

THAIS DE CASTRO MORAIS

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE
GIRASSOL SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO E À
DETERIORAÇÃO**

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2015

THAIS DE CASTRO MORAIS

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE
GIRASSOL SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO E À
DETERIORAÇÃO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2015

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

T

M827a
2015

Morais, Thaís de Castro, 1989-
Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de
girassol submetidas ao estresse hídrico e à deterioração / Thaís
de Castro Moraes. – Viçosa, MG, 2015.
vii, 44f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.37-44.

1. Girassol. 2. *Heliantuus annus*. 3. Sementes. 4. Déficit
hídrico. 5. Envelhecimento. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em
Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 631.521

THAIS DE CASTRO MORAIS

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE
GIRASSOL SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO E À
DETERIORAÇÃO**

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

APROVADA: 16 de julho de 2015

Laércio Júnio da Silva
(Coorientador)

Marcelo Coelho Sekita

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

*Aos meus pais, Ana e Joaquim cujo
apoio e incentivo nunca me faltaram,*

Dedico.
ii

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho.

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

À toda minha família, em especial, Wagner, Lud, Juliana, Daniel, Victor e Luisa, principalmente aos meus pais Ana e Joaquim pelo carinho, amizade e incentivo.

Ao meu namorado, Geverson, por todo apoio, dedicação e paciência.

À professora e orientadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias pela orientação e confiança depositadas em mim em tão pouco tempo.

Ao professor Laécio Junio da Silva pelo apoio no trabalho.

Aos professores Luiz Fernando Finger e Maria Goreti, por disponibilizar os laboratórios para as análises bioquímicas e aos amigos que fiz por lá.

Aos amigos Paola Hormaza e Paulo Hilst pela ajuda de prontidão na execução dos trabalhos.

À todos os amigos do GSem, em especial Marcelo, Aparecida, Daniel, Tiago, Eduardo, Antônio, Pazzin, Maicon, Guilherme, Joyce, Larissa, Hamilton e Rubens, pelo apoio, ajuda e convívio diário.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Milena, Carla, Renan, Paula, Acácio, Thiago, Roberto, Willian, Karla, Sarah, Vitor e Luna pelo companheirismo nos estudos.

Às minhas queridas amigas Natália, Francine, Sarah, Dani, Bia, Camila pelo companheirismo e pelos momentos de risadas.

Aos funcionários José Custódio, José Maurício, Geraldo, Luciene e Mercês por toda ajuda prestada no decorrer do curso.

À empresa HELIAGRO por fornecer a sementes.

À todos que de certa forma participaram de mais essa etapa.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Germinação	5
2.2 Primeira contagem de germinação	5
2.3 Comprimento de parte aérea e raiz	5
2.4 Massa seca de parte aérea e raiz	6
2.5 Emergência de plântulas	6
2.6 Envelhecimento acelerado.....	6
2.7 Condutividade elétrica.....	6
2.8 Avaliação do efeito do estresse hídrico e da deterioração no potencial fisiológico, na atividade enzimática e na peroxidação de lipídios em sementes de girassol.....	7
2.8.1 Estresse hídrico.....	7
2.8.2 Deterioração	7
2.8.3 Comprimento de parte aérea e raiz	8
2.8.4 Massa seca de parte aérea e raiz	8
2.8.5 Condutividade elétrica.....	8
2.8.6 Avaliações bioquímicas.....	8
2.8.7 Avaliação da peroxidação de lipídios.....	8
2.8.8 Determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo.....	9
2.8.8.1 Obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	9
2.8.8.2 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	9
2.8.8.3 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT).....	10
2.8.8.4 Determinação da atividade das peroxidases (POX)	10
2.8.8.5 Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX).....	10
2.8.8.6 Determinação de proteínas	11
2.8.9 Análise estatística	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1 Caracterização dos lotes de sementes de girassol	12

3.2 Efeito do estresse hídrico na germinação de sementes de girassol	13
3.2.1 Germinação e vigor de sementes de girassol submetidas ao estresse hídrico.....	13
3.2.2 Comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz.....	15
3.2.4 Peroxidação de lipídios	17
3.2.5 Atividade enzimática	19
3.3 Efeito da deterioração na germinação de sementes de girassol.....	25
3.3.1 Germinação e vigor de sementes de girassol submetidas à deterioração .	25
3.3.2 Comprimento de parte aérea e raiz	26
3.3.3 Condutividade elétrica.....	27
3.3.4 Peroxidação de lipídios	28
3.3.5 Atividade enzimática	30
4. CONCLUSÕES	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

MORAIS, Thais de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de girassol submetidas ao estresse hídrico e à deterioração.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientador: Laércio Junio da Silva.

O girassol é cultivado na maioria dos estados brasileiros, sendo assim está sujeito à variações ambientais durante a emergência em campo, em especial a disponibilidade hídrica. Além disso, por ser uma semente altamente rica em óleo está mais propensas à deterioração após a colheita. Nesse propósito, objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de girassol submetidas ao estresse hídrico e à deterioração. Foram utilizadas sementes de dois lotes de girassol da cultivar Helio 253, fornecidas pela empresa HELIAGRO. As sementes foram submetidas aos testes de germinação e vigor para caracterização dos lotes. Em seguida foram submetidas aos tratamentos de estresse hídrico nos potenciais 0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 e avaliados pelos testes de germinação, primeira contagem da germinação, comprimento e massa seca de parte aérea e raiz. As avaliações bioquímicas tais como, peroxidação de lípidios e atividade das enzimas do sistema antioxidantes SOD, CAT, POX e APX foram realizadas no 2º, 4º e 6º dias após a semeadura (DAS). As mesmas avaliações foram realizadas para as sementes submetidas à deterioração de 41°C/ 100% UR por 0, 48, 72 e 96 horas. Os lotes apresentaram porcentagem de germinação semelhante, mas pelos testes de vigor realizados, o lote 1 foi superior ao lote 2. A redução do potencial osmótico provocou redução da porcentagem de germinação dos lotes, independentemente do vigor das sementes, associada ao menor crescimento das plântulas, com redução tanto no comprimento, quanto na massa seca de parte aérea e de raiz. Quando submetidas ao estresse hídrico, observou-se maior atividade da SOD e da APX para o lote de maior vigor no segundo dia após a semeadura. A atividade da POX foi reduziu ao longo da germinação das sementes dos dois lotes. Nas sementes submetidas à deterioração, verificou-se aumento na produção de MDA durante a germinação do lote de menor vigor e . Para ambos os lotes, houve, redução da atividade da SOD e da CAT e aumento da POX e APX durante a germinação das sementes.

ABSTRACT

MORAIS, Thais de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Physiological and biochemical changes in sunflower seeds under water stress and deterioration.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coadviser: Laércio Junio da Silva.

The sunflower is cultivated in most Brazilian states, therefore it is subject to environmental changes during the field emergence, especially water availability. Furthermore, being a oilseed is more subject to deterioration after harvest. In this way, the objective of this study was to evaluate the physiological and biochemical changes in sunflower seeds under water stress and after the deterioration. Seeds of two lots of sunflower, cultivar Helio 253, provided by HELIAGRO company were used. The seeds were submitted to germination and vigor tests to characterize the lots. Then they were subjected to water stress treatments on potential 0,0; -0.2; -0.4; -0.6 and -0.8 MPa and evaluated by germination, first count of germination, length and dry weight of shoot and root. The biochemical evaluations such as peroxidation of lipids and enzyme activity of antioxidant system SOD, CAT, POX and APX were evaluated on the 2nd, 4th and 6th days after sowing (DAS). The same evaluations were performed for the seeds subjected to the deterioration of 41° C / 100% RH for 0, 48, 72 and 96 hours. The lots showed similar germination, but by the vigor test, the lot 1 was superior to the lot 2. The reduction of the osmotic potential caused reduced in germination of lots, regardless of seed vigor, associated with lower seedling growth with reduction in length and dry weight of shoot and root. When exposed to water stress, there was increased activity of SOD and APX for the lot of higher vigor on the second day after sowing. The POX activity was reduced along the seed germination of two lots. In seeds subjected to deterioration, there was an increase in MDA production during germination for the lot of smaller vigor. For both lots, there was a reduction in SOD activity and CAT and POX and APX increased during the seed germination.

1. INTRODUÇÃO

O expressivo aumento da área de cultivo de girassol (*Helianthus annuus* L.) faz com que a demanda por sementes de alta qualidade seja crescente, sendo um desafio para as empresas produtoras do país, produzir e manter a qualidade das sementes, atendendo às necessidades e expectativas do mercado. A qualidade da semente compreende uma série de características e atributos que determinam o seu valor para semeadura, sendo considerados os de natureza genética, física, fisiológica e sanitária que influenciam na capacidade da semente em originar plantas vigorosas e representativas (MARCOS FILHO, 2005).

No Brasil, atualmente, o cultivo de girassol se concentra na região do cerrado durante a entressafra das culturas de soja e milho, mas é cultivado na maioria dos estados brasileiros (CONAB, 2014). Sendo assim, a cultura está sujeita à variações nas condições edafoclimáticas, em especial a disponibilidade hídrica do solo no momento da semeadura (Backes et al., 2008). Embora a cultura do girassol seja caracterizada como medianamente sensível à seca (Ralf, 2008), sua produção é afetada substancialmente pelo estresse hídrico. Neste sentido, depois de uma análise da disponibilidade de água durante um período de 39 anos, Bosnjak (2004) relatou que a seca pode causar perdas de até 50% na produção de girassol e previu que secas severas podem ser esperadas no futuro com as mudanças climáticas globais.

A restrição hídrica no solo por ocasião da semeadura reduz a germinação e o desenvolvimento das plântulas em razão da interferência no processo de embebição e de alongamento celular (Marcos Filho, 2005). Além disso, sob condições de déficit hídrico, o desempenho inicial das plantas depende da qualidade fisiológica das sementes. Albuquerque e Carvalho (2003) verificaram que a influência do vigor das sementes de girassol na redução da emergência está associada à condição de estresse a qual estas foram submetidas, além disso sementes com maior vigor, previamente avaliadas pelo teste de envelhecimento acelerado, tiveram menor redução da emergência de plântulas sob restrição hídrica de -1,1 MPa.

A redução do vigor das sementes está relacionada com os eventos iniciais da sequência de deterioração, a qual resulta em alterações fisiológicas,

bioquímicas, físicas e citológicas, culminando com a morte da semente (Marcos Filho, 2005). Essas alterações são causadas pela deterioração natural das sementes e também por diversos fatores de estresse como, por exemplo, estresse hídrico e a deterioração, que acabam gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bewley et al., 2013).

Elevadas temperatura e a umidade são as principais causas da deterioração da semente. Como a semente apresenta respostas fisiológicas e bioquímicas variáveis em temperaturas diferentes, é recomendável determinar a influência desta na qualidade fisiológica de cada espécie de interesse (Nascimento, 2000).

Sementes oleaginosas são mais propensas à deterioração o que reduz a sua longevidade. Segundo McDonald (1999), a deterioração em sementes pode levar a quatro tipos de danos celulares: disfunção mitocondrial, inativação de enzimas, degradação de membranas e danos genéticos. A taxa de deterioração das sementes varia de acordo com a espécie e também com o lote, mas segundo Kibinza et al. (2011), altas temperaturas e umidades aceleram esse processo. Bailly (1996), trabalhando com sementes de girassol, observou a associação entre a perda da viabilidade das sementes e o aumento da peroxidação de lipídios após as sementes serem submetidas à temperatura de 45 °C e umidade relativa de 100 %.

A peroxidação de lipídios é um processo que ocorre em cadeia, sendo desencadeada pelo ataque de radicais livres às duplas ligações de ácidos graxos insaturados (Wilson e McDolnald, 1986), sendo responsável pela degradação dos lipídios presentes nas membranas celulares ou armazenados como reserva pelas sementes. Em função desse processo, há redução da sua disponibilidade como reserva mobilizável para o crescimento das plântulas e também pode levar ao acúmulo de derivados tóxicos nas sementes, o que gera estresse oxidativo e leva à perda de viabilidade das sementes (Hendry, 1993; McDonald, 1999).

O produto final da peroxidação de lipídios é o hidroperóxido de lipídio (ROOH), a partir do qual é formado aldeído, incluindo o malonaldeído (MDA). Assim, a determinação do conteúdo de MDA é um método comumente usado para a determinação da peroxidação de lipídios (Sung e Jeng, 1994), sendo observado acúmulo desse composto com a redução da viabilidade das sementes devido ao processo de deterioração em várias espécies (Lehner et al., 2008).

Os radicais livres, responsáveis pela peroxidação de lipídios, são moléculas resultantes da redução do oxigênio molecular com consequente formação de produtos tóxicos (Hendry, 1993). Várias formas de radicais livres são encontradas em tecidos vivos, entre eles, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), cada um com capacidade diferente em causar danos às células (Hendry, 1993; McDonald, 1999). As reações de estresse oxidativo que ocorrem nas células das plantas estão ligadas à formação desses radicais. De acordo com Tian et. al. (2008), houve aumento significativo no conteúdo do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio em sementes de soja após serem submetidas à altas temperatura e umidade.

Em condições normais, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidas, sem efetivamente causar danos celulares, como produtos intermediários em uma série de reações metabólicas e tão logo, serem eliminadas por agentes do sistema antioxidante. Mas sementes, quando submetidas à condições de estresse, produzem mais EROs e quando não são metabolizadas podem causar uma série de danos que se inicia com a peroxidação de lipídios, avançando para a degradação de membranas e morte celular. Segundo Bailly (2004), apesar de em condições adequadas de germinação a produção de ERO ser baixa, sementes de baixo vigor possuem menor eficiência de capturar essas moléculas gerando assim um estresse oxidativo.

A intensidade dos danos celulares é determinada pela habilidade das sementes de eliminar esses radicais livres. Para minimizar os efeitos das EROs, as sementes possuem um sistema de defesa antioxidante, incluindo compostos não enzimáticos como ascorbato, glutatona, flavonóides e também enzimas como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), peroxidases (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR) (Bailly, 2004).

A SOD, que pode ser mitocondrial, citosólica ou cloroplastídica, é a primeira linha de defesa contra as EROs e é responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ convertendo-o à peróxido de hidrogênio e oxigênio. O peróxido de hidrogênio é então eliminado pela ação da CAT, POX e uma série de outras enzimas formando como produto final água. O ciclo do ascorbato/glutatona também pode eliminar parte do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nesse ciclo estão envolvidas as enzimas ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDAR),

dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR) (Grob et al., 2013). Em girassol, a atividade dessas enzimas não foi afetada quando as sementes foram submetidas ao estresse hídrico e salino até o potencial de -0,4 MPa, mas quando o estresse foi mais severo, sob potenciais de -0,8 MPa, a capacidade antioxidante das plântulas foi reduzida (Carneiro et al., 2011).

Dentre os métodos utilizados para a avaliação da deterioração, uma das alternativas é submeter as sementes à avaliação da peroxidação de lipídios e da atividade de enzimas antioxidantes em condições de diferentes tempos de exposição à deterioração.

Com o cultivo do girassol se expandindo para muitas regiões sob diferentes condições climáticas, em especial o estresse hídrico, e ainda sendo uma semente oleaginosa que está mais propensa à deterioração, o entendimento desses mecanismos pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias capazes de minimizar o efeito dessas condições ambientais no processo de produção de sementes de girassol.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações na qualidade fisiológica, no sistema enzimático antioxidante e na peroxidação de lipídios de sementes de girassol submetidas ao estresse hídrico e à deterioração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Sementes pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa- MG). Foram utilizadas sementes de dois lotes de girassol da cultivar Helio 253, colhidas na safra de 2014, fornecidas pela empresa HELIAGRO.

Inicialmente, as sementes de cada lote foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica por meio dos seguintes testes:

2.1 Germinação

Foi conduzido com oito repetições de 25 sementes, seguindo-se a metodologia descrita nas Regras de Análise de Sementes (2009). A semeadura foi feita em papel para germinação umedecido com volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador a 25°C. Foram realizadas contagens das plântulas normais aos quatro e dez dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.2 Primeira contagem de germinação

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

2.3 Comprimento de parte aérea e raiz

Quatro repetições de dez sementes, foram semeadas de forma linear e equidistante em linha traçada no terço superior do papel para germinação umedecido. Foram confeccionados rolos e esses mantidos em germinador a 25°C. No décimo dia após a semeadura foram feitas as medições do comprimento de parte aérea e de raiz das plântulas normais. Os resultados foram expressos em centímetros cm.plântula^{-1} .

2.4 Massa seca de parte aérea e raiz

Foi determinada em conjunto com a determinação do comprimento da parte aérea e raiz. As partes foram seccionadas e colocadas separadamente em sacos de papel em estufa de ar forçado a 72° C até atingirem peso constante. Foram efetuadas pesagens e os resultados foram expressos em mg.plântula⁻¹.

2.5 Emergência de plântulas

O teste de emergência de plântulas foi realizado em casa de vegetação, em bandejas contendo como substrato solo e areia na proporção 2:1. Foram semeadas quatro repetições de 50 sementes de cada lote com profundidade de 1 cm. As avaliações foram realizadas diariamente até a estabilização do número de plântulas, visando à avaliação da porcentagem de emergência de plântulas (EMERG), o cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE) (Maguire, 1962) e a velocidade de emergência (VE) (Edmond e Drapala, 1958). Foi também determinado o comprimento e a massa seca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas. Os resultados foram expressos em cm.plântula⁻¹ e g.plântula⁻¹ respectivamente.

2.6 Envelhecimento acelerado

Para o teste de envelhecimento acelerado, 250 sementes foram divididas e distribuídas sobre tela acoplada em duas caixas do tipo "Gerbox" contendo, ao fundo, 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas e mantidas em incubadora BOD regulada a 41°C por 48 horas. Após este período, as sementes foram colocadas para germinar conforme relatado para o teste de germinação. A porcentagem de plântulas normais foi avaliada no quarto dia após a semeadura.

2.7 Condutividade elétrica

Quatro repetições de 50 sementes de cada lote, previamente pesadas, foram colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada e mantidas

em germinador à temperatura de 25°C por 24 horas. Decorrido este período, a condutividade elétrica (CE) da solução foi medida pela leitura em condutivímetro Digimed DM32 e os dados obtidos foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

2.8 Avaliação do efeito do estresse hídrico e da deterioração no potencial fisiológico, na atividade enzimática e na peroxidação de lipídios em sementes de girassol

2.8.1 Estresse hídrico

As sementes de cada lote foram submetidas ao estresse hídrico utilizando-se solução de polietileno glicol 6000 (PEG 6000). Para tal, as sementes foram colocadas para germinar conforme descrito para o teste de germinação, utilizando-se papel umedecido com soluções de PEG 6000 nos seguintes potenciais: 0,0 (controle), -0,2, -0,4, -0,6 e -0,8 MPa, que foram obtidas segundo Vilela et al., 1991. Foram realizadas contagens das plântulas normais aos quatro e dez dias após a semeadura sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais. Juntamente com o teste de germinação foi realizado o teste de primeira contagem da germinação assim como descrito anteriormente.

2.8.2 Deterioração

Foi utilizada a metodologia do teste de envelhecimento acelerado segundo, MARCOS FILHO (2005). Para tanto, 250 sementes foram colocadas sobre uma tela suspensa acoplada em caixas do tipo "Gerbox" contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas de modo a se obter 100% de UR em seu interior e foram mantidas em BOD regulada a 41°C por 0, 48, 72 e 96 horas. Após serem submetidas à estas condições de estresse, as sementes foram semeadas em papel toalha umedecido com água destilada conforme descrito para o teste de germinação. Foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador a 25°C. Foram realizadas contagens das plântulas normais aos quatro e dez dias após a semeadura, sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais. Juntamente com o teste de germinação foi realizado o teste de primeira contagem da germinação, assim como descrito anteriormente.

2.8.3 Comprimento de parte aérea e raiz

Foi determinado conforme descrito anteriormente no item 2.3 para os tratamentos submetidos ao estresse hídrico (0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa) e à deterioração (0, 48, 72 e 96 horas de exposição).

2.8.4 Massa seca de parte aérea e raiz

Foi determinado conforme descrito anteriormente no item 2.4 para os tratamentos sob estresse hídrico (0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa).

2.8.5 Condutividade elétrica

Foi determinado conforme descrito anteriormente no item 2.6 para os tratamentos submetidos à deterioração (0, 48, 72 e 96 horas de exposição).

2.8.6 Avaliações bioquímicas

A atividade enzimática e a peroxidação de lipídios foram avaliadas nas sementes secas (0, controle) e no 2º, 4º e 6º dia após a semeadura para todos os tratamentos sob estresse hídrico e deterioração. Foram avaliadas as atividades das enzimas do sistema de defesa antioxidativo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX). A peroxidação de lipídios foi determinada pela quantificação do malonaldeído (MDA) nas plântulas de girassol.

2.8.7 Avaliação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,2 g de sementes foram homogeneizadas com 2 mL de TCA 0,1% (p/v) e centrifugadas a 15.000 xg por 15 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5mL de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 30 min e a reação foi interrompida em banho de gelo por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 xg durante 4 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm e 600

nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para quantificar o conteúdo de MDA. Os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

2.8.8 Determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo

2.8.8.1 Obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para a obtenção dos extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), das peroxidases (POX) e da peroxidase do ascorbato (APX), o material vegetal foi congelado em nitrogênio líquido e mantidas em freezer à temperatura de -80°C . Posteriormente, foram macerados cerca de 0,3 g de material vegetal. Foram então adicionados 2 mL de meio de extração, tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Em seguida, foram feitas duas centrifugações a 15.000 xg por 15 minutos, a 4°C para retirada da camada de óleo do sobrenadante.

2.8.8.2 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Para avaliação da atividade da SOD, o protocolo proposto por Del Longo et al. (1993) foi ajustado para as sementes de girassol, por meio da adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8), contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) $75\mu\text{M}$, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM . A reação foi conduzida a 25°C por cinco minutos em câmara de reação iluminada com lâmpadas fluorescentes de 15 W. O branco foi obtido nas mesmas condições, porém na ausência de luz. Assim a fotorredução do NBT foi determinada pela medição da absorbância a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima capaz de inibir 50% da foinibição do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

2.8.8.3 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o protocolo proposto por Havir e Mchale (1987), por meio da adição de 30 μL do extrato enzimático bruto em 2,97 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM). A atividade enzimática foi obtida com base na leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm durante o primeiro minuto da reação, a 25°C, em seguida calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

2.8.8.4 Determinação da atividade das peroxidases (POX)

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (25 mM, pH 6,8), pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kare e Mishra, 1976). Durante o primeiro minuto de reação foi observado o aumento da absorvância no comprimento de onda de 420 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

2.8.8.5 Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da ascorbato peroxidase foi obtida por meio da adição de 50 μL do extrato enzimático bruto em 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H_2O_2 0,3 mM. Foi observado o decréscimo da absorvância a 290 nm durante o primeiro minuto, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981), e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína.

2.8.8.6 Determinação de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. 100 µL do extrato enzimático foi adicionado a 1 mL do reagente de Bradford, seguido de agitação. Após 20 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 595 nm.

2.8.9 Análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com quatro repetições. Os dados obtidos pelos testes de germinação, primeira contagem, comprimento e massa seca se plantas e condutividade elétrica foram analisados em esquema fatorial 2 lotes x 5 potenciais para o experimento de estresse hídrico e 2 lotes x 4 tempos de exposição, no experimento de deterioração. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de regressão, com exceção dos dados de comprimento de parte aérea e raiz do experimento de deterioração que foram analisados pelo teste tukey a 5% de probabilidade. Os dados de atividade enzimática, peroxidação de lipídios (MDA) foram submetidos a análise de variância em esquema fatorial 2 (lotes) x 5 (potenciais osmóticos) x 4 (dias após a semeadura – DAS) para o experimento de estresse hídrico e 2 (lotes) x 4 (tempos de exposição) x 4 (DAS) para os tratamentos de deterioração, que foram representados pela média, com o respectivo desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos lotes de sementes de girassol

Pela Tabela 1, observa-se que não houve diferença entre os lotes nos resultados dos testes de germinação (G) e velocidade de emergência (VE). Porém, houve diferença entre os lotes nos resultados do teste de primeira contagem da germinação, o que diferencia os dois lotes quanto ao vigor das sementes. Esse teste avalia indiretamente a velocidade de germinação, pela porcentagem de plântulas normais na data estabelecida para a primeira contagem do teste de germinação. Neste caso, o lote 1 se mostrou mais vigoroso por obter maior porcentagem de germinação no quarto dia após a semeadura (DAS).

Tabela 1: Caracterização do potencial fisiológico das sementes de girassol da cultivar Hélio 253.

Variáveis	Lote 1	Lote 2	CV(%)	Variáveis	Lote 1	Lote 2	CV(%)
Primeira contagem	91 A	80 B	5,5	Índice de velocidade de emergência	11,1 A	8,9 B	9,4
Germinação	95 A	91 A	3,0	Velocidade de emergência	4,6 A	5,0 A	6,5
Comprimento de parte aérea	11,9 A	10,1 A	18,0	Emergência	100 A	86 B	4,5
Comprimento de raiz	13,7 A	12,4 A	24,3	Comprimento de Parte aérea em substrato	9,3 A	8,2 B	8,8
Massa seca de parte aérea	45,0 A	44,8 A	17,7	Comprimento de raiz em substrato	13,0 A	13,1 A	9,2
Massa seca de raiz	15,9 A	12,4 A	17,8	Massa seca de parte aérea em substrato	6,1 A	4,4 B	5,3
Primeira contagem após envelhecimento acelerado	75 A	52 B	17,7	Massa seca de raiz em substrato	1,8 A	1,3 B	19,5
Germinação após envelhecimento acelerado	92 A	73 B	11,3	Condutividade elétrica	65,2 A	75,7 B	3,4

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade.

Pelos resultados dos testes de envelhecimento acelerado e condutividade elétrica, também observou-se maior vigor para as sementes do lote 1. Esses testes estão associados à sensibilidade ao estresse e à capacidade de reorganização das membranas. Os dados obtidos em laboratório estão de acordo com o teste de emergência de plântulas realizado em casa de vegetação, em que o lote 1

apresentou desempenho superior nos testes de índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência (EMERG). Esses testes demonstram a capacidade de estabelecimento rápido e uniforme das plântulas no campo.

3.2 Efeito do estresse hídrico na germinação de sementes de girassol

Houve efeito significativo da interação potencial x lote sobre os resultados dos testes de primeira contagem, comprimento de parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea. Para os teste bioquímicos, houve interação significativa para potencial x lote x dia após a semeadura (DAS) para a peroxidação de lipídios e atividades das enzimas SOD, CAT, POX e APX. Não foi observada interação significativa para os dados de germinação e massa seca da raiz, porém a interação foi desmembrada com o intuito de analisar o efeito dos tratamentos para cada lote.

3.2.1 Germinação e vigor de sementes de girassol submetidas ao estresse hídrico

Na Figura 1, observa-se que houve queda na germinação e na primeira contagem da germinação dos lotes 1 e 2 com o decréscimo do potencial osmótico. De acordo com Moterle (2008), o aumento da concentração osmótica da solução de PEG 6000 reduz a absorção de água pelas sementes, causando redução na porcentagem de germinação. Albuquerque e Carvalho (2003), demonstraram que o estresse hídrico em sementes de girassol causaram germinação irregular e estabelecimento desuniforme de plântulas.

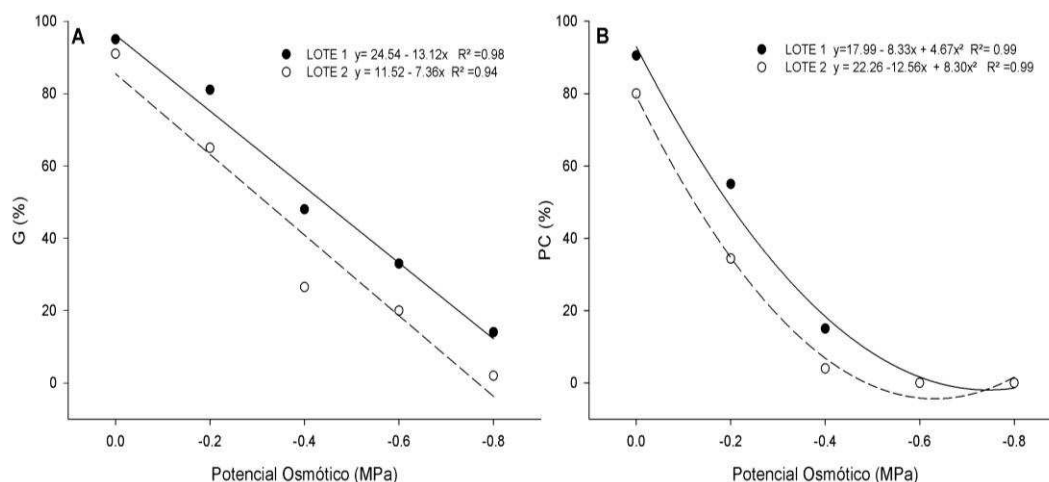


Figura 1: Germinação (A) e primeira contagem (B) de sementes de dois lotes de girassol, CV Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

Abreu et al. (2014) não encontraram diferença significativa na porcentagem de germinação de sementes de linhagens de milho submetidas a potenciais de 0,0 MPa e -0,6 MPa. No potencial de -0,9 MPa a germinação foi significativamente afetada. No presente trabalho, em que houve redução na porcentagem de germinação a partir de -0,2 MPa para os dois lotes. Geralmente, a porcentagem de germinação diminui com o decréscimo do potencial hídrico, mas para cada espécie há um potencial no qual não há germinação (Ávila et. al, 2007).

O efeito da solução de PEG 6000 na germinação foi mais drástico para o lote 2 em todas as concentrações testadas (Figura 1). Na Tabela 2, observa-se que no tratamento controle (0,0 MPa) os dois lotes obtiveram porcentagem de germinação semelhante, mas a medida em que houve redução do potencial osmótico o lote 1 se mostrou menos sensível ao estresse. De acordo com Barros e Rossetto (2009), a redução da germinação de sementes de girassol ocorreu a partir do potencial hídrico de -0,3 MPa e houve inibição total da germinação no potencial de -0,9 MPa. No presente trabalho, a germinação das sementes do lote 2 foi praticamente nula no potencial de -0,8 MPa.

Tabela 2: Germinação (%) de sementes de dois lotes de girassol, cultivar Helio 253, submetidas ao estresse hídrico sob diferentes potenciais osmóticos.

Potencial osmótico	Lote 1	Lote 2
0.0 MPa	95 A	91 A
-0.2	86 A	65 B
-0.4	48 A	27 B
-0.6	33 A	20 B
-0.8	15 A	2 B
CV (%)	15,93	

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade.

3.2.2 Comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz

O estresse hídrico afetou o desenvolvimento inicial das plântulas de girassol (Figura 2). Houve redução tanto no comprimento quanto na massa seca de parte aérea e de raiz com a redução do potencial osmótico.

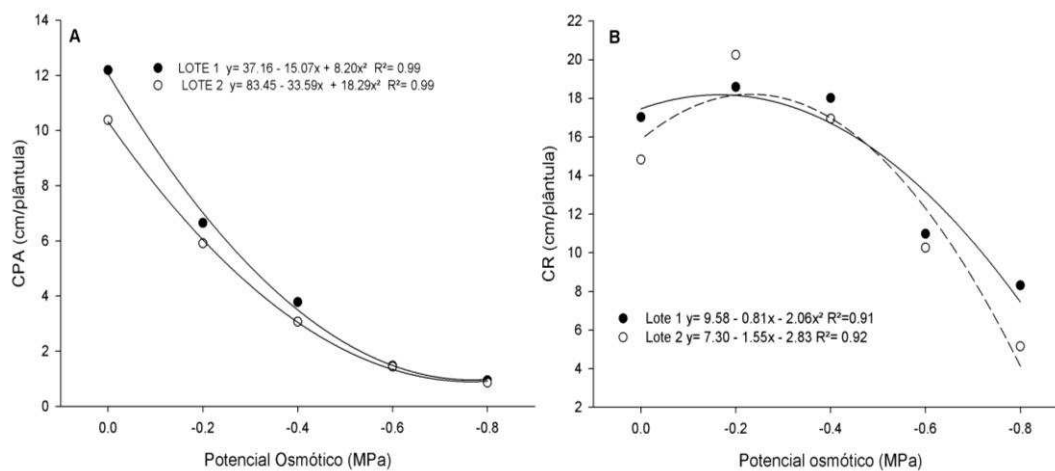


Figura 2: Comprimento de Parte aérea (A) e de Raiz (B) de plântulas de girassol dos lotes 1 e 2, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

Obteve-se expressiva redução do comprimento da parte aérea com o decréscimo do potencial osmótico para ambos os lotes. Esse fato pode ser explicado pela redução no metabolismo das sementes em função da menor disponibilidade de água para digestão das reservas e translocação dos produtos

metabolizados (Bewley e Black, 1994). Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro et al. (2011), em que o comprimento da parte aérea de plântulas de girassol reduziu linearmente a medida que a concentração de PEG 6000 aumentava, apresentando os menores valores no potencial de $-0,8$ MPa. No mesmo trabalho, os autores relatam que o comprimento das raízes nos potenciais de $-0,2$ e $-0,4$ MPa foi superior à testemunha. Nos potenciais osmóticos inferiores aos citados, houve redução no crescimento radicular, o que também ocorreu no presente trabalho como mostra a Figura 2-B. Esse resultado pode ser explicado pelos mecanismos de adaptação das plântulas quando submetidas ao estresse hídrico, como o direcionamento de fotoassimilados para maior crescimento das raízes, na tentativa de absorção de água.

Na Figura 3, nota-se que houve redução da massa seca tanto da parte aérea (A) quanto da raiz (B) para os lotes 1 e 2. Verifica-se que em todos os potenciais testados a massa seca da parte aérea das plântulas do lote 1 foi superior a do lote 2, esses resultados podem ser atribuídos à diferença de vigor entre os lotes. Já para os resultados de massa seca da raiz, não houve diferença entre os lotes a partir do potencial $-0,6$ MPa. A redução da massa seca de plântulas em função da restrição hídrica se dá devido à demora dos processos fisiológicos e bioquímicos ou pela dificuldade de hidrólise e mobilização das reservas armazenadas nas sementes (Bewley e Black, 1994). Kaya et al. (2006) observaram que sementes de girassol submetidas a diferentes potenciais osmóticos induzidos com o uso de PEG 6000 apresentaram inibição no comprimento da parte aérea e de raiz das plântulas, bem como da massa fresca das plântulas. Ainda segundo os autores, o potencial hídrico de $-0,6$ MPa já é considerado crítico para a germinação de sementes de girassol por causar restrição hídrica.

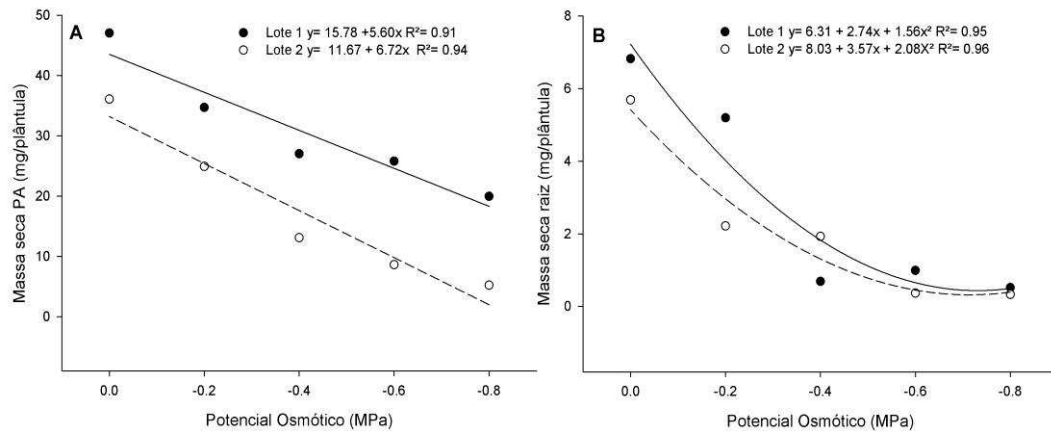


Figura 3: Massa seca de parte aérea (A) e raiz (B) das plântulas de girassol dos lotes 1 e 2, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

Dessa forma, a redução do potencial osmótico provocou redução da porcentagem de germinação dos lotes, independentemente do vigor das sementes (Figura 1), associada ao menor crescimento das plântulas, com redução tanto no comprimento (Figura 2), quanto na massa seca (Figura 3) de parte aérea e de raiz.

3.2.4 Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios pode ser definida como uma série de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares (Lima e Abdalla, 2001). Assim, o conteúdo de malonaldeído (MDA) foi avaliado por ser um dos produtos finais desta peroxidação.

Houve interação significativa entre os fatores lote x potencial x DAS para o conteúdo de MDA em plântulas de girassol. Na Figura 4, observa-se diferença no resultado obtido para os dois lotes em cada potencial avaliado. No tratamento controle, observa-se que o conteúdo de MDA para o lote 1 reduziu durante a germinação, sendo encontrada situação inversa para o lote 2. Esse fato pode ter acontecido devido às sementes do lote 2 serem de menor vigor e, segundo Bailly (2004), sementes de baixo vigor possuem menor capacidade de eliminação de ERO's, levando à uma série de reações que resultam na peroxidação de lipídios.

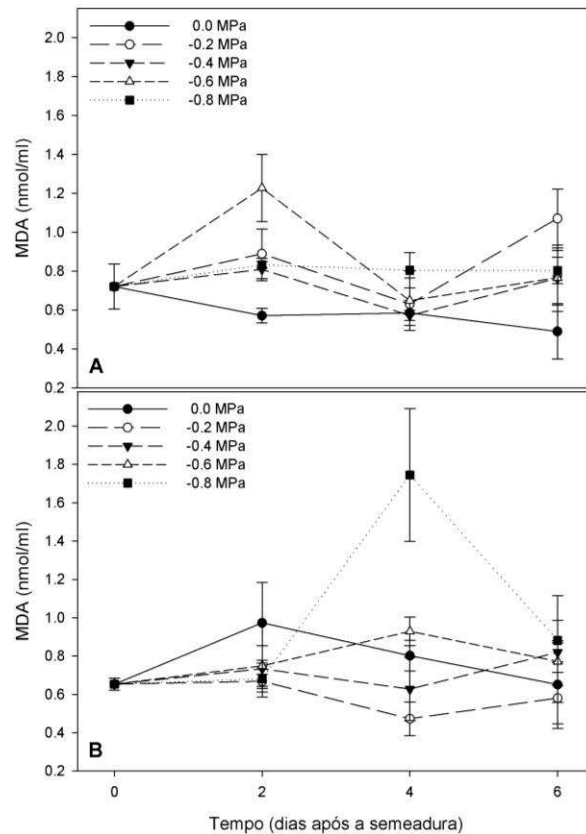


Figura 4: Conteúdo de Malonaldeído (MDA) determinado aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

No lote 1 (Figura 4-A), o conteúdo de MDA foi maior em todos os potenciais em relação ao controle nos dias avaliados. No 2º DAS, observou-se aumento significativo do conteúdo de MDA nas plântulas submetidas ao estresse hídrico. Em seguida, houve redução no conteúdo de MDA. Para o lote 2 (Figura 4-B), verificou-se que até o 2º DAS os tratamentos sob estresse hídrico não diferiram entre si e foram inferiores ao controle. No 4º DAS, as plântulas do tratamento -0,8 MPa apresentaram maior peroxidação de lipídios, seguida pelas plântulas do potencial -0,6 MPa. No 6º DAS, as plântulas submetidas aos tratamentos de maior estresse, -0,4; -0,6 e -0,8 MPa também apresentaram maiores conteúdos de MDA em relação ao controle que não se diferenciou do potencial -0,2 MPa. Ivanova et al. (2014) não encontraram diferença significativa entre o controle (0,0 MPa) e os potenciais de -0,4 e -0,6 MPa mediados por PEG 6000, quanto ao conteúdo de MDA em plântulas de girassol submetidas ao estresse hídrico por 3 dias, mas no potencial de -0,8 MPa houve aumento

significativo na peroxidação de lipídios. Chakraborty e Pradhan (2012) observaram aumento gradativo do conteúdo de MDA em plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas ao estresse hídrico por 3, 6 e 9 dias.

3.2.5 Atividade enzimática

A atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX foram afetadas pelo decréscimo do potencial hídrico ao longo da germinação nos lotes 1 e 2 (Figuras 5, 6, 7 e 8).

A enzima superóxido dismutase atua na primeira linha de defesa contra os radicais livres. O radical superóxido produzido sob condições de estresse é tóxico, tendo uma meia-vida de menos de um segundo e, geralmente, dismutado de forma rápida pela SOD à H_2O_2 , um produto relativamente estável que pode ser detoxificado por catalases e peroxidases.

Na Figura 5-A, observa-se, para o lote 1, que no 2º DAS a atividade da SOD foi maior em todos os tratamentos com estresse em relação ao controle e a partir daí nota-se que a atividade dessa enzima sofre alterações diversas dependendo do potencial e do dia de avaliação. No 4º DAS, a atividade da SOD aumentou aproximadamente quatro vezes no tratamento de -0,8 MPa de estresse em relação ao controle. Estas metaloenzimas constituem uma importante defesa primária das células contra os radicais superóxido gerados sob condições de estresse, assim, o aumento na atividade da SOD é conhecido por conferir tolerância ao estresse oxidativo (Jaleel et al., 2007).

Na Figura 5-B verifica-se, no 2º DAS, que para o lote 2 os resultados foram semelhantes ao lote 1 (Figura 5-A), com aumento na atividade dessa enzima, mas as diferenças foram menos expressivas entre os potenciais, o que pode ter acontecido pelo fato das sementes do lote 2 serem menos vigorosas (Tabela 1), apresentando redução na atividade da SOD a partir do 2º dia. Bailly (2004) relata que sementes de baixo vigor possuem menor eficiência na eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode gerar um estresse oxidativo. Dessa forma, a redução na atividade da SOD a partir do 2º dia para o lote 2 pode estar associado à ineficiência dos mecanismos de defesa contra as

espécies reativas de oxigênio, o que está relacionado com a peroxidação de lipídios, com conseqüente formação de MDA, como observado na Figura 4. Quando as enzimas antioxidantes não atuam de forma eficiente na eliminação das EROs geradas, a peroxidação lipídica se torna mais evidente, sendo este o principal sintoma atribuído ao dano oxidativo, frequentemente utilizada como um indicador de dano às membranas celulares (Hernandez et al., 2000).

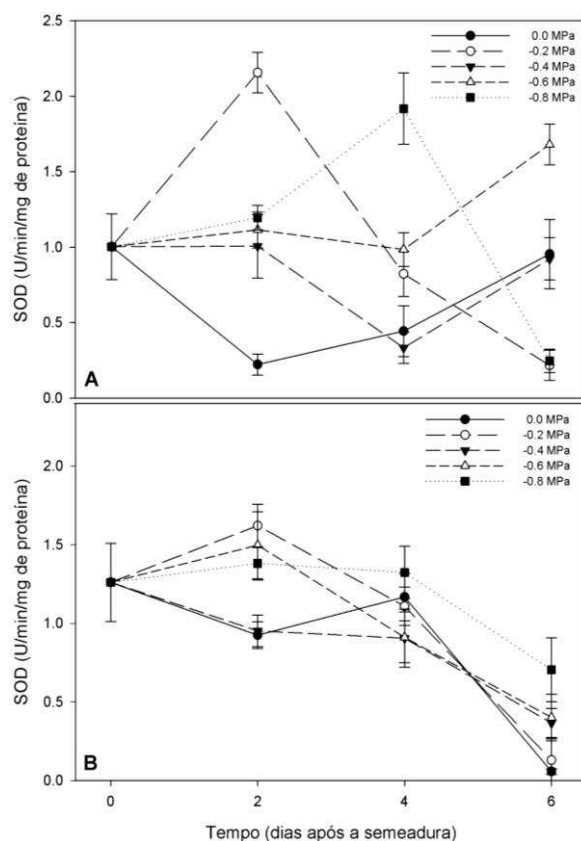


Figura 5: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

A catalase (CAT) está presente em glioxissomos e peroxissomos (Willekens et al., 1995), juntamente com as peroxidases, é responsável pela conversão do H_2O_2 em O_2 .

Na Figura 6, observa-se que a atividade da CAT foi afetada de modo diferente ao longo da germinação nos lotes 1 e 2. As sementes do lote 1 tiveram maior atividade dessa enzima no 6º DAS (Figura 6-A), com exceção no potencial

de -0,6 MPa em que a maior atividade ocorreu no 2º DAS. Para o lote 2, houve redução na atividade da CAT, no 2º, 4º, e 6º DAS em todos os potenciais avaliados em relação ao controle, em que a maior atividade foi encontrada no quarto dia da germinação. Essa redução da atividade da CAT com o decréscimo do potencial osmótico está de acordo com a redução do vigor observada pelos testes de primeira contagem da germinação, comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz (Figuras 1, 2 e 3). Carneiro et al. (2011), trabalhando com plântulas de girassol encontraram redução na atividade da CAT no potencial hídrico de -0,8 MPa, também induzido por PEG 6000 e Naderi et al. (2014), observaram o incremento na atividade da CAT em plântulas de trigo submetidas aos potenciais de -0,4 e -0,8 MPa por 5 dias.

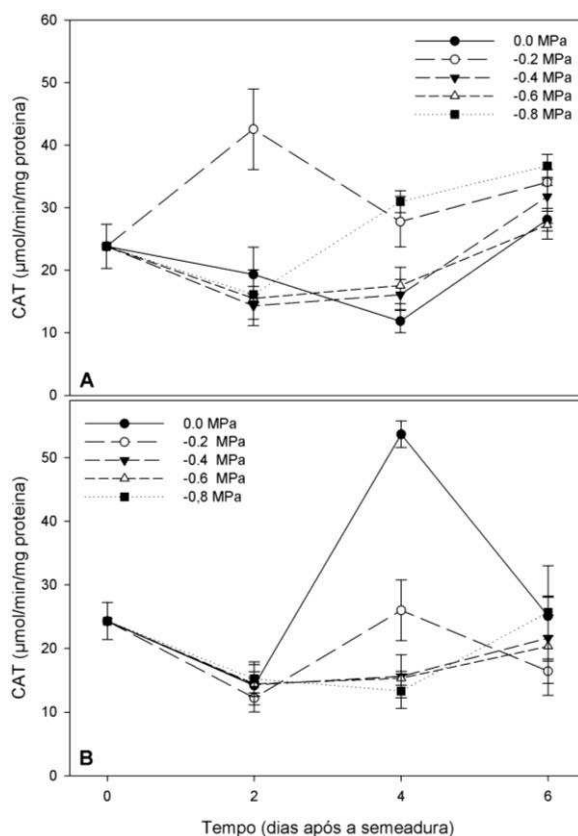


Figura 6: Atividade da enzima catalase (CAT) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a sementeira em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

Assim como a catalase, a peroxidase (POX) age transformando o H_2O_2 em O_2 . Neste trabalho, a atividade da POX foi menor nos tratamentos de estresse hídrico em relação ao controle durante os seis dias tanto para o lote 1 como para o lote 2. A redução da atividade da CAT e da POX está de acordo com os resultados de porcentagem de germinação, comprimento e massa seca da parte aérea e raiz (Figuras 1, 2 e 3), que também reduziram quando as sementes foram submetidas ao estresse hídrico. Observa-se que há maior atividade da POX nos tratamentos 0,0 e -0,2 MPa, sendo que no lote 1 (Figura 7-A) este aumento ocorreu no 2° DAS e no lote 2 (Figura 7-B) no 4° DAS. Esses dados podem ser resultado do atraso no desenvolvimento das plântulas e da sensibilidade do lote menos vigoroso ao estresse. Não houve diferença significativa entre os potenciais -0,4, -0,6 e -0,8 MPa até o 2° DAS, mas a partir daí houve um incremento na atividade da POX para os dois lotes. Akcay et al. (2010) não encontraram diferenças significativas na atividade da POX em plântulas de duas cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) sob estresse hídrico mediado por PEG 6000. A atividade da enzima POX parece não ser diretamente responsável pela proteção contra o dano oxidativo causado pelo estresse hídrico, no entanto, a atividade da APX (Figura 8) parece ser importante como observado pelo aumento da atividade dessa enzima durante a germinação das sementes do lote 1 (Figura 8-A).

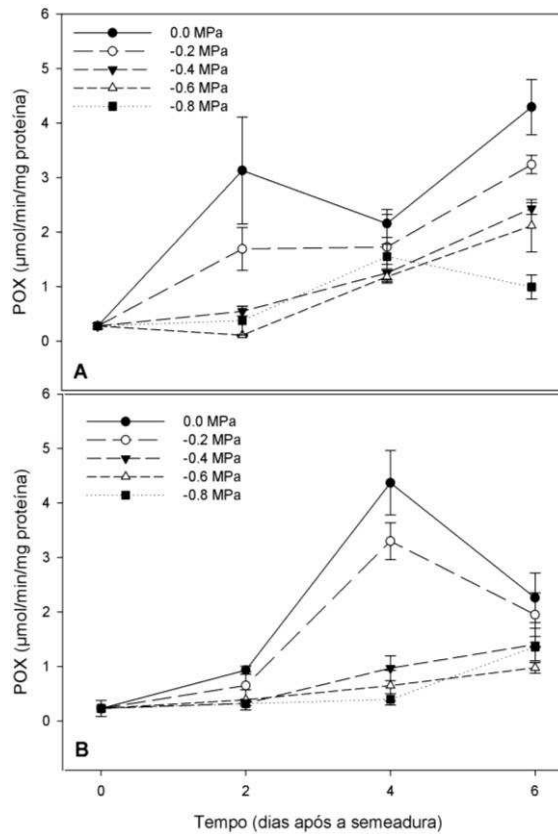


Figura 7: Atividade da enzima peroxidase (POX) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

A enzima ascorbato peroxidase (APX) participa da conversão do H_2O_2 em O_2 através de uma série de oxidações no ciclo do ascorbato/glutationa (Grob et al., 2013). A atividade da APX foi diferentemente afetada pelo estresse hídrico nos lotes 1 e 2. No lote 1, houve aumento da atividade dessa enzima no 2º DAS em todos os tratamentos, sendo que a maior atividade foi encontrada no potencial de -0,6 e -0,8 MPa e a menor atividade no tratamento controle. A partir do 2º DAS, a atividade da APX no potencial hídrico de -0,8 MPa reduziu significativamente, enquanto nos tratamentos com menor nível de estresse a atividade foi reduzida no 4º DAS mas no 6º DAS houve novamente um incremento na atividade enzimática.

Na Figura 8-B, observa-se que para o lote 2, os tratamentos submetidos ao estresse hídrico apresentaram menor atividade da APX em relação ao controle em todos os dias avaliados. Semelhante ao observado para a atividade da POX (Figura 7), houve aumento expressivo no 4º DAS da atividade da APX para o lote

2, enquanto no lote 1 esse aumento ocorreu no 2º DAS evidenciando mais uma vez o menor vigor das sementes do lote 2 em relação ao lote 1. Chakraborty e Pradhan (2012) encontraram aumento da atividade dessa enzima em plântulas de trigo no terceiro dia de germinação sob estresse hídrico. Baloglu et al. (2014), em estudo sobre o efeito do estresse hídrico em plântulas de girassol, concluiu que a APX é importante para a proteção de tecidos radiculares nessa espécie sob condições mais rigorosas de estresse.

Locato et al. (2010) afirma que algumas enzimas da família das peroxidases são constitutivamente expressas, já outras podem ser induzidas por estresses ambientais, assim como constatado em estudos em que sintomas de estresse mais graves mostram maiores atividades da enzima APX.

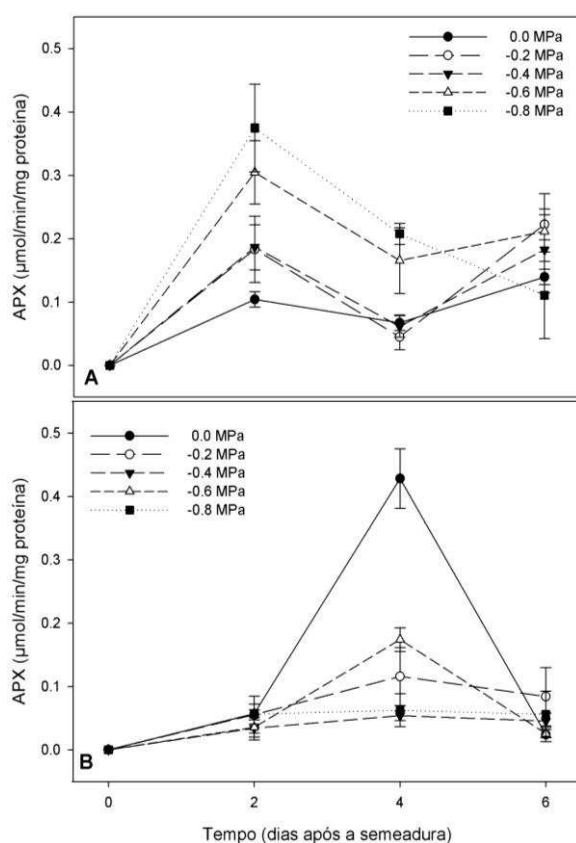


Figura 8: Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas ao estresse hídrico em soluções de PEG 6000.

3.3 Efeito da deterioração na germinação de sementes de girassol

Os resultados da análise de variância (ANOVA) revelaram efeito significativo da interação entre os fatores tempo de exposição x lote na germinação, primeira contagem da germinação, comprimento de parte aérea e condutividade elétrica, também entre os fatores tempo de exposição x lote x DAS para a peroxidação de lipídios e atividade enzimática. Não houve interação significativa para os dados de comprimento da raiz, mesmo assim a interação foi desmembrada com o intuito de analisar o efeito dos tratamentos para cada lote.

3.3.1 Germinação e vigor de sementes de girassol submetidas à deterioração

Na Figura 9, observa-se queda na germinação e na primeira contagem dos lotes 1 e 2 das sementes de girassol quando submetidas à deterioração com o aumento da exposição das sementes ao estresse. A taxa de deterioração das sementes varia de acordo com a espécie e também com a qualidade do lote, mas segundo Kibinza et al, 2011, a temperatura e umidade aceleram esse processo. Bailly et al., 1996, observou redução da germinação quando submeteu as sementes de girassol ao envelhecimento durante cinco dias a 45 °C e 100% de umidade relativa (UR).

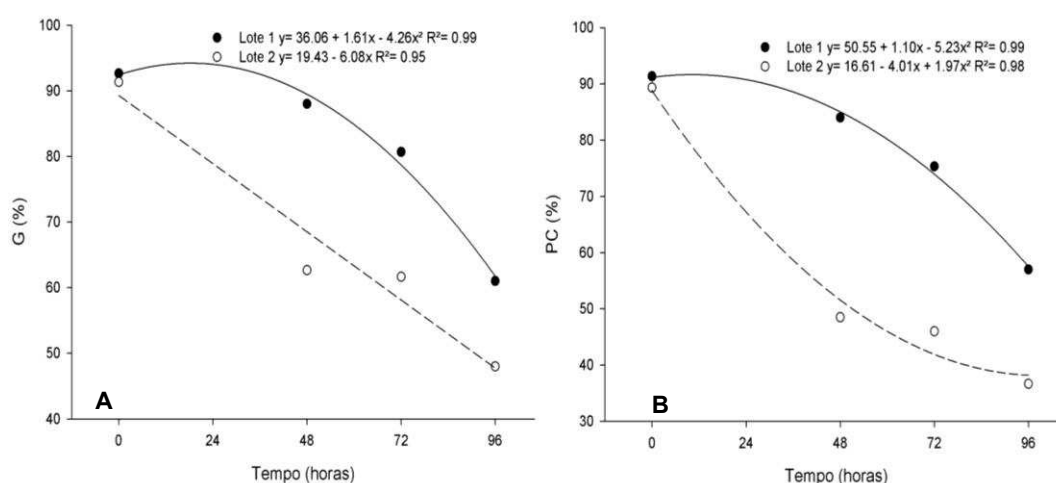


Figura 9: Germinação (A) e Primeira contagem de germinação (B) de sementes de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração.

Após 48, 72 e 96 horas de exposição à temperatura de 41°C e 100% de UR a germinação do lote 1 reduziu de 93% no tratamento controle para 88, 80 e 61% respectivamente. Já para o lote 2, houve redução na germinação de 91% para 62, 61 e 48%, respectivamente. Considerando a porcentagem mínima exigida para a comercialização de sementes certificadas de girassol que é de 75% (Brasil, 2013), o lote 2 se mostrou mais sensível a deterioração já no menor tempo de exposição à deterioração com germinação abaixo da permitida pela legislação.

3.3.2 Comprimento de parte aérea e raiz

Não houve ajuste de modelo de regressão para os dados de comprimento de parte aérea e raiz. Apesar disso, os resultados foram plotados em gráficos para melhor entendimento do efeito dos tratamentos sob esses fatores de estudo. Na Figura 10, observa-se que houve redução no comprimento da parte aérea (Figura 10-A) das plântulas dos dois lotes a medida que houve aumento da exposição das sementes à deterioração. No tratamento controle o comprimento de parte aérea foi maior em relação aos tratamentos submetidos à deterioração, sendo que estes não se diferenciaram entre si. Comparando-se os lotes 1 e 2, houve diferença no comprimento de parte aérea apenas no tratamento controle, devido à diferença de vigor dos lotes como demonstrado na Tabela 1.

Na Figura 10-B, observa-se diferença no comprimento de raiz entre os tempos de exposição à deterioração de 72 e 96 horas em relação ao controle. Nesses tempos, foi observado maior comprimento de raiz para o lote 1. Resultados parecidos foram encontrados por Draganic e Lekić (2012). Esses autores observaram redução significativa no comprimento de raiz de plântulas de girassol submetidas a temperatura de 40°C e 100% UR por 72 horas, porém não encontraram diferença significativa entre o controle e o tratamento com envelhecimento acelerado no comprimento da parte aérea das plântulas.

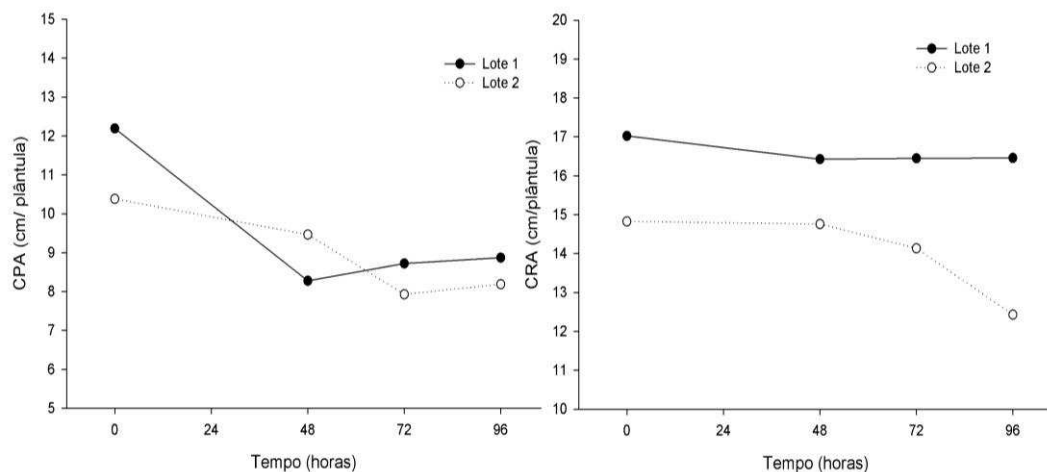


Figura 10: Comprimento de parte aérea (A) e comprimento de raiz (B) de plântulas de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração.

3.3.3 Condutividade elétrica

A alteração nas membranas celulares está relacionada com as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante a deterioração das sementes (McDonald, 1999). A condutividade elétrica (CE) das sementes de girassol submetidas à deterioração foi medida afim de comparar a capacidade de reorganização das membranas dos lotes 1 e 2 e também o efeito do tempo de exposição ao estresse para os mesmos.

Para a condutividade elétrica, observou-se efeito da interação entre fatores lote x tempo de exposição nas sementes. Na Figura 11, nota-se que a CE das sementes do lote 2 foi maior nos tratamentos 0, 48 e 72 horas de exposição à deterioração. Houve aumento significativo da CE nos tratamentos de 72 e 96 horas de exposição ao estresse para o lote 2. Já para o lote 1, apenas o tratamento de 96 horas foi significativamente maior em relação aos demais. Esses resultados estão de acordo com a redução na germinação (Figura 9) que foi mais intensa no lote 2. Caid (2008), observou aumento da condutividade elétrica juntamente com a redução da germinação em duas cultivares de trigo submetidas a 40°C/100 UR por 96 horas. Em sementes mais deterioradas, há menor integridade das membranas e, como consequência, ocorre o extravasamento do conteúdo celular para o meio, constatado pelo aumento da quantidade de lixiviados, durante o processo de embebição (Kruse et al., 2006).

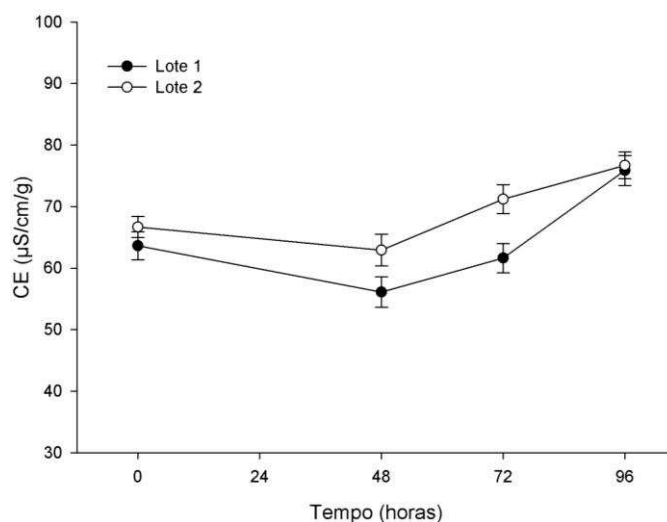


Figura 11: Condutividade elétrica das sementes de girassol dos lotes 1 e 2 submetidas à deterioração.

3.3.4 Peroxidação de lipídios

O resultado da análise de variância mostrou interação significativa entre os fatores lote x tempo de exposição x DAS para o conteúdo de MDA em plântulas de girassol. Na Figura 12, observa-se diferentes respostas em relação ao conteúdo de MDA para os lotes 1 e 2 nos tempos de exposição à deterioração avaliados.

Para o lote 1 (Figura 12-A), o conteúdo de MDA nas sementes do tratamento controle (sementes secas) foi maior em relação aos demais tratamentos. Os tratamentos submetidos à deterioração consistiram em manter as sementes por períodos variáveis de tempo em condição de alta temperatura (41°C) e UR (100%). Dessa forma, durante o envelhecimento artificial, houve aumento no grau de umidade das sementes submetidas à deterioração. As sementes submetidas a esses tratamentos apresentaram menor conteúdo de MDA em relação ao controle (Figura 12-A), o que pode estar relacionado ao maior grau de umidade dessas sementes e, como consequência, à um efeito de diluição do conteúdo de MDA, avaliado em função da massa fresca, resultando em concentrações menores nas sementes mais úmidas. Diante disso, o estresse pré-germinação parece não afetar a peroxidação de lipídios durante o processo

germinativo em lotes de sementes vigorosas, visto que o conteúdo de MDA reduziu durante a germinação em todos os tratamentos.

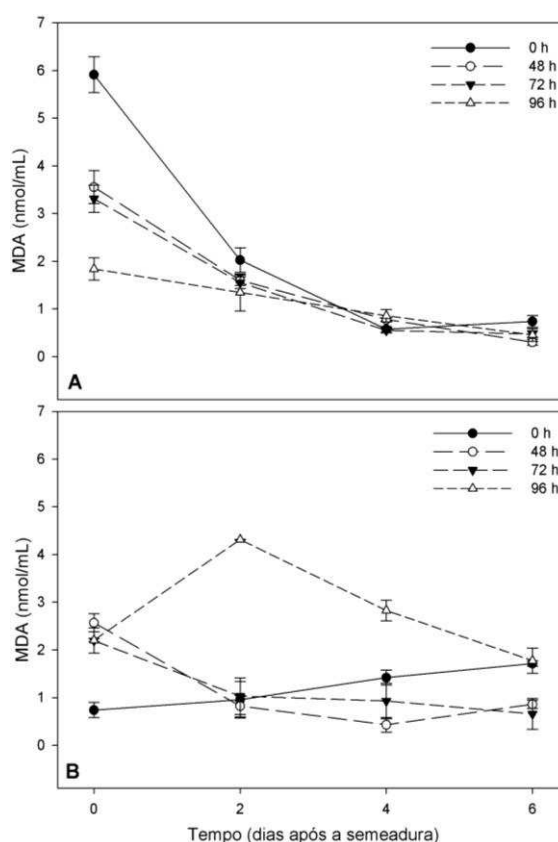


Figura 12: Conteúdo de malonaldeído (MDA) determinado aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração.

No lote 2, o conteúdo de MDA nas sementes do tratamento controle, no tempo 0, foi menor em relação aos tratamentos de exposição ao estresse, que não diferenciaram entre si. Esses dados estão de acordo com a redução da germinação das sementes do lote 2, que sofreu queda drástica já no menor tempo de exposição à deterioração (Figura 9-B). Foi observado ainda maior conteúdo de MDA nas plântulas do tratamento de 96 horas de exposição demonstrando que sementes de baixo vigor podem não possuir o mecanismo de reparo eficiente afim de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo gerado pela deterioração. Bailly et al. (1996) encontrou aumento no conteúdo de MDA em sementes de girassol submetidas ao envelhecimento acelerado por 120 horas/100% UR. Já em *Brassica*

napus, Yin et al. (2015) relataram aumento do conteúdo de MDA a partir de 24 horas de exposição a 40° C/90% UR.

3.3.5 Atividade enzimática

Houve efeito significativo da interação entre os fatores lote x tempo de exposição x DAS para os dados de atividade de enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, POX e APX ao longo da germinação das sementes de girassol.

Na Figura 13, pode-se observar que a atividade da enzima SOD ao longo da germinação seguiu o mesmo padrão para os lotes 1 e 2, ou seja, houve redução da atividade dessa enzima ao longo dos dias avaliados. Na análise da atividade enzimática nas sementes imediatamente após a deterioração, nota-se o aumento da atividade dessa enzima nas sementes do lote 1 (Figura 13-A) após 48 horas de exposição, provavelmente como resposta ao aumento do estresse oxidativo com o início da deterioração das sementes.

Houve menor atividade enzimática nas sementes de ambos os lotes após 96 horas de exposição à deterioração, o que está relacionado à deterioração das sementes durante esse período, e como consequência com queda na viabilidade das sementes, como observado para o teste de germinação (Figura 9). Tian et al. (2008) também encontraram redução na atividade da SOD em sementes de soja submetidas ao envelhecimento acelerado por 5 e 10 dias.

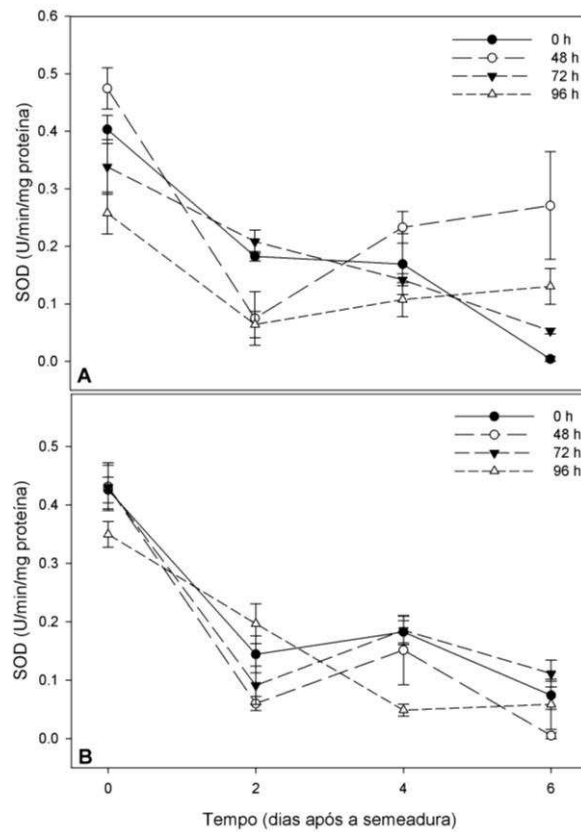


Figura 13: Atividade da enzima superóxido dimutase (SOD) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a sementeira em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração.

Os dados de atividade da catalase estão apresentados na Figura 14. Para as sementes submetidas à deterioração por 48 horas, a atividade da CAT aumentou até o 6° DAS para as sementes do lote 1. O tempo de exposição de 72 horas levou à maior atividade dessa enzima imediatamente após a deterioração, mas em seguida houve redução. No maior tempo de exposição, 96 horas, a atividade da CAT aumentou até o 4° DAS e logo depois foi observada redução.

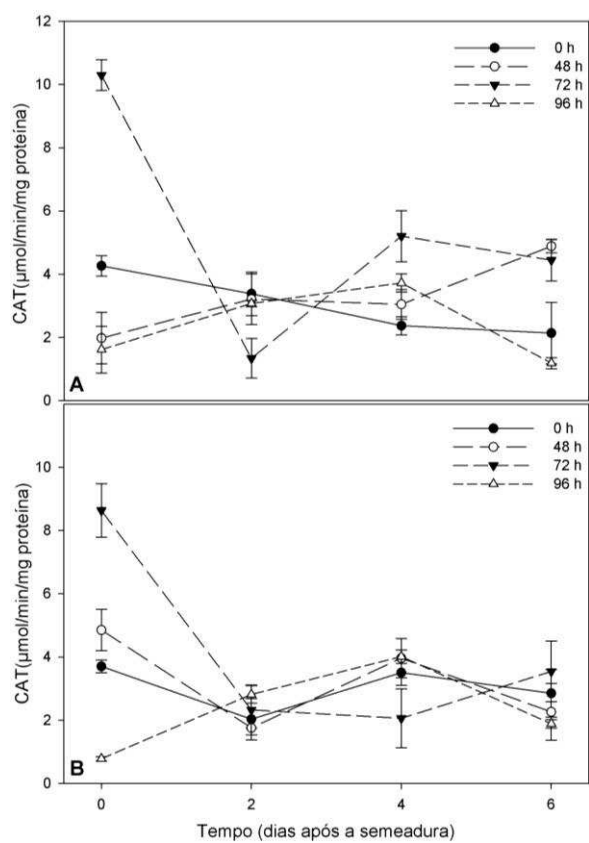


Figura 14: Atividade da enzima catalase (CAT) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração.

A enzima da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 , por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de EROs, especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (Dubey, 2011). Noctor e Foyer (1998) afirmam que a catalase possui baixa afinidade pelo substrato (H_2O_2), porém apresentam alta atividade catalítica. Apesar disso, o papel da CAT na proteção oxidativa é extremamente importante, por estar localizada em pontos estratégicos da célula como os glioxissomos, em sementes, em que ocorre a β -oxidação de ácidos graxos e a produção do H_2O_2 .

Bailly et al., 1996 observaram baixa atividade da CAT e da SOD em sementes de girassol incubadas por 72 horas a 45°/100% UR. Esses autores relatam que houve redução da atividade dessas enzimas juntamente com a perda da viabilidade das sementes, mas que é difícil distinguir se o dano oxidativo e essa redução na atividade da SOD e da CAT são consequências da perda da

viabilidade. A manutenção das sementes em condições de elevada temperatura e umidade relativa pode tanto causar a desnaturação de enzimas quanto afetar a sua síntese.

Quando as enzimas antioxidantes não atuam de forma eficiente na eliminação das EROs geradas, como observado para as atividades da SOD e CAT (Figuras 13 e 14), a peroxidação lipídica se torna mais evidente, sendo este o principal sintoma atribuído ao dano oxidativo, frequentemente utilizada como um indicador de danos às membranas celulares (Hernandez et al., 2000).

Assim, no presente trabalho, observou-se redução tanto na atividade da SOD (Figura 13), quanto da CAT (Figura 14), ao mesmo tempo em que há redução da viabilidade das sementes, ou seja, redução na germinação (Figura 9). Porém, mesmo com o aumento nos valores de condutividade elétrica (Figura 10), não houve relação entre a deterioração das sementes e a peroxidação de lipídios, como observado para o conteúdo de MDA (Figura 12).

Na Figura 15 é possível observar que a atividade da POX aumentou durante a germinação das sementes dos lotes 1 e 2. Para o lote 1, classificado como de maior vigor, a atividade da POX estava em níveis baixos após a deterioração, independentemente do tempo de exposição (Figura 15-A). Já para o lote 2, a atividade da POX, quando as sementes foram submetidas ao tratamento de maior exposição ao estresse (96 horas), se manteve alta durante todo processo germinativo (Figura 15-B).

Algumas peroxidases são constitutivamente expressas, existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares. Além de participarem junto com as catalases do sistema antioxidativo elas também usam o H_2O_2 e compostos fenólicos como doadores de elétrons para outros sistemas (Locato et al., 2010). Outras peroxidases podem ser induzidas por estresses ambientais, como constatado em estudos em que baixas atividades mostram sintomas de estresse menos graves e as altas, sintomas mais graves (Locato et al., 2010), assim, pode-se inferir que nas sementes de menor vigor, ou seja, do lote 2, a deterioração durante 96 horas foi mais severo, e resultou no aumento da atividade da POX já no início da germinação, o que também pode ser constatado pelos menores valores de germinação obtidos para esse lote após a exposição ao estresse (Figura 9).

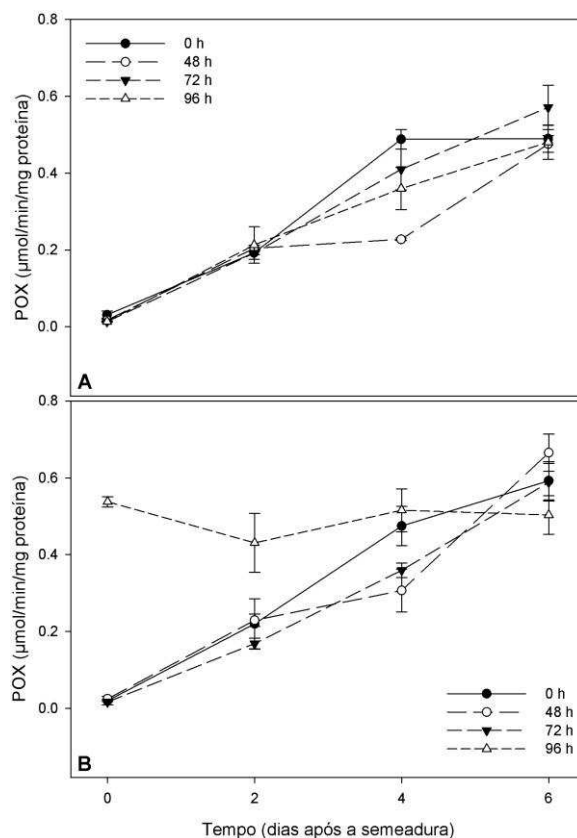


Figura 15: Atividade da enzima peroxidase (POX) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração

Resultado semelhante foi encontrado na atividade da enzima APX que é pertencente à superfamília das peroxidases. Na Figura 16-A, pode-se observar maior atividade dessa enzima durante a germinação das sementes do lote 1 para os tratamentos submetidos ao estresse. No lote 2 (Figura 16-B), a atividade da APX também foi maior no tratamento de maior exposição ao estresse no 2° e 4° DAS. Porém, a atividade dessa enzima foi maior no 6° DAS para o tratamento controle, comparado aos demais tratamentos de exposição à deterioração, associado também com os menores valores de germinação observados para as sementes desses tratamentos (Figura 9).

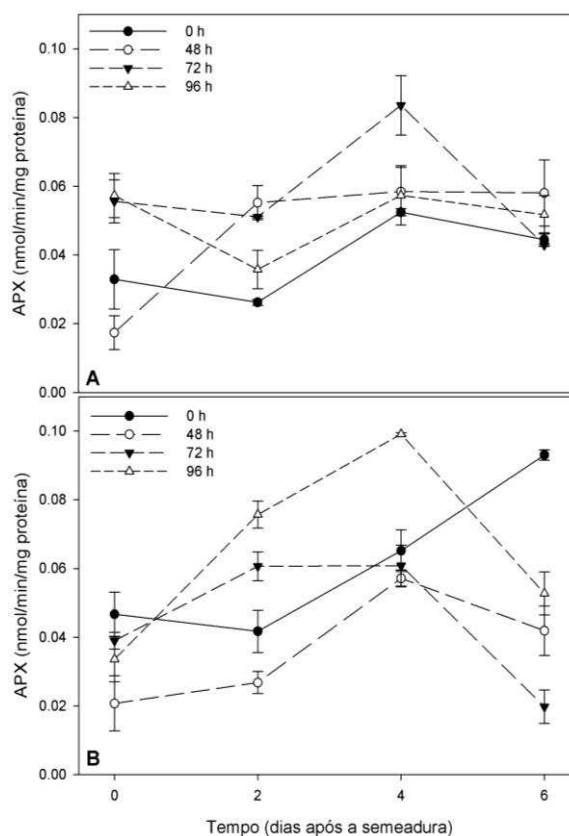


Figura 16: Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) determinada aos 0, 2, 4 e 6 dias após a semeadura em plântulas dos lotes 1 (A) e 2 (B) de girassol, cultivar Hélio 253, submetidas à deterioração.

Assim, em geral, foi observado redução na germinação das sementes submetidas à deterioração, tanto para as sementes do lote de maior vigor, quanto para o lote de menor vigor com o aumento do tempo de exposição à deterioração (Figura 9). A redução da viabilidade das sementes foi acompanhada pelo aumento na condutividade elétrica (Figura 11), refletindo a deterioração das sementes, porém não havendo relação com a peroxidação de lipídios, conforme resultados obtidos para o conteúdo de MDA (Figura 12). Ainda, a redução na viabilidade das sementes foi acompanhada pela redução da atividade das enzimas SOD (Figura 13) e CAT (Figura 14), e aumento da atividade da POX (Figura 15) e APX (Figura 16) durante a germinação das sementes submetidas à deterioração, mais evidente no lote de menor vigor.

4. CONCLUSÕES

Houve redução na germinação e no vigor das sementes de girassol com o decréscimo do potencial hídrico bem como, com o aumento da exposição das sementes à deterioração.

Os efeitos do estresse hídrico e da deterioração foram mais evidentes no lote de menor vigor.

Quando submetidas ao estresse hídrico, observou-se maior atividade da SOD e da APX para o lote de maior vigor no segundo dia após a semeadura. A atividade da POX foi reduzida ao longo da germinação das sementes dos dois lotes.

Nas sementes submetidas à deterioração, verificou-se aumento na produção de MDA durante a germinação do lote de menor vigor e . Para ambos os lotes, houve, redução da atividade da SOD e da CAT e aumento da POX e APX durante a germinação das sementes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. M.; Von Pinho, É. V. D. R.; Von, R. G.; Pinho, G. M. D. F. N.; Neta, I. C. S.; Guimarães, R. M.; Carvalho, M. R. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 1, p. 040-047, 2014.

AKCAY, U. C.; ERCAN, O.; KAVAS, M.; YILDIZ, L.; YILMAZ, C.; OKTEM, H. A.; YUCEL, M. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 61, p. 21–28, 2010.

ALBUQUERQUE, M. C.de F.; CARVALHO, N. M. Effect of the type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. **Seed Science & Technology**, v.31, n.2, p.465-479, 2003.

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.

AVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A. Teste de comprimento de plântulas sob estresse hídrico na avaliação do potencial fisiológico das sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 117-124, 2007.

BACKES, R. L.; DE SOUZA, A. M.; JUNIOR, A. A. B.; GALLOTTI, G. J. M.; BAVARESCO, A. Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no planalto norte catarinense. **Scientia Agricola**, v. 9, n. 1, p. 41-48, 2008.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione

reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 104–110, 1996.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 02, p. 93-107, 2004.

BALOĞLU, M. C.; KAVAS, M.; AYDIN, G.; ÖKTEM, H. A.; YÜCEL, A. M.. Antioxidative and physiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. **Turk Journal Botanic**, v. 36, p. 707-714, 2012.

BARROS, C. S.; ROSSETTO, C. A. V. Condicionamento fisiológico de aquênios de girassol. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1667-1675, 2009.

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

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, W. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**, 3a ed. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. New York, 2013. 392p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**. Springer, 1994.

BORGES, E. E. L.; FLORES, A. V.; ATAÍDE, G. M.; MATOS, A. C. B. Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna schott*. **CERNE**, v. 21, n. 1, p. 75-81, 2015.

BOŠNJAK, Đ. Drought and its relation to field crops production in Vojvodina province. **Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo**, n. 40, p. 45-55, 2004.

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. Instrução normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília-DF, Seção I, p.16, 2013.

CAID, H. S.; Ecchemmakh, T.; Elamrani, A.; Khalid, A.; Boukroute, A.; Mihamou, A.; Demandre, C. Altérations accompagnant le vieillissement accéléré de blé tendre. **Cahiers Agricultures**, v. 17, n. 1, p. 39-44, 2008.

CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S; OLIVEIRA, P. V. ; TEIXEIRA, S. B; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M.. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 752 - 761, 2011.

CHAKRABORTY, U.; PRADHAN, B. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H₂O₂ accumulation. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v. 24, n. 2, p. 117-130, 2012.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária. Brasília, ano XXII, n. 4, 2014.

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

DRAGANIĆ, I.; LEKIĆ, S. Seed priming with antioxidants improves sunflower seed germination and seedling growth under unfavorable germination conditions. **Turkish Journal of Agriculture And Forestry**. v. 36, p. 421-428, 2012.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves

of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.178-203, 2011.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. **Proceedings of American Society of Horticultural Science**, v. 71, n. 2, p. 428-434, 1958.

GIANNOPOLITIS C.N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GRATAO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A.; Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, , v. 32, p. 481-494, 2005.

GROB, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F. Nitricoxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Plant Science**, , v. 4, 2013.

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

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, p. 141-153, 1993.

HERNÁNDEZ, J. A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea plants (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, v. 23, p. 853-862, 2000.

IVANOVA, R. V.; SHTEREVA, L.; KRAPTCHEV, B.; KARCEVA, T. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes to PEG-mediated water stress. **Central European Journal of Biology**. v. 9, n. 12, p. 1206-1214, 2014.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60, p.110-116, 2007.

KAYA, M.D.; OKÇU, G.; ATAK, M.; ÇIKILI, Y.; KOLSARICI, O. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **European Journal of Agronomy**, v. 24, p. 291-295, 2006.

KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M.; SIQUEIRA, I. R. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.

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

LEHNER, A.; MAMADOU, N.; POELS, P.; CÔME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n.3, p. 555-565, 2008.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOCATO, V.; DE PINTO, M. C.; PARADISO A.; DE GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbateglutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p. 45-64, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

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

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MOTERLE, L. M.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; RODOVALHO, M. A.; BARRETO, R. R. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1817, 2008.

NADERI, R.; Valizadeh, M.; Toorchi, M.; Shakiba, M. R. Antioxidant enzyme changes in response to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 58, n. 2, p. 95-101, 2014.

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

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; CARVALHO, N. M. Germinação de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.), submetidas a

diferentes temperaturas e substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 3, p. 471-473, 2000.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual review of plant biology**, v. 49, p. 249–79, 1998.

RAUF, S. Breeding sunflower (*Helianthus annuus* L.) for drought tolerance, **Communications in Biometry and Crop Science**, v.3, p.29-44, 2008.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189–1202, 2004.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 51–55, 1994.

TIAN, X.; SONG, S.; LEI, Y. Cell Death and Reactive Oxygen Species Metabolism during Accelerated Ageing of Soybean Axes, **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, n. 1, p. 33-40, 2008.

VILLELA, F. A; FILHO, L. D.; SEQUEIRA E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 1957-1968, 1991.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v. 1, p. 207-228, 1995.

WILSON, D. O.; MCDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, v. 14, p. 269-300, 1986.

YIN, X; HE, D; GUPTA, R e YANG, P. Physiological and proteomic analyses on artificially aged *Brassica napus* seed, **Frontiers in Plant Science**, v. 6, art. 112, 2015.