

AMANDA ÁVILA CARDOSO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM
EMBRIÕES DE SEMENTES DE *Plathymenia reticulata*
BENTH. (FABACEAE) SUBMETIDAS AO MERCÚRIO E
DITIOTREITOL**

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
2014**

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

T

C268a
2014
Cardoso, Amanda Ávila, 1990-
Alterações fisiológicas e bioquímicas em embriões de
sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae)
submetidas ao mercúrio e ditiotreitól / Amanda Ávila
Cardoso. - Viçosa, MG, 2014.
v, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

Referências bibliográficas: f. 33-37.

1. *Plathymenia reticulata*. 2. Stress oxidativo. 3. Metais.
4. Sementes - Fisiologia. 5. Germinação. 6. Mercúrio.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 583.74

AMANDA ÁVILA CARDOSO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM
EMBRIÕES DE SEMENTES DE *Plathymenia reticulata*
BENTH. (FABACEAE) SUBMETIDAS AO MERCÚRIO E
DITIOTREITOL**

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2014.

Dimas Mendes Ribeiro

Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Coorientador)

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que faz com que toda dificuldade se transforme em bonança.

À minha família, pelo apoio incondicional na realização de mais um sonho e por serem o motivo da minha luta.

Aos grandes e melhores amigos, Luana e Haroldo, pelos conselhos, força e momentos de felicidade inesquecíveis.

À Cristiane J. Silva, pelo incentivo, carinho e companheirismo que não se comparam a nenhum outro.

Aos colegas de laboratório, principalmente Genáina e Raquel, pelo auxílio na realização dos experimentos e força nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Denise e Eduardo, pelo conhecimento transmitido ao longo desta caminhada.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que permitiu minha permanência neste curso.

E a todos que contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional durante o mestrado.

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMO | iv |
| ABSTRACT | v |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 6 |
| 2.1 Objetivo geral | 6 |
| 2.2 Objetivos específicos | 6 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 7 |
| 3.1 Método de superação da dormência e condições de experimento | 7 |
| 3.2 Germinação de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio | 7 |
| 3.3 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio | 8 |
| 3.4 Germinação de sementes embebidas em soluções de ditiotreitól | 8 |
| 3.5 Germinação de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól | 9 |
| 3.6 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól | 9 |
| 3.7 Atividade das principais enzimas do sistema antioxidante em embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de ditiotreitól, cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól | 9 |
| 4. RESULTADOS | 12 |
| 4.1 Germinação de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio | 12 |
| 4.2 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio | 16 |
| 4.3 Germinação de sementes embebidas em soluções de ditiotreitól | 18 |
| 4.4 Germinação de sementes hidratadas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól | 19 |
| 4.5 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól | 21 |
| 4.6 Atividade das principais enzimas do sistema antioxidante em embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de ditiotreitól, cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól | 24 |
| 5. DISCUSSÃO | 28 |
| 6. CONCLUSÃO | 33 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

RESUMO

CARDOSO, Amanda Ávila, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em embriões de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) submetidas ao mercúrio e ditiotreitól.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Grande importância tem sido dada a problemas envolvendo poluição e seus efeitos sobre organismos vivos. Dentre os principais vilões, encontram-se os metais pesados que assumem papel de destaque. Um metal pesado conhecido por sua alta toxicidade é o mercúrio (Hg^{2+}): um elemento químico não essencial que se acumula facilmente nos organismos vivos, causando danos fisiológicos e estruturais bastante acentuados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em embriões de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. tratadas com cloreto de mercúrio ($HgCl_2$). Foi avaliado o efeito do $HgCl_2$ a 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M na germinação de sementes e embebição e teor de água dos embriões oriundos de sementes hidratadas nestas soluções. Foi avaliado também a germinação de sementes hidratadas soluções de ditiotreitól (DTT) nas concentrações 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M. Foi verificada a reversão, utilizando o DTT, dos danos causados pelo cloreto de mercúrio, avaliando a germinação de sementes e embebição e teor de água dos embriões oriundos de sementes hidratadas: nas seguintes soluções: $HgCl_2$ 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e $HgCl_2$ 10^{-2} M + DTT 10^{-3} M. Por fim, foi determinada a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidases totais nos embriões durante as primeiras horas de embebição de sementes nas soluções: DTT 10^{-3} , $HgCl_2$ 10^{-3} M e $HgCl_2$ 10^{-3} M + DTT 10^{-3} . O $HgCl_2$ altera as fases iniciais da embebição dos embriões de sementes de *P. reticulata*, modificando o teor de água dos embriões e a porcentagem e velocidade de germinação, sem promover estresse oxidativo. Em concentrações mais elevadas provoca a morte das sementes. O DTT é capaz de reverter o processo de inibição da embebição de embriões oriundos de sementes tratadas com cloreto de mercúrio, permitindo que o teor de água dos embriões e a porcentagem e velocidade de germinação das sementes sejam restabelecidos.

ABSTRACT

CARDOSO, Amanda Ávila, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Physiological and biochemistry changes in embryo from seeds of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) subjected to mercury and dithiothreitol.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-Adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Great importance has been given to problems involving pollution and the effects on living organisms. Among the main pollution villain, heavy metals assume a relevant role. A heavy metal, referred by the high toxicity is Mercury (Hg^{2+}), a non-essential chemical element that can easily accumulate in all live organisms causing accented physiological and structural damages. The aim of this work was to evaluate physiological and biochemical changes in embryos from *Plathymenia reticulata* Benth. seeds subjected to mercury chloride (HgCl_2) and dithiothreitol (DTT). It was evaluated the effects of HgCl_2 solutions in the concentrations of 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} and 10^{-2} M on seed germination, embryo hydration and embryo moisture content. It was also evaluated he effects of DTT solutions in the concentrations of 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} and 10^{-2} M on seed germination. DTT was used to test the reversal of the damage caused by mercury chloride on seed germination, embryo hydration and embryo moisture content, thus was used the solutions of 10^{-3} M HgCl_2 + 10^{-3} M DTT and 10^{-2} M HgCl_2 + 10^{-3} M DTT. Lastly it was determined the activity of superoxide dismutase, catalase and total peroxidases in embryos during the initial 48 hours of seed imbibition in the solutions: water (control), 10^{-3} M DTT, 10^{-3} M HgCl_2 and 10^{-3} M HgCl_2 + 10^{-3} M DTT. The imbibition of seeds in the concentration of 10^{-3} M HgCl_2 delays the embryo hydration and reduces embryo moisture content and seed germination, without promoting oxidative stress. Imbibition of seeds in the concentration of 10^{-2} M HgCl_2 kills the seeds. DTT reverses the inhibition on embryo imbibition, when seeds are subjected to mercury chloride and allows embryo moisture content and seed germination to restore.

1. INTRODUÇÃO

Grande importância tem sido dada a problemas envolvendo poluição e seus efeitos danosos sobre organismos vivos. Dentre os principais vilões, encontram-se os metais pesados, atualmente citados como elementos traço, que assumem, cada vez mais, papel de destaque na preocupação ambiental (Wani et al., 2012). A poluição por metais pesados é consequência do despejo indiscriminado de efluentes no meio ambiente, seja por fontes como mineração e indústrias ou pelo uso descriterioso de agentes químicos na agricultura. Este processo concorre para o acúmulo de metais e, fatalmente, para o desequilíbrio no ecossistema (Wani et al., 2012).

Um metal pesado que se destaca devido a sua alta toxicidade é o mercúrio (Hg^{2+}). Um elemento químico não essencial que se acumula facilmente nos organismos vivos, causando danos fisiológicos e estruturais bastante acentuados. É reportado também a ocorrência de fenômenos de bioacumulação e biomagnificação desse metal ao longo da cadeia trófica promovendo sérios prejuízos à saúde do meio ambiente (Windmöller et al., 2007; Ohriel et al., 2008). O mercúrio tem ocorrência natural no ambiente, sendo encontrado nas formas orgânicas e inorgânicas e nos estados sólido e gasoso, além de ocorrer dissolvido em corpos d'água. Dessa forma, seu ciclo biogeoquímico envolve processos no solo, na água e na atmosfera (Windmöller et al., 2007; Tinôco et al., 2010). Embora sua presença nos ambientes seja um evento natural, seu acúmulo, devido a fontes antrópicas, é considerado um processo não espontâneo que intensifica a poluição e a degradação do meio onde se encontra.

No Brasil, a contaminação por mercúrio tem sido confirmada em diversos estados, sendo frequentemente associada à atividade de garimpo de ouro, que representa uma das mais impactantes fontes antrópicas emissoras do metal (Tinôco et al., 2010; Cesar et al., 2011a; Cesar et al., 2011b). O estado de Minas Gerais apresenta diversos focos de contaminação por mercúrio, que é encontrado em ambientes fluviais e associado à matéria orgânica nos sedimentos. O histórico da exploração de ouro ocorrido ao longo do século XIX justifica aos altos níveis do metal nos diversos pontos do estado (Tinôco et al., 2010).

Com os elevados níveis de mercúrio 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. Em plantas, sabe-se que o acúmulo excessivo do mercúrio pode interferir em vários processos metabólicos como fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, desenvolvimento e atividade de organelas e funcionalidade de enzimas (Ortega-Villasante et al., 2005; Parmar e Chanda, 2005). Além disto, por se caracterizar como um agente estressante, em níveis elevados, o mercúrio pode levar ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica nos tecidos vegetais onde se encontra (Zhang et al., 2007).

O mercúrio também é apontado como um dos principais inibidores da atividade das aquaporinas, embora existam algumas poucas aquaporinas resistentes ao metal descritas em plantas (Daniels et al., 1994). Sob condições fisiológicas, o mercúrio rapidamente interage com grupos tióis dos resíduos de cisteína, oxidando-os e bloqueando reversivelmente a atividade destas proteínas (Aroca et al., 2012). Devido à sua eficiência em bloquear os canais de água, o cloreto de mercúrio (HgCl_2) tem sido bastante utilizado como ferramenta para estimar a contribuição das aquaporinas no transporte de água de diversas espécies vegetais (Jain et al., 2008; Aroca et al., 2012).

As aquaporinas foram primeiramente descritas em plantas por Maurel et al. (1993). São proteínas intrínsecas de membrana, encontradas em todos os organismos vivos e formam um poro protéico na membrana que facilita a passagem de água entre os compartimentos celulares e entre a célula e apoplasto (Aroca et al., 2012). Embora as aquaporinas tenham sido primeiramente caracterizadas como canais de água, hoje se sabe que algumas aquaporinas vegetais também atuam no transporte de outras moléculas neutras de baixo peso molecular como óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), amônia (NH_3), glicerol, nutrientes (boro e silício), gases (CO_2), uréia e metaloides como ansenito ($\text{As}(\text{OH})_3$) (Gaspar, 2011).

Em plantas, as aquaporinas são divididas em cinco famílias: proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), proteínas intrínsecas do tipo nodulina-26 (NIPs), proteínas intrínsecas pequenas e básicas (SIPs) e proteínas intrínsecas não caracterizadas (XIPs). Um grande número de genes de aquaporinas é

encontrado em vegetais, variando de 30 a 70, dependendo da espécie (Maurel et al., 2008; Park et al., 2010; Aroca et al., 2012).

Diversos fatores têm sido descritos como interferentes e/ou até mesmo inibidores da atividade dessas proteínas. Dentre eles listam-se: baixa temperatura (por efeito indireto), pH ácido, íons cálcio, sais de tetráetilamônio, espécies reativas de oxigênio e metais como prata, zinco, cobre e o próprio mercúrio, como citado anteriormente (Jain et al., 2008; Haddoub et al., 2009).

A inibição da atividade destas proteínas pode ser reversível ou não. No caso do cloreto de mercúrio, a reversão é possível pela aplicação de agentes redutores como, por exemplo, ditioneitol (DTT) e 2-mercaptoetanol, que reduzem os grupos sulfidrilas das aquaporinas permitindo que estas retornem à sua conformação original e retomem sua funcionalidade (Jain et al., 2008).

O mercúrio em altos níveis também afeta 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 a germinação e o desenvolvimento inicial elas se tornam menos tolerantes (Reetha et al., 2012; Aery e Sankar, 2012; Jain, 2013).

A germinação é um evento complexo no qual as células sustentam a retomada de um metabolismo intenso essencial ao crescimento do embrião. O processo germinativo é acompanhado de eventos celulares importantes como respiração, multiplicação e reparo mitocondrial, síntese e reparo de DNA, transcrição e tradução e mobilização de reserva (Nonogaki et al., 2010).

A intensificação do metabolismo, frequentemente, culmina com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (radicais superóxido $O_2^{\cdot -}$, peróxido de hidrogênio H_2O_2 e radicais hidroxilas $\cdot OH$) (Schopfer et al., 2001) que pode ser intensificada por agente estressores, acarretando danos metabólicos e estruturais significativos. Os metais pesados, dentre eles o mercúrio, são agentes promotores de estresse, quando em altas concentrações, e como todos os outros, acentuam a produção de espécies reativas de oxigênio e afetam a homeostase celular.

Primeiramente reconhecidas apenas como subprodutos de reações redox e responsáveis por danos oxidativos, sabe-se, hoje, que as EROs apresentam importante função na sinalização celular (Schopfer et al., 2001). Durante a germinação, a semente passa por um período sensível à infecção e, portanto, acredita-se que as EROs apresentam relevante papel na proteção do

embrião contra a ação de patógenos (Schopfer et al., 2001; Oracz et al., 2009). Radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) também têm sido associados ao enfraquecimento de polissacarídeos da parede celular, modificando sua composição e levando a um enfraquecimento bioquímico que, conseqüentemente, facilita a protrusão radicular (Bailly, 2004; Müller et al., 2009).

Quando a produção de EROs supera os mecanismos de detoxificação celular, o acúmulo dessas moléculas promove alterações drásticas nos tecidos onde se encontram. Dentre as EROs produzidas durante a germinação, os radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) são os mais danosos às células, devido à alta reatividade com moléculas orgânicas e a inexistência de um sistema de reparo específico, não podendo, portanto, ser eliminados enzimaticamente (Bailly, 2004).

Radical hidroxilas possuem um elétron desemparelhado e, portanto, tendem a oxidar rapidamente compostos orgânicos vizinhos. Ao retirar um elétron de uma molécula neutra, esta molécula se torna um radical e inicia, assim, uma reação em cadeia que resulta na destruição de macromoléculas bioativas como proteínas, açúcares, membranas biológicas, nucleotídeos e outros materiais orgânicos (Henzler e Steudle, 2004).

Os radicais hidroxilas também afetam substancialmente a atividade das aquaporinas. Sabe-se que eles inibem reversivelmente a passagem de substância através do poro. O efeito dos $\cdot\text{OH}$ sobre as aquaporinas são considerados mais intensos que os causados pelo cloreto de mercúrio, podendo reduzir em 90% a condutividade hidráulica do vegetal (Henzler e Steudle, 2004; Maurel et al., 2008; Park et al., 2010).

O mecanismo pelo qual os radicais hidroxilas afetam a atividade da aquaporina ainda é desconhecido, porém duas hipóteses são levantadas. Uma hipótese é que o baixo peso molecular da substância permitiria o livre acesso ao poro da proteína e uma vez dentro do poro, eles atacariam resíduos de aminoácidos, como por exemplo, resíduos de cisteína. A oxidação promovida levaria a uma mudança conformacional na aquaporina resultando no fechamento do canal (Henzler e Steudle, 2004).

A segunda hipótese leva em conta a oxidação de lipídeos pelo ataque as ligações C=C formando lipídeos radicais que poderiam, então, atacar diretamente as proteínas do canal resultando no fechamento do mesmo (Henzler e Steudle, 2004).

O fechamento das aquaporinas pelos radicais hidroxilas é um evento rapidamente reversível após sua remoção, que pode ser total ou parcial. Tal reversibilidade indica um efetivo mecanismo de reparo relacionado com antioxidantes citoplasmáticos como ascorbato, glutathiona ou NADPH (Henzler e Steudle, 2004). Diferentemente do HgCl₂, o fechamento do canal por radicais hidroxilas também afeta o transporte de pequenos solutos orgânicos como acetona e alcoóis monohídricos (Henzler e Steudle, 2004).

Na manutenção dos níveis normais das EROs, atuam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Apel e Hirt, 2004; Gill e Tujeta, 2010). O sistema antioxidativo enzimático é constituído principalmente pelas enzimas dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) como peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase da glutathiona (GPX). Enquanto isso mecanismos não enzimáticos envolvem moléculas como glutathiona, ascorbato e antocianinas (Singh et al., 2009).

Nos últimos anos, o estudo da fisiologia de sementes tem aumentado significativamente, com pesquisas relacionadas aos mecanismos celulares e modificações estruturais celulares e teciduais durante os eventos de embebição, processo germinativo e formação de plântulas.

Embora haja um número crescente de trabalhos envolvendo aspectos fisiológicos durante a germinação de sementes, grande parte das pesquisas é realizada com sementes de espécies cultivadas, principalmente, soja, milho, feijão e arroz. Sementes florestais apresentam características bastante diferentes entre si, com alta variabilidade intra e interespecífica decorrente da ausência de melhoramento genético e produção de sementes dessas espécies, o que provoca respostas fisiológicas muito variadas em relação aos padrões de resposta de sementes de espécie cultivadas. Como a fisiologia de sementes de espécies florestais é pouco estudada, torna-se necessário encorajamento para que sejam realizados novos estudos, ampliando o entendimento do metabolismo das mesmas e permitindo que os conhecimentos fisiológicos adquiridos possam ser aplicados na otimização de protocolos de germinação e produção de mudas e possam ser somados às informações do manejo da espécie.

O vinhático (*Plathymenia reticulata* Benth) é uma espécie arbórea neotropical, nativa da região amazônica, encontrado ao longo de diferentes biomas brasileiros. A espécie é potencialmente utilizada na produção de

madeira e indicada na recomposição de áreas degradadas (Carvalho, 2008; Oliveira et al., 2012). Os potenciais econômico e ambiental atribuídos à espécie fazem com que o vinhático seja apontado como uma das espécies mais importantes e úteis encontradas no Cerrado. Associado a isto, a degradação e perda de seus ambientes tem colocado a espécie em uma situação de alta vulnerabilidade à extinção (Almeida et al., 1998; Oliveira et al., 2012). Além da importância econômica e ecológica da espécie, suas sementes apresentam a vantagem de possuir germinação consideravelmente rápida quando tem sua dormência quebrada, com a protrusão da radícula ocorrendo em torno de três dias. Tal característica é altamente desejável quando se realizam trabalhos com espécies florestais, pois permite que sua fisiologia seja estudada em um curto período de tempo.

Trabalhos que envolvam estudos da semente e fisiologia da germinação são importantes para favorecer o sistema de produção de mudas e manejo da espécie. Além disto, como a espécie é utilizada em projetos de recuperação de áreas degradadas, faz-se necessário conhecer sua tolerância e/ou sensibilidade frente a metais pesados que são, frequentemente, encontrados em ambientes que necessitam de intervenção antrópica para se restabelecer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em embriões de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. tratadas com cloreto de mercúrio.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar as alterações durante o processo de embebição de embriões oriundos de sementes hidratadas em soluções de cloreto de mercúrio;

2. Verificar as variações no teor de água de embriões e porcentagem e velocidade de germinação de sementes hidratadas em soluções de cloreto de mercúrio;

3. Definir concentrações de ditioneitol visando testar uma possível reversão nas alterações causadas pelo cloreto de mercúrio sobre os embriões;

4. Determinar a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante em embriões oriundos de sementes hidratadas em soluções de cloreto de mercúrio, ditioneitol e ambos solutos aplicados em conjunto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV - MG), onde foram utilizadas sementes de vinhático (*Plathymenia reticulata* Benth.) coletadas em agosto de 2012 na região de Guaraciaba, MG (20° 34' 15" S; 43° 00' 27" O), armazenadas em temperatura de 20 °C até a realização dos experimentos.

3.1 Método de superação da dormência e condições de experimento

As sementes de vinhático tiveram sua dormência superada através da imersão em ácido sulfúrico P.A. por dez minutos, sendo, em seguida, lavadas em água corrente e colocadas para secar a sombra em temperatura ambiente.

Para todos os experimentos, as sementes foram semeadas em placas de petri de nove centímetros de diâmetro, contendo duas folhas de papel germitest umedecidas com 4,0 mL das soluções e foram mantidas em incubadora do tipo B.O.D. à temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. As placas foram vedadas, evitando assim dessecação e alteração na concentração das soluções aplicadas.

3.2 Germinação de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio

Sementes de vinhático foram embebidas em água e em soluções de cloreto de mercúrio nas concentrações de 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ e 10⁻² M por um período de 72 horas, com avaliações da germinação a cada 24 horas. Ao final do experimento, foi determinada a porcentagem de germinação e calculado o

índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Nakagawa (1999), sendo consideradas germinadas as sementes que emitiram raiz primária com comprimento acima de 1,0 mm. Também foi calculado o teor de água dos embriões através do método padrão de estufa a 105 °C por 24 horas de acordo com as regras para análise de sementes (Brasil, 2009).

Um segundo experimento foi realizado apenas com sementes embebidas em soluções de HgCl_2 nas concentrações de 10^{-3} e 10^{-2} M. Para ambos tratamentos, um novo teste de germinação foi realizado conforme descrito acima. Ao final das 72 horas, as sementes foram lavadas em água destilada e distribuídas sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com 4,0 mL de água pelo mesmo período. Ao final do experimento (com total de 144 horas), os mesmos parâmetros foram avaliados.

3.3 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio

Sementes de vinhático foram embebidas em água e em soluções de cloreto de mercúrio nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M por 42 horas, com determinações da massa fresca realizadas a cada seis horas. Os embriões foram extraídos das sementes com auxílio de estile e tiveram sua massa fresca (g) determinada por meio de balança analítica com precisão de 0,0001.

3.4 Germinação de sementes embebidas em soluções de ditiotreitol

Sementes de vinhático foram embebidas em água e em soluções de ditiotreitol nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M por um período de 72 horas, com avaliações da germinação a cada 24 horas. Ao final do experimento, foi determinada a porcentagem de germinação e calculado o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Nakagawa (1999), sendo consideradas germinadas as sementes que emitiram raiz primária com comprimento acima de 1,0 mm.

3.5 Germinação de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditioneitol

Sementes de vinhático foram embebidas em água e nas soluções: DTT 10^{-3} M, 10^{-3} e 10^{-2} M, HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl_2 10^{-2} M + DTT 10^{-3} M por um período de 72 horas, com avaliações da germinação a cada 24 horas. Ao final do experimento, foi determinada a porcentagem de germinação e calculado o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Nakagawa (1999), sendo consideradas germinadas as sementes que emitiram raiz primária com comprimento acima de 1,0 mm. Também foi calculado o teor de água dos embriões oriundos por meio do método padrão de estufa a 105°C por 24 horas de acordo com as regras para análise de sementes (Brasil, 2009).

3.6 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditioneitol

Sementes de vinhático foram embebidas em água e nas soluções: HgCl_2 10^{-3} e 10^{-2} M, HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl_2 10^{-2} M + DTT 10^{-3} M por 42 horas com determinações da massa fresca realizadas a cada seis horas. Os embriões foram extraídos das sementes com auxílio de estilete e tiveram sua massa fresca (g) determinada através de balança analítica.

3.7 Atividade das principais enzimas do sistema antioxidante

Sementes de vinhático foram embebidas em água e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl_2 10^{-3} e HgCl_2 10^{-3} + DTT 10^{-3} por 48 horas com avaliações das atividades das enzimas realizadas a cada 24 horas, nos embriões extraídos das sementes.

Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase total e ascorbato

peroxidase foram obtidos pela maceração de 0,1 g de embriões 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.

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

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8, metionina 50 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, EDTA 5 mM e riboflavina 10 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 UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) (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% (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em U min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase 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 7,0 e peróxido de hidrogênio 75 mM (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm foi medido em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) 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 μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Determinação da atividade da peroxidase total (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 30 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 20 mM e peróxido de hidrogênio 100 mM (Kar e Mishra, 1976). O incremento na absorvância durante os dois primeiros minutos da reação a 420 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) e 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 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehly, 1955) e expressa em μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA).

3.8 Delineamento experimental e análise estatística

Para o teste de germinação o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições de 20 sementes para porcentagem e velocidade de germinação e cinco repetições de 10 embriões para o teor de água. Para a curva de hidratação, cinco repetições de 10 sementes. E para o teste de atividade enzimática, cinco repetições de 0,1 g da massa fresca dos embriões.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 1% de significância. E para o experimento realizado apenas com sementes embebidas em soluções de HgCl₂ nas concentrações de 10⁻³ e 10⁻² M as médias foram comparadas pelo teste *t*-Student a 1% de significância.

4. RESULTADOS

4.1 Germinação de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio

A embebição das sementes de vinhático em algumas soluções de cloreto de mercúrio promoveu alterações no padrão de germinação quando comparado com o apresentado pelas sementes hidratadas em água. Enquanto as sementes hidratadas nas soluções de HgCl_2 a 10^{-5} e 10^{-4} M se comportaram de forma semelhante ao controle (embebição em água), por outro lado as sementes hidratadas na solução do sal a 10^{-3} M tiveram sua germinação significativamente reduzida e as sementes hidratadas na solução a 10^{-2} M tiveram sua germinação inibida (FIG. 1).

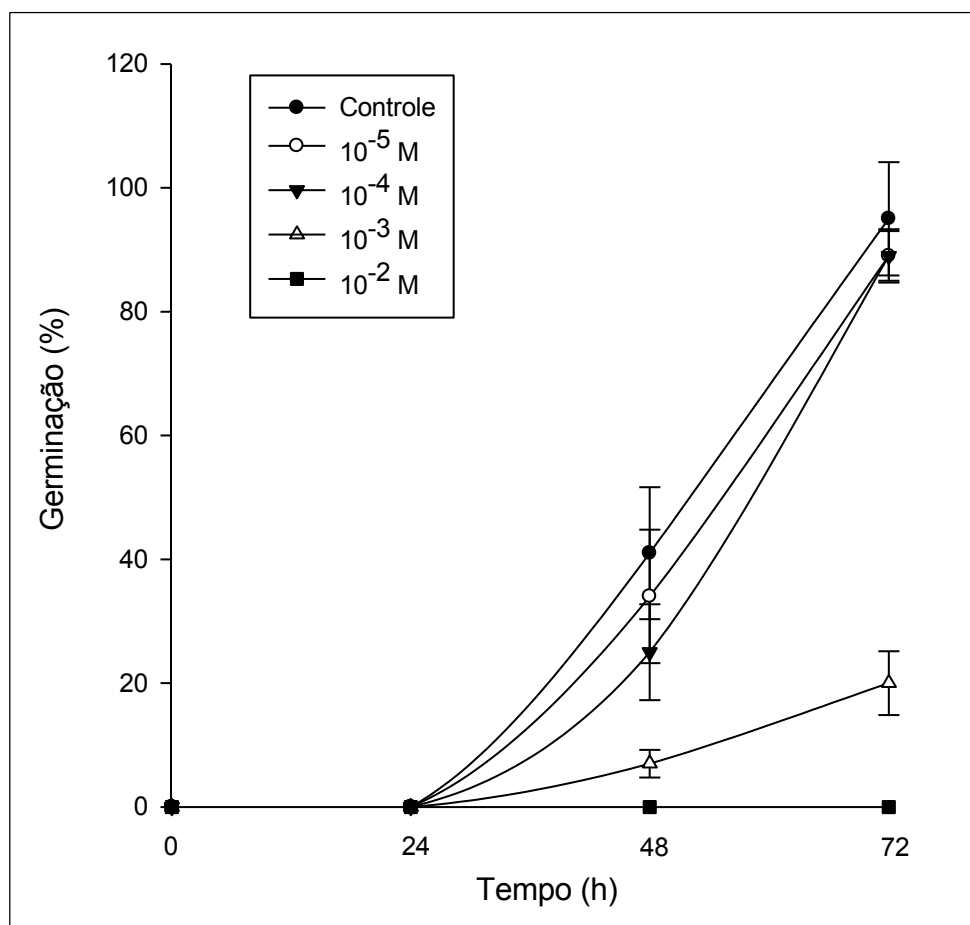


FIGURA 1. Germinação (%), obtida nos tempos 24, 48 e 72 horas, de sementes de *P. reticulata* Benth. embebidas em água e em soluções de HgCl_2 de diferentes concentrações. Média \pm erro padrão, $n = 5$.

Os parâmetros porcentagem e velocidade de germinação e teor de água dos embriões foram afetados de forma diferenciada, dependendo da concentração das soluções às quais as sementes foram expostas. Ao final de 72 horas, sementes embebidas nas soluções mais diluídas (HgCl_2 a 10^{-5} e 10^{-4} M) apresentaram porcentagem e velocidade de germinação, além do teor de água dos embriões estatisticamente semelhantes às sementes hidratadas em água. Já as sementes embebidas na solução de HgCl_2 a 10^{-3} M apresentaram redução significativa na porcentagem e velocidade de germinação, além de ter sido encontrado menor teor de água nos embriões (FIG. 2 e 3).

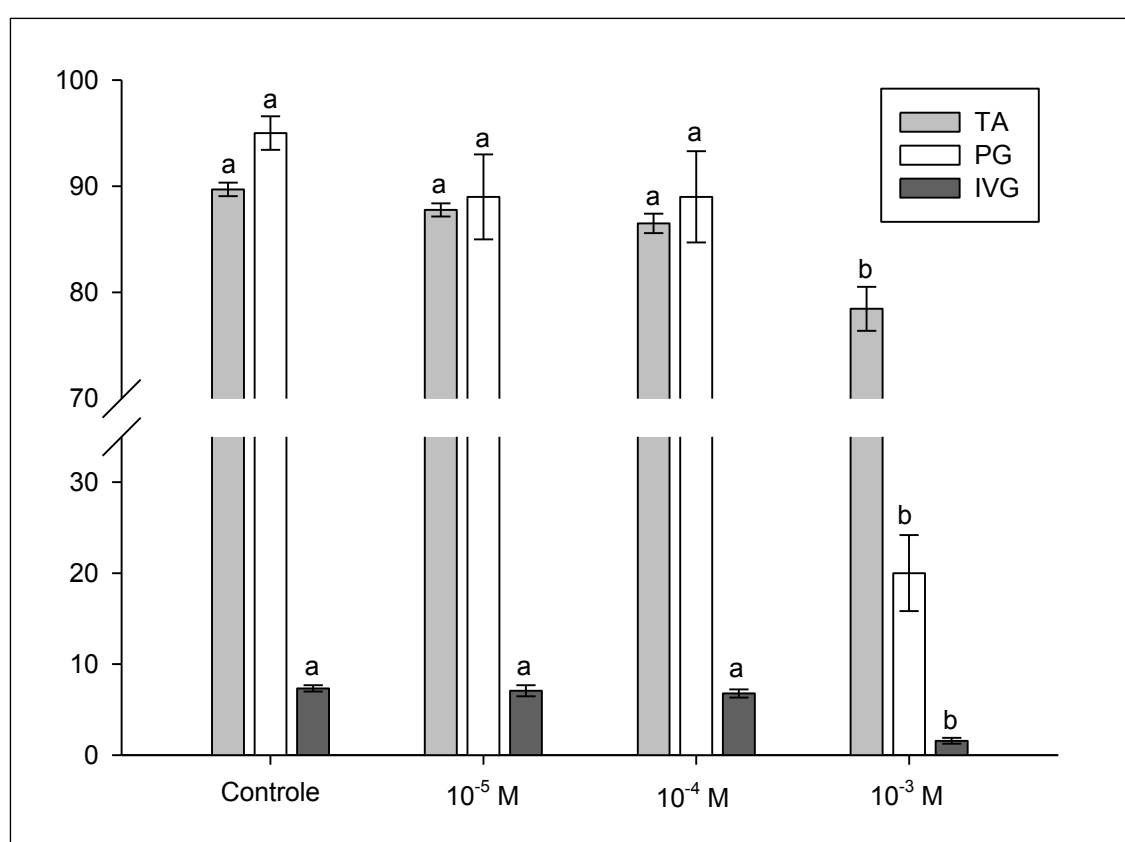


FIGURA 2. Teor de água (TA - %) de embriões, porcentagem de germinação (PG - %) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *P. reticulata* Benth após 72 horas de embebição em água e em soluções de HgCl_2 de diferentes concentrações. Letras iguais, na variável, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$). Média \pm erro padrão, n = 5.

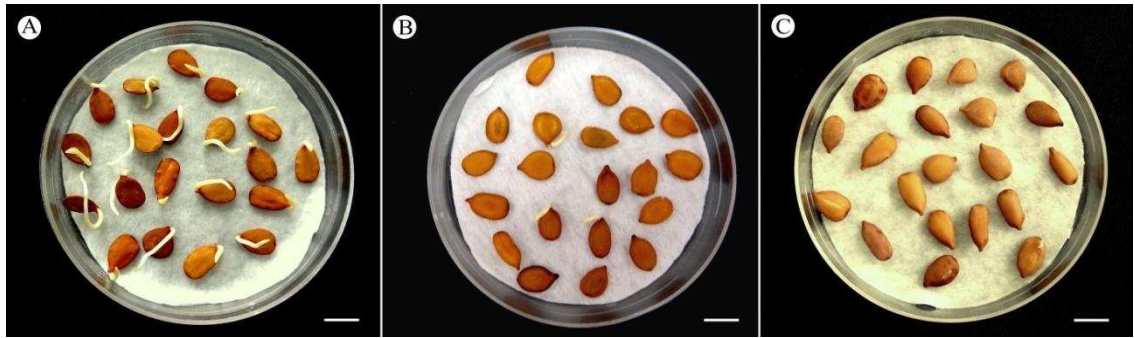


FIGURA 3. Germinação de sementes de *P. reticulata* Benth. após 72 horas de embebição em água (A), HgCl_2 10^{-3} M (B) e HgCl_2 10^{-2} M (C) (Barras = 1cm).

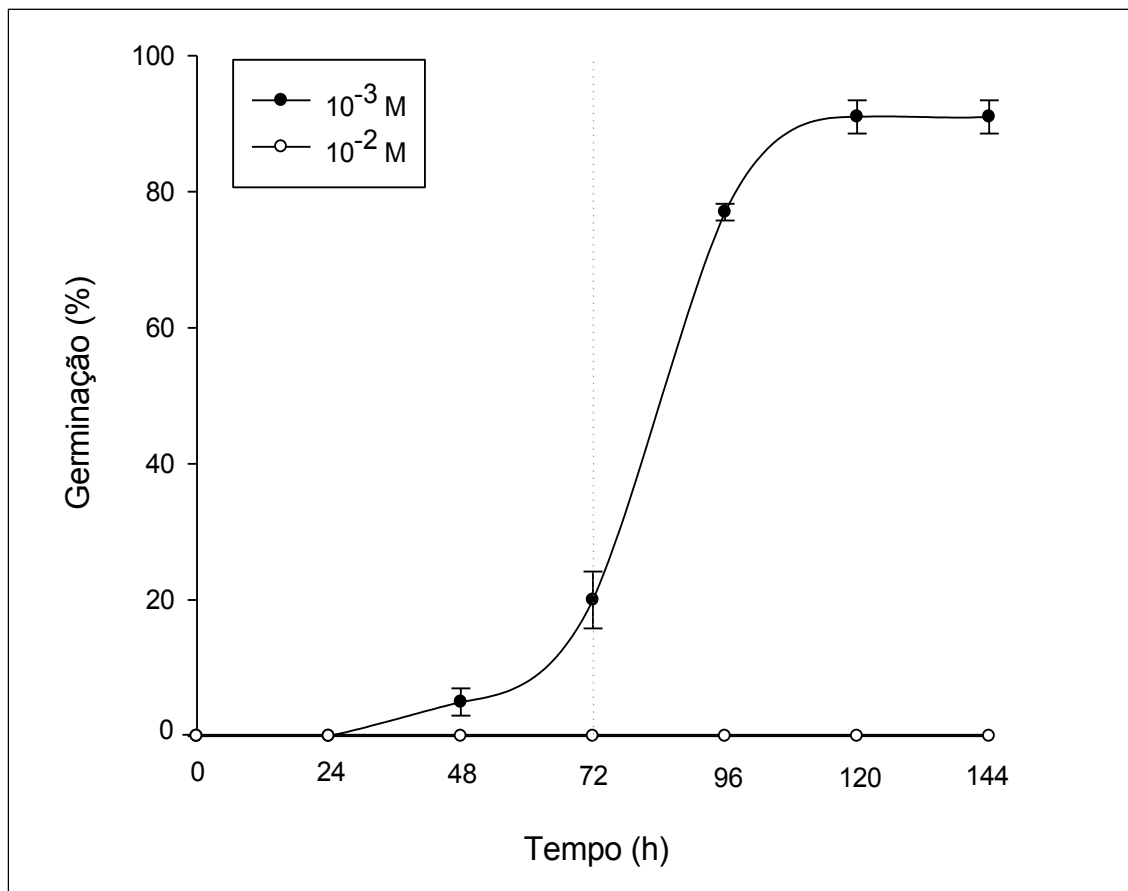


FIGURA 4. Germinação (%) de sementes de *P. reticulata* Benth. embebidas em soluções de HgCl_2 por 72 horas e posteriormente hidratadas em água (indicado na linha tracejada) até 144 horas. Média \pm erro padrão, $n = 5$.

Quando as sementes embebidas nas soluções de HgCl_2 a 10^{-3} e 10^{-2} M por 72 horas foram lavadas e ressemeadas em água, houve um rápido incremento na germinação das sementes previamente embebidas no sal a 10^{-3} M, alcançando porcentagem de germinação semelhante ao obtido pelas sementes do controle em 72 horas. Mesmo depois de colocadas em água, as sementes previamente embebidas no sal a 10^{-2} M continuaram não

apresentando germinação, indicando que o tratamento provocou a morte das sementes, o que foi constatado por meio do teste tetrazólio (dados não apresentados) (FIG. 4 e 5).

Houve aumento significativo no teor de água dos embriões das sementes reidratadas até 144 horas em relação àquelas embebidas por 72 horas, para os dois tratamentos de embebição em HgCl_2 (TABELA 1).

TABELA 1. Teor de água (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth. após 72 horas de embebição em soluções de HgCl_2 de diferentes concentrações e, posteriormente, hidratação em água até 144 horas. Média \pm erro padrão, n = 5.

| Tratamentos | HgCl_2 10^{-3} M | HgCl_2 10^{-2} M |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 72 horas | 78,45 \pm 2,07 b | 70,66 \pm 2,84 b* |
| 144horas | 89,05 \pm 0,88 a | 93,88 \pm 1,74 a |
| C.V. (%) | 3,29 | 4,96 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste t-Student ($P \leq 0,01$).

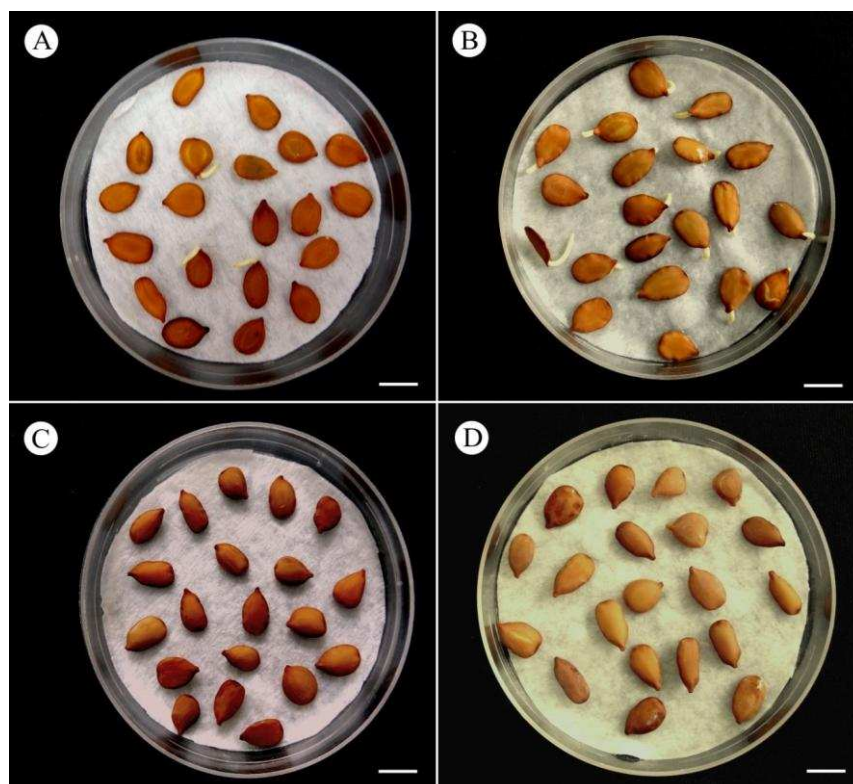


FIGURA 5. Germinação de sementes de *P. reticulata* Benth após 72 horas de embebição em HgCl_2 10^{-3} M (A) e 10^{-2} M (C) e, posteriormente, hidratação em água até 144 horas (B e D respectivamente) (Barras = 1cm).

4.2 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio

Ao se avaliar as curvas de embebição dos embriões, percebe-se o típico padrão trifásico de absorção de água para todos os tratamentos, exceto para os embriões oriundos das sementes hidratadas na solução de HgCl_2 a 10^{-2} M, que não apresentaram germinação e portanto não alcançaram a fase III estabelecida por Bewley e Black (1994) (FIG. 6).

No entanto, é percebido um atraso no ganho de massa nas primeiras seis horas de embebição para todos os embriões das sementes embebidas nas soluções do sal. Embora o ganho de massa dos embriões das sementes tratadas nas soluções de HgCl_2 a 10^{-5} e 10^{-4} M tenha se assemelhado estatisticamente ao ganho de massa do controle, se assemelhou também ao ganho de massa do tratamento 10^{-3} M, indicando um comportamento intermediário (FIG. 6 e Tabela 2).

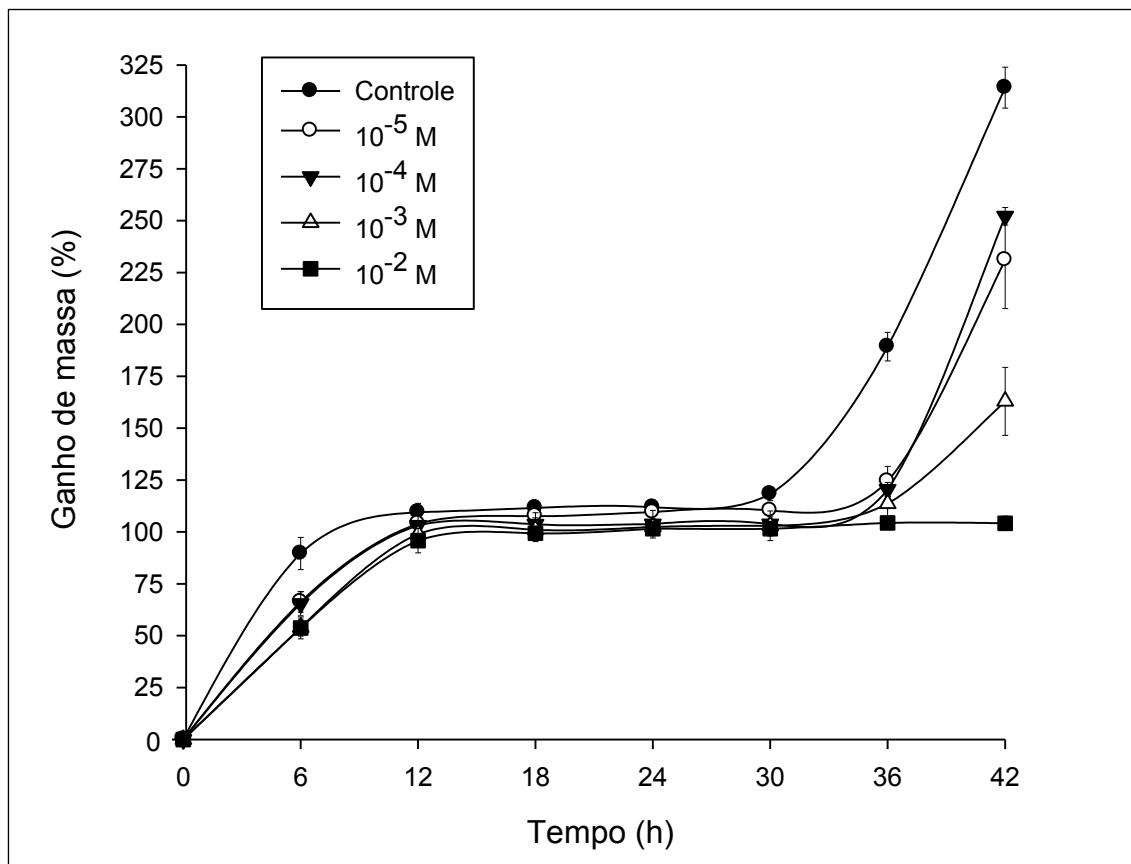


FIGURA 6. Ganho de massa (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth. embebidas em água (controle) e em soluções de HgCl_2 de diferentes concentrações ao longo de 42 horas. Média \pm erro padrão, $n = 5$.

Os embriões oriundos de sementes embebidas nas soluções de concentrações 10^{-3} e 10^{-2} M apresentaram redução estatisticamente significativa no ganho de massa em relação ao controle nas primeiras 6 horas de embebição (FIG 6 e Tabela 2).

No tempo de 12 horas, percebe-se o final da fase I da embebição e o início da fase lag (fase II) para todos os tratamentos, sendo que já neste ponto o ganho de massa foi estatisticamente semelhante entre eles. A semelhança estatística entre o ganho de massa dos diferentes tratamentos permaneceu até o final na segunda fase de embebição (30 horas) (FIG 6 e Tabela 2).

TABELA 2. Comparação das médias (n = 5) referentes ao ganho de massa (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth embebidas em água (controle) e em soluções de $HgCl_2$ de diferentes concentrações ao longo de 42 horas.

| Tratamentos | 6 h | 12 h | 18 h | 24 h | 30 h | 36 h | 42 h |
|-------------|-------|-------|------|------|------|------|-------|
| Controle | a | a | a | a | a | a | a |
| 10^{-5} M | ab | a | a | a | a | b | ab |
| 10^{-4} M | ab | a | a | a | a | b | bc |
| 10^{-3} M | b | a | a | a | a | b | cd |
| 10^{-2} M | b | a | a | a | a | b | d |
| CV (%) | 19,36 | 12,05 | 8,98 | 9,55 | 8,58 | 9,70 | 14,44 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$).

Com 36 horas, iniciou-se a protrusão da raiz primária das sementes hidratadas em água, indicando o começo da fase III da germinação. As sementes dos demais tratamentos (exceto sementes hidratadas em $HgCl_2$ a 10^{-2} M) retomaram o ganho de massa no mesmo tempo, ainda que com um aumento menos acentuado, que foi significativamente diferente do ganho de massa do controle. A diferença permaneceu até o último tempo avaliado, ou seja, 42 horas (FIG. 6 e Tabela 2).

Os embriões oriundos das sementes hidratadas em $HgCl_2$ a 10^{-2} M não chegaram a alcançar a fase III pois as sementes deste tratamento não apresentaram germinação.

4.3 Germinação de sementes embebidas em soluções de ditiotreitol

Sementes embebidas em soluções de DTT não apresentaram diferenças significativas no padrão de germinação quando comparadas com o controle. Entretanto a embebição das sementes na solução mais concentrada (DTT 10^{-2} M) afetou de forma acentuada sua germinação (FIG. 7).

Após 72 horas, a germinação das sementes hidratadas nas soluções de DTT a 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M foi estatisticamente semelhante a germinação encontrada para as sementes hidratadas em água, enquanto a germinação das sementes hidratadas na solução de DTT a 10^{-2} M tenha sido afetada, sofrendo redução significativa em relação ao controle. A velocidade de germinação das sementes hidratadas nas soluções de DTT de diferentes concentrações não foi alterada significativamente em relação à velocidade de germinação do controle (FIG. 7).

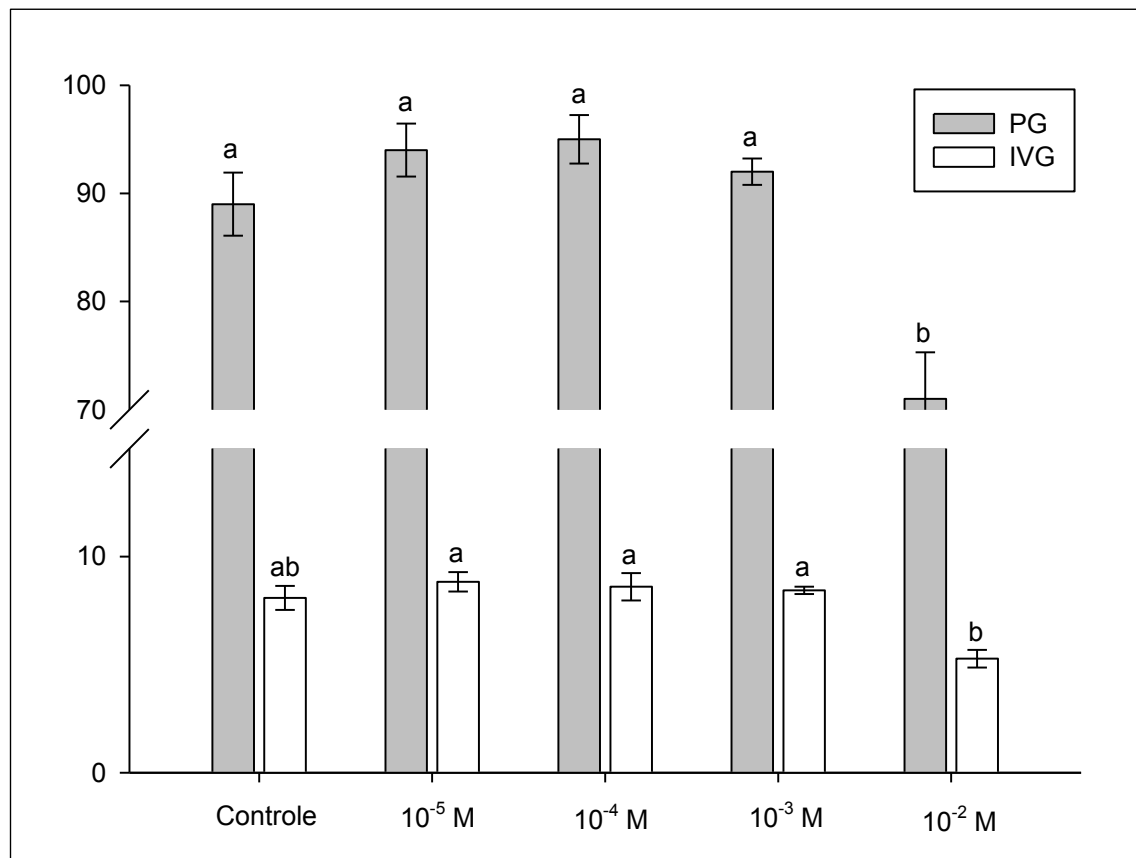


FIGURA 7. Porcentagem de germinação (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *P. reticulata* Benth. após 72 horas de

embebição em água e soluções de DTT. Letras iguais, na variável, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$). Média \pm erro padrão, $n = 5$.

4.4 Germinação de sementes hidratadas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól

Já foi mostrado que as sementes hidratadas na solução de HgCl_2 a 10^{-3} M tiveram sua germinação afetada (FIG. 1 e 2), porém quando embebidas em solução de HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M, as mesmas tiveram seu padrão de germinação restabelecido, se assemelhando do controle (FIG. 8).

As sementes embebidas na solução de HgCl_2 a 10^{-2} M + DTT 10^{-3} M continuaram tendo sua germinação inibida, não apresentando protrusão radicular durante o período avaliado e demonstrando que a solução de DTT a 10^{-3} M associada à solução de HgCl_2 10^{-2} M não foi capaz de restabelecer o processo germinativo das sementes expostas a este tratamento (FIG. 8).

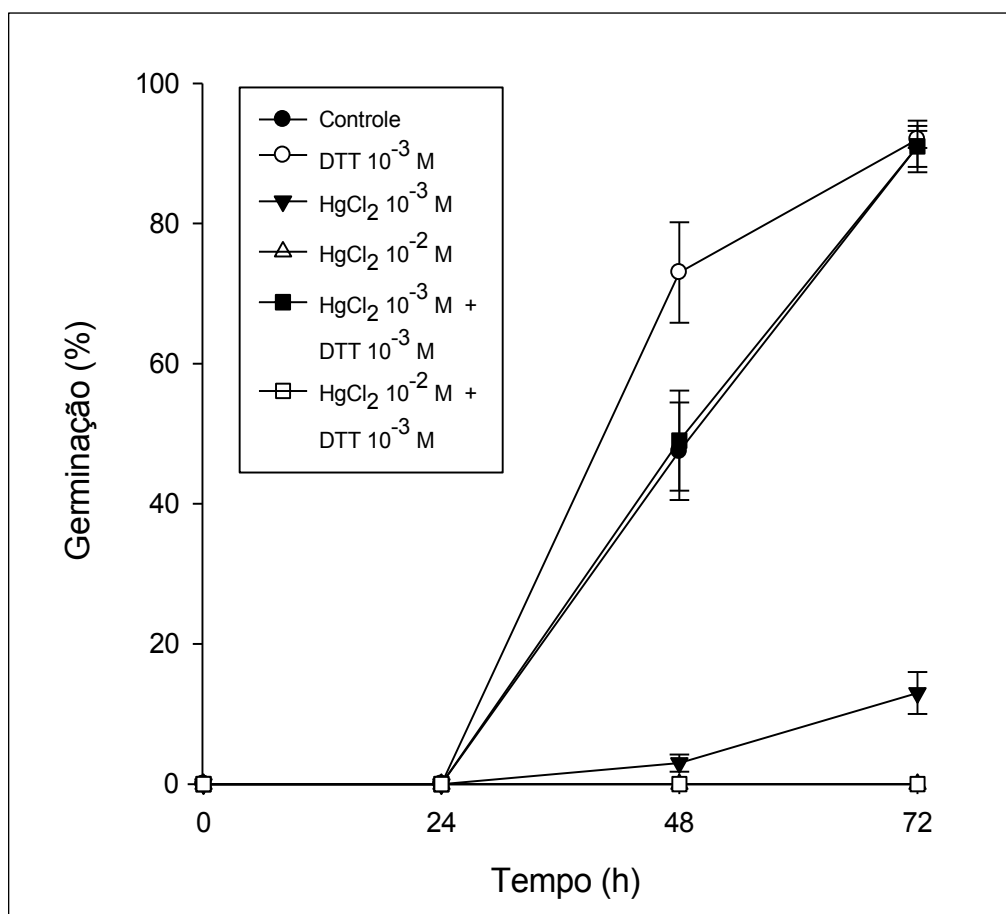


FIGURA 8. Germinação (%), obtidas nos tempos 24, 48 e 72 horas, de sementes de *P. reticulata* Benth. embebidas em água e em soluções de HgCl_2 , DTT e HgCl_2 + DTT. Média \pm erro padrão, $n = 5$.

Ao final de 72 horas, a porcentagem e velocidade de germinação das sementes hidratadas nas soluções de DTT 10^{-3} M e HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M foi estatisticamente semelhante à das sementes hidratadas em água (FIG. 9 e 10).

Da mesma forma, o teor de água dos embriões oriundos das sementes hidratadas nestas soluções não diferiu dos embriões das sementes hidratadas em água (FIG. 9 e 10).

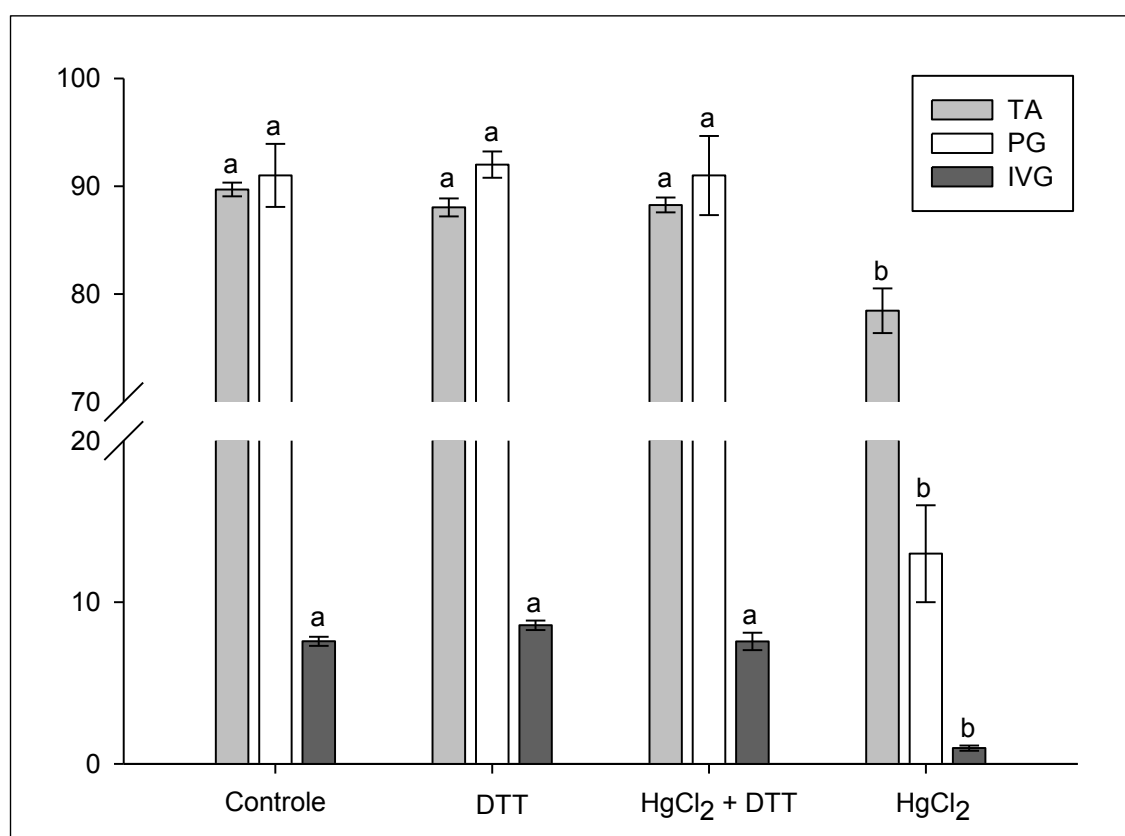


FIGURA 9. Teor de água (TA - %) de embriões, porcentagem de germinação (PG - %) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *P. reticulata* Benth após 72 horas de embebição em água e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl_2 10^{-3} M. Letras iguais, na variável, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$). Média \pm erro padrão, $n = 5$.

Já, as sementes que foram expostas ao HgCl_2 a 10^{-3} M apresentaram menor porcentagem de germinação, menor velocidade de germinação e menor teor de água nos embriões quando comparado com o controle (FIG. 9 e 10).

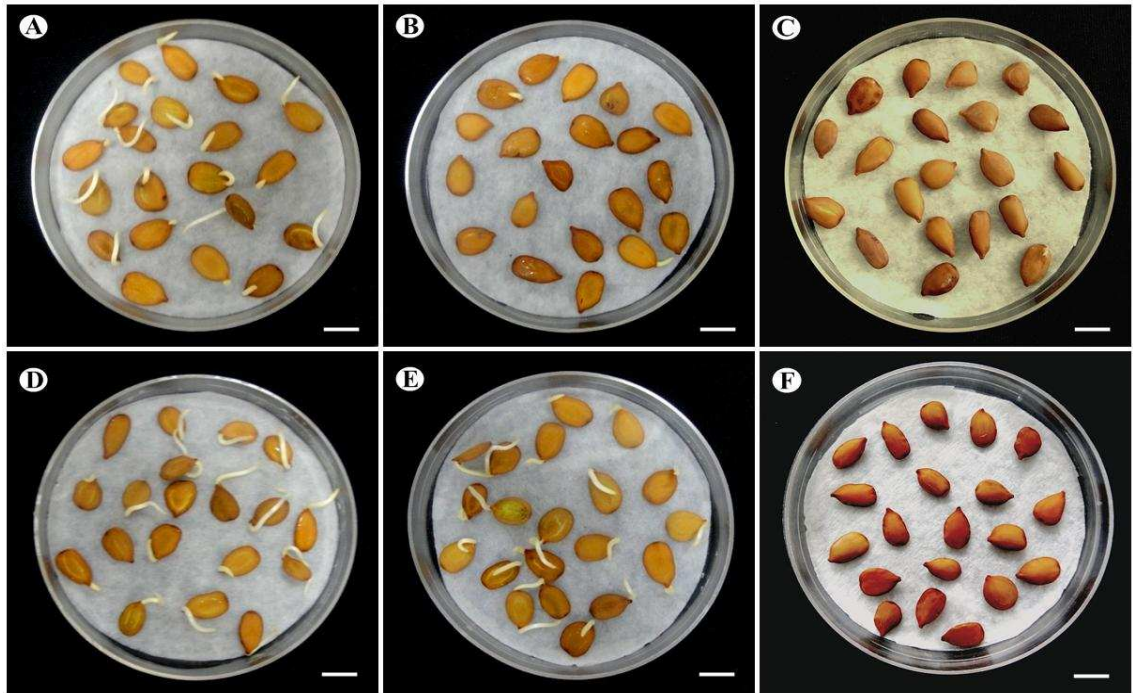


FIGURA 10. Germinação de sementes de *P. reticulata* Benth. após 72 horas de embebição em água (A) e nas soluções: HgCl_2 10^{-3} M (B), HgCl_2 10^{-2} M (C), DTT 10^{-3} M (D), HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M (E) e HgCl_2 10^{-2} M + DTT 10^{-3} M (F) (Barras = 1cm).

4.5 Curvas de hidratação de embriões oriundos de sementes embebidas em soluções de cloreto de mercúrio e cloreto de mercúrio associado ao ditiotreitól

Como anteriormente mostrado, a embebição em solução de HgCl_2 a 10^{-3} M provocou atraso nas primeiras seis horas no ganho de massa dos embriões oriundos das sementes expostas a tal tratamento (FIG. 6). Quando as sementes foram hidratadas na solução HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT a 10^{-3} M houve recuperação no ganho de massa dos embriões, que foi considerado semelhante ao controle (FIG. 11 e Tabela 3).

Ao final da fase I da embebição (12 horas), o ganho de massa dos embriões dos tratamentos HgCl_2 a 10^{-3} M e HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT a 10^{-3} M foi estatisticamente semelhante ao controle e permaneceu assim até o final da fase II (30 horas) (FIG. 11 e Tabela 3).

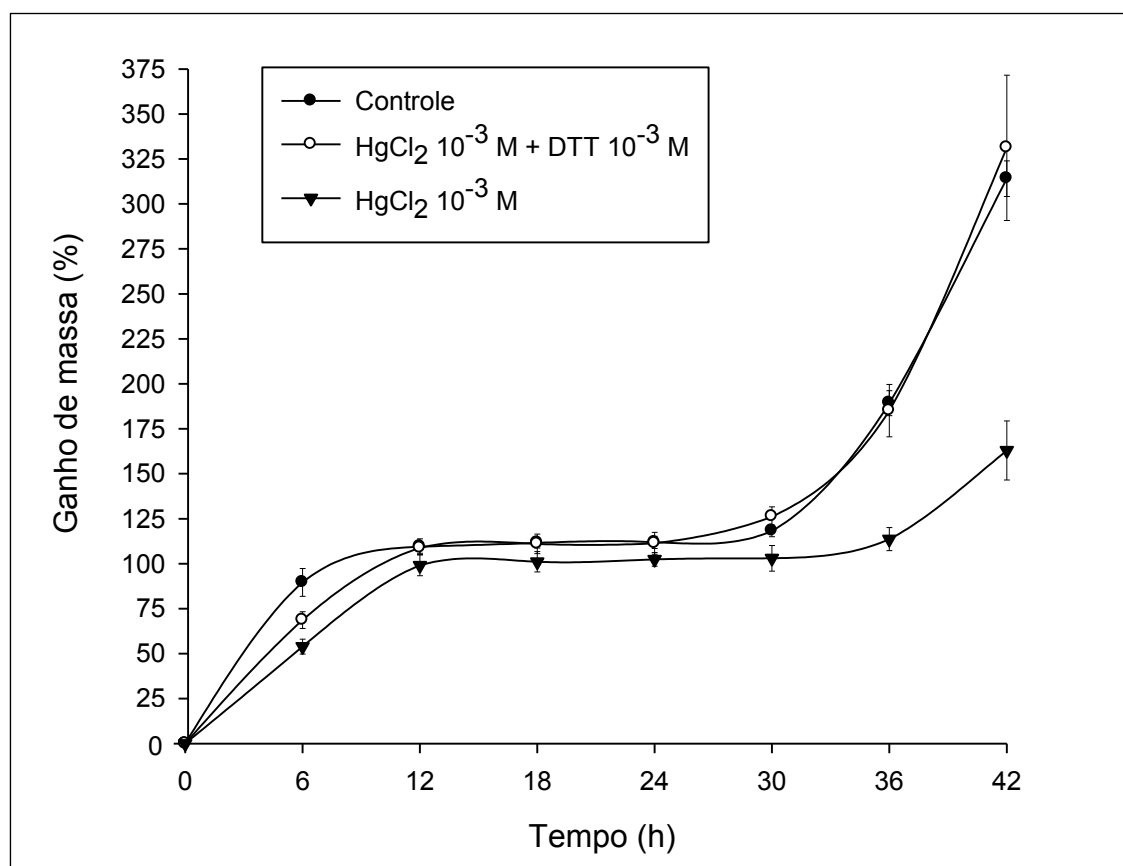


FIGURA 11. Ganho de massa (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth. embebidas em água (controle) e nas soluções: HgCl₂ 10⁻³ M e HgCl₂ 10⁻³ M + DTT 10⁻³ M ao longo de 42 horas. Média ± erro padrão, n = 5.

TABELA 3. Comparação das médias (n = 5) referentes ao ganho de massa (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth embebidas em água (controle) e nas soluções: HgCl₂ 10⁻³ M e HgCl₂ 10⁻³ M + DTT 10⁻³ M ao longo de 42 horas.

| Tratamentos | 6 h | 12 h | 18 h | 24 h | 30 h | 36 h | 42 h |
|-------------------------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Controle | a | a | a | a | a | a | a |
| HgCl ₂ + DTT | ab | a | a | a | a | a | a |
| HgCl ₂ | b | a | a | a | a | b | b |
| CV (%) | 18,12 | 9,49 | 10,4 | 9,74 | 10,63 | 13,74 | 19,11 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$).

Para os três tratamentos, o início da fase III ocorreu às 36 horas e coincidiu com o aumento no ganho de massa dos embriões, embora mais acentuado para os embriões oriundos das sementes embebidas em água e

HgCl₂ a 10⁻³ M + DTT a 10⁻³ M do que para embriões oriundos de sementes embebidas em HgCl₂ a 10⁻³ M (FIG. 11 e TABELA 3).

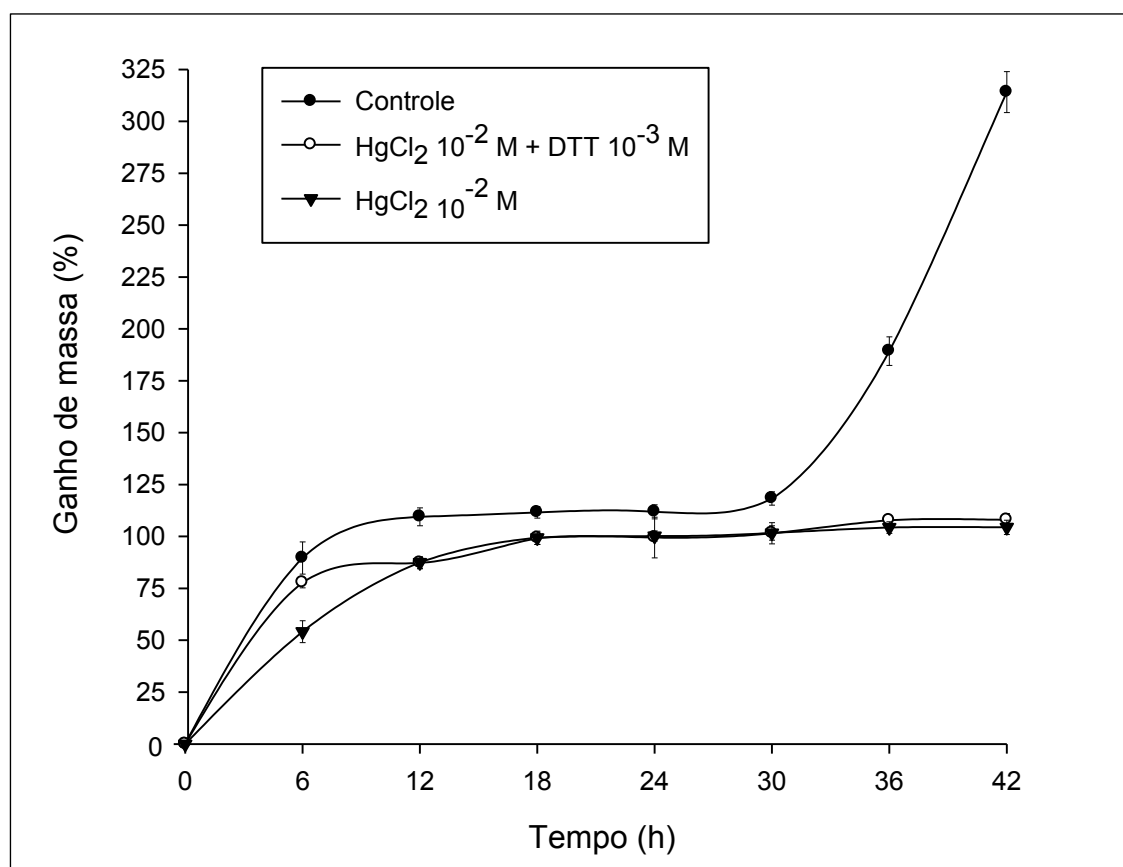


FIGURA 12. Ganho de massa (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth. embebidas em água (controle) e nas soluções: HgCl₂ 10⁻² M e HgCl₂ 10⁻² M + DTT 10⁻³ M ao longo de 42 horas. Média ± erro padrão, n = 5.

TABELA 4. Comparação das médias (n = 5) referentes ao ganho de massa (%) de embriões oriundos de sementes de *P. reticulata* Benth embebidas em água (controle) e nas soluções: HgCl₂ 10⁻² M e HgCl₂ 10⁻² M + DTT 10⁻³ M ao longo de 42 horas.

| Tratamentos | 6 h | 12 h | 18 h | 24 h | 30 h | 36 h | 42 h |
|-------------------------|-------|------|------|-------|------|------|------|
| Controle | a | a | a | a | a | a | a |
| HgCl ₂ + DTT | ab | b | a | a | a | b | b |
| HgCl ₂ | b | b | a | a | a | b | b |
| CV (%) | 16,89 | 7,92 | 5,39 | 13,28 | 8,40 | 7,43 | 7,71 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$).

O ganho de massa dos embriões oriundos das sementes embebidas em soluções de HgCl₂ a 10⁻² M e HgCl₂ a 10⁻² M + DTT a 10⁻³ M foi estatisticamente afetado durante as primeiras 12 horas. Enquanto os embriões do controle

atingiram a fase II da embebição após 12 horas de embebição, os embriões dos demais tratamentos apresentaram um atraso na embebição, atingindo a fase II apenas após 18 horas (FIG. 12 e Tabela 4).

Como as sementes hidratadas nas soluções de HgCl_2 a 10^{-2} M e HgCl_2 a 10^{-2} M + DTT a 10^{-3} M não apresentaram germinação, os embriões oriundos destes tratamentos não atingiram a fase III como ocorreu com os embriões do controle após 36 horas, assim observou-se diferença estatística entre os tratamentos nos dois últimos tempos de embebição (FIG. 12 e Tabela 4).

4.6 Atividade das principais enzimas do sistema antioxidante

Durante as primeiras 24 horas de embebição, houve aumento na atividade da SOD para todos os tratamentos, porém nos embriões oriundos de sementes embebidas em água e em DTT a 10^{-3} M o incremento na atividade da enzima foi estatisticamente superior aos demais tratamentos (FIG. 13 e Tabela 5).

Nas demais 24 horas de embebição, ocorreu uma estabilização na atividade da SOD para os embriões das sementes hidratadas em água, enquanto a atividade da enzima continuou crescendo nos embriões dos demais tratamentos. Maior atividade foi encontrada nos embriões das sementes hidratadas em HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT a 10^{-3} M (FIG. 13 e Tabela 5).

TABELA 5. Comparação das médias ($n = 5$) referentes à atividade da enzima SOD ($\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em embriões de *P. reticulata* Benth, 24 e 48 horas após embebição das sementes em água (controle) e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl_2 10^{-3} M. Média \pm erro padrão, $n = 5$.

| Tratamentos | 24 horas | 48 horas |
|-----------------------|----------|----------|
| Controle | a | b |
| DTT | ab | b |
| HgCl_2 + DTT | b | a |
| HgCl_2 | b | b |
| C.V. (%) | 20,98 | 37,53 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$).

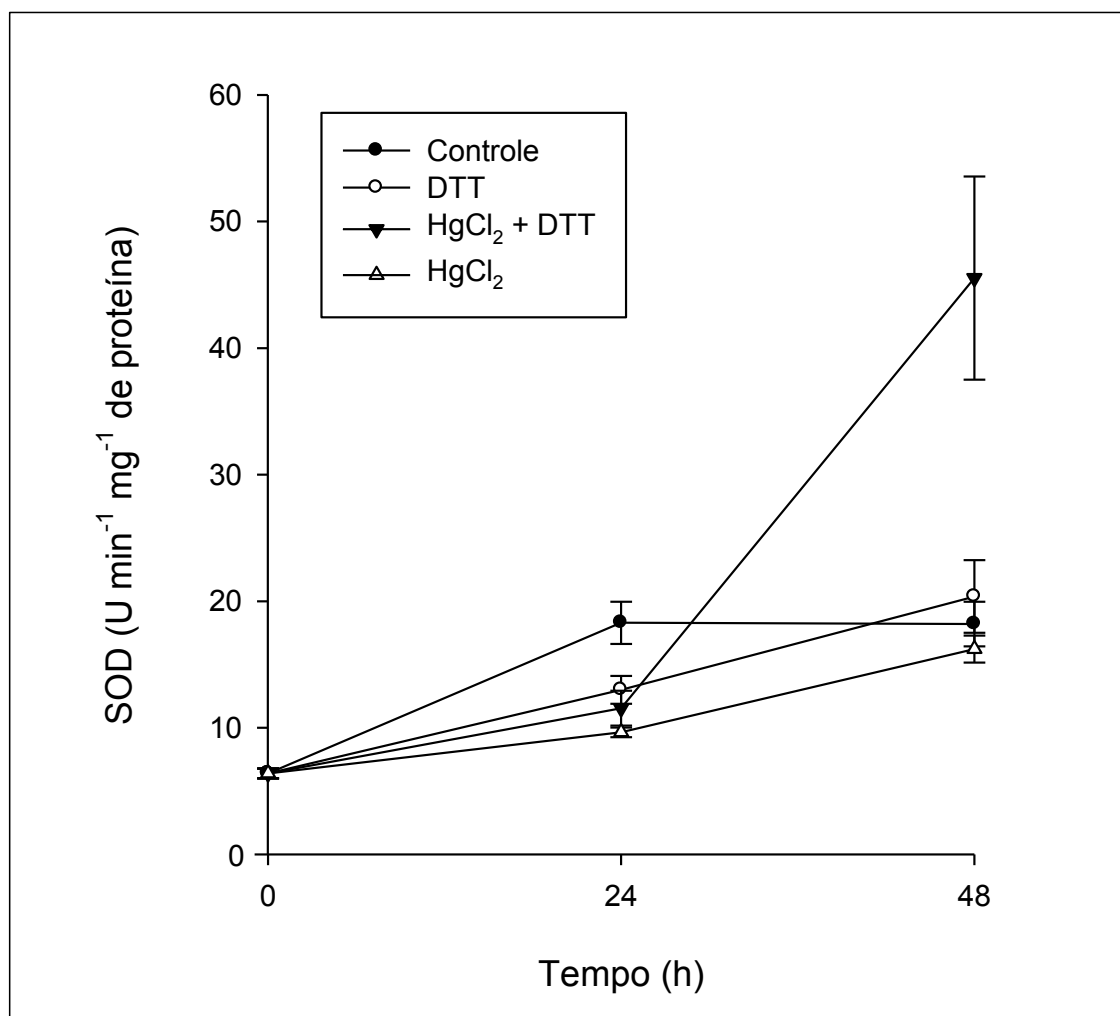


FIGURA 13. Atividade da enzima SOD ($\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em embriões de *P. reticulata* Benth, 24 e 48 horas após embebição das sementes em água (controle) e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl_2 10^{-3} M. Média \pm erro padrão, $n = 5$.

A atividade da enzima catalase também sofreu um incremento nas primeiras 24 horas de embebição nos embriões das sementes de todos os tratamentos, sem haver diferença estatística entre eles (FIG. 14 e Tabela 6).

Ao final de 48 horas de embebição, a atividade da catalase sofreu um aumento considerável nos embriões oriundos das sementes hidratadas em DTT 10^{-3} M e em HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M. Enquanto isso, para os embriões dos demais tratamentos (controle e HgCl_2 10^{-3} M), o aumento na atividade da CAT foi mais discreto, o que proporcionou diferença estatística entre os dois grupos, ou seja, os tratamentos controle e DTT foram significativamente superiores aos tratamentos com HgCl_2 (FIG. 14 e Tabela 6).

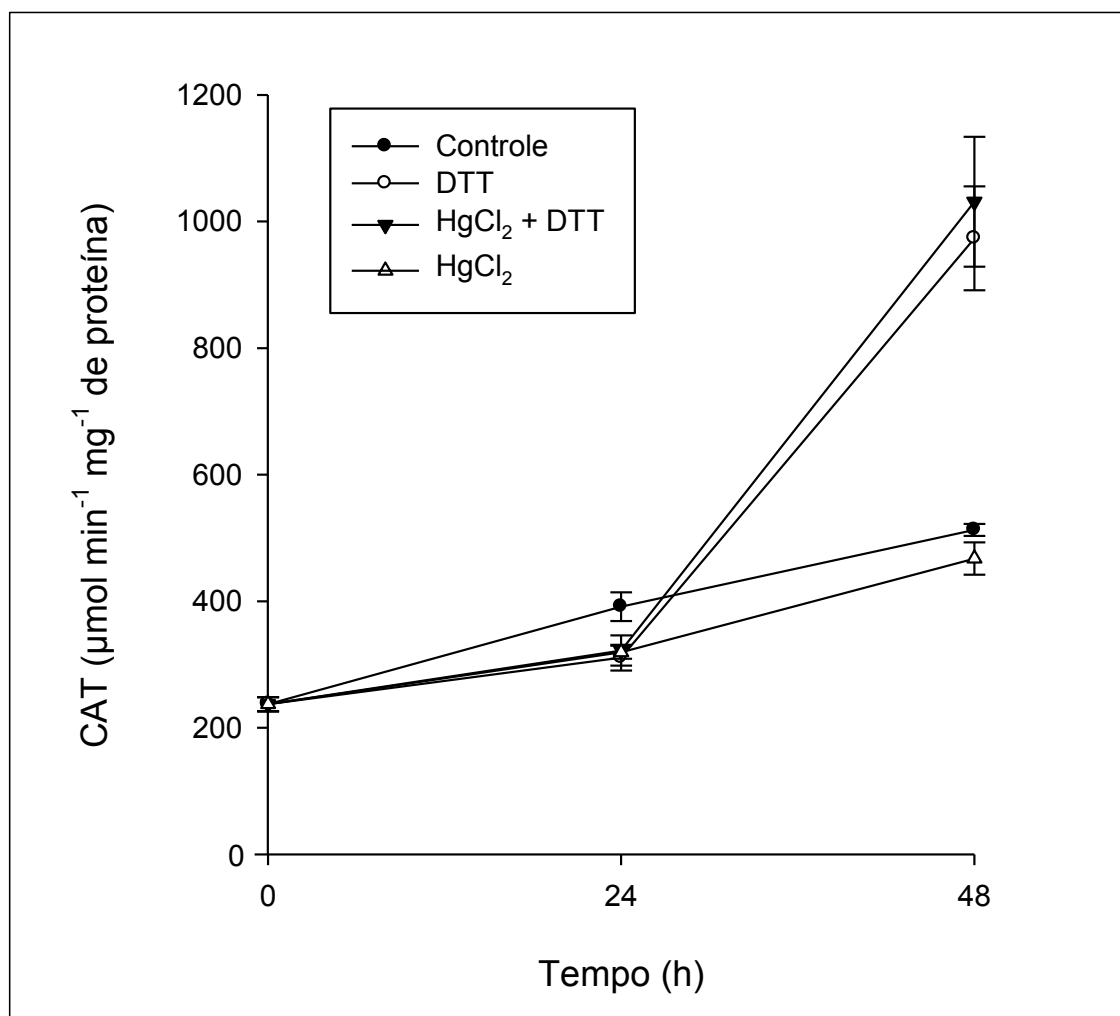


FIGURA 14. Atividade da enzima CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em embriões de *P. reticulata* Benth, 24 e 48 horas após embebição das sementes em água (controle) e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl₂ 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl₂ 10^{-3} M. Média \pm erro padrão, n = 5.

TABELA 6. Comparação das médias (n = 5) referentes à atividade da enzima CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em embriões de *P. reticulata* Benth, 24 e 48 horas após embebição das sementes em água (controle) e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl₂ 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl₂ 10^{-3} M. Média \pm erro padrão, n = 5.

| Tratamentos | 24 horas | 48 horas |
|-------------------------|----------|----------|
| Controle | a | b |
| DTT | a | a |
| HgCl ₂ + DTT | a | a |
| HgCl ₂ | a | b |
| C.V. (%) | 13,22 | 20,13 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$).

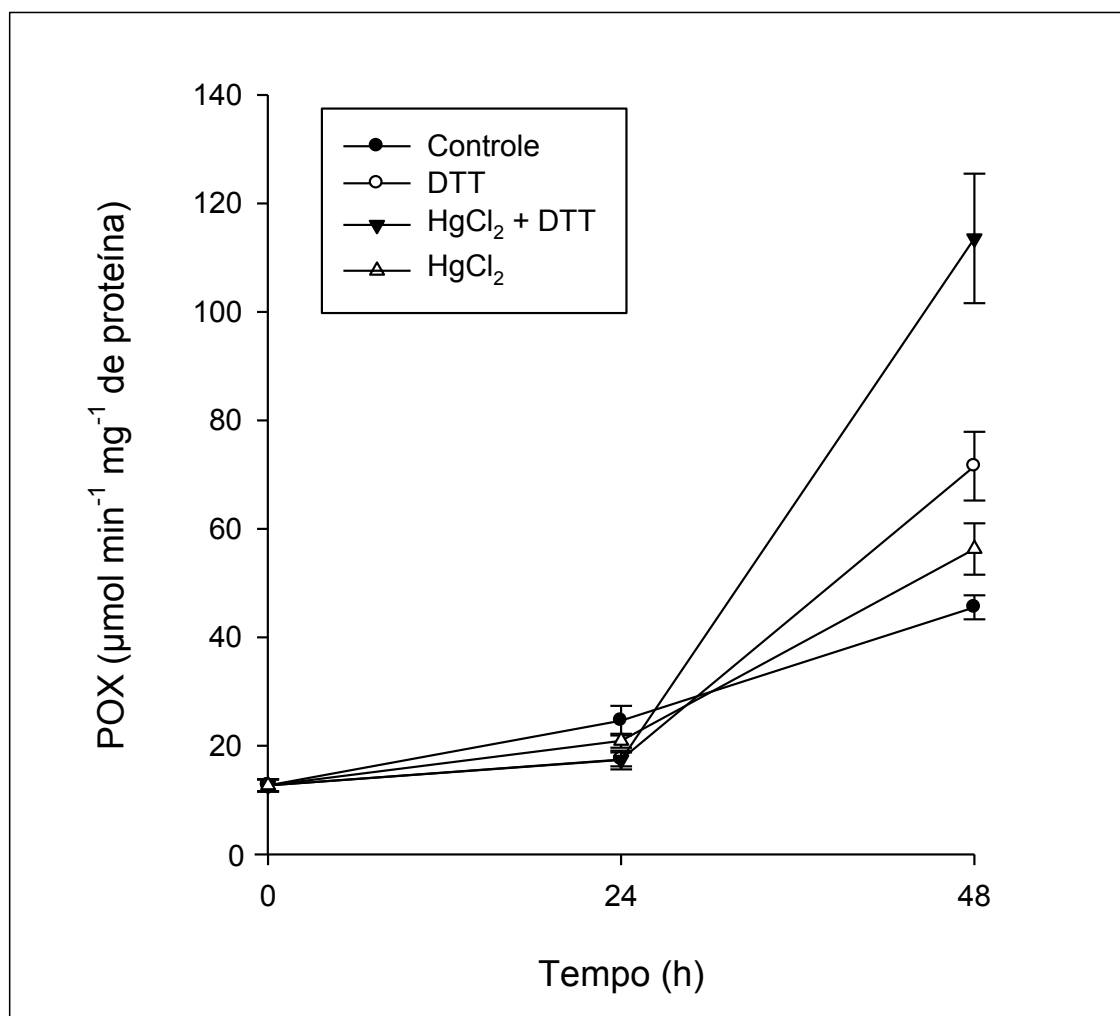


FIGURA 15. Atividade da enzima POX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em embriões de *P. reticulata* Benth, 24 e 48 horas após embebição das sementes em água (controle) e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl₂ 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl₂ 10^{-3} M. Média \pm erro padrão, n = 5.

TABELA 7. Comparação das médias (n = 5) referentes à atividade da enzima POX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em embriões de *P. reticulata* Benth, 24 e 48 horas após embebição das sementes em água (controle) e nas soluções: DTT 10^{-3} M, HgCl₂ 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M e HgCl₂ 10^{-3} M. Média \pm erro padrão, n = 5.

| Tratamentos | 24 horas | 48 horas |
|-------------------------|----------|----------|
| Controle | a | b |
| DTT | a | b |
| HgCl ₂ + DTT | a | a |
| HgCl ₂ | a | b |
| C.V. (%) | 20,63 | 22,54 |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,01$).

A atividade das peroxidases totais sofreu um incremento nas primeiras 24 horas para os embriões de todos os tratamentos, assim como observado para as demais enzimas (FIG. 15 e Tabela 7).

No final das 48 horas, a atividade da POX aumentou consideravelmente nos embriões oriundos das sementes de todos os tratamentos, porém um incremento mais acentuado foi encontrado nos embriões das sementes tratadas em HgCl_2 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M, com diferença estatística significativa em relação aos demais tratamentos (FIG. 15 e Tabela 7).

5. DISCUSSÃO

O mercúrio em altas concentrações inibe a germinação e o reduz índice de velocidade de germinação de sementes de vinhático. O mercúrio é um metal pesado que, como todos os outros, promove estresse oxidativo e causa danos a componentes celulares (Willigen et al., 2006) e, portanto, quando aplicado na maior concentração (10^{-2} M) foi capaz de causar a morte das sementes, inibindo por completo os eventos metabólicos que levam a protrusão da radícula primária.

A embebição das sementes em HgCl_2 a 10^{-3} M não promoveu a morte das sementes, porém afetou drasticamente sua PG e IVG. Em sementes de tomate (Solanaceae) concentrações menores de cloreto de mercúrio aplicado nas sementes já foram capazes de reduzir a porcentagem final de germinação (Jain et al., 2008). Estudos com sementes de *Arabidopsis* (Brassicaceae) também mostraram que a embebição das sementes em soluções de HgCl_2 é capaz de reduzir a velocidade de germinação, induzindo a um atraso na ruptura da testa e na emergência radicular (Willigen et al., 2006).

Trabalhos com espécies cultivadas de diferentes famílias como, por exemplo, feijão mungo (Fabaceae) (Jagatheeswari e Ranganathan, 2012), amendoim (Fabaceae) (Pugalvendhan et al., 2009) e linhaça (Linaceae) (Jain, 2013), além de espécies florestais como pinheiros (*Pinus taeda* e *Pinus echinata*) (Pinaceae) e Plátano (*Platanus occidentalis*) (Platanaceae) (Jean-Philippe et al., 2012) também demonstraram a redução na germinação quando aplicados compostos com mercúrio.

A solução de cloreto de mercúrio na concentração de 10^{-5} M foi considerada tóxica às sementes de tomate (Solanaceae) (Jain et al., 2008),

porém a mesma concentração não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros avaliados neste trabalho com sementes de vinhático. Tal fato mostra a variação na tolerância das sementes de diferentes espécies frente ao metal.

Além de ser considerado um agente tóxico potente, o mercúrio é apontado como inibidor da atividade da aquaporina. Uma vez absorvido pelo tecido, o mercúrio interage rapidamente com grupos tióis dos resíduos de cisteína, oxidando-os e bloqueando reversivelmente a atividade destas proteínas (Aroca et al., 2012). Dessa forma, é possível explicar a redução no teor de água dos embriões oriundos das sementes hidratadas na solução do sal na concentração de 10^{-3} M.

Pode-se, então, afirmar que a redução na PG e no IVG de sementes hidratadas em cloreto de mercúrio a 10^{-3} M pode ser sido causada pelo efeito tóxico do metal ou pela redução no teor de água dos embriões, devido a menor atividade das aquaporinas.

Quando as sementes, previamente hidratadas em HgCl_2 a 10^{-3} M foram transferidas para a água, rapidamente exibiram germinação, além de apresentarem aumento significativo no teor de água dos embriões. É provável que o próprio aumento da umidade tenha permitido o incremento na germinação e que os danos que podem ter sido causados pelo metal nas sementes não tenham alterado de forma irreversível a integridade celular, favorecendo a germinação assim que as sementes foram expostas à água. Já o aumento na umidade dos embriões pode ser explicado pela entrada de água por meio da bicamada lipídica ou pela síntese de novas aquaporinas que, na ausência do metal, exibiram uma atividade normal.

Avaliando-se a curva de hidratação dos embriões, verifica-se que os embriões oriundos de sementes tratadas com soluções de HgCl_2 apresentaram um atraso na embebição durante as primeiras seis horas. Soluções mais diluídas do sal permitiram embebição dos embriões semelhante à de embriões oriundos de sementes hidratadas em água, já soluções mais concentradas inibiram parcialmente o processo de embebição dos embriões em comparação com embriões do controle.

Assim, é possível afirmar que, em sementes de vinhático, a fase I da embebição foi afetada pela presença do sal. Para sementes de *Arabdopsis*, foi demonstrado que as aquaporinas não possuem efeito sobre a primeira fase da embebição (Willigen et al., 2006), porém para sementes de ervilha (*Fabaceae*),

Veselova et al. (2003) propôs que as aquaporinas teriam importância durante as fases iniciais da embebição.

A explicação para tal fato foi baseada no tamanho da semente. Sementes de ervilha, por serem maiores, teriam uma fase I mais longa em relação a sementes de *Arabidopsis*, o que necessitaria de uma via de absorção de água mais eficiente (Willigen et al., 2006).

Sementes de vinhático também possuem um tamanho bastante superior às sementes de *Arabidopsis* e, portanto, é plausível que sigam o comportamento encontrado para as sementes de ervilha.

No início da fase III (36 horas de embebição) o ganho de massa dos embriões do controle foi superior em relação aos embriões dos demais tratamentos. O atraso na germinação das sementes hidratadas em soluções de HgCl_2 parece ter sido responsável pela redução na massa fresca dos embriões. A emissão de radículas menos desenvolvidas também pode explicar a diferença estatística no ganho de massa nos dois últimos tempos da curva de hidratação, uma vez que estudos mostram que o mercúrio afeta, não somente, a germinação, mas o crescimento e desenvolvimento de plântulas de diferentes espécies (Munzuroglu e Geckil, 2002).

A utilização do DTT na reversão da inibição da embebição pelo cloreto de mercúrio é bastante difundida (Willigen et al., 2006; Jain et al., 2008), porém quando aplicado em altas concentrações pode acarretar danos à semente, uma vez que se caracteriza como um agente tóxico. Dessa forma, quando o DTT foi aplicado na maior concentração (10^{-2} M) houve prejuízo à porcentagem e velocidade de germinação das sementes de vinhático. Assim, o teste de germinação de sementes com DTT foi utilizado no intuito de encontrar a maior concentração da substância incapaz de alterar o padrão de germinação da espécie, assim como realizado por outros trabalhos que utilizam o DTT para esta finalidade (Jain et al., 2008). A mesma concentração foi utilizada para verificar o efeito de reversão dos danos, quando utilizada em associação ao HgCl_2 .

Quando o DTT foi aplicado em associação ao HgCl_2 , a PG e o IVG foram semelhantes aos valores encontrados para as sementes do controle, o que também foi observado para o teor de água dos embriões. É provável que o DTT na concentração de 10^{-3} M tenha sido suficiente para reduzir os grupos tióis dos resíduos de cisteína das aquaporinas, permitindo que estas proteínas

mantivessem sua funcionalidade, hidratando o embrião e permitindo a germinação. Resultados semelhantes foram observados por outros trabalhos para diferentes espécies (Willigen et al., 2006; Jain et al., 2008).

O movimento de água nos tecidos ocorre por três rotas: a rota apoplástica que abrange os trajetos por meio dos poros da parede celular e dos espaços intercelulares, a rota simplástica que consiste no movimento de água no citoplasma celular e entre células por meio dos plasmodesmas e, por fim, a rota transmembrana que envolve o movimento de água através da plasmalema e tonoplasto (Steudle and Peterson, 1998). O movimento transmembrana acontece por dois mecanismos de transporte: difusão de moléculas de água por meio da bicamada lipídica e por intermédio das aquaporinas (Taiz e Zeiger, 2006), sendo ambos os movimentos governados por gradiente de potencial osmótico (Aroca et al., 2012).

Pela curva de embebição na presença de HgCl_2 a 10^{-3} M e HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M, observa-se uma confirmação do possível efeito do DTT na reversão da funcionalidade das aquaporinas. Quando aplicado em associação com o cloreto de mercúrio, ainda que com um menor potencial osmótico da solução, a hidratação do embrião foi maior. Isto indica que a redução na embebição pelos embriões ao se utilizar o HgCl_2 não é devido a um efeito puramente físico (devido à redução no gradiente de potencial osmótico), mas que as aquaporinas parecem ter um papel importante nas fases iniciais da embebição das sementes de vinhático e que a utilização do mercúrio atua no sentido de atrasar esta hidratação. Da mesma forma, a presença do DTT permite que na fase III, a embebição do embrião seja semelhante ao controle, permitindo a germinação.

Quando o DTT foi associado ao HgCl_2 a 10^{-2} M, não houve retomada da germinação, o que indica que o DTT é capaz de reverter os danos referentes à hidratação, mas não referentes à toxicidade promovida pelo mercúrio. Os dados da curva de embebição na presença de HgCl_2 a 10^{-2} M e HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT 10^{-3} M mostram que nas primeiras horas da embebição, o DTT é capaz de permitir uma hidratação semelhante ao controle. Porém, essa eficiência cai antes das 12 horas iniciais, muito provavelmente devido à morte das sementes já nesse tempo, o que explicaria uma queda na redução da absorção de água, que seria governada então apenas por processos físicos e não mais fisiológicos, como é o caso das aquaporinas.

Uma segunda hipótese para a redução na germinação de sementes quando aplicado o cloreto de mercúrio, seria o efeito tóxico do metal, promovendo estresse oxidativo nas sementes. Assim, a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante foi avaliada nas primeiras 48 horas da embebição das sementes.

Com a retomada do metabolismo durante a germinação é comum que ocorra aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante, uma vez que a produção de EROs é um evento inerente à atividade metabólica (Bailly et al., 2008; Kranner et al., 2010).

Durante as primeiras 24 horas, não houve diferença na atividade das enzimas dos embriões dos diferentes tratamentos em relação ao controle, porém, ao final das 48 horas já foi possível perceber um aumento na atividade das mesmas para o tratamento HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT a 10^{-3} M em relação aos demais tratamentos.

A atividade das três enzimas nos embriões tratados em água e em HgCl_2 a 10^{-3} M foi semelhante durante as 48 horas de avaliação, permitindo inferir que a concentração do sal utilizada não foi capaz de promover estresse oxidativo nos embriões das sementes expostas à este tratamento. Assim, pode-se afirmar que as alterações na germinação causadas pela aplicação do sal não se deram pelo efeito tóxico do metal, mas provavelmente devido à interferência no processo de embebição durante a germinação.

A utilização do cloreto de mercúrio como ferramenta para se avaliar a atividade das aquaporinas em diferentes tecidos vegetais tem sido criticada, sendo apontados os efeitos tóxicos inespecíficos do metal como um fator que dificulta a determinação no papel destas proteínas (Gaspar, 2011). Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se defender a utilização de baixas concentrações do sal nas quais o transporte de água é afetado, sem que as mesmas estimulem a produção de EROs, verificada indiretamente através da atividade das enzimas.

A concentração utilizada do DTT, que é considerado tóxico, também não promoveu alterações significativas na atividade das enzimas SOD e POX em relação ao controle para os tempos avaliados, porém promoveu aumento na atividade na CAT no final do segundo dia, indicando um possível incremento na produção de peróxido do hidrogênio após as 24 horas iniciais da embebição.

Quando se aplicou DTT em associação com o cloreto de mercúrio, houve um incremento significativo na atividade das três enzimas no final das 48 horas. Tal fato pode ser explicado devido à toxicidade de ambas as substâncias, que quando aplicadas em conjunto, promoveram um efeito negativo em conjunto na produção de EROs e, conseqüentemente, promovendo aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante.

Ao se avaliar os dados de germinação das sementes hidratadas em DTT e DTT associado do HgCl_2 percebe-se que o possível aumento na produção de EROs nos embriões dessas sementes não foi suficiente para causar alterações na PG e no IVG, o que indica que o sistema antioxidante tenha sido capaz de reverter o estresse oxidativo gerado, permitindo o estabelecimento normal da germinação das sementes expostas à estes tratamentos.

6. CONCLUSÃO

O cloreto de mercúrio altera as fases iniciais da embebição de sementes de *P. reticulata* Benth., promovendo redução na porcentagem e velocidade de germinação e no teor de água dos embriões. Em concentrações mais elevadas (HgCl_2 10^{-2} M), leva à morte os embriões das sementes.

O DTT, quando utilizado em concentrações não elevadas (10^{-3} M), reverte o processo de inibição da embebição de embriões oriundos de sementes tratadas com cloreto de mercúrio.

A embebição de sementes na solução de HgCl_2 a 10^{-3} M não promove alterações na atividade das enzimas SOD, CAT e POX nos embriões. Quando as sementes são embebidas em HgCl_2 a 10^{-3} M + DTT a 10^{-3} M há um efeito sinérgico das substâncias que aumenta a atividade das enzimas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aery NC, Sarkar S (2012) Metal species *vis-à-vis* seed germination and early seedling growth responses in soybean. *J Chem Bio Phy Sci Sec B* **2**: 763-769

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol* **109**: 1247–1257

- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM** (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* **63**: 43-57
- Bailly C** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* **14**: 93-107
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287
- Bewley JD, Black M** (1994) *Seeds: physiology of development and germination*, Ed 2. Plenum Press, New York, pp 445
- Brasil** (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, pp 395
- Carvalho PER** (2008) *Espécies Arbóreas Brasileiras*. Embrapa Florestas, Colombo, pp 627
- Cesar R, Colonese J, Silva M, Egler S, Bidone E, Castilhos Z, Polivanov H** (2011b) Distribuição de mercúrio, cobre, chumbo, zinco e níquel em sedimentos de corrente da bacia do rio Piabanha, estado do Rio de Janeiro. *Geochim Bras* **25**: 35-45
- Cesar R, Egler S, Polivanov H, Castilhos Z, Rodrigues AP** (2011a) Mercury, copper and zinc contamination in soils and fluvial sediments from an abandoned gold mining area in southern Minas Gerais State, Brazil. *Environ Earth Sci* **64**: 211-222
- Chance B, Maehly AC** (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol* **2**: 764-775
- Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ** (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol* **106**: 1325-1333
- Del Longo OT, Gonzáles CA, Pastori GM, Trippi VS** (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* **34**: 1023-1028
- Gaspar M** (2011) Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. *Revista Brasil Bot* **34**: 481-491
- Giannopolitis CN, Reis SK** (1977) Superoxide dismutases. *Plant Physiol* **59**: 309-314
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909-930

Haddoub R, Rützler M, Robin A, Flitsch SL (2009) Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors. *Handb Exp Pharmacol* **190**: 385-402

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* **84**: 450–455

Henzler T, Ye Q, Steudle E (2004) Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant Cell Environ* **27**: 1184-1195

Jagatheeswari D, Ranganathan P (2012) Influence of Mercuric Chloride on Seed Germination, Seedling Growth and Biochemical Analysis of Green Gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek. Var. Vamban-3). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* **3**: 291–295

Jain N, Ascough GD, Staden JV (2008) A smoke-derived butenolide alleviates HgCl₂ and ZnCl₂ inhibition of water uptake during germination and subsequent growth of tomato – Possible involvement of aquaporins. *J Plant Physiol* **165**: 1422–1427

Jain RK (2013) Study of heavy metals effect in response to linum seed germination. *Afr J Plant Sci* **7**: 93–109

Jean-Philippe SR, Labbé N, Damay J, Franklin JA, Hughes K (2012) Effect of Mercuric Compounds on Pine and Sycamore Germination and Early Survival. *Am J Plant Sci* **3**: 150–158

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* **57**: 315–319

Kranner I, Roacha T, Beckett RP, Whitaker C, Minibayeva FV (2010) Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *J Plant Physiol* **167**: 805–811

Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water-specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **12**: 2241–2247

Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 595–624

Müller K, Linkies A, Vreeburg RAM, Fry SC, Krieger-Liszkay A, Leubner-Metzger G (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol* **150**: 1855–1865

Munzuroglu O, Geckil H (2002) Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Arch Environ Contam Toxicol* **43**: 203–213

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

Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD (2010) Germination—Still a mystery. *Plant Sci* **179**: 574–581

Oliveira FA, Tarazi R, Menezes IPP, Den Berg CV, Tsai SM, Gaiotto FA (2012) Microsatellite markers for *Plathymenia reticulata* (Leguminosae). *Am J Bot*: 391–393

Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* **150**: 494–505

Ohriel DM, Paterson MJ, Blanchfield PJ, Bodaly RA, Gilmour CC, Hintelmann H (2008) Temporal changes in the distribution, methylation, and bioaccumulation of newly deposited mercury in an aquatic ecosystem. *Environ Pollut* **154**: 77–88

Ortega-Villasante C, Rella'n-A'lvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernandez LE (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* **56**: 2239–2251

Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, Campbell BT (2010) Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol* **10**: 142

Parmar G, Chanda V (2005) Effects of mercury and chromium on peroxidase and IAA oxidase enzymes in the seedlings of *Phaseolus vulgaris*. *Turk J Biol* **29**: 15–21

Peixoto PHPI, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira PA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* **11**: 137–143

Pugalvendhan R, Sharavanan PS, Prabakaran G (2009) Studies on the effect of mercury on germination and biochemical changes of ground nut [*Arachis hypogaea* (L). var. vri- 1] seedlings. *Rec Res Sci Tech* **1**: 207–2010

Reetha S, Bakiyaraj R, Thamizhiniyan P, Bhuvanewari G (2012) Effect of cadmium nitrate and mercuric chloride on germination, growth and biochemical constituents of onion seedlings (*Allium cepa* L.). *Int J Res Biol Sci* **2**: 182–186

Schopfer P, Plachy C, Frahry G (2001) Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* **125**: 1591–1602

Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* **20**: 289–297

Steudle E, Peterson CA (1998) How does water get through roots? *J Exp Bot* **49**: 775–788.

Taiz L, Zeiger E (2006) Transporte e translocação de água e solutos. In Taiz L, Zeiger E, *Fisiologia vegetal*, Ed 3. Artmed, Porto Alegre, pp 59–136

Tinoco AAP, Azevedo ICAD, Marques EAG, Munteer AH, Martins CP, Nascentes R, Reis EL, Natalino R (2010) Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto, MG. *Eng Sanit Ambient* **15**: 305–314

Veselova TV, Veselovskii VA, Usmanov PD, Usmanova OV, Kozar VI (2003) Hypoxia and imbibition injuries to aging seeds. *Russ J Plant Physiol* **50**: 835–842

Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD (2007) 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* **67**: 44–50

Wani PA, Khan MS, 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

Willigen CV, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y (2006) Expression and Inhibition of Aquaporins in Germinating Arabidopsis Seeds *Plant Cell Physiol* **47**:1241–50

Windmüller CC, Santos RC, Athayde M, Palmieri HEL (2007) Distribuição e especiação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). *Quim Nova* **30**: 1088–1094