

RAQUEL MARIA DE OLIVEIRA PIRES

**AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES DE GERGELIM
(*Sesamum indicum L.*) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTRESSE**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2014

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

T

P667a
2014 Pires, Raquel Maria de Oliveira, 1986-
Ação protetora do óxido nítrico em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) submetidas a diferentes condições de estresse / Raquel Maria de Oliveira Pires. - Viçosa, MG, 2014.
xiv, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Gergelim. 2. *Sesamum indicum* L. 3. Sementes. 4. Germinação.
5. Cádmio. 6. Nitroprussiato de Sódio (SNP). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.85

RAQUEL MARIA DE OLIVEIRA PIRES

**AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES DE GERGELIM
(*Sesamum indicum L.*) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTRESSE**

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

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014.

Glauciana da Mata Ataíde

Luiz Antônio dos Santos Dias

Eduardo Euclides de Lima Borges
(Coorientador)

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

Á Deus,
Aos meus pais, Walter e Egléa,
Aos meus irmãos Vitor e Vinícius.

Dedico.

*"Existe uma força mais poderosa do que a energia
atômica: a força de vontade!"*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas vezes em que cansada e desiludida, recorri em uma prece e fui atendida.

Aos meus pais, pelo amor, exemplo, apoio e dedicação incondicionais e por me ajudarem a tornar o que hoje, eu sou.

Aos meus irmãos, pelo carinho, incentivo e palavras de conforto quando precisei.

À minha cunhada Mariana, pelo exemplo.

À minha sobrinha Malu, que ainda conto os dias para tê-la em meus braços.

Aos meus parentes e familiares que mesmo distantes, sempre estiveram presentes, em especial meu Tio Zanã pela força e certeza de que vamos superar essa.

Aos amigos de sempre, por todos os momentos que já vivemos e por aqueles que ainda vamos viver, em especial, Priscilla, Ana, Gabi, Flá, Dally, Marina, Joyce, Fausto, Marcone e Liliane.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela orientação, confiança e paciência.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges pela amizade, exemplo profissional, orientação e ajuda.

À professora Glauciana da Mata Ataíde, pela ajuda, dicas e participação na banca.

Ao professor Luiz Antônio dos Santos Dias que prontamente aceitou o convite de participação da banca de mestrado e pelos ensinamentos em estatística.

Aos técnicos do Laboratório de Sementes Florestais, Mauro e Leacir pela ajuda na condução dos experimentos, ensinamentos, paciência e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitotecnia, pelos conhecimentos repassados e pela contribuição à minha formação profissional.

Ao professor Paulo Cecon e à Izabel pelas preciosas dicas de estatística.

À técnica do Laboratório de Química, Luciana, pela aquisição do material e ajuda.

Aos colegas do GSEM pelos momentos de descontração, auxílio e sugestões, em especial Amanda, Paulo e Marcelo.

Aos grandes amigos de Viçosa, pela força, carinho e atenção. Em especial Alessandra, Néia, Renato, Genaina, Alex e Paola pela presença constante, cumplicidade e amizade sincera.

Ao meu grande companheiro, Mateus pela parceria e amor constante.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

MEU ETERNO AGRADECIMENTO!!!

BIOGRAFIA

Raquel Maria de Oliveira Pires, filha de Walter José Pires e Egléa Maria de Oliveira Pires, nasceu em 19 de março de 1986, em Lavras, Minas Gerais.

Cursou o Ensino Fundamental e Médio no Instituto Presbiteriano Gammon, na cidade de Lavras MG, concluindo o terceiro ano em 2004.

Em julho de 2005, iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, no estado de Minas Gerais, recebendo o título de Engenheira Agrônoma em julho de 2011.

Em agosto de 2011, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação da professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
ARTIGO 1.....	6
AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES DE GERGELIM (<i>Sesamum indicum L.</i>) SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR CÁDMIO	6
RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO	11
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ARTIGO 2.....	36
AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES DE GERGELIM (<i>Sesamum indicum L.</i>) SUBMETIDAS AS ESTRESSE POR DÉFICT HÍDRICO	36
RESUMO	37
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APX = ascorbato peroxidase

BSA= albumina sérica bovina

CAT = catalase

Cd= cádmio

CdCl_2 = cloreto de cádmio

EROs = espécies reativas de oxigênio

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

G = porcentagem de germinação

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

IVG = índice de velocidade de germinação

NBT = azul de nitro tetrazólio

O_2 = oxigênio molecular

$\text{O}_2^{\bullet -}$ = radical superóxido

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singlet

OH^{\bullet} = radical hidroxila

PC = primeira contagem de germinação

PMSF= fluoreto de fenilmetilsulfônico

POX = peroxidase

PVPP = polivinil polipirrolidona

SNP = nitroprussiato de sódio

SOD = superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

Figura 1. A- Germinação (G%), B- Primeira Contagem de Germinação (PC%) e C- Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Sesamum indicum* nos testes conduzidos em substrato umedecido com água (controle); 200 μM de SNP; 800 μM de CdCl_2 ; 800 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP; 600 μM de CdCl_2 ; 600 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP; 400 μM de CdCl_2 e 400 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP.-----27

Figura 2. A- Comprimento do hipocótilo- CH(cm/plântula normal), B- comprimento da radícula- CR(cm/plântula normal), C- massa seca do hipocótilo- MSH(cm/plântula normal), D- massa seca da radícula-MSR(cm/plântula normal) de plântulas de *Sesamum indicum* nos testes conduzidos em substrato umedecido com água (controle), água + SNP, solução de cádmio 800 μM , e 800 μM de CdCl_2 + SNP, 600 μM de CdCl_2 , e 600 μM de CdCl_2 + SNP, 400 μM de CdCl_2 e 400 μM de CdCl_2 +SNP.-----29

Figura 3. A- A- Plântulas normais de *S. indicum* obtidas de sementes germinadas em água no sexto dia; B- plântulas anormais de *S.indicum* com inibição total da radícula e parcial do hipocótilo obtidas de sementes germinadas em soluções de cádmio no sexto dia; C- plântulas anormais de *S.indicum* com inibição total da radícula e total do hipocótilo obtidas de sementes germinadas em soluções de cádmio ao sexto dia; e D- plântulas anormais de *S.indicum* escurecidas pelo efeito tóxico do elemento estressante no sexto dia de germinação..-----30

Figura 4. Ganho de massa (g) pelas sementes de *Sesamum indicum* submetidas à embebição em água (controle) e em soluções de cádmio 800 μM , 600 μM de CdCl_2 , e 400 μM de CdCl_2 ..-----32

ARTIGO II

Figura 1. A- Germinação (G%), B- primeira contagem de germinação (PG%) e C- Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Sesamum indicum* submetidas à embebição em água (controle), água + SNP, e em soluções de PEG 6000 a -0,1 MPa, -0,2 MPa e -0,3 MPa e acrescidas ou não de SNP.-----57

Figura 2. A- Comprimento do hipocótilo- CH(cm/plântula normal), B- comprimento da radícula- CR(cm/plântula normal), C- massa seca do hipocótilo- MSH(cm/plântula normal), D- massa seca da radícula-MSR(cm/plântula normal) de plântulas de *Sesamum indicum* submetidas á embebição com água (controle), água + SNP, maior potencial osmótico (-0,1 MPa), maior potencial osmótico acrescido de SNP (-0,1MPa + SNP), potencial osmótico intermediário (-0,2 MPa), acrescido de SNP (-0,2MPa + SNP), baixo potencial osmótico (-0,3 MPa) e acrescido de SNP (-0,3MPa + SNP).-----**61**

Figura 3. A- Ganho de peso de sementes de *Sesamum indicum* submetidas á embebição com água (controle), maior potencial osmótico (-0,1 MPa), potencial osmótico intermediário (-0,2 MPa) e baixo potencial osmótico (-0,3 MPa). B- Ganho de peso de sementes de *Sesamum indicum* submetidas á embebição com água (controle), maior potencial osmótico e SNP (-0,1 MPa+ SNP), potencial osmótico intermediário e SNP (-0,2 MPa+ SNP) e baixo potencial osmótico e SNP (-0,3 MPa+ SNP)-----**65**

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.-----**35**

Tabela 2. Atividade da enzima catalase (CAT), em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.-----**36**

Tabela 3. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), em sementes de *Sesamum indicum* após 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.-----**37**

Tabela 4. Atividade da enzima peroxidase (POX), em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP -----**37**

ARTIGO II

Tabela 1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.-----**68**

Tabela 2. Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.-----**69**

Tabela 3. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) em sementes de *Sesamum indicum* após 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.-----**69**

Tabela 4. Atividade da enzima peroxidase (POX) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP-----**70**

RESUMO

PIRES, Raquel Maria de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Ação protetora do óxido nítrico em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) submetidas a diferentes condições de estresse.** Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Sementes estão frequentemente expostas a diversos estresses bióticos e abióticos que prejudicam o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do óxido nítrico (ON) como agente protetor em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) submetidas à diferentes estresses. Para tanto, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, as sementes foram semeadas em substrato umedecido com água ou com diferentes concentrações de cloreto de cádmio (CdCl_2) e cloreto de cádmio acrescido de nitroprussiato de sódio (SNP) nos seguintes tratamentos: 1) água (controle), 2) +200 μM de SNP, 3) 800 μM de CdCl_2 , 4) 800 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP, 5) 600 μM de CdCl_2 , 6) 600 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP, 7) 400 μM de CdCl_2 e 8) 400 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP. As seguintes determinações foram feitas: germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de hipocótilo (CH) e radícula (CR), massa seca de hipocótilo (MSH) e radícula (MSR), curva de embebição, além da quantificação da atividade das enzimas antioxidativas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases totais (POX). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas para os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. As médias obtidas nos tratamentos com e sem SNP foram comparadas pelo teste F a 5% de significância e os tempos de embebição na análise das atividades das enzimas, também pelo teste Tukey a 5%. Para a realização da curva de embebição realizou-se regressão com ajuste polinomial de grau 3. No segundo experimento, as sementes de gergelim foram semeadas em substrato umedecido com água ou em diferentes concentrações de polietileno glicol (PEG 6000) e PEG 6000 acrescido de SNP nos seguintes tratamentos: 1) água (controle), 2) +200 μM de SNP, 3) 0,1MPa, 4) -0,1MPa +200 μM de SNP, 5) -0,2MPa, 6) -0,2MPa +200 μM de SNP, -7) 0,3MPa e 8) -0,3MPa, +200 μM de SNP. As mesmas determinações e análises estatísticas do primeiro experimento foram realizadas. Conclui-se que ambos os estresses causaram a redução da germinação e do vigor, sendo

as maiores concentrações as mais prejudiciais às sementes de gergelim. O ON foi capaz de amenizar os danos causados pelos estresses invertendo parcialmente todos os parâmetros fisiológicos avaliados, o que proporcionou maior e mais rápida germinação além de maior desenvolvimento inicial das plântulas. O cádmio e o PEG 6000 provocaram menor absorção e menor ganho de massa nas maiores concentrações em relação à água assim como um prolongamento da Fase II da embebição. Em relação ao sistema antioxidante, houve aumento da atividade enzimática no período de 0 a 24 horas, demonstrando organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. Observou-se que nos maiores potenciais e nas soluções mais concentradas, a atividade enzimática foi maior, o que sugere atividade desintoxicante dessas moléculas em sementes submetidas ao déficit hídrico e solução de cádmio mais rigorosa. O uso do SNP, de maneira geral, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, evidenciando um eficiente sistema de eliminação das espécies reativas de oxigênio formadas.

ABSTRACT

PIRES, Raquel Maria de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Protective action of nitric oxide on sesame seeds (*Sesamum indicum L.*) submitted to different conditions of stress.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Seeds frequently encounter biotic and abiotic stress that adversely affects growth, development, or productivity. The objective of this work was to investigate the effect of nitric oxide (NO) like protective agent in sesame seeds submitted to different stresses. Therefore, two experiments were conducted. In the first one, sesame seeds were placed in soaked substrate with water or with different concentrations of cadmium chloride and cadmium chloride plus sodium nitroprusside (SNP) in the following treatments: 1) water (control), 2) +200 μM of SNP, 3) 800 μM of CdCl_2 , 4) 800 μM of CdCl_2 +200 μM of SNP, 5) 600 μM of CdCl_2 , 6) 600 μM of CdCl_2 +200 μM of SNP, 7) 400 μM of CdCl_2 and 8) 400 μM of CdCl_2 +200 μM of SNP. Were done the following determinations: germination (G), first count of germination (PC), speed germination index (IVG), hypocotyl length (CH), radicle length (CR), dry mass of hypocotyl (MSH) and dry mass of radicle (DMR) and imbibition curve. It were quantified the activity of antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and total peroxidase (POX). It was adopted the completely randomized design with five replicates. The data were submitted to variance analysis and the means obtained for treatments were compared by Tukey test at 5% of significance. The means obtained in treatments with and without SNP were compared by F test at 5% and the times of imbibition by Tukey test at 5%. For the realization of imbibition curve was realized a polynomial regression fit 3. In the second experiment, sesame seeds were placed in soaked substrate with water or with different concentrations of PEG 6000 and PEG 6000 plus SNP in the following treatments: 1) water (control), 2) +200 μM of SNP, 3) 0,1MPa, 4) -0,1MPa +200 μM of SNP, 5) -0,2MPa, 6) -0,2MPa +200 μM of SNP, 7) -0,3MPa and 8) -0,3MPa, +200 μM of SNP. The same determinations done in experiment one, was made in the experiment two. Both stress caused the reduction of germination and vigor, being the highest concentrations, the most harmful to sesame seeds. NO was able to minimize the damage caused by the stresses, reversing partially all the biochemical parameters evaluated, what provides higher and faster germination, beyond the higher initial development of

seedlings. Cadmium and PEG 6000 provoked less absorption and less gain of mass in higher concentrations in relation to water, and an extension of Phase II. In relation to the antioxydative system, there was an increase of enzymatic activity in period of 0 to 24 hours, showing the organization of the antioxidant system with the sesame seeds over time. Was observed that in higher potentials and in solutions more concentrated, the activity enzymatic was higher, what suggest detoxifying activity of these molecules in seeds submitted to water deficit and solution of cadmium more strict. The use of SNP, increased the activity of antioxidative enzymes, evidencing an efficient of elimination of EROs formed.

INTRODUÇÃO GERAL

Por mais de 50 anos, a única molécula de sinalização conhecida pela ciência era o hormônio vegetal etileno. Em 1998, o Prêmio Nobel de Medicina anunciou uma nova molécula capaz de desempenhar essa função sinalizadora no sistema cardiovascular de mamíferos- o óxido nítrico (NOBELPRIZE.ORG, 2013).

Antigamente conhecido por sua capacidade de destruição da camada de ozônio e suspeito de ser carcinogênico e precursor das chuvas ácidas, o óxido nítrico (ON) era considerado apenas como mais uma molécula tóxica na lista de poluentes ambientais. No entanto, estudos posteriores provaram diversas outras funções fisiológicas desta molécula, incluindo sua atividade no sistema nervoso e imune, artérias, fígado, pâncreas, útero e pulmões de mamíferos, introduzindo o ON no “hall” das moléculas mensageiras (CULOTTA e KOSHLAND, 1992).

O ON é uma molécula gasosa, inorgânica, pequena e bioativa, composta por um átomo de oxigênio e um de nitrogênio (DUSSE et al., 2003), a qual tem recebido grande atenção dos pesquisadores devido a sua participação em diversos processos celulares tanto em animais como vegetais (LEITNER et al., 2009).

Em plantas, sua presença foi constatada em trabalho pioneiro realizado por Klepper (1979), que dependendo da dose aplicada, observou um aumento gradativo da produção de ON em plantas de soja tratadas com herbicidas. Desde então, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados demonstrando que o ON é uma molécula multifuncional, agindo em diversos processos celulares na planta, tais como, crescimento vegetativo da parte aérea (ZHANG et al., 2003), divisão celular (ÖTVÖS et al., 2005), formação de raiz e desenvolvimento de raízes adventícias e pelos radiculares (LOMBARDO et al., 2006; TEWARI et al., 2008), entre outros.

O efeito do ON sob o processo germinativo de sementes, já foi comprovado por diversos trabalhos que demonstram que o ON atua na indução do processo germinativo (BELIGNI e LAMATTINA, 2000; NEIL et al., 2002; BETHKE et al., 2004) fazendo com que as sementes germinem mais e mais rápido (SARATH et al., 2006; LIU et al., 2007). Além disso, diminui os efeitos do envelhecimento das sementes no armazenamento (PEREIRA et al., 2010) e induz à quebra de dormência em várias espécies, entre elas alface (BELIGNI e LAMATTINA, 2000), cevada (BETHKE et al., 2004), *Arabidopsis* (BETHKE et al., 2006; LIBOUREL et al., 2006) e *Panicum virgatum* (SARATH et al., 2006). Estudos relatam ainda, a ação do ON no aumento da tolerância das sementes a diversos estresses abióticos como os causados por metais pesados (KOPYRA e GOWÓŹDŹ, 2003; SINGH et al., 2013), estresse salino (ZHENG et al., 2009) e hídrico (ZHANG et al., 2003).

O sistema antioxidante enzimático é fundamental para aumentar a tolerância da planta a possíveis distúrbios ocasionados por fatores bióticos ou abióticos. Essa tolerância pode ocorrer 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). Assim, o ON pode exercer efeito protetor contra o estresse oxidativo promovido por uma elevação dos níveis de radical hidroxila (OH^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BAILEY-SERRES et al., 2008; PEREIRA, 2010).

O gergelim (*Sesamum indicum*) é uma das principais oleaginosas com maior área plantada no mundo (QUEIROGA et al., 2008). Sua produção é estimulada por sua tolerância à seca, fácil cultivo, retorno econômico ao produtor, elevado teor de óleo nas sementes e rápida germinação. Os potenciais econômico e ambiental atribuídos à espécie fazem com que o gergelim seja apontado como uma das espécies mais importantes e úteis encontradas em

Regiões do Brasil. Contudo, informações no que diz respeito à tolerância do gergelim à diferentes estresses abióticos são escassos.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito protetor do ON em sementes de gergelim submetidas a diferentes concentrações de cádmio e PEG 6000, nas características bioquímicas e fisiológicas de sementes de gergelim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v.59, p.313–339, 2008.

BELIGNI, M.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide stimulates seed germination and co-etiolation, 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.

CULOTTA, E.; KOSHLAND JR, D.E. NO news is good news. **Science**, v.258, p.1862-1865, 1992.

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.

KLEPPER, L. Nitric oxide and nitrogen dioxide emissions from herbicide treated soybean plants. **Atmospheric Environment**, v.13, p.537-542, 1979.

KOPYRA, M.; GWÓZDŹ, 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.

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.

LEITNER, M.; VANDELLE, E.; GAUPELS, F.; BELLIN, D.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling in plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 451-458, 2009.

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.

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 10 de janeiro de 2014.

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. **The Plant Journal**, v.43, p.849-860, 2005.

PEREIRA, A. Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp.*). **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

QUEIROGA, V.P.; SILVA, O.R.R.F. **Tecnologias utilizadas no cultivo do gergelim mecanizado**. EMBRAPA-CNPQ, Campina Grande. 142p.(Documentos, 20).

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.; PAK, 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.

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.

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.

ARTIGO 1

AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES DE GERGELIM (*Sesamum indicum L.*) SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR CÁDMIO

**Raquel Maria de Oliveira Pires¹, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias², Eduardo
Euclides de Lima e Borges³**

¹Agrônoma, Mestranda, Depto. Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Cep 36570-000, Viçosa, MG, raquel.opires@yahoo.com.br.

²Profª Drª Associada, Depto Fitotecnia, UFV, Viçosa, MG, dcunhadas@gmail.com.

³Prof. Dr Associado, Depto de Engenharia Florestal, UFV, Viçosa, MG, elborges@ufv.br.

RESUMO

PIRES, Raquel Maria de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014.
Ação protetora do óxido nítrico em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) submetidas as estresse por cádmio. Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.
Co-orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do óxido nítrico (ON) como agente protetor em sementes de gergelim submetidas a diferentes concentrações de cloreto de cádmio (CdCl_2) e cloreto de cádmio acrescido de nitroprussiato de sódio (SNP). Os tratamentos foram: 1) água (controle), 2) +200 μM de SNP, 3) 800 μM de CdCl_2 , 4) 800 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP, 5) 600 μM de CdCl_2 , 6) 600 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP, 7) 400 μM de CdCl_2 e 8) 400 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP, totalizando 8 tratamentos. As sementes foram colocadas para germinar nos tratamentos descritos e as seguintes determinações foram realizadas aos seis dias após a instalação do experimento: germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de hipocótilo (CH) e radícula (CR) e massa seca de hipocótilo (MSH) e radícula (MSR), curva de embebição, além de quantificar a atividade das enzimas antioxidativas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases totais (POX). A determinação da atividade enzimática foi feita nos tempos de 0h, 12h e 24h de embebição

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas para os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As médias obtidas nos tratamentos com e sem SNP foram comparadas pelo teste F a 5% de significância e os tempos de embebição na análise das atividades das enzimas, também pelo teste de Tukey a 5%. Para a realização da curva de embebição realizou-se regressão com ajuste polinomial de grau 3. O aumento na concentração de cádmio na solução de embebição ocasionou redução na germinação e no vigor das sementes, além de redução no crescimento inicial das plântulas,

evidenciando o efeito tóxico desse elemento às sementes de gergelim. O ON devido à aplicação de SNP foi benéfico, proporcionando aumento na germinação, vigor e crescimento de plântulas quando submetidas ao estresse por cádmio. O cádmio não provocou alteração na velocidade de germinação das sementes em relação à testemunha na Fase I. Porém, houve menor absorção e menor ganho de massa com o aumento da concentração de cádmio na solução e um prolongamento da Fase II, com conseqüente retardo da emergência da radícula. Houve aumento progressivo da atividade das enzimas antioxidativas no período de 0 a 24 horas, demonstrando organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. Esse aumento foi mais expressivo nas soluções mais concentradas de cádmio. A associação do cádmio ao SNP aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, evidenciando um eficiente sistema protetor de eliminação das Espécies Reativas de Oxigênio formadas durante a exposição ao metal pesado, permitindo um aumento da tolerância dessa espécie ao cádmio e estímulo a germinação das sementes.

ABSTRACT

PIRES, Raquel Maria de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Protective action of nitric oxide on sesame seeds (*Sesamum indicum L.*) submitted to stresses by cadmium.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

The objective of this work was to investigate the effect of nitric oxide (NO) like protective agent in sesame seeds submitted to different concentrations of cadmium chloride and cadmium chloride plus sodium nitroprusside (SNP). The treatments were: 1) water (control), 2) +200 μM of SNP, 3) 800 μM of CdCl_2 , 4) 800 μM of CdCl_2 +200 μM of SNP, 5) 600 μM of CdCl_2 , 6) 600 μM of CdCl_2 +200 μM of SNP, 7) 400 μM of CdCl_2 and 8) 400 μM of CdCl_2 +200 μM of SNP, totalizing eight treatments. Were done the following determinations: germination (G), first count of germination (PC), speed germination index (IVG), hypocotyl length (CH), radicle length (CR), dry mass of hypocotyl (MSH) and dry mass of radicle (DMR) and imbibition curve. It were quantified the activity of the antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and total peroxidase (POX). The determination of the enzymatic activity was done in the times of 9h, 12h and 24 hours of imbibition. It was adopted the completely randomized design with five replicates. The dates were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means obtained for treatments were compared by Tukey test at 5% significance. The means obtained in treatments with and without SNP were compared by F test at 5% probability and the times of imbibition by Tukey test at 5%. For the realization of the imbibition curve was performed regression polynomial fit of degree 3. The increase of cadmium concentration in imbibition solution reduced the germination and vigor, beyond the reduction in initial growth of seedlings indicating the toxic effect of cadmium to sesame seeds. The NO due to the application of SNP was benefit, providing an increase of germination, vigor and seedling growth. Cadmium did not caused alterations in germination velocity of

seed in comparison to the control in Phase I. However, there was less absorption and smaller mass gain with increasing concentration of cadmium in the solution and an extension of the Phase II, with consequent delay of the emergence of the radicle. There was a progressive increase in the activity of antioxidant enzymes in the period from 0 to 24 hours, showing the organization of the antioxidant system with the sesame seeds over time. This increase was more pronounced in the more concentrated solutions of cadmium. The association of cadmium to SNP increased the activity of antioxidant enzymes, indicating an efficient protective system for the disposal of Reactive Oxygen Species formed during exposure to heavy metal, allowing increased tolerance of this species to cadmium and stimulate seed germination.

INTRODUÇÃO

A compreensão dos problemas relacionados à poluição e os seus efeitos deletérios nos organismos vivos são de grande importância. A explosão populacional, o desejo de suprir as necessidades básicas dessa população crescente e as ações antropogênicas inescrupulosas têm, nas últimas décadas, aumentado o nível de compostos xenobióticos em todos os ecossistemas.

Os metais pesados, atualmente citados como elementos traço ou poluentes orgânicos persistentes assumem, cada vez mais, papel de destaque na preocupação com o meio ambiente (WANI et al., 2012). Dentre eles, destaca-se o cádmio (Cd), metal de transição e elemento químico não essencial, que se acumula facilmente nos organismos vivos causando danos fisiológicos bastante acentuados (BRIDGEN et al., 2000). Utilizado na fabricação de plásticos coloridos, pigmentos de tintas, fabricação de baterias de automóveis, soldagens de juntas e de placas de circuitos eletrônicos e atividades de mineração de cobre, níquel e zinco, entre outros (BAIRD, 2002), a Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR (ATSDR, 2007), classificou o Cd oito vezes seguidas, como uma das substâncias de maior periculosidade à saúde humana e persistência no ambiente.

Com os elevados níveis de cádmio no ambiente, a absorção e acúmulo do metal em organismos vivos se tornam frequentes. Plantas e animais são fatalmente contaminados, acarretando diversas alterações fisiológicas nestes indivíduos.

Sabe-se que o acúmulo desses elementos contaminantes em plantas pode provocar diversos danos fisiológicos, acarretando distúrbios no crescimento (FERNANDES, 2006; JOHN et al., 2009) e alterações estruturais e ultraestruturais nas plantas (KASIM, 2006). Além disto, níveis elevados de cádmio podem levar ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica nos tecidos vegetais onde se encontram (ZHANG et al., 2007).

Elevadas concentrações de cádmio também afetam a germinação de sementes e o crescimento inicial de plântulas de diversas espécies. Embora as plantas possuam mecanismos

de proteção contra diferentes tipos de estresse, durante os processos de germinação e desenvolvimento inicial, elas se tornam menos tolerantes. O processo germinativo representa uma intensificação do metabolismo que frequentemente culmina com a produção de espécies reativas de oxigênio (eros), produção essa que pode ser intensificada por agentes estressores, como o cádmio. Altas concentrações desses metais ativam o metabolismo e elevam a produção de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas ($\cdot OH$) (SCHOPFER et al., 2001), acarretando danos metabólicos e estruturais significativos aos organismos.

Na defesa contra esse estresse oxidativo, as plantas apresentam sistemas enzimáticos antioxidantes que constituem uma importante defesa primária contra os radicais livres gerados em sementes sob condições de estresse. Dentre as enzimas deste sistema tem-se a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a catalase (CAT) que remove o H_2O_2 convertendo-o a água e oxigênio e as peroxidases (POX), que são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula receptora de elétrons. A peroxidase do ascorbato (APX) utiliza o ascorbato como doador específico de elétron na redução do H_2O_2 à água.

Estudos demonstram que compostos químicos, como o óxido nítrico (ON) atuam na proteção de plantas expostas a fatores de estresse. O ON é uma molécula multifuncional, que age em diversos eventos fisiológicos, e tem entre outras funções, a de citoprotetora (BELIGNI e LAMATTINA, 1999) pela capacidade de regular o nível e a toxicidade das eros. O nitroprussiato de sódio (SNP) é o mais utilizado doador de óxidos nitrogenados que produzem ON. O mecanismo de liberação do ON a partir do SNP não é claro, embora seja conhecido e usado na terapia clínica há mais de 70 anos (WANG et al. 2002; FLORYSZAK-WIECZOREK et al. 2006).

Trabalhos comprovam a eficiência do ON em promover a germinação. Sementes de *Plathymenia reticulata*, submetidas ao envelhecimento acelerado, tiveram a germinação aumentada quando aplicado SNP (PEREIRA et al., 2010). Também foi possível verificar que o ON reduziu a inibição da germinação de *Oryza sativa* sob estresse por alumínio (SILVA, 2007). Em estudos com sementes de tremoço amarelo (*Lupinus luteus*), Kopyra e Gwózdź (2003) relataram que o SNP exerceu considerável efeito na promoção da germinação sob condições de estresse causado pela presença de chumbo e cádmio, indicando a eficiência do ON contra o impacto negativo dos metais pesados na germinação.

Nos últimos anos, o estudo da fisiologia de sementes, no que diz respeito a eventos como embebição, processo germinativo e formação de plântulas têm crescido e grande parte das pesquisas ainda é voltada para sementes de grandes culturas e hortaliças. Trabalhos que envolvam estudos da semente e fisiologia da germinação são importantes para favorecer o correto manejo da espécie. Além disso, faz-se necessário conhecer sua tolerância e/ou sensibilidade frente a metais pesados, frequentemente encontrados em ambientes onde houve intervenção antrópica.

Dentre as principais oleaginosas produzidas atualmente, destaca-se o gergelim pelo elevado teor de óleo em suas sementes (40% a 60%), diversas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, óleo-química e medicinal, além de elevado valor nutricional para fins alimentares (QUEIROGA, 2008). No entanto, estudos relacionados à fisiologia de sementes de gergelim ainda são escassos, especialmente com relação ao seu padrão de embebição e à atividade das enzimas antioxidantes sob diferentes estresses.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do ON como agente protetor e sinalizador em sementes de gergelim submetidas à diferentes concentrações de cádmio, através de avaliações das características fisiológicas e bioquímicas, padrões de embebição das sementes e da atividade das enzimas antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa, no período de maio a dezembro de 2013. Foram utilizadas sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) do ano agrícola de 2013, provenientes da EMBRAPA-Algodão. Até a realização dos experimentos, as sementes foram armazenadas em câmara à temperatura constante de 20 °C.

Para testar o efeito de concentrações de cloreto de cádmio (CdCl_2) e da solução doadora de ON (nitroprussiato de sódio-SNP), foram selecionados os seguintes tratamentos: 1) água (controle); 2) 200 μM de SNP; 3) 800 μM de CdCl_2 ; 4) 800 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP; 5) 600 μM de CdCl_2 ; 6) 600 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP; 7) 400 μM de CdCl_2 e 8) 400 μM de CdCl_2 +200 μM de SNP, totalizando 8 tratamentos. Foram feitas as seguintes determinações:

Teste de germinação: sementes de gergelim foram colocadas para germinar em cada solução acima descrita. O teste foi realizado em placas de petri, em cinco repetições de 50 sementes, distribuídas sobre papel germitest umedecidos com 3mL das soluções e mantidas em B.O.D. O germinador foi regulado com temperatura alternada de 20-30°C, com presença de luz constante (BRASIL, 2009). Ao final do sexto dia avaliou-se a porcentagem de plântulas normais.

Primeira contagem de germinação: consistiu do registro do número de plântulas normais obtidas no terceiro dia após o início do teste de germinação, sendo os valores expressos em porcentagem.

Índice de velocidade de germinação: foi efetuado concomitantemente ao teste de germinação, procedendo-se contagens diárias do número de sementes que emitiram raiz primária maior que 1 mm e calculado de acordo com Nakagawa (1999).

Comprimento de hipocótilo e raiz primária: as sementes de cada tratamento, em cinco repetições de 25, foram semeadas equidistantes entre si, seguindo a metodologia descrita acima para o teste de germinação. Efetuou-se a medição do comprimento do hipocótilo e da raiz primária das plântulas classificadas como normais com o auxílio de régua graduada no sexto dia de germinação. Os resultados foram expressos em cm.plântula⁻¹.

Massa fresca e massa seca: foi determinada em balança analítica, com cinco repetições de 100 sementes. A massa seca das sementes foi determinada após secagem em estufa a 80°C por 48 horas.

Curvas de embebição: para cada tratamento descrito, as sementes, em cinco repetições de 50, foram colocadas em placas de petri contendo duas folhas de papel germitest umedecido com 3,0mL de água ou soluções descritas acima. As placas foram tampadas e vedadas com fita crepe e mantidas em germinador regulado à temperatura alternada de 20-30°C. Para monitorar a absorção de água, as sementes foram pesadas secas e em intervalos de três horas após embebição. Este procedimento foi seguido até que ocorresse a protrusão da raiz primária em 50% +1 das sementes. As sementes tiveram sua massa (g) determinada por meio de balança analítica com precisão de 0,0001 g.

Atividade das principais enzimas do sistema antioxidante: as sementes foram colocadas para embeber por 12 e por 24 horas em água ou nas soluções de cádmio e cádmio acrescido de SNP, seguindo a metodologia descrita acima para o teste de germinação.

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

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela adição de 200 μL do extrato enzimático bruto a 2,9mL de meio de reação constituído de ácido ascórbico 10 mM e H_2O_2 10 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25°C, durante o primeiro minuto de reação (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.

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8, pirogalol 150mM e peróxido de hidrogênio 125 mM (KAR e MISHRA, 1976). O incremento na absorbância durante os dois primeiros minutos da reação a 420 nm à temperatura constante de 25°C. determinou a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (CHANCE e MAEHLY, 1955) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8 e peróxido de hidrogênio 125 mM (HAVIR e MCHALE, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm foi medido durante os dois primeiros minutos da reação, que foi realizada à temperatura constante de 25 °C, sendo a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm^{-1} (ANDERSON et al., 1995) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,8, metionina 50 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, EDTA 5 mM e riboflavina 100 mM (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C em

câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa internamente revestida com papel alumínio. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi determinada pela absorção a 560 nm em espectrofotômetro (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). As leituras foram realizadas em triplicata. Considerou-se como branco o valor de absorbância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro pelo mesmo tempo, sendo subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50%. A atividade da SOD foi expressa em $U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Para a determinação do **teor de proteínas**, foi utilizado o método de Bradford (1976) com curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA) como proteína de referência.

Para todas as avaliações, o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos tratamentos com e sem SNP, as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade e na comparação entre os oito tratamentos, utilizou-se Tukey a 5% de significância. Os tempos de embebição na análise das enzimas foram comparados pelo teste de Tukey a 5%. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar (FERREIRA, 2000). Para a realização da curva de embebição realizou-se regressão com ajuste polinomial de grau 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de gergelim tiveram a germinação inibida sob estresse por cádmio, apresentando valores de 98,4% em condições ótimas (germinação em água), e de 36,4% sob elevada concentração de cádmio (800 μM de CdCl_2), 42,8% sob concentração intermediária (600 μM de CdCl_2) e 56% sob baixa concentração (400 μM de CdCl_2) (Figura 1A).

Comparando-se os valores de germinação obtidos em água e na maior concentração de cádmio, verifica-se redução acentuada de 62 pontos percentuais.

A aplicação de SNP não afetou a germinação das sementes em água, o que era de certo modo esperado, já que não houve estresse, pois as condições de germinação eram ideais (Figura 1A). A aplicação de SNP em todos os tratamentos com Cd permitiu aumentar significativamente a germinação em relação aos tratamentos sem SNP. Assim, nas concentrações alta, intermediária e baixa, o SNP reverteu os danos causados pelo cádmio proporcionando aumento na germinação de 13,2, 19,6 e 8,4 pontos percentuais, respectivamente (Figura 1A).

Pelos resultados dos testes de vigor; primeira contagem de germinação (PC) e índice de velocidade de germinação (IVG) verifica-se que o cádmio, em quaisquer das concentrações testadas, afetou negativamente o desempenho das sementes, reduzindo a velocidade de germinação (Figuras 1B e 1C). Em condições ótimas (água) a PC foi de 94,8%, e o IVG de 29,72, ocorrendo queda significativa sob estresse por Cd, com valores de 24,4% e 9,99 para PC e IVG respectivamente, na maior concentração de cádmio, 31,6% e 10,35 para a concentração intermediária e 30,8% e 10,9 para a concentração mais baixa.

Após aplicação do SNP, para todas as concentrações de cádmio testadas, houve aumento significativo nos valores de PC em relação aos tratamentos sem SNP, (Figura 1B). Por outro lado, a aplicação de SNP não provocou aumento significativo da velocidade de germinação (IVG) ao se comparar com os tratamentos com cádmio (Figura 1C).

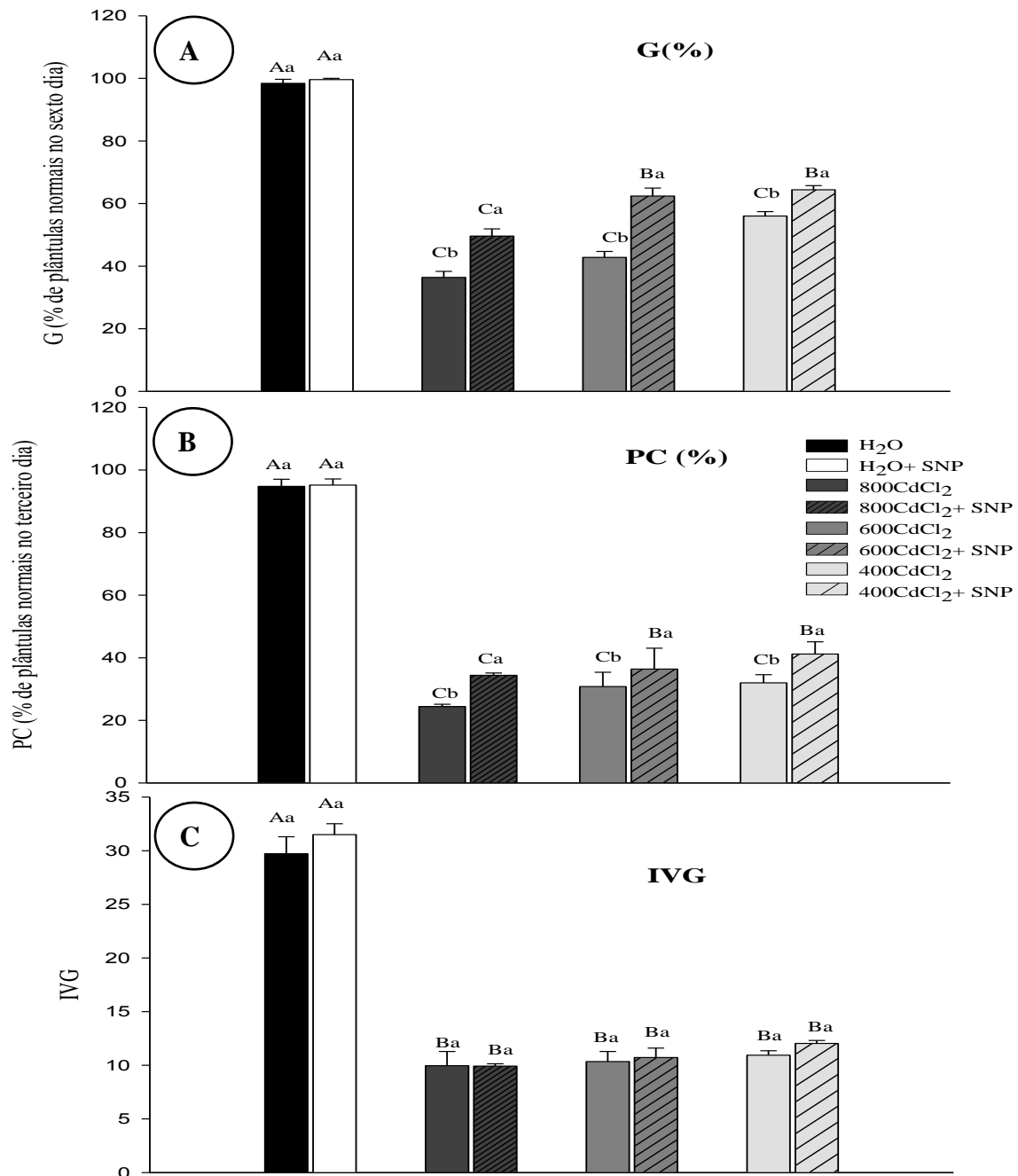


Figura 1. A- Germinação (G%), B- Primeira Contagem de Germinação (PC%) e C- Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Sesamum indicum* nos testes conduzidos em substrato umedecido com água (controle); 200 μ M de SNP; 800 μ M de CdCl₂; 800 μ M de CdCl₂ +200 μ M de SNP; 600 μ M de CdCl₂; 600 μ M de CdCl₂ +200 μ M de SNP; 400 μ M de CdCl₂ e 400 μ M de CdCl₂ +200 μ M de SNP

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. **Médias de cada tratamento com e sem SNP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 5).

ROSSI e LIMA (2001), afirmam que o efeito fitotóxico do cádmio é capaz de promover um desarranjo no desenvolvimento e na diferenciação celular, originando plântulas anormais e diminuindo a porcentagem de plântulas normais na germinação

De acordo com Kopyra e Gwózdź (2003), o ON estimula a germinação em situações de altas concentrações de metais pesados. BELIGNI e LAMATTINA (2002) relataram que o ON atua como um indutor do processo germinativo aumentando a germinação nos tratamentos com SNP. A exposição de sementes ao metal pesado provavelmente ocasionou um aumento das Espécies Reativas de Oxigênio produzidas em decorrência de alguma disfunção biológica causada pelo cádmio. O uso do SNP como doador de ON aumentou a germinação provavelmente pela capacidade de regulação ou eliminação dessas eros, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando a germinação de sementes.

Como um dos primeiros órgãos emitidos pela semente é a radícula, ela é a primeira a entrar em contato com a solução, sendo uma das principais vias de entrada dos metais tóxicos. É provável que este seja o primeiro órgão a sofrer danos por causa destes elementos, sendo os demais órgãos prejudicados após o transporte destes metais, ou como consequência dos seus efeitos danosos na própria radícula. O cádmio é facilmente absorvido pelas raízes das plantas e, uma vez acumulado em níveis tóxicos, pode interferir em processos metabólicos, incluindo a fotossíntese e a respiração (HASAN et al., 2009).

Verifica-se redução acentuada no comprimento da radícula quando as sementes foram tratadas em solução de cádmio, em relação às sementes embebidas em água (Figura 2B). Observa-se que o desenvolvimento da radícula foi mais comprometido pelas concentrações do metal, do que a parte aérea (Figura 2A, 2B e 3). Provavelmente, o efeito danoso à radícula acarretou a não translocação de solutos para a parte aérea da plântula. ACCIOLY et al., (2004), trabalhando com sementes de *Eucalyptus camaldulensis* observaram maior teor de Cd

na raiz primária em relação à parte aérea da plântula, sendo um indicativo da translocação limitada desse metal.

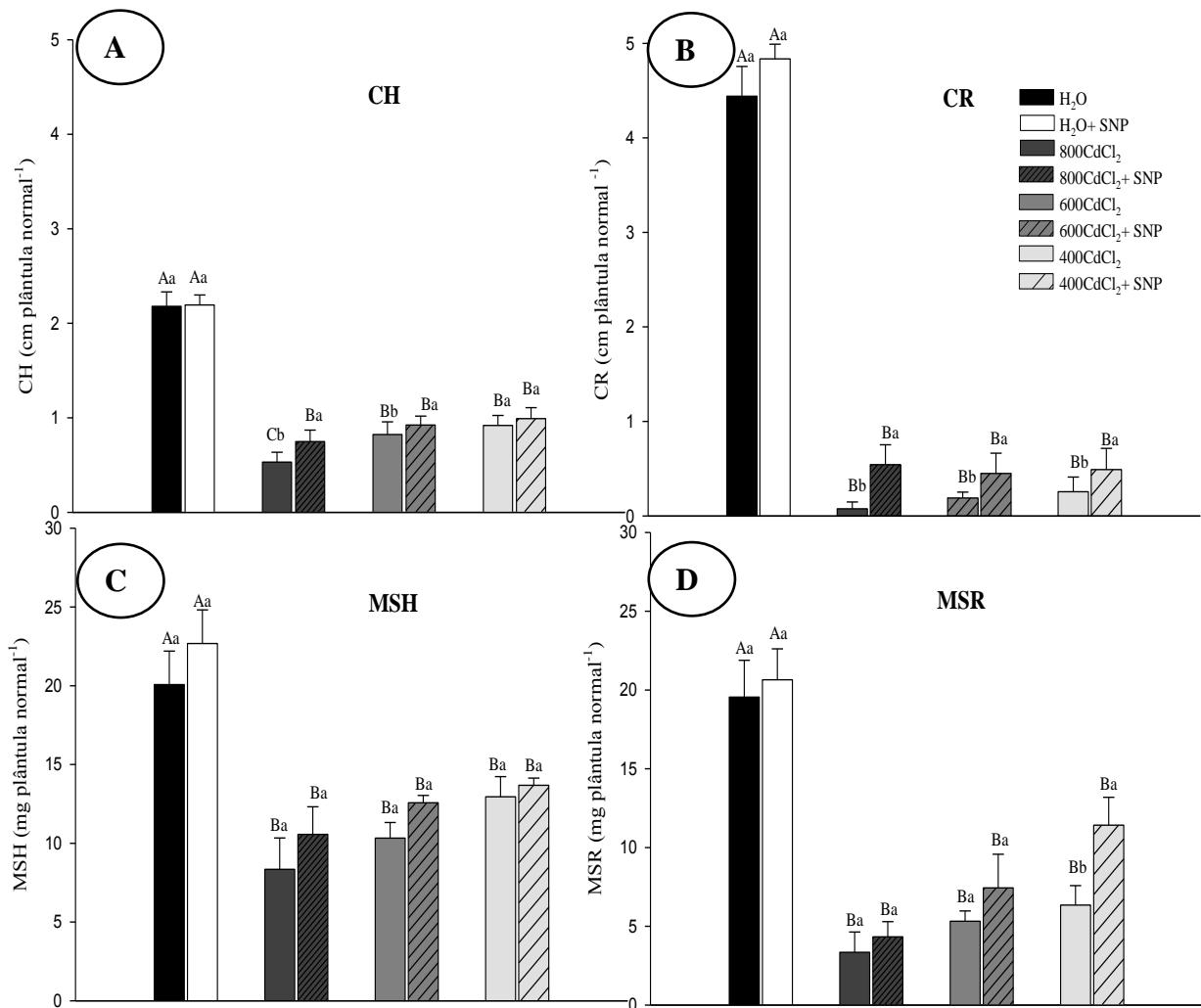


Figura 2. A- Comprimento do hipocótilo- CH(cm/plântula normal), B- comprimento da radícula- CR(cm/plântula normal), C- massa seca do hipocótilo- MSH(cm/plântula normal), D- massa seca da radícula- MSR(cm/plântula normal) de plântulas de *Sesamum indicum* nos testes conduzidos em substrato umedecido com água (controle), água + SNP, solução de cádmio 800 μM, e 800 μM de CdCl₂ + SNP, 600 μM de CdCl₂, e 600 μM de CdCl₂ + SNP, 400 μM de CdCl₂ e 400 μM de CdCl₂ + SNP.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. **Médias de cada tratamento com e sem SNP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Sugere-se que para o cádmio, um dos primeiros e mais importantes efeitos de sua toxicidade seja a inibição radicular. Exposições prolongadas do sistema radicular das plantas ao

Cd levam à manifestação de um conjunto de sintomas que expressam o efeito contínuo desse íon sobre o crescimento do sistema radicular, entre eles, o escurecimento da radícula (Figura 3D).

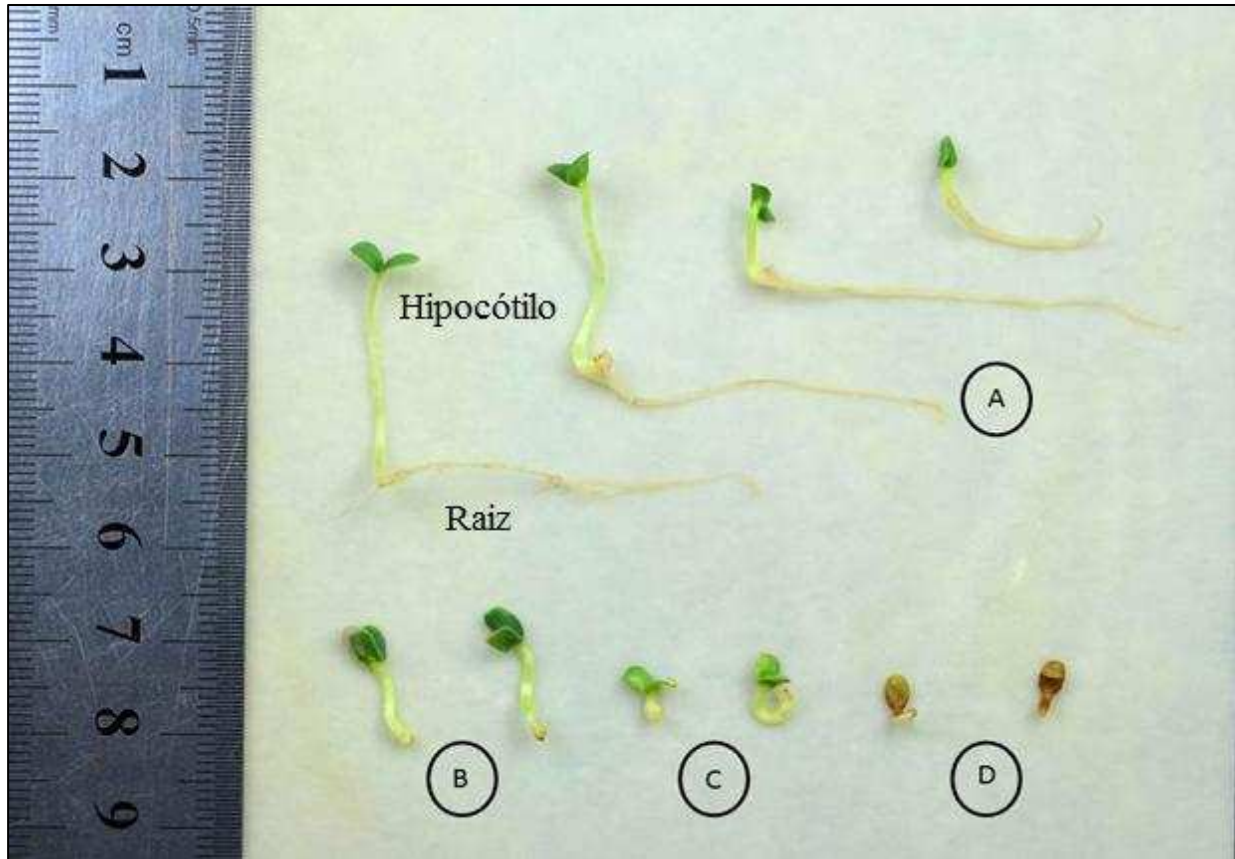


Figura 3. A- Plântulas normais de *S. indicum* obtidas de sementes germinadas em água no sexto dia; B- plântulas anormais de *S.indicum* com inibição total da radícula e parcial do hipocótilo obtidas de sementes germinadas em soluções de cádmio no sexto dia; C- plântulas anormais de *S.indicum* com inibição total da radícula e total do hipocótilo obtidas de sementes germinadas em soluções de cádmio ao sexto dia; e D- plântulas anormais de *S.indicum* escurecidas pelo efeito tóxico do elemento estressante no sexto dia de germinação.

Esses mesmos sintomas de toxidez por Cd foram observados em espécies de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* após uma semana de exposição ao metal pesado, em que as radículas apresentaram menor desenvolvimento e escurecimento em concentrações de 180 μM de Cd (SOARES et al., 2005).

Observa-se maior acúmulo de matéria seca nas plântulas do controle, que apresentaram MSH de $20,07\text{mg.plântula}^{-1}$ e $19,54\text{mg.plântula}^{-1}$ de MSR (Figura 2C e 2D, respectivamente). Na maior concentração de cádmio, houve redução de 58,4% e de 83% na MSH e na MSR em relação ao controle, respectivamente. Na concentração intermediária, a redução foi de 48,5% e de 72,8%, e na concentração inferior de cádmio a redução da MSH e da MSR em relação ao controle foi de 35,5% e 68% respectivamente. A aplicação do ON foi capaz de reverter parcialmente a redução da MSR, somente na menor concentração de cádmio.

Em relação à embebição das sementes (Figura 4) observa-se que tanto as sementes embebidas em água como em soluções de cádmio seguiram o padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994), sendo a fase I caracterizada por uma rápida absorção nas primeiras oito horas. As sementes embebidas em água apresentaram ao final da Fase I, massa aproximadamente 50% superior à massa inicial das sementes. Essa rápida absorção também foi observada nas três concentrações de cádmio, porém quanto menor a concentração, maior o ganho de massa das sementes ao longo do período de embebição. Essa rápida absorção, tanto para a solução mais concentrada quanto para a menos concentrada pode se dar pela não-seletividade das membranas quanto às concentrações crescentes do metal pesado.

Em seguida, observa-se uma certa estabilização da embebição, que foi mais evidente nas maiores concentrações de cádmio, caracterizando a fase II da embebição. Sementes embebidas em água apresentaram ganho de massa maior em relação aos demais tratamentos, atingindo o início da Fase III, caracterizada pela protrusão da radícula (BEWLEY e BLACK, 1994), após 23 horas de embebição (representação gráfica por seta). Nos demais tratamentos, houve um atraso da germinação de aproximadamente seis horas, em decorrência da menor absorção de água nas soluções com cádmio.

As plantas exercem vários tipos de controle que facilitam o movimento da água através de seus tecidos, entre eles, as AQP's, que são proteínas intrínsecas de membrana que facilitam a passagem de água pela formação de um poro (PARK et al., 2010). Em estudos relacionados à aquaporina, a atuação do Cd foi comparado ao Ca^{2+} , pelo fato de ambos serem cátions bivalentes, e pela interação de cadeias laterais. Após essa ligação, o Cd^{2+} media mudanças conformacionais que levam ao fechamento do poro pela formação de ligações do tipo pontes de hidrogênio, envolvendo cadeias laterais citoplasmáticas e grupos carbonila (TORNROTH-HORSEFIELD et al., 2006). Esse fechamento do poro da aquaporina por meio de pontes de hidrogênio altera a conformação dessa proteína e consequentemente, seu funcionamento, diminuindo a absorção da água e possivelmente do metal pesado ao longo do tempo de embebição.

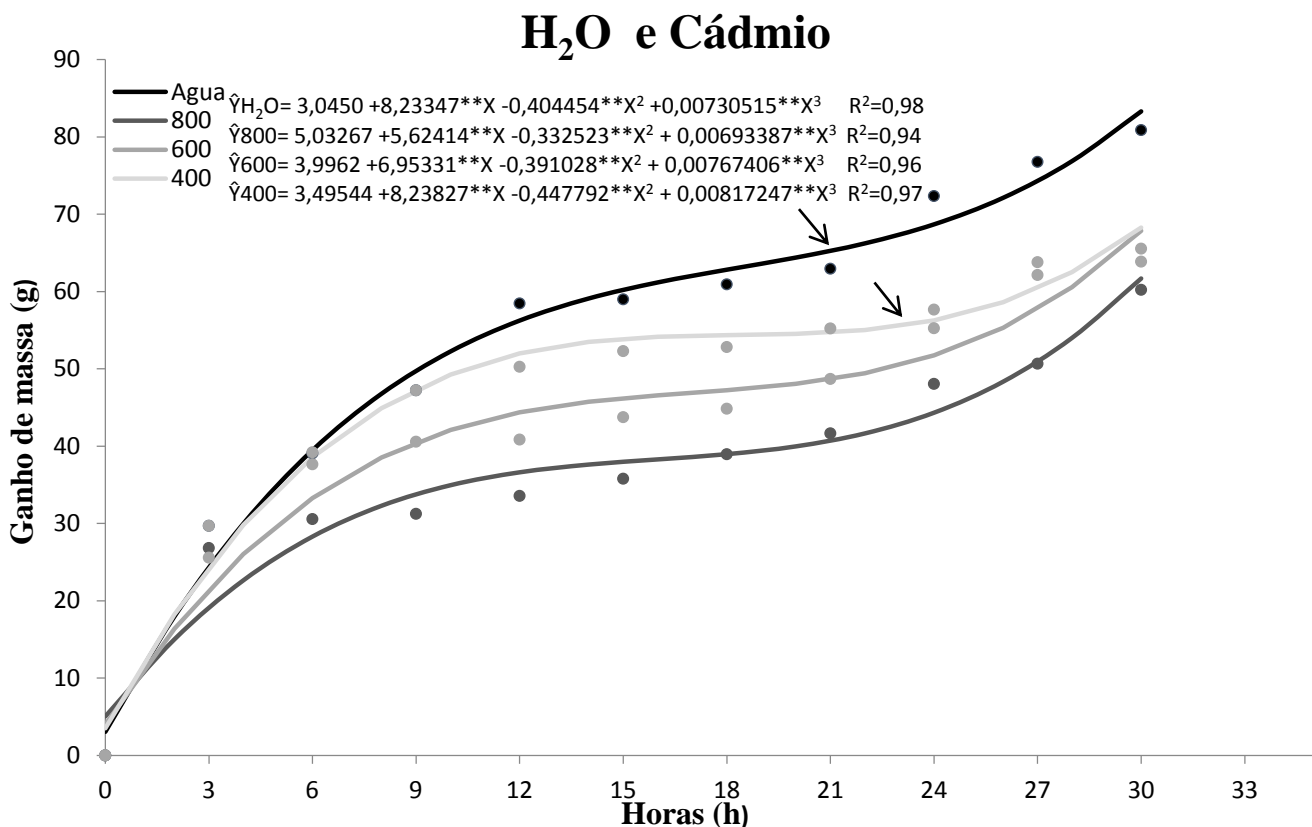


Figura 4. Ganho de massa (g) pelas sementes de *Sesamum indicum* submetidas à embebição em água (controle) e em soluções de cádmio 800 µM, 600 µM de CdCl₂ e 400 µM de CdCl₂.

Outro fato a ser considerado, é que durante o processo de germinação, Espécies Reativas de Oxigênio são geradas, com significativo aumento em presença de agentes estressores. O peróxido de hidrogênio, capaz de difundir-se livremente através das aquaporinas é de grande relevância por ser a principal via de formação do radical OH^\cdot , capaz de causar danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares. Pesquisas sugerem a atuação das aquaporinas na germinação de sementes mediando o controle temporal e espacial do transporte de água durante a embebição e o crescimento do embrião (MAUREL et al. 2008), sendo que o principal mecanismo pelo qual os radicais hidroxilas afetam especificamente a atividade da aquaporina ainda é desconhecido. Sugere-se, que o baixo peso molecular deste radical OH^\cdot permitiria seu livre acesso ao poro da proteína, e uma vez dentro do poro, eles poderiam atacar resíduos de cisteína ou outros resíduos de aminoácidos. A oxidação destes resíduos levaria a uma mudança conformacional na aquaporina resultando no fechamento do canal e redução da absorção ao longo do tempo de embebição (HENZLER et al., 2004).

O mecanismo de defesa de sementes de gergelim submetidas às diferentes concentrações de cádmio foi avaliado por meio da atividade de enzimas antioxidantes. Em geral, observa-se maior atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX (Tabelas 1 a 4, respectivamente) com o aumento progressivo do período de embebição de 0 para 24 horas, para praticamente todos os tratamentos. Estes resultados indicam uma aparente organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. No entanto, verificou-se que nos períodos de 0h e 12h, não foram observadas diferenças entre os tratamentos e a testemunha para as enzimas CAT, APX e POX, evidenciando que esses tempos são insuficientes para organização do aparato antioxidativo em sementes de gergelim submetidas ao estresse por cádmio, ou que possivelmente o efeito tóxico do cádmio não foi

expressivo até as 12h. Já no período de 24 horas, é possível observar diferença na atividade das enzimas em relação à testemunha em praticamente todos os tratamentos.

É válido lembrar, que em 0h, não houve o contato das sementes com as soluções de cádmio ou cádmio acrescido de SNP, não havendo contaminação das sementes. Dessa forma, calculou-se os valores de cada enzima, atribuindo-se valor fixo para todos os tratamentos

No tempo de 24 horas, verifica-se que a aplicação de soluções de Cd estimulou o sistema antioxidante das sementes, sendo esse aumento mais expressivo nas maiores concentrações da solução. No entanto, maior atividade das enzimas pode ser verificada nos tratamentos acrescido de SNP em relação à não aplicação do ON, o que sugere atividade desintoxicante dessas moléculas em sementes submetidas ao estresse por cádmio (Tabelas 1 a 4, respectivamente).

Cada enzima apresenta uma função específica, como a SOD que atua na remoção do superóxido O_2^- convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT (KIBINZA et al., 2011). A SOD é considerada como primeira linha de defesa antioxidante contra as EROs o que explica ser a única enzima que apresentou aumento da sua atividade em relação à testemunha já nas primeiras 12h de embebição, sendo esse aumento mais significativo nas maiores concentrações de cádmio (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	SOD (U min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)		
	0h	12h	24h
Test	0,38 ± 0,01 Ba	0,58 ± 0,02 Be	1,16 ± 0,02 Ag
800CdCl ₂	0,38 ± 0,01 Ca	3,13 ± 0,01 Ba	4,25 ± 0,05 Ae
800CdCl ₂ +SNP	0,38 ± 0,01 Ba	0,69 ± 0,02 Bd	8,21 ± 0,07 Aa
600CdCl ₂	0,38 ± 0,01 Ca	2,40 ± 0,01 Bb	4,93 ± 0,01 Ad
600CdCl ₂ +SNP	0,38 ± 0,01 Ba	0,91 ± 0,05 Bd	7,39 ± 0,01 Ab
400CdCl ₂	0,38 ± 0,01 Ca	1,89 ± 0,03 Bc	2,64 ± 0,01 Af
400CdCl ₂ +SNP	0,38 ± 0,01 Ba	0,92 ± 0,08 Bd	5,83 ± 0,06 Ac
CV(%)	-----	22,97	20,45

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão

A degradação de O₂^{•-} é catalisada pela SOD, entretanto H₂O₂ é degradado pela CAT e peroxidases (POXs). A CAT é responsável por remover peróxido de hidrogênio presente em altas concentrações nos peroxissomos, protegendo as células de danos oxidativos decompondo H₂O₂ em oxigênio molecular e água (McDONALD et al., 1999).

Na Tabela 2, verifica-se aumento da atividade da CAT em relação à testemunha em todos os tratamentos no intervalo de 24h, no entanto, ao inverso do que ocorreu com a SOD, houve um decréscimo da atividade da enzima nas maiores concentrações do metal, bem como nos tratamentos com SNP. Vários fatores podem afetar a atividade da catalase, como o agente tóxico estressante, sua concentração utilizada, o tempo de exposição e a espécie vegetal, o que, de certa forma, pode fazer com que a atividade dessa enzima seja submetida a grandes variações (PEREIRA et al., 2010). Essa diminuição da atividade da CAT também pode estar associada à inibição da síntese da enzima em presença do cádmio.

Tabela 2. Atividade da enzima catalase (CAT), em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	CAT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$)		
	0h	12h	24h
Test	15,64 \pm 1,24 Ca	22,51 \pm 3,11 Ba	35,44 \pm 3,45 Ae
800CdCl ₂	15,64 \pm 1,24 Ca	23,96 \pm 3,67 Ba	29,33 \pm 2,78 Af
800CdCl ₂ +SNP	15,64 \pm 1,24 Ca	24,08 \pm 2,43 Ba	52,19 \pm 4,12 Ac
600CdCl ₂	15,64 \pm 1,24 Ca	26,50 \pm 2,12 Ba	37,56 \pm 3,28 Ae
600CdCl ₂ +SNP	15,64 \pm 1,24 Ca	26,76 \pm 2,18 Ba	58,23 \pm 2,13 Ab
400CdCl ₂	15,64 \pm 1,24 Ca	27,59 \pm 3,12 Ba	48,69 \pm 2,17 Ad
400CdCl ₂ +SNP	15,64 \pm 1,24 Ca	27,82 \pm 1,56 Ba	64,90 \pm 1,76 Aa
CV(%)	-----	17,14	18,34

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média \pm desvio padrão

A APX age contra os intermediários reativos de oxigênio, degradando o H₂O₂, mas, diferentemente de outras enzimas, a APX depende de um sistema de regeneração de glutatona reduzida, o ciclo ascorbato-glutatona e requer ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H₂O₂ à água (NOCTOR e FOYER, 1998). Dada a importância dessa enzima na defesa antioxidante das plantas, o aumento de sua atividade tem sido apresentado por várias espécies quando expostas a diferentes agentes tóxicos, (MOLLER et al., 2007). Na Tabela 3, verifica-se a atividade da APX. No tempo de 0h não foi observada atividade da enzima (dado não apresentado). No entanto, houve atividade da enzima catalase (CAT). O fato da enzima APX não apresentar atividade em sementes secas é relatado também por Bailly et al. (2001), que justifica uma maior atividade da catalase para suprir a ausência de APX, já que as duas agem dismutando o peróxido de hidrogênio. Já no intervalo de 24h após início da embebição, de modo semelhante ao que ocorreu com a SOD (Tabela 1), a atividade da peroxidase do ascorbato (APX) e da peroxidase (POX) (Tabelas 3 e 4, respectivamente)

aumentou nas maiores concentrações de cádmio. Também foi possível observar maior atividade de ambas as enzimas nos tratamentos acrescidos de SNP.

Tabela 3. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), em sementes de *Sesamum indicum* após 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	APX ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$)	
	12h	24h
Test sem embeb	0,12 \pm 0,01 Ba	1,06 \pm 0,02 Ag
800CdCl ₂	0,09 \pm 0,02 Ba	4,71 \pm 0,01 Ac
800CdCl ₂ +SNP	0,06 \pm 0,01 Ba	7,73 \pm 0,14 Aa
600CdCl ₂	0,16 \pm 0,02 Ba	3,30 \pm 0,02 Ad
600CdCl ₂ +SNP	0,09 \pm 0,02 Ba	6,76 \pm 0,23 Ab
400CdCl ₂	0,20 \pm 0,04 Ba	2,12 \pm 0,22 Af
400CdCl ₂ +SNP	0,11 \pm 0,04 Ba	2,87 \pm 0,78 Ae
CV(%)	19,43	21,76

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média \pm desvio padrão

Tabela 4. Atividade da enzima peroxidase (POX), em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes concentrações de cádmio, acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	POX ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$)		
	0h	12h	24h
Test	8,54 \pm 1,03 Ba	11,67 \pm 0,12 Ba	20,18 \pm 0,24 Ag
800CdCl ₂	8,54 \pm 1,03 Ca	20,16 \pm 0,32 Ba	30,73 \pm 0,13 Ad
800CdCl ₂ +SNP	8,54 \pm 1,03 Ca	19,17 \pm 0,27 Ba	46,73 \pm 0,16 Aa
600CdCl ₂	8,54 \pm 1,03 Ca	16,72 \pm 0,12 Ba	25,29 \pm 0,17 Ae
600CdCl ₂ +SNP	8,54 \pm 1,03 Ca	18,17 \pm 0,31 Ba	42,73 \pm 0,17 Ab
400CdCl ₂	8,54 \pm 1,03 Ba	12,78 \pm 0,27 Ba	23,83 \pm 0,17 Af
400CdCl ₂ +SNP	8,54 \pm 1,03 Ca	18,69 \pm 0,25 Ba	34,83 \pm 0,37 Ac
CV(%)	-----	16,56	21,32

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média \pm desvio padrão.

CONCLUSÕES

O aumento na concentração de cádmio na solução de embebição ocasionou redução na germinação e no vigor das sementes, além de redução no crescimento inicial das plântulas, evidenciando o efeito tóxico desse elemento às sementes de gergelim.

O ON através da aplicação de SNP foi benéfico, proporcionando aumento na germinação, vigor e crescimento de plântulas estressadas por cádmio.

Houve aumento progressivo da atividade das enzimas antioxidativas no período de 0 a 24 horas, demonstrando organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. Esse aumento foi mais expressivo nas soluções mais concentradas de cádmio.

A associação do cádmio ao SNP aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, evidenciando um eficiente sistema protetor permitindo um aumento da tolerância dessa espécie ao cádmio e estímulo a germinação das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; MOREIRA, F.M.S. Amenização do calcário na toxidez de zinco e cádmio para mudas de *Eucalyptus camaldulensis* cultivadas em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.4, p.775-783, 2004.

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

ATSDR. 2007 CERCLA **Priority list of hazardous substances**. Agency for Toxic Substances and Disease Control. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/clist.html>>. Acesso em Jan. 2014.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science and Research**, v.14, p.93-107, 2010.

BAIRD, C. (2002) **Química ambiental**. 2ª ed. Porto Alegre, Editoria Bookman, 622p.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? **Trends in Plant Science**, v.4, p.299-300, 1999.

BELIGNI, M.V.; L. LAMATTINA. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant Cell Environ**, v. 25,p. 737-74, 2002.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York : Plenum Press, 1994. 445p.

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 (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, p. 395.

BRIDGEN, K.; STRINGER, R. LABUSKA, I. Poluição por organoclorados e metais pesados, associada ao fundidor de ferro da Gerdau em Sapucaia do Sul, Brasil, Rio Grande do Sul, **Greenpeace**, 2000.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay of catalase and peroxidase. **Methods Enzymol.**, 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.

FERNANDES, M. S. 2006. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 432p.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI A. Do nitric oxide donors mimic an endogenous NO-related response in plant? **Planta**, v. 224, p. 1363–1372, 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; REIS, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiol**, v. 59, p. 309–314, 1977.

HASAN, S.A.; FARIDUDDIN, Q.; ALI, B.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. **Journal of Environmental Biology**, v.30, n.2, p.165-174, 2009.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HENZLER,; STEUDLE E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.2053–2066, 2000.

HENZLER, T.; YE, Q.; STEUDLE, E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 1184–1195, 2004.

JOHN, R.; AHMAD, P.; GADGIL, K.; SHARMA, S. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. **International Journal of Plant Production**, v.3, n.3, p.65-76, 2009.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiol** v.57, p.315–319, 1976.

KASIM, W. A. Changes induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.8, n.1, p.123-128, 2006.

KIBINZA, S. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant science**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-7, 2003.

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

MAUREL, C.; CHRISPEELS, M.J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. **Plant Physiology**, v. 125, p. 135-138, 2001.

McDONALD, M. B. Seed deterioration physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, p.531-539, 1999.

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

NAKAGAWA, J. (1999) Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanoski FC, Vieira RD, França Neto JB (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES, Londrina p 2.1–2.21.

NOCTOR, G; FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–279, 1998.

PARK, W., SCHEFFLER, B.E., BAUER, P.J. & CAMPBELL, B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC. Plant Biology**, v.10, p.142, 2010.

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, n.88, p.629-636, 2010.

PEREIRA, F.J.; MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; CASTRO, E.M.; ALVES, J.D. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesq Agropec Bras**, v.45, p. 450-456, 2010.

QUEIROGA, V.P.; SILVA, O.R.R.F. **Tecnologias utilizadas no cultivo do gergelim mecanizado**. EMBRAPA-CNPA, Campina Grande. 142p.(Documentos, 20).

ROSI, C.; LIMA, G.P.P. Cádmio e a atividade de peroxidase duante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, 2001.

SCHOPFER, P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. **Plant Journal**, v. 28, p. 679–688, 2001.

SILVA, T.K. **Ação do óxido nítrico sobre o estresse de alumínio na germinação de arroz (*Oryza sativa* L.): alterações fisiológicas e bioquímicas.** 2007. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; DE CARVALHO, J.G.; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva **Revista Árvore**, v.29, n.2, p.175-183, 2005.

TORNROTH-HORSEFIELD, S.; WANG, Y.; HEDFALK, K.; JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; TAJKHORSHID, E.; NEUTZE, R.; KJELLBOM, P. Structural mechanism of plant aquaporin gating. **Nature**, v.439, p.688-694, 2006.

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.

WANG, P. G. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemistry Review**, v.102, p.1091-1134, 2002.

WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. (2012) Toxic effects of heavy metals on germination and physiological processes of plants. In Zaidi A, Wani PA, Khan MS, **Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation.** Springer, Berlin, pp 45–66.

ZHANG, F. Q.; WANG, Y. S.; LOU, Z. P.; DONG, J. D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, v.67, p. 44–50, 2007.

ARTIGO 2

AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES DE GERGELIM (*Sesamum indicum L.*) SUBMETIDAS AS ESTRESSE POR DÉFICT HÍDRICO

Raquel Maria de Oliveira Pires, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

¹Agrônoma, Mestranda, Depto. Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Cep 36570-000, Viçosa, MG, raquel.opires@yahoo.com.br.

²Prof^a Dr^a Associada, Depto Fitotecnia, UFV, Viçosa, MG, dcunhadas@gmail.com.

RESUMO

PIRES, Raquel Maria de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Ação protetora do óxido nítrico em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) submetidas as estresse por déficit hídrico.** Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do óxido nítrico (ON) como agente protetor e sinalizador em sementes de gergelim submetidas à diferentes potenciais osmóticos. Este potenciais foram simulados por meio de polietileno glicol 6000 (PEG), obtendo-se os seguintes tratamentos; 1) água (controle), 2) +200 μM de SNP, 3) -0,1MPa, 4) -0,1MPa +200 μM de SNP, 5) -0,2MPa, 6) -0,2MPa +200 μM de SNP, 7) -0,3MPa e 8) -0,3MPa +200 μM de SNP, totalizando oito tratamentos. As seguintes determinações foram feitas: germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de hipocótilo (CH) e radícula (CR), massa seca de hipocótilo (MSH) e radícula (MSR), curva de embebição, além da quantificação das atividades das enzimas antioxidativas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases totais (POX). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas para os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As médias obtidas nos tratamentos com e sem SNP foram comparadas pelo teste F a 5% de significância e os tempos de embebição na análise das atividades da enzimas, também pelo teste de Tukey a 5%. Para a realização da curva de embebição realizou-se regressão com ajuste polinomial de grau 3. O aumento do potencial osmótico na solução de embebição ocasionou redução na germinação e no vigor das sementes de gergelim. Entretanto, a presença de ON devido à aplicação de SNP foi benéfica, proporcionando aumento na germinação, vigor e crescimento de plântulas em relação às sementes não tratadas. Em relação à embebição, houve uma menor absorção e menor ganho de massa em sementes submetidas ao déficit hídrico em relação às

sementes embebidas em água. Não houve protrusão de radícula nos tratamentos com déficit hídrico em decorrência do atraso da Fase II. A aplicação de SNP aumentou a duração da Fase I, provavelmente pela reparação de algum dano à membrana. Houve aumento da atividade das enzimas antioxidativas no período de 0 a 24 horas, demonstrando organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. No potencial mais negativo (-0,3 MPa) houve maior atividade das enzimas SOD, APX, CAT e POX, o que sugere atividade desintoxicante dessas moléculas em sementes submetidas ao déficit hídrico mais rigoroso. A associação do PEG 6000 ao SNP aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, permitindo um aumento da tolerância dessa espécie à restrição de água e estímulo a germinação das sementes.

ABSTRACT

PIRES, Raquel Maria de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Protective action of nitric oxide on sesame seeds (*Sesamum indicum L.*) submitted to stresses by water restriction.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

The objective of this work was to investigate the effect of nitric oxide (NO) like protective and signaling agent in sesame seeds submitted to different osmotic potentials. These potentials were simulated by polyethylene glycol (PEG6000), obtaining the following treatments; 1) water (control), 2) +200 μ M de SNP, 3) -0,1MPa, 4) -0,1MPa +200 μ M de SNP, 5) -0,2MPa, 6) -0,2MPa +200 μ M de SNP, 7) -0,3MPa and 8) -0,3MPa +200 μ M de SNP, totalizing eight treatments. Were done the following determinations: 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 (DMR). It were quantified the activity of the antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and total peroxidase (POX). It was adopted the completely randomized design with five replicates. For all determinations, the experimental design was completely randomized with five replications. The dates were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means obtained for treatments were compared by Tukey test at 5% significance. The means obtained in treatments with and without SNP were compared by F test at 5% probability and the times of imbibition by the Scott-Knott test at 5%. For the realization of the imbibition curve was performed regression polynomial fit of degree 3. The increase of osmotical potential in the imbibition solution ocased reduction in the germination and vigor of seeds, beyond the reduction in initial growth of seedlings. The water restriction reduced the germination of sesame seeds, however, the presence of NO due to the application of SNP, was beneficial, promoting increase in germination, vigor and growth of

seedlings. In relation to imbibition, there was less absorption and less gain of mass in seeds submitted to water deficit in relation to those seeds in water. There wasn't emergence of radicle in treatments with water deficit due to the delay in Phase II. The application of SNP increased the duration of Phase I, probably by the repair of some damage to membrane. There was an increase of antioxidative enzymes activity in the period of 0 to 24 hours, demonstrating organization of antioxidative system in sesame seeds all long the time. In the most negative potential (-0,3 MPa) there was higher activity of SOD, APX, CAT and POX enzymes, what suggests a detoxifying activity of these molecules in seeds submitted to higher water deficit. The association of PEG 6000 to SNP, increased the activity of antioxidative enzymes, evidencing an efficient system of elimination of EROs formed during the exposition to water deficit, allowing an increase of tolerance of this specie to water restriction.

INTRODUÇÃO

No processo de germinação das sementes, a primeira etapa na sequência de eventos que culminam com a retomada do crescimento do embrião é a embebição. A água absorvida pelos tecidos das sementes é responsável pela reidratação, estando envolvida direta ou indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo subsequente. Sua participação é decisiva nas reações enzimáticas, na solubilização e no transporte de metabólicos e como reagente na digestão hidrolítica de proteínas, carboidratos e lipídios dos tecidos de reserva da semente (DELL'AQUILA, 1992; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000)

Três fases estão presentes no processo de embebição de acordo com Bewley e Black (1994). A Fase I é caracterizada por uma rápida embebição, sendo regida pelo potencial matricial (Ψ_m) da semente seca. É dependente apenas da ligação entre a água e a matriz da semente (BEWLEY et al., 2013). Na Fase II, o conteúdo de água da semente se estabiliza, mantendo-se constante por um período conhecido como intervalo de preparação para o crescimento. Essa paralisação da embebição ocorre quando o potencial hídrico da semente (Ψ_{semente}) é balanceado pelo turgor, ou potencial de pressão (Ψ_p) (CASTRO et al, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

Os processos metabólicos necessários para o crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo ocorrem na Fase II. É nesta fase que ocorre 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 Fase III é identificada pela protrusão visível da raiz primária, alcançada apenas pelas sementes vivas e não dormentes. As sementes exibem novamente absorção de água e atividade respiratória significativa. Esse aumento respiratório é atribuído especialmente à ruptura do tegumento, resultante da pressão exercida durante o aumento do volume da

semente e do alongamento do eixo embrionário, e à facilidade de acesso ao oxigênio (BEWLEY e BLACK, 1985).

A ocorrência de déficit hídrico em plantas leva à redução da velocidade de germinação e retardamento do desenvolvimento de 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 (BRACCINI et al, 1998; RAHIMI, 2013).

Uma exposição prolongada à deficiência hídrica gera diversas reações naturais nas sementes. Uma das consequências dessa exposição é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam ao estresse oxidativo, ocasionando danos à germinação e à viabilidade de sementes (BARTELS e SUNKAR, 2005; WANG et al., 2009). A perda da capacidade da semente em manter a homeostase celular das EROs, leva ao estresse oxidativo, ou seja, há um aumento da peroxidação de lipídeos e uma diminuição na atividade das enzimas sequestradoras das EROs (YAO et al., 2012).

As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses e conseguem modular respostas de defesa de forma a superar tais estresses e retornar ao metabolismo normal. Um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo é o sistema antioxidante, que pode ser enzimático ou não enzimático. O sistema antioxidante enzimático requer várias enzimas que podem eliminar o excesso de EROs produzidas pela semente. A superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e as peroxidases (POX) e a ascorbato peroxidase (APX) 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).

Alguns compostos químicos como óxido nítrico (ON), vêm sendo estudados no que se refere à proteção de plantas expostas a fatores de estresse. O ON é a segunda molécula gasosa com função sinalizadora reconhecida pela ciência (WOJTASZEK, 2000). 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 protetora ou tóxica, 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 (DELLEDONE et al., 1998; BELIGNI e LAMATTINA, 1999).

Estudos mostram que o ON é capaz de aumentar a germinação de sementes de trigo submetidas ao estresse salino (ZHENG et al., 2009), estresse por metais pesados como arsênio (SINGH E et al., 2013), cobre (HU et al., 2007), chumbo e cádmio (KOPYRA e GWÓŹDŹ, 2003), além de aumentar o acúmulo de matéria seca em plântulas de abóbora sob estresse salino (FAN et al., 2013). Essa ação do ON no aumento da tolerância dos vegetais a diferentes tipos de estresses vem sendo fortemente associada à sua capacidade em proteger as células vegetais de danos decorrentes da oxidação. No entanto, estudos com sementes submetidas ao estresse hídrico e à influência do ON como molécula protetora ainda são incipientes.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do ON como agente protetor e sinalizador em sementes de gergelim submetidas a diferentes potenciais osmóticos, através de avaliações das características fisiológicas, padrões de embebição das sementes e da atividade das enzimas antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa, no período de maio a dezembro de 2013. Foram utilizadas sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) do ano

agrícola de 2013, provenientes da EMBRAPA-Algodão. Até a realização dos experimentos, as sementes foram armazenadas em câmara à temperatura constante de 20 °C.

Para testar o efeito de concentrações de cloreto de cádmio (CdCl_2) e da solução doadora de ON (nitroprussiato de sódio-SNP), foram selecionados os seguintes tratamentos: 1) água (controle); 2) 200 μM de SNP; 3) -0,1MPa; 4) -0,1MPa +200 μM de SNP; 5) -0,2MPa; 6) -0,2MPa +200 μM de SNP; 7) -0,3MPa e 8) -0,3MPa, +200 μM de SNP, totalizando 8 tratamentos. Foram feitas as seguintes determinações:

Teste de germinação: sementes de gergelim foram colocadas para germinar em cada solução acima descrita. O teste foi realizado em placas de petri, em cinco repetições de 50 sementes, distribuídas sobre papel germitest umedecidos com 3mL das soluções e mantidas em B.O.D. O germinador foi regulado com temperatura alternada de 20-30°C, com presença de luz constante (BRASIL, 2009). Ao final do sexto dia avaliou-se a porcentagem de plântulas normais.

Primeira contagem de germinação: consistiu do registro do número de plântulas normais obtidas no terceiro dia após o início do teste de germinação, sendo os valores expressos em porcentagem.

Índice de velocidade de germinação: foi efetuado concomitantemente ao teste de germinação, procedendo-se contagens diárias do número de sementes que emitiram raiz primária maior que 1 mm e calculado de acordo com Nakagawa (1999).

Comprimento de hipocótilo e raiz primária: as sementes de cada tratamento, em cinco repetições de 25, foram semeadas equidistantes entre si, seguindo a metodologia descrita acima para o teste de germinação. Efetuou-se a medição do comprimento do hipocótilo e da raiz primária das plântulas classificadas como normais com o auxílio de régua graduada no sexto dia de germinação. Os resultados foram expressos em cm.plântula^{-1} .

Massa fresca e massa seca: foi determinada em balança analítica, com cinco repetições de 100 sementes. A massa seca das sementes foi determinada após secagem em estufa a 80°C por 48 horas.

a 80°C por 48 horas.

Curvas de embebição: para cada tratamento descrito, as sementes, em cinco repetições de 50, foram colocadas em placas de petri contendo duas folhas de papel germitest umedecido com 3,0mL de água ou soluções descritas acima. As placas foram tampadas e vedadas com fita crepe e mantidas em germinador regulado à temperatura alternada de 20-30°C. Para monitorar a absorção de água, as sementes foram pesadas secas e em intervalos de três horas após embebição. Este procedimento foi seguido até que ocorresse a protrusão da raiz primária em 50% +1 das sementes. As sementes tiveram sua massa (g) determinada por meio de balança analítica com precisão de 0,0001 g.

Atividade das principais enzimas do sistema antioxidante: as sementes foram colocadas para embeber por 12 e por 24 horas em água ou nas soluções de cádmio e cádmio acrescido de SNP, seguindo a metodologia descrita acima para o teste de germinação.

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

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela adição de 200 µL do extrato enzimático bruto a 2,9mL de meio de reação constituído de ácido ascórbico 10 mM e H₂O₂ 10 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25°C, durante o primeiro minuto de reação (NAKANO e ASADA, 1981; KOSHIBA, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de

extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (NAKANO e ASADA, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8, pirogalol 150mM e peróxido de hidrogênio 125 mM (KAR e MISHRA, 1976). O incremento na absorvância durante os dois primeiros minutos da reação a 420 nm à temperatura constante de 25°C. determinou a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE e MAEHLI, 1955) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8 e peróxido de hidrogênio 125 mM (HAVIR e MCHALE, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm foi medido durante os dois primeiros minutos da reação, que foi realizada à temperatura constante de 25 °C, sendo a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm^{-1} (ANDERSON et al., 1995) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,8, metionina 50 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, EDTA 5 mM e riboflavina 100 mM (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa internamente revestida com papel alumínio. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi determinada pela absorção a 560 nm em espectrofotômetro (GIANNOPOLITIS e RIES,

1977). As leituras foram realizadas em triplicata. Considerou-se como branco o valor de absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro pelo mesmo tempo, sendo subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50%. A atividade da SOD foi expressa em $U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Para a determinação do **teor de proteínas**, foi utilizado o método de Bradford (1976) com curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA) como proteína de referência.

Para todas as avaliações, o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos tratamentos com e sem SNP, as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade e na comparação entre os oito tratamentos, utilizou-se Tukey a 5% de significância. Os tempos de embebição na análise das enzimas foram comparados pelo teste de Tukey a 5%. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar (FERREIRA, 2000). Para a realização da curva de embebição realizou-se regressão com ajuste polinomial de grau 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de gergelim apresentaram 98,4% de germinação sob condições ótimas (germinação em água), ocorrendo redução na germinação sob estresse hídrico, com valores de 31,60% no menor potencial osmótico (-0,3MPa), 40% no potencial osmótico intermediário (-0,2MPa) e 66,8% no potencial osmótico maior (-0,1MPa) (Figura 1A). A germinação em água foi 66,8 pontos percentuais superior do que a obtida sob concentração de PEG a -0,3 MPa. Observam-se que os diferentes valores de potencial hídrico estudados atuaram reduzindo a germinação. Apesar disso, a germinação alcançada no potencial osmótico de -0,1MPa está acima de 60%, considerada mínima para comercialização de sementes de gergelim, de acordo com a Instrução Normativa nº 45, de 17 de Setembro de 2013 (BRASIL,

2013). A redução da porcentagem de germinação das sementes em condições de déficit hídrico é atribuída à menor difusão da água através do tegumento.

A aplicação de SNP não afetou a germinação das sementes em água, o que era de certo modo esperado, já que não houve estresse, pois as condições de germinação eram ideais (Figura 1A), mas permitiu obter aumento significativo na germinação das sementes dos tratamentos com PEG 6000 nas três concentrações testadas (Figura 1A).

Pelos resultados de primeira contagem de germinação (PC) e índice de velocidade de germinação (IVG), verifica-se que o déficit hídrico em qualquer dos potenciais testados, reduziu a velocidade de germinação (Figura 1B e 1C). Houve redução acentuada na velocidade de germinação com o aumento do estresse hídrico, ou seja, com o decréscimo do potencial osmóticos das soluções de PEG 6000.

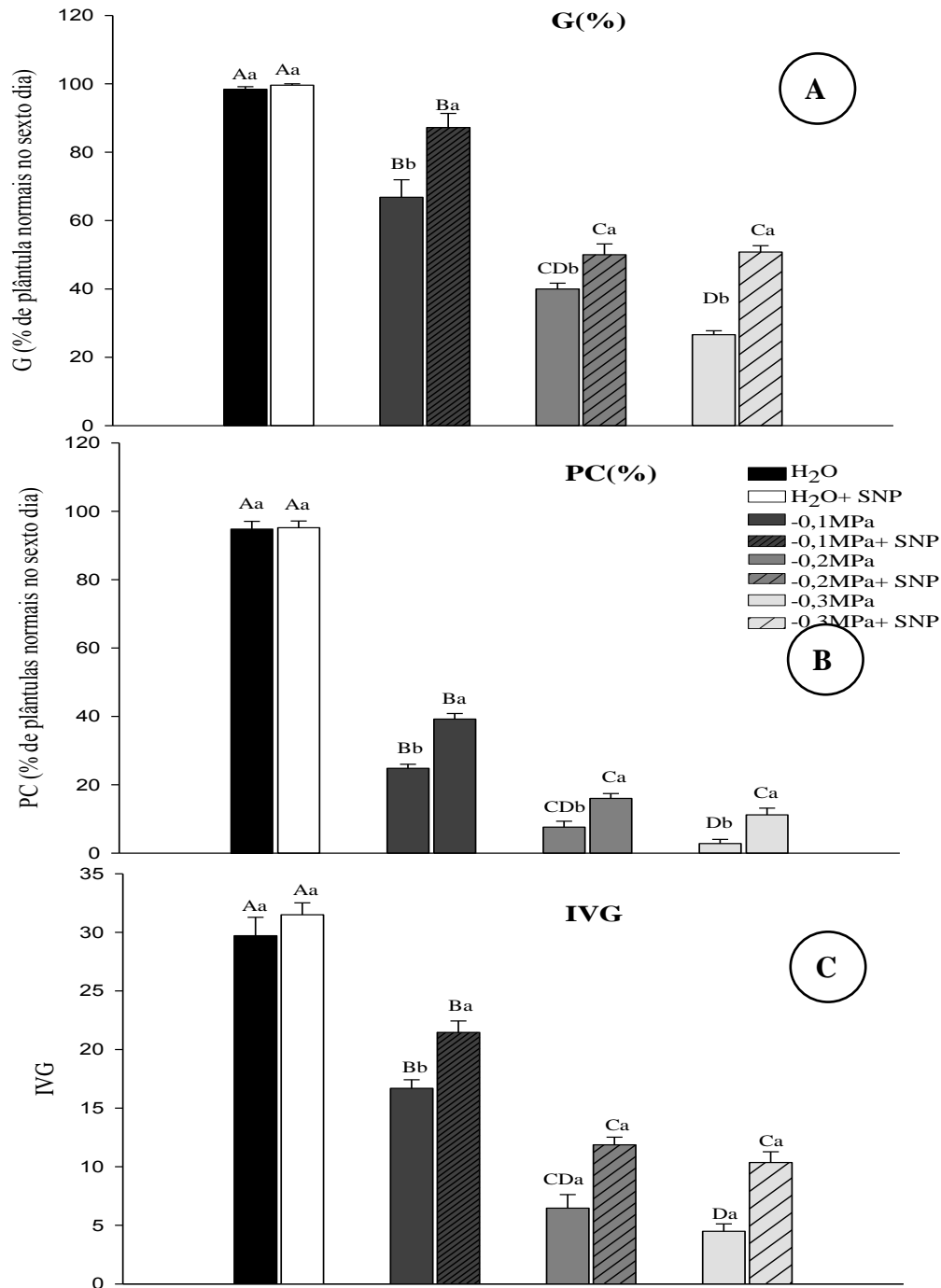


Figura 1. A- Germinação (G%), B- primeira contagem de germinação (PG%) e C- Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Sesamum indicum* submetidas à embebição em água (controle), água + SNP, e em soluções de PEG 6000 a -0,1 MPa, -0,2 MPa e -0,3 MPa e acrescidas ou não de SNP.

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. **Médias de cada tratamento com e sem SNP seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 5).

Para as sementes germinadas em água (Figura 1A) não houve aumento na velocidade de germinação, tanto pela primeira contagem como pelo IVG, com a aplicação do SNP associado à água. Quando foram utilizadas as soluções de PEG, houve aumento na velocidade de germinação (Figuras 2B e 2C) com o uso do SNP. Para o IVG, a aplicação de SNP também aumentou a velocidade de germinação em todos os potenciais testados, sendo o aumento mais significativo no maior potencial (-0,1MPa).

Os efeitos negativos da restrição hídrica na germinação de sementes têm sido relatados em diversos trabalhos para diferentes espécies. SILVA et al. (2011), trabalhando com sementes de cenoura, verificaram que o potencial osmótico -0,3 MPa afetou a germinação e a velocidade de germinação de sementes. ÁVILA et al.(2007) verificaram redução acentuada na germinação de sementes de canola quando submetidas à potenciais osmóticos mais negativos. PEREIRA e LOPES, (2011) observaram redução drástica da germinação, da velocidade de germinação e do desempenho das plântulas de sementes de pinhão manso no potencial de -0,2 MPa e TEIXEIRA et al (2011), trabalhando com sementes de crambe, verificaram redução significativa da germinação e vigor em sementes submetidas a potenciais osmóticos mais negativos, não havendo formação de plântulas normais em potenciais inferiores a -0,6 MPa. A redução da germinação das sementes quando expostas ao estresse hídrico é esperada, uma vez que a presença de solutos, no caso o PEG, diminui a absorção de água pelas sementes.

A restrição hídrica reduziu a germinação de sementes de gergelim, entretanto a presença de ON devido à aplicação de SNP estimulou a germinação das mesmas. Porém, os resultados de germinação foram inferiores à germinação em água com valores de 87,2 % no maior potencial osmótico (-0,1 MPa), 50% no potencial osmótico intermediário (-0,2 MPa) e 50,8 no menor potencial osmótico (-0,3 MPa).Os mecanismos pelos quais o ON estimula a germinação ainda não foram completamente elucidados, porém alguns estudos comprovam o efeito eficaz do ON na promoção da germinação de sementes. DENG e SONG (2012)

constatarem a eficiência do ON em promover a germinação quando sementes de alface foram submetidas ao estresse hídrico, assim como Sarah et al.,(2005) e Hang et al., (2013) com sementes de *Panicum virgatum* e trigo respectivamente. Uma hipótese utilizada por esses autores seria o efeito direto do ON no teor endógeno de ABA. A relação entre sinalização do ON e a resposta ao ABA tem sido demonstrada por alguns pesquisadores (BRIGHT ET AL. 2006, SARATH et al. 2007, ZHANG et al. 2007, NEILL et al. 2008). SARATH e colaboradores (2006) demonstraram que a aplicação de SNP reverte parcialmente o efeitos inibitórios do ABA sobre a germinação, alongamento da radícula e a emergência do coleóptilo em *Panicum virgatum*.

Em relação ao comprimento do hipocótilo (CH) (Figura 2A), observou-se redução à medida que o potencial osmótico ficou mais negativo. No potencial de -0,3 MPa foram obtidos valores para o CH 75% inferiores aos observados nas plântulas que se desenvolveram sob condições adequadas de disponibilidade de água (0,0 MPa), sendo aquele potencial o que afetou de forma mais drástica o desenvolvimento da parte aérea da plântula de gergelim.

Para o comprimento de radícula (CR), verifica-se redução quando as sementes foram submetidas ao estresse hídrico em relação àquelas embebidas em água (Figura 2B). Contudo, comparando-se os diferentes potenciais hídricos, observa-se em geral que o CR das sementes de gergelim aumentou à medida que o potencial osmótico da solução ficou mais negativo. Os menores valores para o CR foram observados nos potenciais de -0,1 e -0,2 MPa sem SNP, que também não diferiram do tratamento PEG 6000 -0,1 MPa com SNP. Assim, os valores obtidos no potencial de -0,3 MPa, com e sem aplicação de SNP, foram superiores aos observados nos potenciais de -0,1 e -0,2 MPa sem SNP, sendo inferiores apenas à testemunha (água).

De maneira geral, o sistema de raízes foi menos comprometido pela restrição hídrica do que o desenvolvimento da parte aérea. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de

que plântulas submetidas ao estresse hídrico mais rigoroso, em geral, tendem a investir maior biomassa e a desenvolver maior sistema radicular como estratégia de sobrevivência. A distribuição do sistema radicular em profundidade/comprimento em razão da insuficiência hídrica é considerada como parâmetro indicador de tolerância á seca e pode conferir adaptação em algumas espécies (BRAGA et al., 1999).

O estresse hídrico comprometeu o crescimento radicular e de parte aérea das plântulas de gergelim. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com girassol (KAYA et al., 2006), canola (ÁVILA et al., 2007), 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 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 à necessidade de maior exploração do solo em busca de maior disponibilidade hídrica em camada mais profunda do solo.

Observa-se o maior acúmulo de matéria seca nas plântulas do controle, que apresentaram MSH de 20,07 mg.plântula⁻¹ (Figura 2C) e MSR de 19,54 mg.plântula⁻¹ (Figura 2D). Quando as sementes foram submetidas ao potencial osmótico de -0,1 MPA houve redução de 53% e de 62% na MSH e na MSR, respectivamente. No potencial de -0,2 MPa, a redução foi de 69% e de 74%, e no potencial de -0,3 MPa a redução da MSH e da MSR em relação ao controle foi de 84% e 88%, respectivamente. Esses dados estão de acordo com Moraes et al. (2005), que observaram que a matéria seca de plântulas de feijão decresceu com a redução do potencial osmótico, sendo menor no potencial de -0,3MPa. O mesmo foi observado para sementes de soja, onde houve redução progressiva na massa seca das plântulas

à medida que diminuiu o potencial osmótico das soluções, sendo mínima no valor de -0,2MPa.

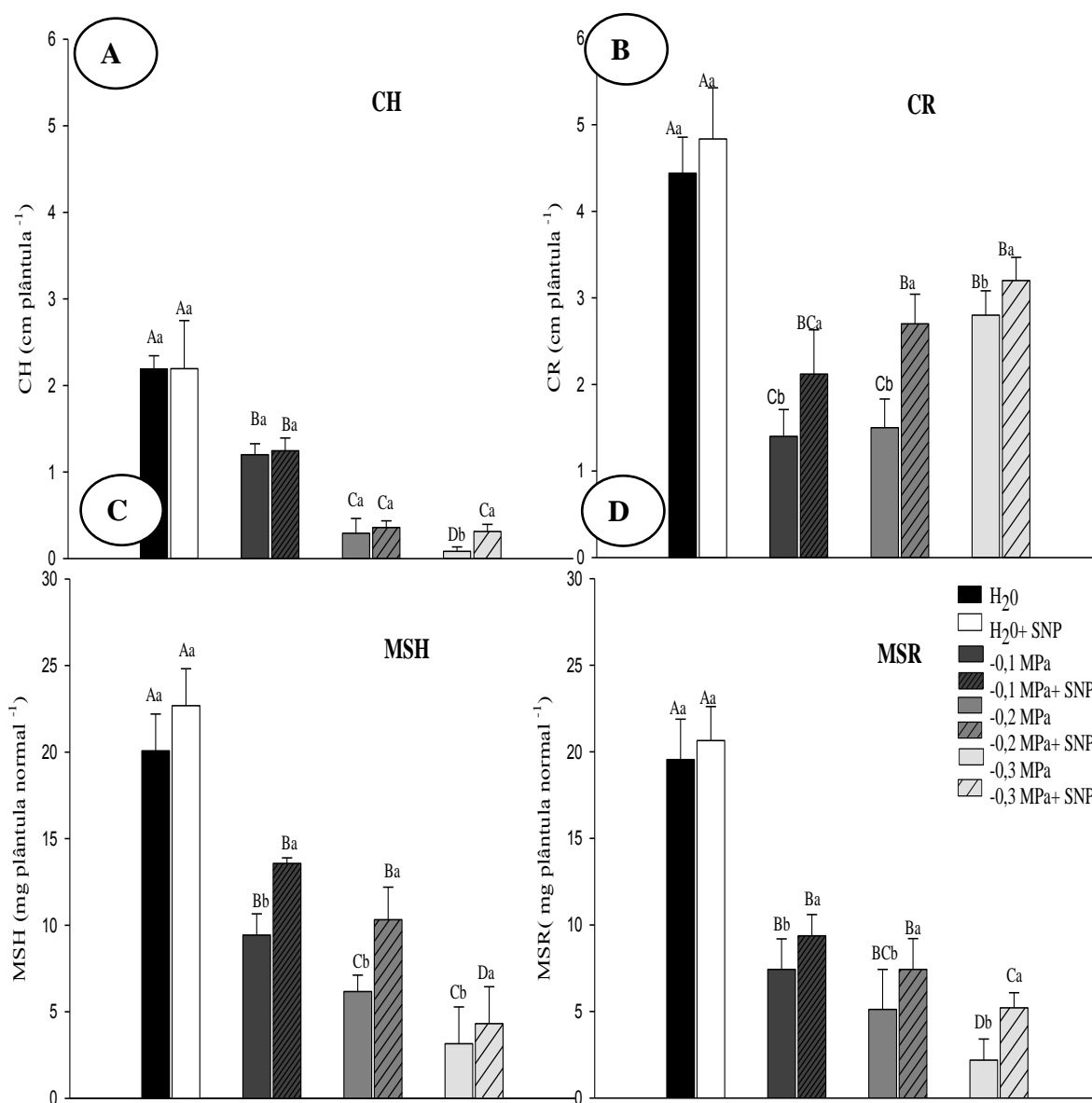


Figura 2. A- Comprimento do hipocótilo- CH(cm/plântula normal), B- comprimento da radícula- CR(cm/plântula normal), C- massa seca do hipocótilo- MSH(cm/plântula normal), D- massa seca da radícula-MSR(cm/plântula normal) de plântulas de *Sesamum indicum* submetidas á embebição com água (controle), água + SNP, maior potencial osmótico (-0,1 MPa), maior potencial osmótico acrescido de SNP (-0,1MPa + SNP), potencial osmótico intermediário (-0,2 MPa), acrescido de SNP (-0,2MPa + SNP), baixo potencial osmótico (-0,3 MPa) e acrescido de SNP (-0,3MPa + SNP).

*Médias representadas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. **Médias dos tratamentos representados pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 5).

A aplicação do ON foi capaz de reverter significativamente a redução da MSH e MSR provocada pelo estresse hídrico. Em relação à MSH, a reversão da redução no potencial osmótico de -0,1MPa foi de 4,2 pontos percentuais e 4,18 pontos no potencial intermediário de -0,2MPa. Já em relação a MSR, a reversão da redução no maior potencial osmótico foi de 1,94 pontos percentuais, 2,31 pontos no potencial intermediário e 3,02 no menor potencial.

Para germinar, as sementes necessitam alcançar um nível adequado de hidratação que permita a reativação do metabolismo e o conseqüente crescimento do eixo embrionário, sendo que quanto maior a quantidade de água disponível, mais rápida será a absorção pelas sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Em relação à embebição de sementes de gergelim, observa-se pelas Figuras 3A e 3B que as sementes de gergelim embebidas em água apresentaram o padrão trifásico de embebição proposto por Bewley e Black (2013), ocorrendo uma fase inicial curta, onde a embebição é rápida, seguida por uma fase de estabilização da hidratação (fase II) de duração um pouco mais longa. Durante a fase I ocorre a ativação do metabolismo da semente, sendo caracterizada pelo rápido aumento da respiração, proporcional ao aumento da hidratação dos tecidos das sementes (BEWLEY e BLACK, 2013). Os resultados obtidos para a embebição de sementes de gergelim em água demonstram que o final da Fase I ocorreu por volta de 10 horas após o início da embebição. Após a fase II, observa-se a protusão radicular, que ocorreu somente em sementes embebidas em água, com protusão observada em 50% das sementes +1, após aproximadamente 21 horas de embebição (representação gráfica por seta), não sendo observada emissão da radícula nos demais tratamentos de embebição em solução de PEG 6000 (Figura 3A).

O movimento e a disponibilidade de água para as sementes são de grande importância para a germinação, crescimento inicial do sistema radicular e emergência das plântulas, sendo estes fatores influenciados pelas características da própria semente e do complexo coloidal do substrato em que as sementes se encontram (ÁVILA et al., 2007). Além desses fatores, a

embebição depende do gradiente de potencial hídrico (tensão de água) existente entre a semente e o meio externo.

Nos tratamentos com soluções osmóticas de PEG 6000 e PEG 6000+SNP, verifica-se maior tempo de hidratação e menor ganho de massa das sementes durante a Fase I em comparação com a embebição em água (Figura 3A e 3B). Em soluções de PEG 6000, observa-se o início da Fase II aproximadamente 23 horas após início da embebição para os três tratamentos, sendo que o final da Fase II não pôde ser observado porque a avaliação da curva foi encerrada quando as sementes estavam na fase estacionária, ou seja, em relação à testemunha, a Fase II foi prolongada de modo que as sementes não atingiram a fase III, não ocorrendo a emergência da radícula (Figura 3A).

A restrição hídrica imposta às sementes nos potenciais de -0,1, -0,2 e -0,3 MPa reduz a velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos, restringindo o desenvolvimento do embrião, o que pode ser constatado pelos resultados de germinação (Figura 1 A), primeira contagem (Figura 1B) e IVG (Figura 2C). DELL'AQUILLA (1992) atribuiu a diminuição no crescimento do embrião às mudanças na turgescência celular em decorrência da redução da síntese de proteínas no embrião sob estresse hídrico. FALLERI (1994) afirmou que o déficit hídrico ocasiona um prolongamento da fase estacionária do processo de embebição, devido à redução da atividade enzimática e, conseqüentemente, um maior atraso na protrusão da radícula. Já Bewley e Black, (1994) associam a restrição hídrica à diminuição do metabolismo para digestão de reservas e translocação dos produtos metabolizados.

Em relação a rápida embebição na Fase I nos tratamentos com água, Mayer e Poljakoff-Mayber (1989) esclarecem que a embebição é mais rápida quando as sementes estão em contato com água pura do que quando em contato com soluções osmóticas. Na embebição de sementes acrescido de SNP (Figura 3B), houve um prolongamento da Fase I, não sendo possível a observação do início da Fase II em sementes submetidas à restrição

hídrica. Considerando que o SNP é efetivo formador de óxido nítrico (BETHKE et al. 2007), é possível supor que ele esteja atuando na recuperação da função da membrana em sementes submetidas ao estresse hídrico, tornando-as mais estáveis.

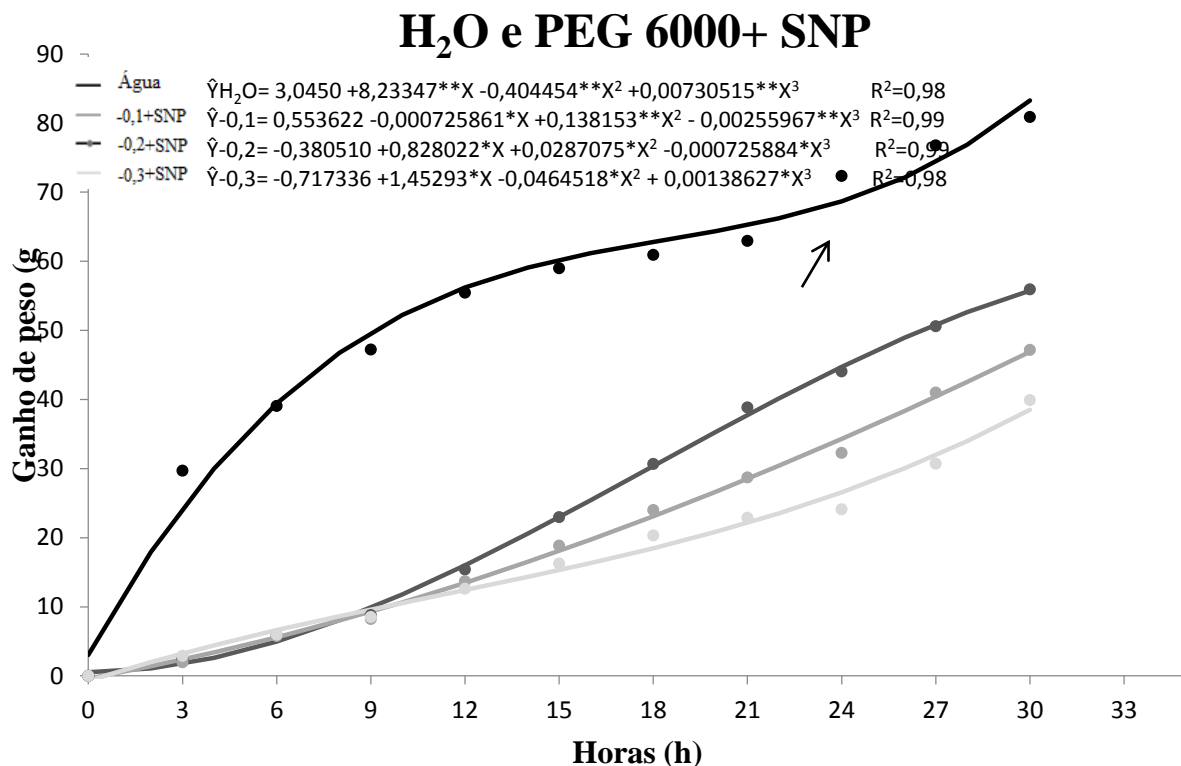
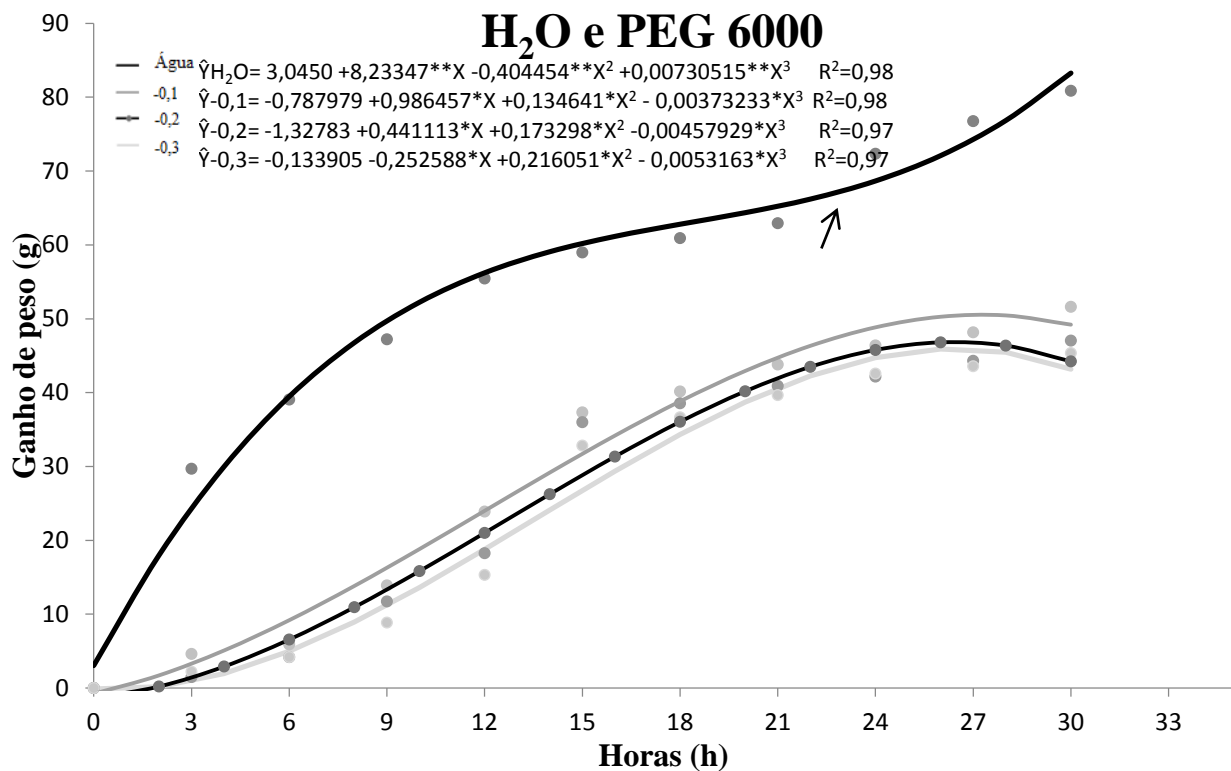


Figura 3. A- Ganho de peso de sementes de *Sesamum indicum* submetidas á embebição com água (controle), maior potencial osmótico (-0,1 MPa), potencial osmótico intermediário (-0,2 MPa) e baixo potencial osmótico (-0,3 MPa). B- Ganho de peso de sementes de *Sesamum indicum* submetidas á embebição com água (controle), maior potencial osmótico e SNP (-0,1 MPa+ SNP), potencial osmótico intermediário e SNP (-0,2 MPa+ SNP) e baixo potencial osmótico e SNP (-0,3 MPa+ SNP).

Situações adversas ou disfunções biológicas levam à formação de espécies reativas de oxigênio. O mecanismo de defesa de sementes de gergelim submetidas a diferentes concentrações de PEG 6000 foi avaliado por meio da atividade de enzimas antioxidantes (Tabelas 1 a 4, respectivamente). Em geral, observa-se maior atividade das enzimas SOD, CAT, e APX com o aumento progressivo do período de embebição de 0 para 24 horas para praticamente todos os tratamentos. Para a POX, os tratamentos nos intervalos de 0 e 12 horas não diferiram entre si. Estes resultados indicam uma aparente organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. No entanto, verificou-se que o período de 0h e 12h não diferiu estatisticamente os tratamentos em relação à testemunha para todas as enzimas, evidenciando que esses tempos são insuficientes para organização do aparato antioxidativo em sementes de gergelim submetidas ao estresse por déficit hídrico. Já no período de 24 horas, é possível observar diferença na atividade das enzimas em relação à testemunha para todos os tratamentos, com exceção da SOD no potencial de -0,1MPa.

É válido lembrar, que em 0h, não houve o contato das sementes com as soluções de PEG 6000 ou PEG 6000 acrescido de SNP. Dessa forma, calculou-se os valores de cada enzima, atribuindo-se valor fixo para todos os tratamentos nesse tempo.

Comparando-se os diferentes tratamentos no período de 24 horas de embebição (Tabelas 1 a 4), observa-se de modo geral, que para todas as enzimas estudadas, houve maior atividade enzimática no potencial osmótico mais negativo (-0,3 MPa), com menor atividade no potencial 0,0MPa (testemunha). Observa-se também maior atividade de enzimas antioxidantes nos tratamentos com aplicação de SNP em comparação com o mesmo tratamento sem SNP. Presume-se que a aplicação de SNP contribuiu para diminuir a concentração de EROs durante o processo de germinação das sementes de gergelim. Segundo Zhang et al. (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 de sementes submetidas ao estresse salino (ZHENG et al., 2009; XU et al., 2011), por calor (SONG et al., 2006) e por metais pesados (KOPYRA e GWÓŹDŹ, 2003; HU et al., 2007), devido à maior atividade das enzimas do aparato antioxidativo.

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 estas podem reagir com grande quantidade de biomoléculas, que resulta em estresse oxidativo, podendo causar danos celulares irreversíveis (BAILLY, 2010). O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e os seus derivados, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) são os principais causadores de danos oxidativos aos componentes celulares (MITTLER, 2002).

A APX age contra os intermediários reativos de oxigênio, degradando o H_2O_2 , mas, diferentemente de outras enzimas, a APX depende de um sistema de regeneração de glutathiona reduzida, o ciclo ascorbato-glutathiona e requer ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água (NOCTOR e FOYER, 1998). Dada a importância dessa enzima na defesa antioxidante das plantas, o aumento de sua atividade tem sido apresentado por várias espécies quando expostas a diferentes agentes tóxicos, (MISHRA et al., 2006; MOLLER et al., 2007). Na Tabela 3, verifica-se a atividade da APX. No tempo de 0h não foi observada atividade da enzima (dado não apresentado). No entanto, houve atividade da enzima catalase (CAT). O fato da enzima APX não apresentar atividade em sementes secas é relatado também por Bailly et al. (2001), que justifica uma maior atividade da catalase para suprir a ausência de APX, já que as duas agem dismutando o peróxido de hidrogênio.

Já no intervalo de 24 h após início da embebição, de modo semelhante ao que ocorreu com a SOD (Tabela 1), a atividade da peroxidase do ascorbato (APX) e da peroxidase (POX) (Tabelas 3 e 4, respectivamente) aumentou nas maiores concentrações de cádmio. Também foi possível observar maior atividade de ambas as enzimas nos tratamentos acrescidos de SNP.

Tabela 1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	SOD (U min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)		
	0h	12h	24h
Test	0,38 ± 0,01 Ba	087 ± 0,01 Ba	1,09 ± 0,06 Ae
-0,1MPa	0,38 ± 0,01 Ca	1,08 ± 0,03 Ba	1,22 ± 0,14 Ae
-0,1MPa +SNP	0,38 ± 0,01 Ca	1,21 ± 0,14 Ba	2,18 ± 0,32 Ac
-0,2MPa	0,38 ± 0,01 Ba	0,79 ± 0,03 Ba	1,69 ± 0,52 Ad
-0,2MPa +SNP	0,38 ± 0,01 Ba	1,37 ± 0,06 Ba	2,68 ± 0,31 Ab
-0,3MPa	0,38 ± 0,01 Ca	1,27 ± 0,30 Ba	1,75 ± 0,18 Ad
-0,3MPa +SNP	0,38 ± 0,01 Ca	1,33 ± 0,32 Ba	3,29 ± 0,23 Aa
CV(%)	-----	23,21	19,43

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão

Tabela 2. Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12

Tabela 2. Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	CAT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$)		
	0h	12h	24h
Test	15,64 \pm 1,24 Ca	29,51 \pm 2,13 Ba	32,82 \pm 2,56 Af
-0,1MPa	15,64 \pm 1,24 Ca	33,68 \pm 1,97 Ba	42,88 \pm 4,23 Ae
-0,1MPa +SNP	15,64 \pm 1,24 Ca	34,62 \pm 1,89 Ba	50,31 \pm 3,67 Ac
-0,2MPa	15,64 \pm 1,24 Ca	29,58 \pm 2,31 Ba	49,53 \pm 3,21 Ad
-0,2MPa +SNP	15,64 \pm 1,24 Ca	34,04 \pm 3,14 Ba	55,44 \pm 4,23 Ab
-0,3MPa	15,64 \pm 1,24 Ca	33,26 \pm 3,18 Ba	49,13 \pm 3,10 Ad
-0,3MPa +SNP	15,64 \pm 1,24 Ca	34,09 \pm 2,33 Ba	63,26 \pm 3,67 Aa
CV(%)	-----	18,45	23,21

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média \pm desvio padrão

Tabela 3. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) em sementes de *Sesamum indicum* após 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	APX ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$)	
	12h	24h
Test	0,11 \pm 0,01 Ba	1,39 \pm 0,40 Af
-0,1MPa	0,05 \pm 0,01 Ba	1,67 \pm 0,32 Ae
-0,1MPa +SNP	0,13 \pm 0,02 Ba	3,75 \pm 0,21 Ac
-0,2MPa	0,03 \pm 0,01 Ba	3,28 \pm 0,19 Ad
-0,2MPa +SNP	0,09 \pm 0,01 Ba	4,91 \pm 0,31 Ab
-0,3MPa	0,06 \pm 0,01 Ba	3,59 \pm 0,08 Ad
-0,3MPa +SNP	0,05 \pm 0,02 Ba	5,72 \pm 0,08 Aa
CV(%)	21,93	15,38

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média \pm desvio padrão

Tabela 4. Atividade da enzima peroxidase (POX) em sementes de *Sesamum indicum* após 0, 12 e 24 horas de embebição em soluções com diferentes potenciais osmóticos acrescidas ou não de SNP.

Tratamento	POX ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$)		
	0h	12h	24h
Test	8,54 \pm 1,03 Aa	12,14 \pm 1,78 Aa	18,45 \pm 2,34 Af
-0,1MPa	8,54 \pm 1,03 Ba	13,17 \pm 1,23 Ba	31,39 \pm 4,32 Ae
-0,1MPa +SNP	8,54 \pm 1,03 Ba	9,23 \pm 1,29 Ba	52,99 \pm 3,21 Ac
-0,2MPa	8,54 \pm 1,03 Ba	10,45 \pm 2,01 Ba	44,39 \pm 2,28 Ad
-0,2MPa +SNP	8,54 \pm 1,03 Ba	10,34 \pm 1,45 Ba	59,12 \pm 3,21 Ab
-0,3MPa	8,54 \pm 1,03 Ba	11,87 \pm 2,65 Ba	48,45 \pm 2,89 Ad
-0,3MPa +SNP	8,54 \pm 1,03 Ba	12,45 \pm 3,12 Ba	65,45 \pm 4,67 Aa
CV(%)	-----	21,36	19,22

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.**Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Média \pm desvio padrão

É interessante observar que para todas as enzimas analisadas, os tratamentos isolados de -0,2 MPa e -0,3 MPa não diferiram entre si, permitindo supor que o estresse oxidativo em ambos os potenciais foi semelhante. Resultados semelhantes foram encontrados nos testes de germinação, primeira contagem de germinação e índice de velocidade de germinação, onde os dois potenciais hídricos se assemelharam significativamente nos parâmetros analisados.

CONCLUSÕES

O aumento do potencial osmótico na solução de embebição ocasionou redução na germinação e no vigor das sementes, além de redução no crescimento inicial das plântulas.

A restrição hídrica reduziu a germinação de sementes de gergelim, entretanto a presença de ON devido à aplicação de SNP foi benéfica, proporcionando aumento na germinação, vigor e crescimento de plântulas nestas condições

Em relação à embebição, houve uma menor absorção e menor ganho de massa em sementes submetidas ao déficit hídrico em relação às sementes embebidas em água. Não houve protrusão de radícula nos tratamentos com déficit hídrico em decorrência do atraso da Fase II. A aplicação de SNP aumentou a duração da Fase I.

Houve aumento da atividade das enzimas antioxidativas no período de 0 a 24 horas, demonstrando organização do sistema antioxidante nas sementes de gergelim com o decorrer do tempo. No potencial mais negativo (-0,3 MPa) houve maior atividade das enzimas SOD, APX, CAT e POX, o que sugere atividade desintoxicante dessas moléculas em sementes submetidas ao déficit hídrico mais rigoroso.

A associação do PEG 6000 ao SNP aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, permitindo um aumento da tolerância dessa espécie à restrição de água e estímulo a germinação das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ÁVILA, M.R.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; FAGLIARI, J.R.; SANTOS, J.L. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola, **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, 2007.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science and Research**, v.14, p.93-107, 2010.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plants Sciences**, v.24, p.23-58, 2005.

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.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seed: physiology of development and germination**. New York, Plenum Press, 1985. 367p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York : Plenum Press, 1994. 445p.

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.

BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. IN: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p.152-175.

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.

BRAGA, L. F. *et al.* Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 02, p. 95-102, 1999.

BRASIL. Instrução Normativa nº 45, de 17 de Setembro de 2013. Legislação de sementes e mudas. Brasília: 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 2009. 399p.

BRIGHT, J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T., WEIR, I.S. & NEILL, S.J. ABA induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. **Plant Journal**, v. 45, p. 113–122, 2006.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In **Germinação: do básico ao aplicado** (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67. 2004.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1995.

DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, v.69, n.2,p.167-171, 1992.

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.

FALLERI, E. Effect of water stress on germination in six provenances of *Pinus pinaster* Ait, *Seed and Science Technology*, v.22, p.591-599, 1994.

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.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR(Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. **In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA**, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

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.

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.

KOPYRA, M.; GWÓZDŹ, 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.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. FEALQ: Piracicaba, 2005. 495p.

MAYER, A.C. & POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. London: Pergaman Press, 1989. 270p.

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.

MISHRA, S.; SVIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; KUMAR, R.; SETH, C.S.; GUPTA, D.K. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere**, v,6, p. 1027-1039, 2006.

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

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

MORAES, G.A.F.; DE MENEZES, N.L.; PASQUALLI, L.L. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. **Ciência Rural**, v.35, n. 4, p.776-780, 2005

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1-2.24

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.

NEILL, S.J., BARROS, R., BRIGHT, J., DESIKAN, R., HANCOCK, J., HARRISON, J., MORRIS, P., RIBEIRO, D. & WILSON, I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany** v.59, p. 165–176, 2008.

NOCTOR, G; FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. Annual **Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–279, 1998.

PACE PF; CRALLE HT; EL-HALAWANY SHM; COTHREN JT; SENSEMAN SA. 1999. Drought-induced Changes in Shoot and Root Growth of Young Cotton Plants. **The Journal of Cotton Science** 3: 183-187.

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

PEREIRA, M.D.; LOPES, J.C. Germinação e desenvolvimento de plântulas de pinhão manso sob condições de estresse hídrico simulado **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1837-1842, 2011.

PINTO, C.M.; TÁVORA, F.J.F.; BEZERRA, M.A.; CORREA, M.C.M. Crescimento, distribuição do sistema radicular em amendoim gergelim e mamona a ciclos de deficiência hídrica. **Revista Ciência Agronômica**, v.39, p.429-436, 2008.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985.289p.

RAHIMI, A. Seed priming improves the germination performance of cumin (*Cuminum syminum* L.) under temperature and water stress. **Industrial Crop and Products**, v.42, p.454-460, 2013.

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.

SARATH, G., HOU, G., BAIRD, L.M., MITCHELL, R.B. 2007. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4-grasses. *Planta* 226: 697–708.

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.

TEIXEIRA, R.N.; TROLEDO, M.Z.; FERREIRA, G.; CAVARIANI, C.; JASPER, S.P. Germinação e vigor de sementes de crambe sob estresse hídrico. **Irriga**, v. 16, p. 42-51, 2011.

TIAN, X.; LEI, Y. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v.50, p.775-777, 2006.

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.

YUAN-YUAN, SUN.; YONG-JIAN, SUN.; MING-TIAN, WANG.;XU-LIU, LI.; XIANG, GOU.; RONG, HU.;JUN, MA. Effects of seed priming on germination and seedling growth under water stress in rice. **Acta Agronomica Sinica**, v.36, p.1931-1940, 2010.

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.

WOJTASZEK, P. Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. **Phytochemistry**, v. 54,p. 1–4, 2000.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. **New Phytologist**, v.132, p.361-373, 1996.

ZHANG, A.Y., JIANG, M.Y., ZHANG, J.H., TAN, M.P. & HU, X.L. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. **New Phytologist**, v.175, p. 35–60,2007.

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.

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.