; ZHANG, W.H. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.144, p.206-217, 2007
- ZHENG, C.; JIANG, D.; LIU, F.; DAI, T.; LIU, W.; JING, Q.; CAO, W. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.222-227, 2009.

Capítulo II. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ERVILHA (*Pisum sativum* L.) SOB ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO – A embebição das sementes é essencial para a retomada das atividades metabólicas e início dos eventos celulares após a maturidade, desempenhando papel fundamental no processo germinativo. A restrição hídrica às sementes pode acarretar diversos processos naturais como aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), consequentemente aumentando o estresse oxidativo. O óxido nítrico (ON) tem ação em diversos eventos nos vegetais. Nas sementes, o ON é capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidativas e das amilases. A influência do ON em sementes sob estresse hídrico ainda não está elucidada, assim, o objetivo deste estudo foi verificar a influência do ON na germinação de sementes de ervilha sob estresse hídrico. Para tanto, sementes de ervilha foram semeadas em substrato umedecido com água (controle), solução de polietilenoglicol (PEG 6000; -0,15 MPa) e solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa; 50 μ M). Foram determinados os seguintes parâmetros: germinação, primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de hipocótilo (CH) e radícula (CR) e massa seca de hipocótilo (MSH), radícula (MSR) e cotilédone (MSC), além de quantificar a atividade da α e da β -amilase, das enzimas antioxidativas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases totais (POX), peroxidação de lipídeos através conteúdo de malonaldeído (MDA), de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a liberação de ânion superóxido (O_2^-). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O estresse hídrico reduz a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, assim como a atividade das amilases e das enzimas do aparato antioxidativo. O ON aumentou a germinação, a PG e o IVG das sementes de ervilha sob estresse hídrico. Apesar do ON não aumentar CH e o CR, houve maior acúmulo de MSC e MSR. A atividade da α e da β -amilase, das enzimas antioxidativas foi aumentada com a aplicação de ON e, consequentemente, diminuiu a liberação O_2^- , a quantidade de H_2O_2 e a peroxidação de lipídeos.

Palavras-chave: SNP, germinação, EROs, estresse oxidativo, restrição hídrica.

Chapter II. NITRIC OXIDE EFFECT DURING THE GERMINATION OF PEA SEEDS (*Pisum sativum* L.) UNDER WATER STRESS

ABSTRACT – The seeds imbibition is essential for the metabolic activities resumption and the early cellular events after the seeds maturity, playing a fundamental function in the germination process. Water restriction for the seeds can lead several natural process like increase the reactive oxygen species (ROS), consequently increasing the oxidative stress. The nitric oxide (NO) acts in several plants events. In seeds, the NO can increase the antioxidative and amylases enzymes activity. How the NO influence the seeds under water stress is not yet elucidated, so, this research aimed to evaluate the influence of NO in the germination of pea seeds under water stress. Therefore, pea seeds were sown in a substrate with water (control), polietilenoglicol solution (PEG 6000; -0,15 MPa) and PEG 6000 + SNP solution (-0,15 MPa; 50 μ M). It were determined the following parameters: germination (G), first count of germination (PC), speed germination index (IVG), hipocotyl length (CH), radicle length (CR), dry mass of hipocotyl (MSH) and dry mass of radicle (MSR), besides qualifying the α and β -amylase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and total peroxidase (POX) activity, lipid peroxidation by the malonaldehyde content (MDA), hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion liberation (O_2^-). It was adopted the completely randomized design with four replicates. The data were subjected to variance analysis and the means were analyzed by Tukey test at 5% of probability. The water stress decrease the seed germination, the initial seedling development, the amylases and the antioxidative enzymes activity. The NO increase the pea seeds germination, the PC and the IVG, under water stress. The NO does not increase the CH and CR, but increase the MSC and MSR. The α and β -amylase and antioxidative enzymes activity were increased in the NO presence and consequently there were less O_2^- liberation, less H_2O_2 content and less lipid peroxidation.

Keywords: SNP, germination, ROS, oxidative stress, water restriction.

INTRODUÇÃO

A embebição das sementes é essencial para a retomada das atividades metabólicas e início dos eventos celulares após a maturidade, desempenhando papel fundamental no processo germinativo (Marcos Filho, 2005; Bewley et al., 2013).

O processo de embebição das sementes em água, normalmente, apresenta um padrão trifásico. Em geral, há uma fase de rápida absorção de água (fase I), que é regida pelo potencial matricial (Ψ_m) da semente seca e dependente apenas da ligação entre a água e a matriz da semente (Bewley et al., 2013).

O potencial osmótico (Ψ_o) é responsável pelo contínuo ganho de água pela semente após as matrizes atingirem a hidratação plena. A embebição é total ou parcialmente paralisada quando o potencial hídrico da semente (Ψ_{semente}) é balanceado pelo turgor, ou potencial de pressão (Ψ_p). Nessa etapa, o conteúdo de água na semente atinge um platô, mantido relativamente constante por um período conhecido como intervalo ou fase de preparação e ativação metabólica (fase II) (Castro et al, 2004; Marcos Filho, 2005).

Durante a fase II, são ativados os processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo. Nessa fase, há a restauração da integridade celular, reparo mitocondrial, aumento significativo da respiração, reparo e síntese de DNA, digestão das reservas e síntese de mRNAs associados à germinação (Bewley et al., 2013).

A disponibilidade hídrica é um dos fatores de maior relevância para uma germinação bem sucedida. À medida que a disponibilidade de água para a semente é reduzida, há redução da velocidade de germinação e retardamento do desenvolvimento das plântulas. Restrições mais severas passam a prejudicar a porcentagem final de germinação devido ao atraso ou a não ocorrência dos processos metabólicos necessários para a germinação (Rosseto et al., 1997; Braccini et al, 1998; Rahimi, 2013). Geralmente, a exposição das sementes ao estresse hídrico gera várias reações naturais nas sementes. Uma das consequências dessa exposição é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, conseqüentemente, podem causar estresse oxidativo afetando as estruturas e o metabolismo celular (Bartels e Sunkar, 2005; Wang et al., 2009).

O estresse oxidativo se dá devido à perda da capacidade da semente em manter a homeostase celular das EROs, ou seja, há um aumento na peroxidação de lipídeos e um declínio na atividade das enzimas sequestradoras das EROs (Yao et al., 2012). Um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo é o sistema de antioxidante que pode

ser enzimático ou não enzimático. O sistema antioxidativo enzimático requer várias enzimas que podem eliminar o excesso de EROs produzidas pela semente. A superóxido dismutase (SOD, catalase (CAT) e as peroxidases (APX e POX por exemplo) são algumas das enzimas antioxidativas existentes no reino vegetal. A SOD catalisa a conversão do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A CAT remove o H_2O_2 convertendo-o à água e oxigênio. As POX são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos como o ascorbato no caso da APX, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula receptora de elétrons. A peroxidação do substrato orgânico resulta na liberação de água (Zhang e Kirkham, 1996; Mittler, 2002).

O óxido nítrico (ON) é um radical livre de formação endógena em diversos sistemas biológicos, possui variadas funções fisiológicas e é, por si só, uma espécie reativa de nitrogênio, podendo afetar diferentes tipos de células tendo características protetoras ou tóxicas, dependendo da concentração. Em sistemas em que a toxicidade é predominantemente devido à presença e ação das EROs, o ON age quebrando a cadeia e limitando os danos causados por estes radicais livres (Lipton et al., 1993; Delledone et al., 1998; Beligni e Lamattina, 1999).

A aplicação de doadores de ON em vegetais vem sendo bastante explorada pela pesquisa, pois o ON é uma importante molécula sinalizadora, envolvida em diversas funções fisiológicas nas plantas, mediando diversas respostas dos vegetais a estresse bióticos e abióticos (Delledonne, 2005). O tratamento com ON é capaz de aumentar a germinação de sementes de trigo sob estresse salino (Zheng et al., 2009), estresse por metais pesados como arsênio (Singh et al., 2013), cobre (Hu et al., 2007), chumbo e cádmio (Kopyra e Gwózdź, 2003), além de aumentar o acúmulo de matéria seca em plântulas de milho (Zhang et al., 2006), e de abóbora, sob estresse salino (Fan et al., 2013), de trigo, sob estresse hídrico (Zhang et al., 2003), e de citros, sob níveis tóxicos de alumínio (Yang et al., 2012).

A ação do ON no aumento da tolerância dos vegetais à diferentes tipos de estresses vem sendo fortemente correlacionada à sua capacidade em proteger as células vegetais de danos decorrentes da oxidação. O ON promove maior transformação das EROs pelas enzimas do aparato antioxidativo, além de aumentar a disponibilidade de açúcares solúveis para o eixo embrionário, devido à maior hidrólise do amido pela ação das amilases. A influência do ON em sementes sob estresse hídrico ainda não está elucidada, logo, o objetivo neste estudo foi verificar a influência do ON na germinação de sementes de ervilha sob estresse hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Foram utilizadas sementes de ervilha Itapuã 600, produzidas pela empresa ISLA Sementes Ltda. As sementes foram distribuídas em rolos de papel filtro, tipo Germitest[®] umedecido com água (controle), solução de polietilenoglicol (PEG 6000; -0,15 MPa) e em solução de PEG 6000 com SNP (-0,15 MPa + 50 µM) na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Foram realizadas os seguintes testes e determinações:

Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram distribuídas em rolos de papel filtro, tipo Germitest[®], umedecido com água (controle) ou com solução de SNP 50 µM na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador na temperatura de 20°C. O resultado consistiu na percentagem de plântulas normais obtidas no oitavo dia após a semeadura, como descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Primeira contagem de germinação

Foi realizado juntamente com o teste de germinação, consistindo na percentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a semeadura, como determinado nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

Adotou-se a metodologia descrita acima para o teste de germinação, realizando-se avaliações diárias, à mesma hora, a partir do dia em que surgiram as primeiras plântulas normais. As plântulas normais foram computadas e retiradas do rolo até o oitavo dia após a semeadura (Brasil, 2009). Foi calculado o índice de velocidade de germinação empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$$

Onde: IVG = índice de velocidade de germinação;

G_1, G_2, G_n = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem;

N_1, N_2, N_n = Número de dias da sementeira à primeira contagem, à segunda contagem e à última contagem.

Comprimento de hipocótilo e radícula

As sementes, em quatro repetições de 10 sementes, foram semeadas de forma linear e equidistante em linha traçada no terço superior do papel toalha umedecido conforme descrito acima para o teste de germinação. Foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador a 20 °C. No oitavo dia após a sementeira foram efetuadas as medições do comprimento de hipocótilo e de radícula das plântulas normais com o auxílio de uma régua graduada em cm. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula (Nakagawa, 1999).

Massa seca de hipocótilo e radícula

Foi realizada conjuntamente com a determinação do comprimento de hipocótilo e radícula. As plântulas normais utilizadas na determinação do comprimento do hipocótilo e da radícula tiveram os seus cotilédones removidos. Os hipocótilos, as radículas e os cotilédones foram colocados separadamente em sacos de papel e colocados para secar em estufa de ar forçado, a 70 °C, até atingirem peso constante. Foram efetuadas pesagens e os resultados foram expressos em miligramas de hipocótilo ou radícula por plântula (Nakagawa, 1999).

Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade das amilases

As sementes foram colocadas para germinar como descrito acima para o teste de germinação. As 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a sementeira, foram retiradas amostras para a realização das determinações enzimáticas.

As amilases foram extraídas e quantificadas pelos métodos propostos por Kishorekumar et al. (2008) e Térrado e Nicolás (1976). Cerca de 1 g de material vegetal foi macerada em 10 mL de água gelada (4°C). O extrato foi centrifugado a 15.000 g a 4°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado para a quantificação da atividade da α e da β -amilase.

Determinação da atividade da α -amilase

Cinco mililitros do extrato enzimático foram misturados com 3 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) 3 mM, e incubados a 70°C, durante 5 minutos. Colocou-se em um tubo de ensaio, 0,7 mL do extrato ainda quente e 2 mL de tampão citrato 0,1 mM (pH 5,0) contendo 2% de amido (p/v). Os tubos foram incubados a 30°C, por 5 minutos e, posteriormente, a reação foi paralisada pela adição de 2 mL de um reagente contendo 1,0 g de ácido 3',5-dinitrosalicílico em 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, e 30 g de tartarato de sódio e potássio, em 100 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 50°C durante 5 minutos acrescentando-se, então, água destilada até completar 10 mL. A leitura da absorvância foi realizada através de espectrofotômetro a 540 nm.

Determinação da atividade da β -amilase

A atividade da β -amilase foi mensurada depois da inativação da atividade da α -amilase por meio de pH ácido (pH 3,4), com EDTA 0,1 M. Dois mL de tampão citrato (pH 3,4), contendo 2% de amido (p/v) foram adicionados a 0,7 mL do extrato enzimático tratado com EDTA mM em um tubo de ensaio. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 30°C. Foram adicionados 2 mL de reagente contendo 1 g de ácido 3',5-dinitrosalicílico, em 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, e 30 g de tartarato de sódio e potássio, em 100 mL de água destilada, para a paralisação da reação. A mistura foi aquecida a 50°C durante 5 minutos e então acrescentou-se água destilada até completar 10 mL. A leitura da absorvância foi realizada por meio de espectrofotômetro a 540 nm.

A atividade da α e da β -amilase foram expressas em unidades mg^{-1} de proteína, sendo que uma unidade equivale à liberação de um miligrama de maltose do amido por minuto pela enzima. A quantidade de proteínas solúveis nas sementes foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão.

Obtenção do extrato bruto para determinação da atividade de enzimas antioxidativas

Para a obtenção dos extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da superóxido dismutase (SOD), as sementes foram liofilizadas e, posteriormente,

macerados cerca de 0,3 g de sementes. Foram então adicionados 2 mL de meio de homogeneização, tampão fosfato de potássio 0,1M, pH6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 g por 15 min, a 4 °C.

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

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

Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Foi determinada atividade da catalase pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a 25°C, foi medido o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kare e Mishra, 1976). O incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C,

determinou a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada pela adição de $100 \mu\text{L}$ do extrato enzimático bruto a $2,9 \text{ mL}$ de meio de reação constituído de ácido ascórbico $0,8 \text{ mM}$ e H_2O_2 $1,0 \text{ mM}$, em tampão fosfato de potássio 50 mM , pH $6,0$. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm , à 25°C , durante o primeiro minuto de reação (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Liberação de ânion superóxido

Amostras de $0,2 \text{ g}$ de sementes foram cortadas em pequenos segmentos e incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) $100 \mu\text{M}$, β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) $20 \mu\text{M}$, e tampão de fosfato de sódio 20 mM , pH $7,8$ (Mohammadi e Karr, 2001) em tubos, tipo “penicilina”, hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de $100 \mu\text{L}$ de epinefrina $25,2 \text{ mM}$ em HCl $0,1 \text{ N}$, utilizando-se, seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28°C , sob agitação, por 1 minuto. Os segmentos foram removidos e, a partir do segundo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância a 480 nm , durante 1 minuto. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem material vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridoovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris, 1984).

Quantificação de peróxido de hidrogênio

Amostras de $0,2 \text{ g}$ de sementes, trituradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em $2,0 \text{ mL}$ de tampão fosfato de potássio 50 mM , pH $6,5$, contendo hidroxilamina 1 mM , seguido de centrifugação a 10.000 g , por 15 min , 4°C , e coleta do sobrenadante (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 30 μL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. A determinação da absorvância a 560 nm e a quantificação de H_2O_2 foi realizada com base em curva de calibração, com a utilização de concentrações de peróxido como padrão. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

Avaliação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,3 g de sementes foram homogeneizadas com 2 mL de TCA 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 g por 15 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 30 min, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 min. A leitura da absorvância foi realizada a 532 nm e 600 nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para quantificar-se a concentração dos peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} (Heath e Packer, 1968).

Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de ervilha germinaram com taxa de 98%, em condições ótimas (0,0 MPa), e de 63% sob restrição hídrica (PEG 6000 -0,15 MPa). Com aplicação de SNP, mesmo sob restrição hídrica, a germinação foi de 84% de plântulas normais, no oitavo dia após a semeadura (Figura 1A).

Pelos testes de vigor, PCG e IVG, observou-se que o estresse hídrico, além de afetar negativamente o vigor, diminui também a velocidade de germinação. Em condições ideais, a PCG foi de 96% e o IVG de 12,89, apresentando quedas significativas sob estresse hídrico, apresentando valores de 10,5% e 4,47, respectivamente. O ON foi capaz de reverter parcialmente a queda na PCG e no IVG provocada pelo estresse hídrico, obtendo-se valores superiores aos observados no tratamento com PEG a -0,15 MPa (Figura 1B e C).

A restrição hídrica reduziu a germinação das sementes de ervilha; entretanto, a germinação foi estimulada na presença do ON. Aparentemente, o ON aumentou o vigor das sementes e acelerou a emergência do hipocótilo e da raiz primária. Outros estudos também comprovaram o eficaz efeito do ON em promover a germinação de sementes de alface (Deng e Song, 2012), *Panicum virgatum* (Sarath et al., 2005), trigo sob estresse hídrico (Zhang et al., 2003) e salino (Zheng et al., 2009), e de tomate submetidas ao estresse térmico (Amooaghaie e Nikzad, 2013).

Na Figura 1D, verifica-se que sob estresse hídrico o comprimento do hipocótilo das plântulas diminuiu, apresentando valores 78% inferiores se comparados aos das plântulas que se desenvolveram em condições adequadas de disponibilidade hídrica. Já para o comprimento de radícula não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento de estresse hídrico (Figura 1E). A aplicação do ON não teve efeito sobre o comprimento das plântulas.

É possível observar na figura 1F e G que houve maior acúmulo de matéria seca nas plântulas do controle, que apresentaram valores de MSH de 18,32 mg plântula⁻¹ e de MSR de 20,24 mg plântula⁻¹. Quando submetidas ao estresse hídrico, houve redução de 70 e 55% respectivamente, naqueles valores. A aplicação do ON foi capaz de reverter a redução da MSH em 17% e não foi capaz de aumentar a MSR. Contudo, pela razão MSR/CR constata-se que o estresse hídrico prejudicou o acúmulo de matéria seca nas radículas, apresentando valores de 1,17 mg de MS cm⁻¹ de radícula nas plântulas sob estresse, se comparada a 1,97 mg de MS cm⁻¹, de radícula no controle e 1,81 mg de MS cm⁻¹ de radícula nas plântulas sob estresse e na presença do ON, o que significa queda

significativa de 41% e recuperação de 33 pontos percentuais. Por esses resultados observou-se que há maior translocação e fixação de assimilados pelo eixo embrionário, o que é reforçado pelos menores valores de MSC (Figura 1H) no controle e sob estresse hídrico com a presença do SNP.

Sob o estresse hídrico o crescimento radicular e de parte aérea das plântulas de ervilha foi reduzida. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com girassol (Kaya et al., 2006), feijão (Guimarães et al 1996), amendoim, gergelim e mamona (Pinto et al., 2008). Contudo, o estresse hídrico moderado (-0,2 a -0,4 MPa) é comumente relatado como estimulante ao crescimento radicular. Meneses e colaboradores (2011), estudando o desenvolvimento de plântulas de algodão durante a germinação, observaram que potencial hídrico de até -0,4 MPa foi capaz de estimular o crescimento radicular. Resultados semelhantes também foram encontrados em plântulas de feijão (Guimarães et al., 1996) e de arroz (Yuan-Yuan et al., 2010). Segundo Pace et al. (1999), esse comportamento é comum devido a necessidade de maior exploração do solo em busca de maior disponibilidade hídrica em camada mais profunda do solo.

A atividade das enzimas do aparato antioxidativo tiveram comportamento crescente ao longo da germinação das sementes de ervilha, apresentando valores, em média, 7, 4 e 6 vezes maiores no último dia de avaliação comparada ao tempo zero para o controle, para sementes submetidas ao estresse hídrico e para aquelas sob o estresse hídrico na presença do ON. A aplicação do ON aumentou a atividade enzimática do aparato antioxidativo durante a germinação das sementes submetidas ao estresse hídrico. Comparando-se apenas as sementes sob estresse hídrico em presença ou não do ON, é possível observar que o ON promoveu um aumento de 35, 22, 64 e 37% da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX, respectivamente, no sétimo dia de avaliação (Figura 2).

O conteúdo de H_2O_2 e a liberação de O_2^- foram menores ao longo de toda a germinação nas sementes tratadas com o ON. A liberação de O_2^- aumentou até o terceiro dia de germinação e, a partir de então, decresceu. No sétimo dia de avaliação, a liberação de O_2^- foi 61% menor nas sementes tratadas com ON, quando comparadas às sementes sob estresse sem SNP (Figura 3A). A concentração de H_2O_2 foi crescente durante todo o período avaliado, porém, a aplicação de SNP promoveu, no sétimo dia de avaliação, valores 22% menores nas sementes tratadas com ON quando comparadas às sementes sob estresse e sem a presença de ON (Figura 3B).

As concentrações de MDA foram crescentes durante toda a germinação e apresentou valores menores nas sementes tratadas com ON, o que indica que o SNP pode

ser efetivo na proteção de sementes em processo germinativo, devido à maior proteção contra o estresse oxidativo. No sétimo dia de avaliação, a concentração de MDA foi 25% inferior nas sementes tratadas com ON, quando comparadas às sementes sob estresse sem SNP (Figura 3C).

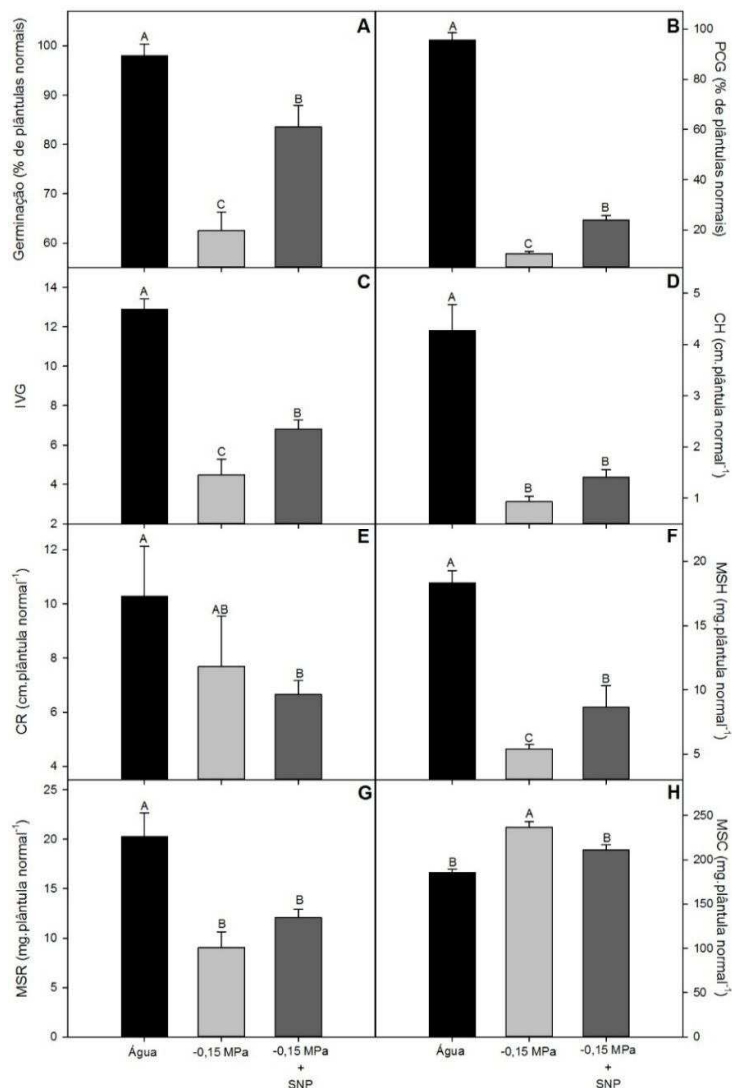


Figura 1. Porcentagem de germinação (A), primeira contagem de germinação (B) e índice de velocidade de germinação (C) de sementes, comprimento de hipocótilo (D), comprimento de radícula (E), massa seca de hipocótilo (F), massa seca de radícula (G) e massa seca de cotilédone (H) de plântulas de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μ M).

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

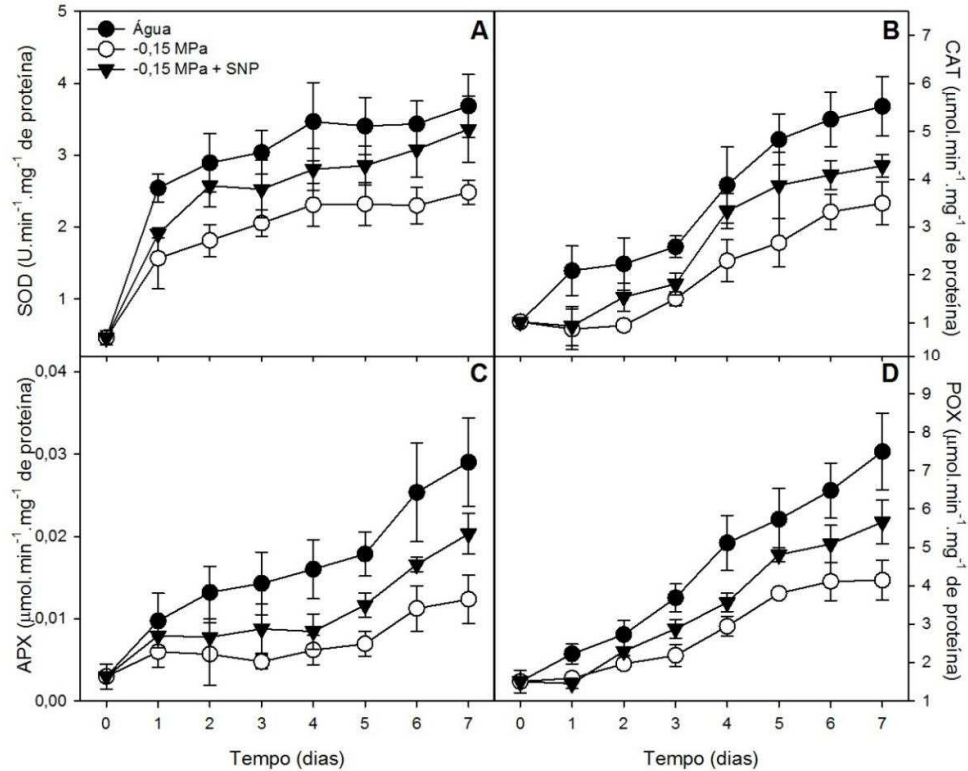


Figura 2. Atividade da superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase do ascorbato (C) e peroxidase (D) durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μM).

Segundo Tian e Lei (2006), o estresse hídrico pode causar danos oxidativos às células devido à excessiva geração de EROs. O acúmulo descontrolado de EROs é altamente tóxico às células, pois podem reagir com grande quantidade de biomoléculas, que resulta em estresse oxidativo, podendo causar danos celulares irreversíveis (Bailly, 2004).

No presente estudo, observa-se que o tratamento com o ON diminuiu significativamente a peroxidação de lipídeos, a concentração de H_2O_2 e a liberação de O_2^- nas sementes de ervilha, durante a germinação. Segundo Zhang e colaboradores (2003), o ON promove tolerância ao estresse hídrico devido ao estímulo à maior atividade das enzimas antioxidativas, proporcionando, então, maior proteção contra estresses oxidativos, durante o processo germinativo de sementes. A aplicação de doadores de ON também foi eficiente no aumento da tolerância ao estresse salino (Zheng et al., 2009; Xu et al., 2011), por calor (Song et al., 2006) e por metais pesados (Kopyra e Gwózdź, 2003; Hu et al., 2007), devido à maior atividade das enzimas do aparato antioxidativo.

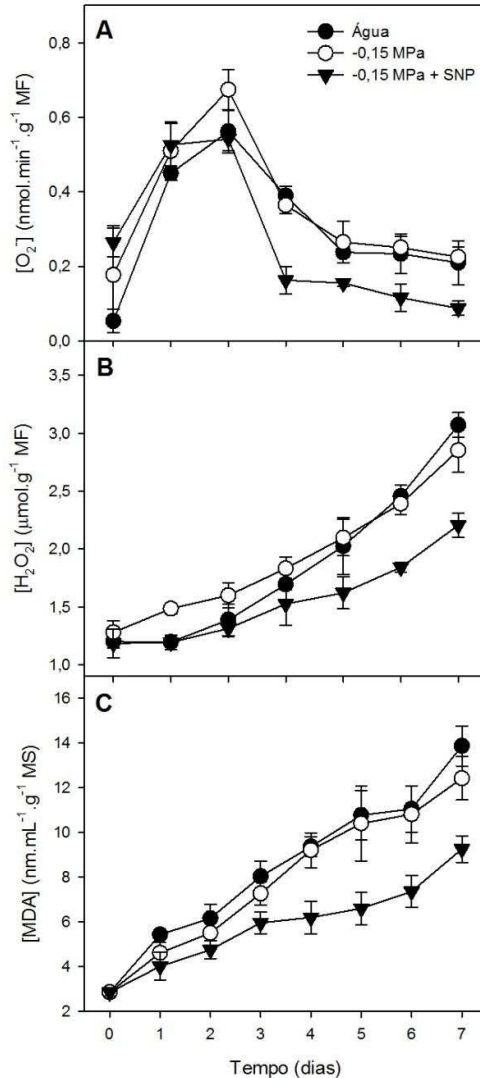


Figura 3. Liberação de ânion superóxido (A), conteúdo de peróxido de hidrogênio (B) e de malonaldeído (C) durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μM).

A atividade das enzimas α e β -amilase foi crescente ao longo do tempo, contudo, sementes sob estresse hídrico tiveram a atividade dessas enzimas reduzida, apresentando queda de 42% e 45% no sétimo dia de avaliação na α e β -amilase respectivamente, se comparadas ao controle. A aplicação de SNP reverteu parcialmente a queda na atividade dessas enzimas, permitindo a recuperação de 9 e 22 pontos percentuais da atividade da α -amilase e da β -amilase respectivamente.

A atividade das amilases é imprescindível para que haja a hidrólise do amido e abastecimento de açúcares solúveis para o eixo embrionário, durante a germinação de sementes (Kumari et al., 2010; Sfaxi-Bousbih et al., 2010). O efeito do ON no aumento

da atividade da α e da β -amilase durante a germinação de trigo (Zhang et al., 2005; Hu et al., 2007 e Zheng et al., 2009), de tremoço (Beligni et al., 2002) e de tomate (Amooaghaie e Nikzad, 2013) também foi relatado, corroborando a hipótese de que o ON aumenta a conversão do amido em açúcares solúveis através da maior atividade das amilases.

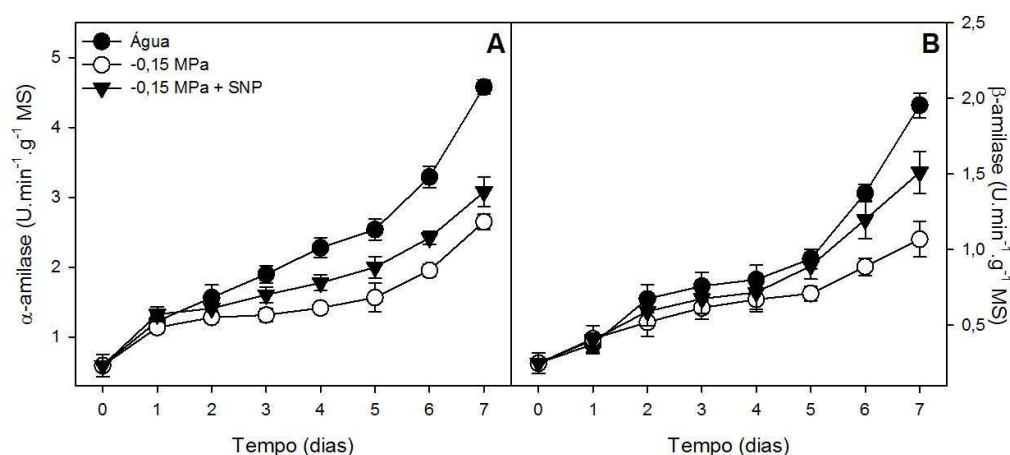


Figura 4. Atividade da α (A) e da β -amilase (B) durante a germinação de sementes de *Pisum sativum* submetidas à embebição com água (controle), solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa e 50 μ M).

Observa-se, no presente trabalho, que sementes submetidas ao estresse hídrico têm a atividade das enzimas do aparato antioxidativo reduzida, maior conteúdo de H_2O_2 , maior liberação de O_2^- e maior peroxidação de lipídeos. Além disso, há menor hidrólise de amido, avaliada pela atividade das amilases, quando comparadas às sementes submetidas a condições ótimas de embebição.

Tais alterações metabólicas acarretaram redução significativa da germinação das sementes e do desenvolvimento inicial das plântulas quando o estresse hídrico foi aplicado às sementes. Entretanto, o ON amenizou os danos causados pelo estresse hídrico, invertendo parcialmente todos parâmetros bioquímicos avaliados, o que proporcionou maior e mais rápida germinação além de maior desenvolvimento inicial das plântulas.

CONCLUSÕES

O estresse hídrico diminui a germinação e o vigor de sementes de ervilha, além de causar um desbalanço das espécies reativas de oxigênio, devido à menor atividade das enzimas antioxidativas, o que acarreta na maior peroxidação de lipídeos.

Com aplicação de nitroprussiato de sódio houve maior germinação e maior velocidade de germinação em sementes submetidas ao estresse hídrico.

A atividade das enzimas do aparato antioxidativo é maior quando as sementes germinam na presença de óxido nítrico, amenizando os danos causados pelo estresse hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOOAGHAIE, R.; NIKZAD, K. The role of nitric oxide in priming-induced low-temperature tolerance in two genotypes of tomato. **Seed Science Research**, v.23, p.1-9, 2013.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, p.93-107, 2010.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plants Science**, v.24, p.23-58, 2005.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.
- BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-344, 1999.
- BELIGNI, M.; FATH, A.; BETHKE, P.C.; LAMATTINA, L.; JONES, R.L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, W. W. M.; NONOGAKI, H. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*, 3^a ed. Springer, New York, 2013. 392p.
- BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods in Enzymology**, v.105, p.429-435, 1984.
- BRACCINI, A. L.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, C. S.; SEDIYAMA, T.; ROCHA, V. S. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1451-1459, 1998.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília, 2009. 399p.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1995.
- DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.
- DENG, Z.; SONG, S. Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the thermo-dormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. **South African Journal of Botany**, v.78, p.139-146, 2012.
- FAN, H.; DU, C.; GUO, S. Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. **Environmental and Experimental Botany**, v.86, p.52-59, 2013.
- GAY, C.; GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v.284, p.217-220, 2000.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.
- GUIMARÃES, C. M.; BRUNINI, O.; STONE, L. F. Adaptação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.393-399, 1996.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.
- HU, K.; HU, L.; LI, Y.; ZHANG, F.; ZHANG, H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. **Plant Growth Regulation**, v.53, p.173-183, 2007.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- KAYA, M. D.; OKÇU, G.; ATAK, M.; ÇIKILI, Y.; KOLSARICI, Ö. Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **European Journal of Agronomy**, v.24, p.291-295, 2006.
- KISHREKUMAR, A.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; SRIDHARAN, R.; MURALI, P.V.; PANNEERSELVAM, R. Comparative effects of different triazole compounds on antioxidant metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. **Colloids and Surfaces**, v.62, p.307-311, 2008.
- KOPYRA, M.; GWÓŹDŹ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1011-1017, 2003.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.
- KUMARI, A.; SINGH, V. K.; FITTER, J.; POLEN, T.; KAYASTHA, A. M. α -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds – Purification, characterization and

- sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. **Phytochemistry**, v.71, p.1657-1666, 2010.
- KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v.46, p.149-152, 2003.
- LIPTON, S. A.; CHOI, Y.; PAN, Z.; LEI, S. Z.; CHEN, H. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMIER, J. S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v.364, p.626-632, 1993.
- MAGUIRE, J.D. Seeds germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176, 1962.
- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ: Piracicaba, 2005. 495p.
- MENESES, C. H. S. G.; BRUNO, R. L. A.; FERNANDES, P. D.; PEREIRA, W. E.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Germination of cotton cultivar seeds under water stress induced by polyethyleneglycol-6000. **Scientia Agricola**, v.68, p.131-138, 2011.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v.246, p.6886-6890, 1971.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.
- MOHAMMADI, M.; KARR, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.1023-1029, 2001.
- 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.
- PACE, P. F.; CRALLE, H. T.; EL-HALAWANY, S. H. M.; COTHEN, J. T.; SENSEMAN, S. A. Drought-induced changes in shoot and root growth of young cotton plants. **Journal of Cotton Science**, v.3, p.183-187, 1999.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.
- PINTO, C. M.; TÁVORA, F. J. F. A.; BEZERRA, M. A.; CORRÊA, M, C, M. Crescimento, distribuição do Sistema radicular em amendoim, gergilim e mamona a ciclos de deficiência hídrica. **Revista Ciência Agronômica**, v.39, p.429-436, 2008.
- RAHIMI, A. Seed priming improves the germination performance of cumin (*Cuminum cyminum* L.) under temperature and water stress. **Industrial Crop and Products**, v.42, p.454-460, 2013.

- ROSSETTO, C. A. V.; NOVENBRE, A. D. L. C.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R.; NAKAGAWA, J. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. **Scientia Agricola**, v.54, p.97-105, 1997.
- SARATH, G.; BETHKE, P.C.; JONES, R.; BAIRD, L.M.; HOU, G.; MITCHELL, R.B. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, v.223, p.1154-1164, 2006.
- SFAXI-BOUSBIH, A.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. E. Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1123-1129, 2010.
- SINGH, V. P.; SRIVASTAVA, P. K.; PRASAD, S. M.; Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged *Luffa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.71, p.155-163, 2013.
- SONG, L.; DING, W.; ZHAO, M.; SUN, B.; ZHANG, L. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Science**, v.171, p.449-458, 2006.
- SUN, Y.; SUN, Y.; WANG, M.; LI, X.; GUO, X.; HU, R.; MA, J. Effects of seed priming on germination and seedling growth under water stress in rice. **Acta Agronomica Sinica**, v.36, p.1931-1940, 2010.
- TÁRRAGO, J.F.; NICOLÁS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. **Plant Physiology**, v.58, p.618-621, 1976.
- TIAN, X.; LEI, Y. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v.50, p.775-777, 2006.
- WANG, W.; KIM, Y.; LEE, H.; KIM, K.; DENG, X.; KWAK, S. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfafa under salt and drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.570-577, 2009.
- XU, S.; LOU, T.; ZHAO, N.; GAO, Y.; DONG, L.; JIANG, D.; SHEN, W.; HUANG, L.; WANG, R. Presoaking with hemim improves salinity tolerance during wheat seed germination. **Acta Physiologica Plantarum**, v.33, p.1173-1183, 2011.
- YANG, T.; QI, Y.; CHEN, L.; SANG, W.; LIN, X.; WU, Y.; YANG, C. Nitric oxide protects sour pummelo (*Citrus grandis*) seedling against aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v.82, p.1-13, 2012.
- YAO, Z.; LIU, L.; GAO, F.; RAMPITSCH, C.; REINECKE, D. M.; OZGA, J. A.; AYELE, B. T. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p.1477-1488, 2012.
- ZHANG, H.; SHEN, W.B.; XU, L.L. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress. **Acta Botanica Sinica**, v.45, p.901-905, 2003.

- ZHANG, H.; SHEN, W.; ZHANG, W.; XU, L. A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. **Planta**, v.220, p.708-716, 2005.
- ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. **New Phytologist**, v.132, p.361-373, 1996.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; WEI, Q.; ZHANG, W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedling through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. **Planta**, v.224, p.545-555, 2006.
- ZHENG, C.; JIANG, D.; LIU, F.; DAI, T.; LIU, W.; JING, Q.; CAO, W. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.222-227, 2009.

ANEXOS

Tabela 1. Germinação (GER); primeira contagem de germinação (PCG); índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de frio (TF) dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Lote/Trat	Testes							
	GER (%)		PCG (%)		IVG		TF (%)	
	Água	SNP	Água	SNP	Água	SNP	Água	SNP
1	95,00 Aa	94,50 Aa	90,50 Aa	91,50 Aa	11,07 Ab	12,35 Aa	83,00 Ab	92,00 Aa
2	85,00 Ba	89,00 Aa	67,00 Bb	77,50 Ba	9,13 Bb	10,07 Ba	74,00 Bb	82,00 Ba
3	69,00 Ca	73,00 Ba	45,00 Cb	67,50 Ca	6,68 Cb	8,40 Ca	43,50 Cb	52,00 Ca
CV (%)	4,25		5,79		5,11		4,68	

Tabela 2. Comprimento de hipocótilo (CH); comprimento de radícula (CR); massa seca de hipocótilo (MSH) e massa seca de radícula (MSR) dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Lote/Trat.	Determinações							
	CH (cm.plântula ⁻¹)		CR (cm.plântula ⁻¹)		MSH (mg.plântula ⁻¹)		MSR (mg.plântula ⁻¹)	
	Água	SNP	Água	SNP	Água	SNP	Água	SNP
1	3,61 Aa	3,73 Aa	8,43 Aa	8,61 Aa	18,56 Ab	21,99Aa	19,97 Aa	21,35 Aa
2	3,12 Bb	3,37 ABa	7,07Aa	7,17 Ba	16,36 Ab	18,96 Ba	15,61 Aa	17,74 Ba
3	1,91 Cb	2,79 Ca	2,95 Bb	4,37 Ca	12,75 Bb	15,78 Ca	10,44 Aa	14,70 Ba
CV (%)	9,52		9,55		7,48		8,35	

Tabela 3. Atividade da catalase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	1,02 Aa	0,95 Aa	1,06 Aa	6,08
	SNP	1,02 Aa	0,95 Aa	1,06 Aa	
1	Água	1,10 Aa	0,95 ABb	0,75 Bb	14,77
	SNP	1,06 Aa	0,88 Aa	0,85 Ba	
2	Água	1,23 Ab	1,26 Aa	0,75 Ba	11,71
	SNP	1,33 Aa	1,27 Aa	0,70 Ba	
3	Água	1,94 Ab	1,50 Ab	0,85 Ba	15,06
	SNP	2,34 Aa	1,64 Ba	0,81 Ca	
4	Água	2,57 Ab	2,13 Ab	0,91 Ba	10,68
	SNP	2,82 Aa	2,60 Aa	0,92 Ba	
5	Água	2,73 Ab	2,37 Ab	1,11 Ba	8,24
	SNP	3,11 Aa	2,82 Aa	1,37 Ba	
6	Água	2,82 Aa	2,41 Ab	1,58 Bb	12,39
	SNP	3,19 Aa	3,17 Aa	2,08 Ba	
7	Água	3,00 Ab	2,66 Ab	1,88 Bb	8,49
	SNP	3,57 Aa	3,41 Aa	2,85 Ba	

Tabela 4. Atividade da peroxidase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	1,29 Ba	1,32 Ba	1,66 Aa	5,56
	SNP	1,29 Ba	1,32 Ba	1,66 Aa	
1	Água	1,14 Bb	1,91 Aa	1,54 Bb	9,84
	SNP	1,76 Aa	1,80 Aa	1,89 Aa	
2	Água	1,74 Bb	2,18 Aa	1,52 Bb	9,03
	SNP	2,75 Aa	1,96 Ba	2,04 Ba	
3	Água	2,26 Ab	2,20 Ab	2,22 Aa	9,92
	SNP	3,20 Aa	2,60 Ba	2,54 Ba	
4	Água	3,52 Ab	3,01 ABb	2,51 Bb	10,36
	SNP	4,75 Aa	4,47 ABa	3,68 Ba	
5	Água	4,58 Ab	4,19 Ab	3,48 Bb	6,13
	SNP	5,50 Aa	5,24 Aa	4,19 Ba	
6	Água	5,38 Ab	4,56 ABb	4,35 Bb	8,13
	SNP	6,76 Aa	5,86 ABa	5,55 Ba	
7	Água	5,39 Ab	4,31 Bb	4,27 Bb	5,18
	SNP	7,26 Aa	5,49 Ba	5,38 Ba	

Tabela 5. Atividade da peroxidase do ascorbato durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	9,99 Aa	9,72 Aa	12,96 Aa	17,48
	SNP	9,99 Aa	9,72 Aa	12,96 Aa	
1	Água	6,53 Aa	5,66 Aa	5,40 Aa	17,30
	SNP	6,47 Aa	6,33 Aa	6,03 Aa	
2	Água	6,69 Aa	6,18 Aa	5,18 Aa	24,28
	SNP	7,70 Aa	7,37 Aa	7,26 Aa	
3	Água	16,26 Ab	13,71 Ab	12,00 Aa	14,14
	SNP	21,50 Aa	19,79 Aa	13,50 Ba	
4	Água	24,08 Ab	18,88 ABb	13,82 Bb	11,43
	SNP	28,17 Aa	24,56 Aa	18,19 Ba	
5	Água	29,71 Aa	20,80 Bb	13,82 Cb	9,77
	SNP	32,26 Aa	27,62 Aa	20,79 Ba	
6	Água	31,52 Aa	20,73 Bb	13,92 Bb	14,37
	SNP	36,30 Aa	30,65 Aa	20,84 Ba	
7	Água	24,91 Ab	19,38 Ab	19,41 Ab	11,07
	SNP	33,35 Aa	28,53 Aa	28,57 Aa	

Tabela 6. Atividade da superóxido dismutase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	0,46 ABa	0,45 Ba	0,56 Aa	9,36
	SNP	0,46 ABa	0,45 Ba	0,56 Aa	
1	Água	0,86 Aa	0,76 Aa	0,83 Aa	7,85
	SNP	0,88 Aa	0,77 Aa	0,84 Aa	
2	Água	0,99 Ab	0,92 Ab	0,95 Ab	4,78
	SNP	1,01 ABa	0,94 Ba	1,10 Aa	
3	Água	1,50 Ab	1,07 Bb	1,14 Bb	8,61
	SNP	1,73 Aa	1,27 Ba	1,38 Ba	
4	Água	1,52 Ab	1,31 Ab	1,31 Ab	6,92
	SNP	1,71 Aa	1,58 Aa	1,51 Aa	
5	Água	1,55 Ab	1,34 Ab	1,35 Ab	7,24
	SNP	1,78 Aa	1,73 Aa	1,68 Aa	
6	Água	1,56 Ab	1,32 Ab	1,34 Ab	10,36
	SNP	1,82 Aa	1,78 Aa	1,71 Aa	
7	Água	1,65 Ab	1,25 Bb	1,30 Bb	9,40
	SNP	1,98 Aa	1,86 Aa	1,78 Aa	

Tabela 7. Conteúdo de malonaldeído durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	2,86 Aa	2,57 Aa	2,72 Aa	5,39
	SNP	2,86 Aa	2,57 Aa	2,72 Aa	
1	Água	4,47 Aa	4,13 ABa	4,01 Ba	3,54
	SNP	4,63 Aa	4,27 Ba	4,36 Ba	
2	Água	5,26 Aa	5,62 Aa	5,84 Aa	7,64
	SNP	5,40 Aa	5,46 Aa	5,74 Aa	
3	Água	5,92 Ba	7,35 Aa	7,74 Aa	9,02
	SNP	5,38 Ba	6,14 ABb	6,71 Ab	
4	Água	6,31 Ba	7,63 ABa	8,16 Aa	10,43
	SNP	5,71 Aa	6,26 Ab	6,83 Ab	
5	Água	7,02 Ba	7,75 Ba	9,78 Aa	6,79
	SNP	5,99 Bb	6,59 ABb	7,25 Ab	
6	Água	7,56 Ba	8,65 Ba	10,80 Aa	8,63
	SNP	6,69 Ab	6,91 Ab	8,06 Ab	
7	Água	7,59 Ba	8,73 Ba	11,05 Aa	6,39
	SNP	6,85 Bb	7,07 Bb	8,45 Ab	

Tabela 8. Liberação de ânion superóxido durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	nd	nd	nd	-
	SNP	nd	nd	nd	
1	Água	0,08 Aa	0,05 Aa	0,09 Aa	50,85
	SNP	0,11 Aa	0,12 Aa	0,15 Aa	
2	Água	0,34 Ba	0,48 ABa	0,55 Aa	12,86
	SNP	0,27 Ba	0,44 Aa	0,46 Aa	
3	Água	0,71 Aa	0,67 ABa	0,59 Ba	7,91
	SNP	0,39 Ab	0,46 Ab	0,44 Ab	
4	Água	0,72 Aa	0,66 ABa	0,56 Ba	10,10
	SNP	0,48 Ab	0,40 Ab	0,21 Bb	
5	Água	0,62 Aa	0,44 Ba	0,34 Ba	13,36
	SNP	0,43 Ab	0,28 Bb	0,17 Bb	
6	Água	0,54 Aa	0,44 Aa	0,24 Ba	16,97
	SNP	0,28 Ab	0,22 Ab	0,15 Aa	
7	Água	0,39 Aa	0,40 Aa	0,22 Ba	13,01
	SNP	0,16 Ab	0,14 Ab	0,15 Ab	

Tabela 9. Conteúdo de peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	nd	nd	nd	-
	SNP	nd	nd	nd	
1	Água	1,19 Aa	1,13 Aa	1,06 Aa	10,56
	SNP	1,25 Aa	0,98 Aa	1,02 Aa	
2	Água	1,56 Aa	1,37 Aa	1,50 Aa	11,21
	SNP	1,34 Aa	1,29 Aa	1,29 Aa	
3	Água	1,94 Aa	1,67 Aa	1,81 Aa	12,99
	SNP	1,56 Ab	1,42 Aa	1,37 Ab	
4	Água	2,46 Aa	1,66 Ba	2,08 ABa	10,95
	SNP	1,88 Ab	1,44 Aa	1,38 Ab	
5	Água	2,59 Aa	1,93 Aa	2,14 Aa	14,16
	SNP	1,99 Ab	1,47 Aa	1,41 Ab	
6	Água	2,65 Aa	2,19 Aa	2,26 Aa	12,66
	SNP	2,08 Ab	1,56 Ab	1,49 Ab	
7	Água	3,10 Aa	2,91 Aa	2,32 Aa	13,30
	SNP	2,10 Ab	1,86 Ab	1,52 Ab	

Tabela 10. Atividade da alfa-amilase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	10,14 Aa	10,88 Aa	12,37 Aa	11,94
	SNP	10,14 Aa	10,88 Aa	12,37 Aa	
1	Água	15,12 Aa	14,55 Aa	14,30 Aa	11,74
	SNP	17,33 Aa	16,24 Aa	15,15 Aa	
2	Água	21,61 Aa	19,25 Aa	18,38 Aa	10,62
	SNP	23,35 Aa	21,12 Aa	20,28 Aa	
3	Água	25,49 Ab	21,71 ABa	20,21 Ba	7,41
	SNP	28,22 Aa	23,99 Ba	22,31 Ba	
4	Água	32,28 Ab	24,22 Bb	23,49 Bb	7,19
	SNP	35,76 Aa	30,04 Ba	27,08 Ba	
5	Água	41,83 Ab	36,41 Bb	33,96 Bb	5,48
	SNP	47,40 Aa	43,22 Aa	37,64 Ba	
6	Água	52,23 Ab	48,97 ABb	44,88 Bb	4,09
	SNP	59,58 Aa	56,42 Aa	50,03 Ba	
7	Água	59,49 Ab	57,78 Ab	48,43 Bb	3,82
	SNP	70,65 Aa	66,85 Aa	57,71 Ba	

Tabela 11. Atividade da beta-amilase durante a germinação de sementes dos lotes 1, 2 e 3 de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle) ou em solução de SNP (50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento	Lotes			CV (%)
		1	2	3	
0	Água	7,59 Aa	6,63 Ba	6,28 Ba	5,55
	SNP	7,59 Aa	6,63 Ba	6,28 Ba	
1	Água	9,33 Aa	8,28 Aa	7,55 Aa	13,36
	SNP	10,24 Aa	9,08 ABa	6,85 Ba	
2	Água	11,19 Aa	10,48 Aa	8,41 Ba	8,06
	SNP	11,02 Aa	9,61 Aa	9,57 Aa	
3	Água	11,46 Ab	10,88 ABa	9,32 Bb	7,75
	SNP	12,85 Aa	11,72 Aa	11,24 Aa	
4	Água	13,51 Ab	11,84 Bb	11,24 Bb	4,54
	SNP	15,98 Aa	12,86 Ba	12,30 Ba	
5	Água	15,64 Ab	13,55 Bb	12,76 Bb	4,90
	SNP	17,82 Aa	15,49 Ba	13,85 Ca	
6	Água	17,84 Ab	15,70 Bb	14,70 Bb	4,52
	SNP	20,90 Aa	18,20 Ba	17,04 Ba	
7	Água	22,03 Ab	18,11 Bb	14,58 Cb	5,31
	SNP	26,52 Aa	25,25 Aa	19,21 Ba	

Tabela 12. Germinação (GER); primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tratamentos	Testes		
	Germinação (%)	PCG (%)	IVG (%)
Água	98,00 a	95,50 a	12,89 a
-0,15 MPa	62,50 c	10,50 c	4,47 c
-0,15 MPa + SNP	83,50 b	24,00 b	6,82 b
CV (%)	4,45	4,74	7,63

Tabela 13. Comprimento de hipocótilo (CH); comprimento de radícula (CR); massa seca de hipocótilo (MSH); massa seca de radícula (MSR) e massa seca de cotilédone (MSC) de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tratamentos	Determinações				
	CH (cm.plântula ⁻¹)	CR (cm.plântula ⁻¹)	MSH (mg.plântula ⁻¹)	MSR (mg.plântula ⁻¹)	MSC (mg.plântula ⁻¹)
Água	4,27 a	10,28 a	18,32 a	20,24 a	185,07 b
-0,15 MPa	0,93 b	7,68 ab	5,41 c	9,01 b	236,46 a
-0,15 MPa + SNP	1,41 b	6,65 b	8,65 b	12,10 b	210,83 b
CV (%)	14,35	18,94	15,34	15,75	12,04

Tabela 14. Atividade da catalase durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	1,02 a	1,02 a	1,02 a	9,29
1	2,09 a	0,87 b	0,93 b	35,05
2	2,23 a	0,94 b	1,54 ab	23,27
3	2,59 a	1,50 b	1,81 b	10,21
4	3,88 a	2,30 b	3,34 ab	17,84
5	4,83 a	2,67 b	3,87 a	15,33
6	5,25 a	3,32 b	4,09 b	10,12
7	5,52 a	3,50 b	4,28 b	10,42

Tabela 15. Atividade da peroxidase durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	1,50 a	1,50 a	1,50 a	19,76
1	2,22 a	1,59 b	1,45 b	9,91
2	2,73 a	1,97 b	2,29 ab	9,98
3	3,69 a	2,18 c	2,88 b	10,35
4	5,12 a	2,94 b	3,57 b	11,92
5	5,73 a	3,80 b	4,81 a	10,14
6	6,48 a	4,11 b	5,09 b	11,06
7	7,49 a	4,14 c	5,66 b	12,56

Tabela 16. Atividade da peroxidase do ascorbatodurante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	0,0030 a	0,0030 a	0,0030 a	50,71
1	0,0097 a	0,0060 a	0,0079 a	29,77
2	0,0132 a	0,0057 a	0,0077 a	50,08
3	0,0143 a	0,0048 b	0,0088 ab	30,75
4	0,0160 a	0,0062 b	0,0084 b	25,69
5	0,0179 a	0,0069 c	0,0117 b	16,09
6	0,0253 a	0,0112 b	0,0166 b	21,88
7	0,0290 a	0,0124 c	0,0203 b	18,45

Tabela 17. Atividade da superóxido dismutase durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	0,46 a	0,46 a	0,46 a	21,95
1	2,54 a	1,56 b	1,90 b	13,57
2	2,89 a	1,81 b	2,58 a	13,02
3	3,04 a	2,05 b	2,53 ab	12,17
4	3,47 a	2,31 b	2,80 ab	13,83
5	3,41 a	2,32 b	2,85 ab	11,45
6	3,44 a	2,30 b	3,08 a	11,03
7	3,69 a	2,48 b	3,36 a	11,95

Tabela 18. Conteúdo de malonaldeído durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	2,86 a	2,86 a	2,86 a	5,89
1	5,43 a	4,62 ab	4,02 b	10,00
2	6,17 a	5,51 ab	4,76 b	10,87
3	8,04 a	7,28 a	5,96 b	8,14
4	9,38 a	9,21 a	6,20 b	8,07
5	10,78 a	10,41 a	6,61 b	13,30
6	11,06 a	10,82 a	7,37 b	10,59
7	13,87 a	12,42 a	9,26 b	7,02

Tabela 19. Liberação de ânion superóxido durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	nd	nd	nd	-
1	0,0533 b	0,1769 ab	0,2641 a	49,63
2	0,4500 a	0,5096 a	0,5258 a	11,51
3	0,5617 ab	0,6742 a	0,5418 b	8,15
4	0,3896 a	0,3642 a	0,1629 b	9,57
5	0,2375 ab	0,2647 a	0,1551 b	15,34
6	0,2337 a	0,2503 a	0,1159 b	20,54
7	0,2098 a	0,2251 a	0,0873 b	22,38

Tabela 20. Conteúdo de peróxido de hidrogênio durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	nd	nd	nd	-
1	1,20 a	1,28 a	1,18 a	8,23
2	1,19 b	1,48 a	1,19 b	3,81
3	1,39 ab	1,60 a	1,31 b	7,61
4	1,69 a	1,83 a	1,53 a	7,43
5	2,03 ab	2,10 a	1,62 b	9,77
6	2,46 a	2,39 a	1,84 b	3,61
7	3,07 a	2,85 a	2,21 b	5,15

Tabela 21. Atividade da alfa-amilase durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	0,59 a	0,59 a	0,59 a	27,10
1	1,23 ab	1,14 b	1,32 a	7,75
2	1,56 a	1,28 b	1,41 ab	8,33
3	1,90 a	1,32 c	1,60 b	6,80
4	2,28 a	1,42 c	1,78 b	5,98
5	2,54 a	1,57 c	2,00 b	8,45
6	3,29 a	1,95 c	2,42 b	4,55
7	4,58 a	2,65 c	3,08 b	4,38

Tabela 22. Atividade da beta-amilase durante a germinação de sementes de sementes de *Pisum sativum* embebidas em água (controle), em solução de PEG 6000 (-0,15 MPa) ou em solução de PEG 6000 + SNP (-0,15 MPa ; 50 µM). UFV, Viçosa, MG, 2013.

Tempo (dias)	Tratamento			CV (%)
	Água	-0,15 MPa	-0,15 Mpa + SNP	
0	0,25 a	0,25 a	0,25 a	26,66
1	0,38 a	0,41 a	0,40 a	17,19
2	0,68 a	0,52 a	0,59 a	15,82
3	0,76 a	0,62 a	0,68 a	13,12
4	0,80 a	0,67 a	0,72 a	13,24
5	0,94 a	0,71 b	0,89 a	8,14
6	1,37 a	0,89 c	1,20 b	7,45
7	1,95 a	1,07 c	1,51 b	7,63