

Influência do óxido nítrico na germinação de sementes  
de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigorInfluence of nitric oxide on the germination of seeds  
of *Plathymenia reticulata* Benth with low vigor.Bárbara Luísa Corradi Pereira<sup>1</sup>, Eduardo Euclides de Lima e Borges<sup>2</sup>, Aylson Costa Oliveira<sup>1</sup>,  
Helio Garcia Leite<sup>2</sup> e José Francisco de Carvalho Gonçalves<sup>3</sup>**Resumo**

Este estudo teve como objetivo investigar a ação do óxido nítrico (ON) na promoção da germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* com baixo vigor. Realizaram-se envelhecimento acelerado das sementes por 24, 48 e 72 horas a 40°C e pré-embebição em soluções de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) e nitroprusiato de sódio (SNP) nas concentrações de zero (testemunha), 0,01, 0,10, 1,00 e 10,00 mmol/L, por seis, 12, 18 e 24 horas. Os períodos de envelhecimento acelerado foram seguidos à pré-embebição em KNO<sub>3</sub> e SNP. Quantificou-se a condutividade elétrica e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). As maiores porcentagens de germinação ocorreram nas sementes pré-embebidas em KNO<sub>3</sub> e SNP durante 24 horas e em 0,10mmol/L. O KNO<sub>3</sub> e o SNP aumentaram a germinação de sementes envelhecidas de *P. reticulata*. O envelhecimento acelerado aumentou a permeabilidade da membrana, que foi reduzida pela aplicação de KNO<sub>3</sub> e SNP. A atividade da SOD foi maior em sementes tratadas com KNO<sub>3</sub> e SNP. A atividade da CAT não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, mesmo quando pré-embebidas em KNO<sub>3</sub> e SNP. Conclui-se que o óxido nítrico aumentou a qualidade das sementes envelhecidas, pela manutenção da integridade das membranas e estímulo à atividade da superóxido dismutase.

**Palavras-chave:** estresse, deterioração, semente florestal, bioquímica**Abstract**

The objective of this study was to investigate the nitric oxide (NO) action on the promotion of seeds germination with low vigor of *Plathymenia reticulata*. Accelerated aging on seeds were made per 24, 48 and 72 hours at 40°C as well as pre soaking in potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) and sodium nitroprussiate (SNP) solutions. The concentrations from zero (control), 0,01, 0,10, 1,0 and 10,0mMol.l<sup>-1</sup> per six, 12, 18, and 24 hours were used. The accelerated aging period were followed by pre soaking in KNO<sub>3</sub> and SNP. The electric conductivity and the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were quantified. The best results of germination occurred with the pre soaked seeds in KNO<sub>3</sub> and SNP during 24 hours and in 0,10mMol.l<sup>-1</sup>. The KNO<sub>3</sub> and the SNP increased the germination of the aged seeds of *P. reticulata*. The accelerated aging increased the membrane permeability, which was reduced with the KNO<sub>3</sub> and SNP treatments. The activity of SOD was greater in seeds treated with KNO<sub>3</sub> and SNP. The CAT activity did not show significant differences among the treatments, even when the seeds were soaked in KNO<sub>3</sub> and SNP. It can be concluded that the nitric oxide increased the quality of the aged seeds by maintaining the membrane integrity and stimulus of the superoxide dismutase activity.

**Keywords:** stress, deterioration, forest seed, biochemistry**INTRODUÇÃO**

Durante a deterioração das sementes ocorrem mudanças estruturais e funcionais, tendo a perda da capacidade de germinação como último efeito

na sua qualidade fisiológica (DELOUCHE, 1969). Braga *et al.* (2007) estudando a influência do tempo de armazenamento em sementes de *P. reticulata*, concluíram que o aumento do tempo resultou na diminuição do poder germinativo.

<sup>1</sup>Estudantes de graduação, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, 36570-000 - E-mail: [babicorradi@gmail.com](mailto:babicorradi@gmail.com) e [aylsoncosta@gmail.com](mailto:aylsoncosta@gmail.com)

<sup>2</sup>Eng. Florestais, professores Drs, Departamento de Eng. Florestal, UFV, av. P. H. Rolfs, 36570-000, Viçosa, MG - E-mail: [elborges@ufv.br](mailto:elborges@ufv.br) e [hgleite@ufv.br](mailto:hgleite@ufv.br)

<sup>3</sup>Pesquisador, Dr. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Efigênio Sales, 2239, Aleixo, Manaus, 69011-970 - E-mail: [jfc@inpa.gov.br](mailto:jfc@inpa.gov.br)

O aumento da peroxidação de lipídios, mediado por radicais livres e peróxidos é uma das prováveis razões para a perda da viabilidade de sementes durante armazenamento (HENDRY, 1993; SUNG, 1996). De acordo com Chanany e Naithani (1994), sementes de *Shorea robusta* que perderam a viabilidade tiveram aumento na lixiviação de soluto celular pelo aumento na peroxidação de lipídios e ação de radicais superóxido. Somente se observou atividade da enzima superóxido dismutase em sementes 100% viáveis. A perda de viabilidade de sementes de *Helianthus annuus* foi associada ao decréscimo de atividade de superóxido dismutase, de catalase e à peroxidação de lipídios (BAILLY *et al.*, 2006).

Segundo Hendricks e Taylorson (1974), o nitrato de potássio estimulou significativamente a germinação de cinco entre sete espécies. As duas espécies que não tiveram a germinação diferente estatisticamente da testemunha foram assim mesmo, superiores. De acordo com Faron *et al.* (2004) e Abu-Zanat e Samarah (2005) a aplicação de nitrato de potássio estimulou, respectivamente, a germinação de sementes de *Hypericum perforatum* e de *Atriplex nummularia*. De acordo com Corpas *et al.* (2009), a aplicação de nitroprussiato de sódio aumentou a presença de óxido nítrico em pontas de raiz de *Arabidopsis*, tanto em plantas normais, quanto em mutantes.

O atual conhecimento a respeito do envelhecimento de sementes florestais permanece insuficiente diante da complexidade dos eventos e a diversidade dessas espécies. Dessa forma, este trabalho investigou as ações de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) e de nitroprussiato de sódio (SNP), formadores de óxido nítrico que agem contra o estresse oxidativo em sementes de baixo vigor de *Plathymentia reticulata* Benth.

## MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *P. reticulata* foram coletados em 2008, de árvores matrizes em Guaraciaba, Zona da Mata de Minas Gerais. Retirou-se a película membranácea das sementes e descartou-se aquelas mal-formadas, de tamanho reduzido e predadas (presença de insetos ou mesmo vestígios de predação). As sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria a 5°C e 60% de umidade relativa, por 30 dias, quando se iniciaram as pesquisas.

O teste de germinação foi realizado com a colocação das sementes sobre duas folhas de papel de filtro tipo germitest, colocadas em placas de

Petri, e umedecidas com 4,0mL de água destilada. As sementes foram mantidas em germinador a 25°C, sob luz constante proporcionada por quatro lâmpadas fluorescentes 20W, tipo luz do dia especial. A germinação foi determinada pela contagem diária de sementes que emitiram radícula, no período de sete dias. Os resultados foram expressos em porcentagem média. Para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), foi utilizada a fórmula de Maguire (1962):  $IVG = \sum(n_i / t_i)$ , onde,  $n_i$  é o número de sementes germinadas por dia e,  $t_i$  é o tempo (dias de semeadura).

As sementes foram pré-embebidas em soluções de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) ou nitroprussiato de sódio (SNP) nas concentrações de 0,01, 0,10, 1,00 e 10,00mmol/L, por seis, 12, 18 e 24 horas à 25°C, após a superação de dormência (ácido sulfúrico concentrado por 10 min.). Os períodos de pré-embebição em nitrato de potássio foram escolhidos com base em experimentos preliminares, nos quais se verificou que períodos maiores que 24 horas acarretaram a germinação de sementes. Cem sementes para cada tratamento foram colocadas sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com 14mL de solução ou de água. As placas foram vedadas com fita crepe e mantidas a 25°C, sob luz constante. Após cada tempo de pré-embebição as sementes foram lavadas em água destilada e colocadas para germinar em água, conforme metodologia descrita para o teste de germinação.

Para verificar as reações fisiológicas e bioquímicas das sementes envelhecidas e do efeito do nitrato e SNP, foram realizados os seguintes tratamentos: sementes provenientes do lote original; sementes envelhecidas por 24 horas a 40°C; sementes envelhecidas por 48 horas a 40°C; sementes envelhecidas por 72 horas a 40°C; sementes envelhecidas por 24 horas a 40°C e tratadas com  $\text{KNO}_3$  0,10mmol/L; sementes envelhecidas por 48 horas a 40°C e tratadas com  $\text{KNO}_3$  0,10mmol/L; sementes envelhecidas por 72 horas a 40°C e tratadas com  $\text{KNO}_3$  0,10mmol/L; sementes envelhecidas por 24 horas a 40°C e tratadas com SNP 0,10mmol/L; sementes envelhecidas por 48 horas a 40°C e tratadas com SNP 0,10mmol/L; sementes envelhecidas por 72 horas a 40°C e tratadas com SNP 0,10mmol/L. As sementes foram pré-embebidas nas soluções de nitrato ou de nitroprussiato por 24 horas antes do envelhecimento. Foram utilizadas 100 sementes, para cada tratamento, sobre tela de alumínio,

colocadas em caixas plásticas tipo gerbox onde foram adicionados 40mL de água destilada. Em seguida, as caixas foram levadas à câmara de envelhecimento, previamente regulada para a temperatura de 40°C, com umidade relativa de, aproximadamente, 100% e mantidas durante os períodos de 24, 48 e 72 horas.

Decorrido cada período de envelhecimento, com ou sem embebição em cada uma das soluções, cinco repetições de 20 sementes, por tratamento, foram colocadas para germinar conforme metodologia descrita para o teste de germinação.

Amostras de sementes de cada tratamento, sem secagem posterior, foram colocadas em erlenmeyer com 75mL de água deionizada a 25°C, por 24 horas. A condutividade elétrica do lixiviado foi determinada, utilizando-se um condutivímetro MICRONAL, modelo B 330, eletrodo com constante 1,0, conforme procedimento descrito por Woodstock (1973). Foram avaliadas cinco repetições com vinte sementes cada.

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades da SOD e CAT foram obtidos pela maceração de 0,2g de tecido vegetal de cotilédone e de eixo embrionário seguido da adição de 2,0mL da solução de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO *et al.*, 1999). Centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C, obtendo-se o extrato enzimático bruto. Todo o trabalho foi realizado sob baixa temperatura.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto de cotilédone e eixo embrionário a 2,97mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,8, contendo metionina 13mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2µM. A reação foi conduzida a 25° em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560nm (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). A absorbância a 560nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de "branco" e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi de-

finida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Foram utilizados cinco repetições e a atividade da enzima foi expressa em Unidade SOD min<sup>-1</sup>.

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5mM. O decréscimo na absorbância a 240nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm<sup>-1</sup> e o resultado expresso em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. (CORTE, 2008). Foram utilizados cinco repetições.

O conteúdo de proteína solúvel presente nos extratos utilizados para as determinações enzimáticas da SOD e da CAT foi estimado pelo método de Bradford (1976). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando serum de albumina bovina (BSA) como proteína de referência. Foram utilizadas cinco repetições na quantificação do teor de proteínas. O resultado foi expresso em mgg<sup>-1</sup> de massa seca.

Utilizou-se o esquema fatorial 4 x 4 (4 concentrações, 4 tempos de pré-embebição) para se determinar a melhor concentração e tempo de pré-embebição das sementes em KNO<sub>3</sub> e SNP, utilizando-se cinco repetições por tratamento. Utilizou-se também o esquema fatorial 3 x 3 com tratamento adicional (3 tempos de envelhecimento acelerado, 3 tipos de pré-embebição e testemunha), utilizando-se cinco repetições por tratamento.

Os resultados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o software Statística 8.0. Quando necessário, os dados foram transformados por não terem atendido as pressuposições dos testes de normalidade e de homogeneidade. Em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), efetuando-se os respectivos desdobramentos das interações significativas. A comparação entre os diferentes tratamentos foi feita pelo teste de Tukey a 5% de significância e 95% de probabilidade, quando encontradas diferenças significativas. Como parte do experimento é composto por fatorial com tratamento adicional, fez-se a comparação entre cada tratamento do fatorial e a testemunha, através do teste de Dunnett, a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 contém os valores de IVG de sementes de *P. reticulata* após pré-embebição em SNP e em KNO<sub>3</sub>. Utilizou-se este parâmetro de comparação, pois as porcentagens totais de germinação de sementes nos diferentes tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (p>0,05), além de este ser parâmetro mais rigoroso na avaliação da qualidade das sementes.

As aplicações de diferentes concentrações e tempos de SNP estimularam a germinação de sementes de *P. reticulata*. Não se verificaram alterações significativas, em relação à testemunha, nas diferentes concentrações do SNP nas primeiras seis horas de sua aplicação, embora ocorresse pequeno aumento no IVG na concentração de 1,0mmol/L. A partir de 12 horas de embebição todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha.

Não houve diferença significativa entre os resultados das concentrações nas primeiras 12 horas de aplicação do SNP. Em 18 horas, somente a concentração de 1,0mmol/L diferiu das demais. Esta concentração alcançou o patamar em 24 horas, igualando-se às demais. A concentração de 0,10mmol/L alcançou seu maior estímulo em 24 horas, diferindo significativamente da maior e da menor concentração, que não diferiram significativamente entre elas.

O tempo de exposição das sementes ao SNP por seis horas resultou em IVG significativamente menor do que os demais. Somente a concentração de 0,10mmol/L aumentou continuamente os valores de velocidade de germinação com o aumento do tempo de exposição. Em 0,01 e 1,00mmol/L o aumento do tempo de 18 para 24 horas de aplicação não resultou em aumento significativo do IVG, enquanto em 10mmol/L o tempo de 24 horas diferiu significativamente dos de 12 e 18 horas, que foram similares entre si. Para testes posteriores

adotou-se a concentração de 0,10 mmol/L de SNP e o período de 24 horas para pré-embebição de sementes de *P. reticulata*.

Os resultados de germinação de sementes de *P. reticulata* estão de acordo com os de Silva (2007), que observou que solução de SNP estimulou a germinação de *Oryza sativa*. A concentração de 0,05mmol/L foi a recomendada para aquele caso, uma vez que as concentrações de SNP acima de 0,5mmol/L causaram redução da germinação. Kopyra e Gwózdź (2003) relataram que o ON ocasionou aumento da germinação de sementes de *Lupinus luteus*, no início da embebição, ocorrendo favorecimento da capacidade germinativa até a concentração próxima a 0,4mmol/L de SNP. Nessa espécie as concentrações entre 0,6 e 1,0 mmol/L acarretaram redução da germinação. Giba (1998) concluiu que baixas concentrações de ON estimularam a germinação de sementes de *Paulownia tomentosa* e inibiu-a em concentrações superiores a 1,0mmol/L de SNP.

Verificou-se aumento da velocidade de germinação das sementes de *P. reticulata* submetidas às diferentes concentrações de solução de KNO<sub>3</sub>, nos diferentes tempos de aplicação (Tabela 1). Diferentemente do SNP, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações, em todos os tempos, com exceção dessas com a testemunha, que foram todas significativas. Em todas as concentrações o maior tempo de embebição resultou em maior velocidade de germinação, com diferença significativa do tempo de 24 horas em relação aos demais. Seis horas de exposição ao nitrato de potássio resultou em IVG significativamente inferior aos demais, com exceção da concentração de 10mmol/L no tempo de 12 horas, em que se igualaram.

Nos testes seguintes adotou-se a concentração de 0,10 mmol/L de KNO<sub>3</sub> e o tempo de 24 horas para pré-embebição de sementes de *P. reticulata*, por apresentar o maior IVG quando se comparam todos os tratamentos.

**Tabela 1.** Índice de velocidade de germinação de sementes de *P. reticulata* sob efeito de várias concentrações de SNP e de KNO<sub>3</sub> após diferentes períodos de pré-embebição.

**Table 1.** Index for germination velocity of *P. reticulata* seeds under the effect of various concentrates of SNP and KNO<sub>3</sub> after different periods of pre imbibition.

Tempo (horas)	Concentrações SNP (mmol/L)				Concentrações KNO <sub>3</sub> (mMol/L)			
	0,01	0,10	1,00	10,00	0,01	0,10	1,00	10,00
6	7,18 Ca	7,37 Da	8,13 Ca	7,59 Ca	8,07 Ca	8,09 Ca	7,06 Ca	8,07 Ca
12	10,14 Ba *	9,45 Ca *	11,19 Ba *	10,07 Ba *	10,05 Ba *	10,2 Ba *	9,1 Ba *	8,87 BCa *
18	11,23 ABb *	11,39 Bb *	13,40 Aa *	11,01 Bb *	10,46 Ba *	11,25 Ba *	10,36 Ba *	10,05 Ba *
24	13,17 Ab *	16,58 Aa *	14,90 Aab *	13,57 Ab *	14,6 Aa *	15,51 Aa *	14,22 Aa *	13,15 Aa *
<b>Testemunha = 6,49</b>					<b>Testemunha = 6,49</b>			

Mesmas letras maiúsculas em cada coluna e minúsculas em cada linha, em cada solução, indicam igualdade pelo teste Tukey (p>0,05).

\* Estatisticamente diferente da testemunha, pelo teste de Dunnett (p>0,05).

As porcentagens e índices de velocidade de germinação de sementes submetidas ao envelhecimento acelerado, seguido ou não à pré-embrição em  $\text{KNO}_3$  ou SNP encontram-se na Tabela 2. O envelhecimento acelerado reduziu significativamente a porcentagem de germinação em relação à testemunha, com a redução sendo acentuada com o maior tempo sob alta temperatura. Com a aplicação de ambos os produtos, a redução da germinação foi menor, tendo os resultados de 24 horas sido significativamente semelhantes aos da testemunha. As aplicações de SNP e  $\text{KNO}_3$  reverteram significativamente o efeito do envelhecimento, com o nitrato estimulando a germinação das sementes de forma significativamente mais efetiva que o SNP no tempo de 48 horas. É interessante ressaltar a recuperação significativa da germinação naquelas sementes com 72 horas de envelhecimento, com a aplicação de ambos os produtos. Entretanto, percebe-se que o nitrato e o SNP não conseguiram recuperar a qualidade original das sementes quando houve aumento no tempo de envelhecimento.

Os valores de IVG encontram-se na Tabela 2. Os envelhecimentos por 48 e 72 horas reduziram significativamente a velocidade de germinação, em relação à testemunha. Os resultados advindos da aplicação do SNP e do nitrato aceleraram significativamente a velocidade de germinação quando aplicados nas primeiras 24 horas, mantendo-se a diferença significativa para o trata-

mento com nitrato em 48 horas. No tempo de 24 horas o SNP foi significativamente mais eficiente do que o nitrato no estímulo à germinação, invertendo-se em 48 horas. Em 72 horas ambos conseguiram recuperar igualmente o IVG.

A Tabela 3 contém os valores médios obtidos no teste de condutividade elétrica de sementes de *P. reticulata*. A deterioração das sementes de *P. reticulata* provocada pelo envelhecimento acelerado pode ser confirmada pelo aumento significativo da condutividade elétrica das sementes envelhecidas já em 24 horas. A aplicação de ambas as substâncias não reduziu significativamente a lixiviação em 72 horas de envelhecimento, em relação à testemunha, embora o tenha feito em relação às sementes que não foram embebidas nas soluções. Comparado aos resultados da testemunha, o limite da capacidade de ambas as substâncias de reverterem os danos causados às membranas ocorre até 48 horas de envelhecimento, mas, mesmo assim, foram mais eficientes na reversão, em todos os tempos, em relação àquelas sementes que não foram embebidas nas soluções.

O aumento da condutividade de lixiviados é um dos primeiros indícios da deterioração das sementes. Há vários estudos que avaliam a deterioração das sementes florestais por meio do teste de condutividade elétrica citando-se espécies como a *Cedrela fissilis* (CHEROBINI *et al.*, 2008), *Dalbergia nigra* (MARQUES *et al.*, 2002a; MARQUES *et al.*, 2002b), a *Copaifera langsdorffii*

**Tabela 2.** Porcentagem e índice de velocidade de germinação de sementes de *P. reticulata* submetidas ao envelhecimento acelerado, seguido à pré-embrição, ou não, em  $\text{KNO}_3$  ou SNP.

**Table 2.** Percentage and index for germination velocity for *P. reticulata* seeds subjected to accelerated aging, following, or not, by pre-imbibition in  $\text{KNO}_3$  or SNP.

Tempo de Envelhecimento (horas)	Tipo de pré-embrição					
	Germinação (%)			Índice de velocidade de germinação (IVG)		
	Sem pré-embrição	SNP	$\text{KNO}_3$	Sem pré-embrição	SNP	$\text{KNO}_3$
24	75,0 Ab *	95,0 Aa	95,0 Aa	4,21 Ac	15,28 Aa *	12,01 Ab *
48	25,0 Bc *	65,0 Bb *	82,0 Ba *	1,01 Bc *	6,81 Bb	10,5 Aa *
72	0,0 Cb *	56,0 Ba *	66,0 Ca *	0 Bb *	6,35 Ba	6,78 Ba
Testemunha = 98,6			Testemunha = 6,09			

Mesmas letras maiúsculas em cada coluna e minúsculas em cada linha, em cada parâmetro, indicam igualdade pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente da testemunha, pelo teste de Dunnett ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Valores médios obtidos no teste de condutividade elétrica de sementes de *P. reticulata* após envelhecimento acelerado, seguido à pré-embrição, ou não, em  $\text{KNO}_3$  ou SNP.

**Table 3.** Average values obtained in electrical conductivity test of *P. reticulata* seeds after being subjected to accelerated aging, following, or not, pre-imbibition in  $\text{KNO}_3$  or SNP.

Tempo de Envelhecimento (horas)	Tipo de pré-embrição		
	Sem pré-embrição	SNP	$\text{KNO}_3$
24	270,93 Ca *	86,93 Bb	116,80 Bb
48	331,73 Ba *	106,13 Bb	156,27 Bb
72	420,80 Aa *	193,07 Ab *	231,47 Ab *
Testemunha = 73,60			

Mesmas letras maiúsculas em cada coluna e minúsculas em cada linha indicam igualdade pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente da testemunha, pelo teste de Dunnett ( $p > 0,05$ ).

(FERREIRA *et al.*, 2004), a *Tabebuia chrysotricha* (FONSECA *et al.*, 2005) e a *Sebastiania commersoniana* (SANTOS; PAULA, 2005). Considerando que o SNP é efetivo formador de óxido nítrico (BETHKE *et al.* 2007), é possível supor que este esteja atuando na recuperação da função da membrana, demonstrando claramente o papel fundamental delas na manutenção da qualidade das sementes. Indiretamente, o nitrato também é efetivo formador de óxido nítrico (BETHKE *et al.* 2007), e a clara ação em nível de membranas, à semelhança do nitroprussiato, demonstra que além de efetivo superador de determinados tipos de dormência, age também na aceleração da germinação e recupera, sob determinadas limites de envelhecimento, a qualidade das sementes.

A enzima SOD apresentou aumento significativo na atividade em relação à testemunha, quando aplicado o SNP, após 24 e 48 horas de envelhecimento, enquanto o nitrato somente mostrou tal estímulo após 48 horas (Tabela 4). Mesmo com a aplicação de ambos os compostos, as alterações na atividade da SOD nas primeiras 48 horas não diferiram estatisticamente entre si, à semelhança das sementes sem qualquer aplicação.

Entretanto, a aplicação do SNP estimulou significativamente a atividade desintoxicante da SOD nas sementes após todos os tempos de envelhecimento, em relação àquelas não submetidas ao produto. O nitrato mostrou o efeito estimulante na SOD, em relação àquelas sem pré-embebição somente após 48 horas de envelhecimento. A formação do óxido nítrico proporcionado pelo SNP e sua ação ocorre mais

rapidamente do que aquele do nitrato, podendo, tal diferença de tempo, ser creditado ao intervalo em que o nitrato é processado e convertido a óxido nítrico. Nos demais tempos após o envelhecimento o tecido pode ter perdido a capacidade manter a atividade da SOD, mesmo com a aplicação de ambos os compostos.

Os compostos doadores do NO também induziram a atividade da SOD em plantas de *Oryza sativa* (UCHIDA *et al.*, 2002). Em estudo realizado por Song *et al.* (2006) foi verificado que o pré-tratamento com SNP aumentou a atividade da SOD quando callus embriogênicos de sementes de *Phragmites communis* foram submetidos a altas temperaturas. Kopyra e Gwózdź (2003) atribuíram a função antioxidante do ON em raízes de *Lupinus luteus*, sob condições de estresse, à redução de radicais superóxido.

A CAT é responsável por remover peróxido de hidrogênio presente em altas concentrações nos peroxissomos, protegendo as células de danos oxidativos (KLAPHECK *et al.*, 1990). Os resultados da aplicação de SNP ou nitrato na atividade da CAT encontram-se na Tabela 5.

A atividade da CAT não apresentou diferenças significativas nos resultados para nenhum dos tratamentos em relação à testemunha e também não há diferença entre a atividade de tal enzima no tratamento sem pré-embebição e os demais. A redução na atividade da enzima implica na perda da capacidade da célula em eliminar o peróxido de hidrogênio, o que pode resultar em distúrbios metabólicos, especialmente em nível de membrana. Marcos Filho (2005) destaca

**Tabela 4.** Atividade específica da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em sementes de *P. reticulata*, após envelhecimento acelerado, seguido à pré-embebição, ou não, em KNO<sub>3</sub> ou SNP.

**Table 4.** Specific activity of Superoxide Dismutase enzyme for *P. reticulata* seeds subjected to accelerated aging, following, or not, by pre-imbibition in KNO<sub>3</sub> or SNP.

Tempo de Envelhecimento (horas)	Tipo de pré-embebição		
	Sem pré-embebição	SNP	KNO <sub>3</sub>
24	0,328 Ab	0,366 Aa *	0,339 ABb
48	0,314 ABb	0,350 ABa *	0,359 Aa *
72	0,303 Bb	0,338 Ba	0,338 Ba
Testemunha = 0,325			

Mesmas letras maiúsculas em cada coluna e minúsculas em cada linha indicam igualdade pelo teste Tukey (p>0,05).

\* Estatisticamente diferente da testemunha, pelo teste de Dunnett (p>0,05).

**Tabela 5.** Atividade específica da enzima Catalase (CAT), em sementes de *P. reticulata*, após envelhecimento acelerado, seguido à pré-embebição, ou não, em KNO<sub>3</sub> ou SNP.

**Table 5.** Specific activity of Catalase (CAT) enzyme for *P. reticulata* seeds subjected to accelerated aging, following, or not, by pre-imbibition in KNO<sub>3</sub> or SNP.

Tempo de Envelhecimento (horas)	Tipo de pré-embebição		
	Sem pré-embebição	SNP	KNO <sub>3</sub>
24	121,61	143,58	125,41
48	88,51	126,66	116,45
72	114,67	109,06	142,70
Testemunha = 137,80			

que elevadas temperaturas causam deterioração, decréscimos do teor e da síntese das proteínas e, como conseqüência, há a perda da capacidade de exercer suas funções durante a deterioração. A desnaturação protéica pode resultar no decréscimo da atividade das enzimas antioxidantes quando submetidas ao envelhecimento artificial (CORTE 2008) ou mesmo redução da concentração delas diminuindo sua eficiência de desintoxicação. Alternativamente, o peróxido pode ter sido eliminado da célula quando a permeabilidade da membrana tornou-se menos seletiva, tendo em vista que ele se difunde através da membrana normal, atuando em outros locais que não o de produção (BAYLLY, 2004). Comparando-se as tabelas 3 e 5, verifica-se que a permeabilidade da membrana nas sementes aumentou com o aumento do tempo de envelhecimento, em relação à testemunha, permitindo que a difusão ocorresse. A intensa lixiviação causou possível redução de substrato, mantendo-se a enzima em atividade de baixa e aproximadamente constante.

## CONCLUSÕES

- A pré-embebição de sementes de *P. reticulata* com SNP ou  $\text{KNO}_3$  no tempo de 24 horas e na concentração de  $100\mu\text{M}$  resulta em maiores valores de IVG;
- O ON reduz a inibição da germinação causado pelo envelhecimento acelerado;
- A perda da qualidade da semente por envelhecimento acelerado está relacionada com aumento na permeabilidade de membrana, revertida, parcialmente, pelo SNP e  $\text{KNO}_3$ ;
- Somente a atividade da enzima SOD é estimulada significativamente pela ação do óxido nítrico, não afetando a atividade da CAT.

## REFERÊNCIAS

- ABU-ZANAT, M.M.W.; SAMARAH, N. Physical and chemical treatments for enhancing seed germination of oldman saltbush (*Atriplex nummularia*). *African Journal Range Forage Science*, v.22, n.2, p.141-145, 2005.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, Wallingford, v.14, p.93-107, 2004.
- 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*, Copenhagen, v.97, n.1, p.104-110, 2006.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase in proved as says and as say applicable to acrylamide gels. *Analytical Chemistry*, Washington, v.44, p.276-287, 1971.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. IN: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p.152-175.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAGA, L.L.; TOLENTINO, G.S.; SANTOS, M.R.; VELOSO, M.D.M.; NUNES, Y.L.F. Germinação de Sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae) sob Influência do Tempo de Armazenamento. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p.258-260, 2007.
- CHANANYA, K.S.K.; NAITHANI, S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Phytologist*, Oxford, v.126, p.623-627, 1994.
- CHEROBINI, E.A.I.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v.18, n.1, p.65-73, 2008.
- CORPAS, F.J.; HAYASHI, M.; MANO, S.; NISHIMURA, M.; BARROSO, J.B. Peroxisomes are required for *in vitro* nitric oxide (NO) accumulation in the cytosol following salinity stress of Arabidopsis stress. *Plant Physiology*, Bethesda, v.151, p. 2083-2094, 2009.
- CORTE, V.B. **Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de Melanoxylon brauna envelhecidas natural e artificialmente**. 2008. 129p. Dissertação (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- DELOUCHE, J.C. Planting seed quality. In: BELT WIDE COTTON PRODUCTION-MACHANIZATION CONFERENCE. 1969, New Orleans. **Proceedings...** Mississippi: Mississippi Agric. Exp. Sta., Mississippi State University Journal paper n° 1721, Mississippi Agric. Exp. Sta. / Mississippi State University, 1969. p.16-18. Journal paper n° 17211.
- FARON, M.L.B.; PERCIN, M.B.; LAGO, A.A.; BOVI, O.A.; MAIA, N.B. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de semente de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliensis* Choisy. *Bragantia*, Campinas, v.63, n.2, p.193-199, 2004.

- FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, D.; OLIVEIRA, A.F.; GEMAQUE, R.C.R. Qualidade fisiológica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.35, n.1, p.82-86, 2004.
- FONSECA, R.L.; MENEGARIO, C.; MORI, E.S.; NAKAGAWA, J. Maturidade fisiológica das sementes do ipê amarelo, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.69, p.136-141, 2005.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Bethesda, v.59, p.309-314, 1977.
- GIBA, Z. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.26, p.175-181, 1998.
- HENDRICKS, S.B.; TAYLORSON, R.B. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. **Plant Physiology**, Bethesda, v.54, p.304-309, 1974.
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, p.141-153, 1993.
- KLAPHECK, S.; ZIMMER, I.; COSSE, H. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.31, p.1005-1013, 1990.
- KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.1011-1017, 2003.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluating or seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J.M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MARQUES, M.A.; PAULA, R.C.; RODRIGUES, T.J.D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p.271-278, 2002a.
- MARQUES, M.A.; PAULA, R.C.; RODRIGUES, T.J.D. Efeito do número de sementes e do volume de água na condutividade elétrica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p.254-262, 2002b.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANTANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.11, p.137-143, 1999.
- SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.27, n.2, p.136-145, 2005.
- SILVA, T.K. **Ação do óxido nítrico sobre o estresse de alumínio na germinação de arroz (*Oryza sativa* L.): alterações fisiológicas e bioquímicas**. 2007. 56p. Dissertação ( Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- SONG, L.; ZANG, L.; SUN, B.; ZHAO, M.; DING, W. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Science**, Amsterdam, v.171, p.449-458, 2006.
- SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 85-89, 1996.
- UCHIDA, A.; JAGENDORE, A.T.; HIBINO, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, Amsterdam, v.163, p.515-523, 2002.
- WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical test for seed vigor. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, p.127-57, 1973.

Recebido em 14/04/2010  
Aceito para publicação em 15/10/2010