



MÁRCIO ANTÔNIO PEREIRA DO CARMO

**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO EM
SEMENTES DE *UROCHLOA* spp. COM O USO DE
MOLÉCULAS SINALIZADORAS**

**LAVRAS – MG
2023**

MÁRCIO ANTÔNIO PEREIRA DO CARMO

**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO EM SEMENTES DE
UROCHLOA spp. COM O USO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Carmo, Márcio Antônio Pereira do.
Indução de tolerância ao estresse abiótico em sementes de
Urochloa ssp com o uso de moléculas sinalizadoras / Márcio Antônio
Pereira do Carmo. - 2023.
74 p. : il.

Orientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. Braquiária. 2. *Priming*. 3. Estresse hídrico. I. Santos, Heloisa
Oliveira dos. II. Título.

MÁRCIO ANTÔNIO PEREIRA DO CARMO

**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO EM SEMENTES DE
UROCHLOA spp. COM O USO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS**

**INDUCTION OF ABIOTICAL STRESS TOLERANCE IN SEEDS OF *UROCHLOA*
RUZIZIENSIS CV. RUZIZIENSIS WITH THE USE OF SIGNALING MOLECULES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 10 de março de 2023.

Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Prof. Adauton Vilela de Rezende	UNIFENAS
Profa. Thaisa Fernanda Oliveira	UFV
Prof. Everson Reis Carvalho	UFLA

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

*A DEUS, pelo dom da vida é por estar me concedendo a realização deste sonho.
Ao meu pai Oswaldo Aureliano do Carmo (in memoriam) e, em especial, à minha mãe
Eudóxia Pereira do Carmo (in memoriam), pelo exemplo de vida, amor e respeito. Tive muita
sorte de ter você como mãe, ter crescido e aprendido a viver com você!
À minha filha Ludmila, por entender a minha ausência.
Ao Renzo Garcia Von Pinho, pelo apoio desde o início, antes
mesmo da graduação, sem sua ajuda não estaria aqui.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pelo dom da vida, e pelas pessoas que fazem parte dela.

À toda a minha família por estarem sempre ao meu lado.

À Universidade Federal de Lavras, aos professores que fizeram parte da minha formação profissional, em especial ao do Departamento de Agricultura, Setor Sementes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado. À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, professora Heloísa Oliveira dos Santos, pela orientação, confiança e amizade. Um exemplo de profissionalismo e ética que levarei comigo para o resto da minha vida.

À professora Maria Laene Moreira de Carvalho, que fez parte dessa trajetória, pela qual eu tenho grande consideração e admiração.

Ao professor João Almir, um exemplo de pessoa, ser humano incrível, sem palavras para descrever o quanto sou grato a você.

À professora Édila, exemplo de profissionalismo e ética, sem você eu não estaria aqui.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Semente, Jaque, Rose, Rafaela, em especial ao Geraldo, muito prestativo e atencioso. À Marli, pela disposição e auxílio.

Ao doutorando Antônio, pela amizade e auxílio com as análises bioquímicas.

A todos os orientados pela professora Heloisa, que me ajudaram na condução do experimento, Jessica, Marília, Gisele e a todos que de alguma contribuíram, em especial à Isadora, que além de me ajudar na condução do experimento se tornou uma grande amiga e aliada.

À Cristiane Mesquita, meu muito obrigado por estar sempre ao meu lado, você teve grande contribuição para a conclusão dessa etapa.

Em especial ao Renzo, um exemplo de profissionalismo e ética, ser humano incrível de bom coração. Se estou aqui hoje devo a você, confiou em mim, quando poucos confiavam, acreditou em mim quando quase ninguém acreditava. Todas as palavras ditas aqui serão insuficientes para demonstrar a minha gratidão.

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

Eternamente grato!

Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode não ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é tudo entre VOCÊ e DEUS.

Nunca foi entre você e os outros.

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

Os estresses abióticos estão entre as principais causas de redução de produtividade das culturas de importância econômica mundial. Esses estresses podem comprometer o desenvolvimento de sementes, sua germinação e a sobrevivência das plantas em condições desfavoráveis. Dentre essas culturas, as espécies forrageiras apresentam grande importância econômica e social. Em decorrência de sua importância torna-se relevante a busca de ferramentas para melhorar as condições de cultivo e mitigar os impactos desses estresses. Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes moléculas sinalizadoras para a indução de tolerância a estresse abióticos em semente de *Urochloa ruziziensis* cv Ruziziensis. Foram realizados dois experimentos, o primeiro teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes moléculas sinalizadoras para a indução de tolerância à restrição hídrica e estresse salino com aplicação via condicionamento fisiológico. No segundo experimento objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes moléculas sinalizadoras para a indução de tolerância a altas temperaturas e contaminação por cádmio. Os experimentos foram instalados e conduzidos no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes da Universidade Federal de Lavras. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5x3+1 sendo 5 moléculas sinalizadoras (ácido indolilacético, melatonina, quitosana, peróxido de hidrogênio, e nitroprussiato de sódio), 3 condições de germinação, mais um controle (sementes não condicionadas). Determinou-se: teor de água após o condicionamento (antes de secagem) e após a secagem das sementes; primeira contagem de germinação; germinação aos 21 dias após a semeadura; índice de velocidade de germinação comprimento de plântulas e a quantificação de peróxido de hidrogênio, ascorbato peroxidase, catalase, peroxidação lipídica e superóxido dismutase. O condicionamento fisiológico com uso de moléculas sinalizadoras reduz os efeitos negativos de salinidade, restrição hídrica, altas temperaturas e contaminação por cádmio. As moléculas sinalizadoras utilizadas foram eficientes em minimizar os efeitos negativos dos estresses. Sementes condicionadas com moléculas sinalizadoras têm maior expressão das enzimas do sistema antioxidante.

Palavras-chave: Braquiária. *Priming*. Estresse hídrico. Salinidade. Quitosana. Melatonina.

ABSTRACT

The abiotic stresses are among the main causes of reduced productivity of crops of world economic importance. These stresses can compromise seed development, germination and plant survival in unfavorable conditions. Among these crops, forage species have great economic and social importance. Due to its importance, becomes relevant the search for tools to improve cultivation conditions and mitigate the impacts of these stresses. With the objective of evaluating the effect of different signaling molecules for the induction of tolerance to abiotic stress in seed of *Urochloa ruziziensis* cv *Ruziziensis*. Two experiments were carried out, the first aimed to evaluate the effect of different signaling molecules for the induction of tolerance to water restriction and salt stress with application via physiological conditioning. The second experiment aimed to evaluate the effects of different signaling molecules for the induction of tolerance to high temperatures and cadmium contamination. The experiments were installed and conducted at the Central Laboratory for Research in Seeds at the Federal University of Lavras. The treatments were arranged in a 5x3+1 factorial scheme, with 5 signaling molecules (indolylacetic acid, melatonin, chitosan, hydrogen peroxide, and sodium nitroprusside), 3 germination conditions, plus a control (unconditioned seeds). It was determined: Water content after conditioning (before drying) and after drying the seeds; first germination count; germination at 21 days after sowing; germination speed index seedling length and quantification of hydrogen peroxide, ascorbate peroxidase, catalase, lipid peroxidation and superoxide dismutase. Physiological conditioning using signaling molecules reduces the negative effects of salinity, water restriction, high temperatures and cadmium contamination. The signaling molecules used were efficient in minimizing the negative effects of stress. Seeds conditioned with signaling molecules have higher expression of antioxidant system enzymes.

Keywords: Brachiaria. *Priming*. Hydric stress. Salinity. Chitosan. Melatonin.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Importância econômica	12
2.2	Condicionamento fisiológico	13
2.3	Estresses abióticos em plantas	15
2.4	Germinação de sementes sob condições de estresses abióticos.....	18
	REFERÊNCIAS.....	23
	CAPÍTULO 2 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA A RESTRIÇÃO HÍDRICA E SALINA EM SEMENTES DE <i>UROCHLOA RUZIZIENSIS</i> COM O USO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS	30
1	INTRODUÇÃO.....	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	CAPÍTULO 3 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA A ALTAS TEMPERATURAS E CÁDMIO EM SEMENTES DE <i>UROCHLOA RUZIZIENSIS</i> COM O USO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS	53
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca na produção mundial de produtos agrícolas sendo um dos maiores produtores e exportadores. Dentre eles, a produção forrageira apresenta grande importância econômica e social, estando o Brasil como maior produtor, consumidor e exportador de sementes de forrageiras (ABRASEM, 2022). Dentre as espécies forrageiras se destaca o gênero *Urochloa* com mais de 70% da área cultivada com forrageiras no país. Geralmente, estas áreas de pastagens são de baixa qualidade, devido, principalmente, à utilização de sementes de baixo vigor, visto que o uso de sementes de qualidade é fator primário em qualquer cultura (BONOME *et al.*, 2006).

Além da qualidade fisiológica das sementes, outros fatores interferem no desempenho da cultura, a exemplo dos estresses abióticos, incluindo seca, salinidade, temperaturas extremas e contaminantes, que são as principais causas de perdas em produtividade em todo o mundo. Por meio de alguns estudos tem sido observado que o crescimento e o desenvolvimento das plantas podem ser inibidos ou atrasados por diferentes estresses abióticos que envolvem interações complexas entre vários fatores, em diferentes estágios de desenvolvimento.

Alguns dos principais aspectos do crescimento incluem o desenvolvimento de sementes, germinação e sobrevivência das plantas em condições desfavoráveis, sendo a germinação das sementes, a etapa mais crucial, uma vez que garante a sobrevivência da maioria das espécies cultivadas. Para garantir a sobrevivência, as plantas desenvolveram mecanismos que permitem que a germinação das sementes seja suspensa sob condições de estresse, e depois retomada quando as condições são favoráveis (DASZKOWSKA, 2011).

Nesse contexto, por reduzir o tempo de germinação e padronizar este processo, o condicionamento fisiológico de sementes propicia maior tolerância às condições desfavoráveis no campo e diminui os efeitos das variações ambientais. Isso permite que a germinação ocorra em diferentes condições de temperatura, luz, solo e disponibilidade de água, resultando em elevado desenvolvimento da parte aérea e aceleração no crescimento das plantas (ZHENG *et al.*, 2016; BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). Como esses processos iniciais da germinação são ativados ainda em condições ótimas, a técnica fornece uma vantagem às sementes quando estas forem expostas às condições

adversas de salinidade, déficit hídrico ou outros tipos de estresse, e ainda possibilita a utilização de moléculas adicionadas à solução condicionante, atingindo resultados mais promissores.

Associado ao condicionamento fisiológico, estudos relacionados à adaptação de culturas ao clima, com a utilização de moléculas que aumentam a tolerância ao estresse, são cada vez mais necessários para controle dos efeitos negativos de ambientes desfavoráveis, principalmente relacionados ao processo germinativo de sementes e estabelecimento de plântulas. Várias moléculas naturais e produtos químicos sintéticos têm sido trabalhados com o intuito de proteger as plantas. Dentre estas moléculas podem ser citados a melatonina, ácido indolilacético (AIA), óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e quitosana. A ação destes produtos contra estresses abióticos parece estar associada aos mecanismos de defesa, ou seja, atuam como moléculas sinalizadoras da indução de rotas de proteção oxidativa.

Além de sua proteção contra o efeito do estresse, algumas dessas moléculas, a exemplo da melatonina e do AIA, também podem estimular o crescimento e desenvolvimento das plântulas e plantas (KERCHEV *et al.*, 2020). Embora estes produtos atuem na promoção da tolerância de diferentes espécies vegetais a estresses abióticos, são escassos os estudos que relacionem a aplicação exógena desses, via condicionamento fisiológico, sob condições de restrição hídrica e salinidade durante o processo de germinação e desenvolvimento de plântulas de braquiária. Sabe-se que a maioria dos estresses abióticos, incluindo seca e salinidade, resulta em estresse oxidativo, o que pode causar o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs).

O estresse oxidativo é limitado pela indução da expressão de genes relacionados a estresses, redução da peroxidação lipídica e dos níveis de H_2O_2 , além de um aumento do sistema antioxidante enzimático (ZHANG *et al.*, 2014; REITER *et al.*, 2015). O estresse oxidativo atrasa o crescimento das plantas e diminui o rendimento nos casos de plantas cultivadas, além de poder desencadear a morte celular programada (PCD), em casos severos (GADJEV *et al.*, 2008; PETROV *et al.*, 2015).

Diante do exposto, é importante avaliar os benefícios do condicionamento fisiológico e a utilização de moléculas sinalizadoras em relação ao aumento da tolerância às diferentes condições de estresse abióticos, durante os processos de germinação de sementes, e desenvolvimento de plântulas de braquiária. Com isso, o objetivo desta pesquisa foi analisar a eficiência do condicionamento fisiológico de sementes de braquiária na presença de moléculas sinalizadoras para a indução de tolerância a estresses abióticos, durante os processos de germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de braquiária.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de sementes de braquiária (ABRASEM, 2022). Isso se deve principalmente às condições climáticas favoráveis para esta espécie, à disponibilidade de cultivares adaptadas e ao aumento das áreas de pastagens.

No Brasil, as áreas de pastagens têm aumentado ano a ano, com previsão de alcançar em 2027, 156.397.000 ha (ABIEC, 2022). Estas áreas se justificam pelo fato de o país ser um dos maiores produtores mundiais de carne bovina (VALE; PEREIRA, 2019), sendo que a produção animal é baseada principalmente em pastagens de gramíneas e leguminosas.

A formação e renovação de pastagens no Brasil ocorreu em três fases, a primeira antes da década de 1970, quando as áreas de pastagens eram cultivadas com capim colômbio (*Panicum maximum*), estrela (*Cynodon plectostachyus*), gordura (*Melinis minutiflora*) e Jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), todos de origem africana e com introdução acidental (SOUZA, 2001). A segunda fase ocorreu no início dos anos 1970, com a importação de grandes quantidades de sementes de braquiárias vindas da Austrália, dando impulso às áreas de pastagens formadas por braquiária no país, principalmente a *Brachiaria decumbens*, *B. humidicula* e *B. ruziziensis*. A terceira fase corresponde ao desenvolvimento de cultivares pela Embrapa, com a liberação em 1984, da *Brachiaria brizantha* cv *Marandú* (SOUZA, 2001).

Apesar de o Brasil ser o maior produtor e exportador de sementes de braquiária, a maior parte dessas sementes ainda é de baixa qualidade, visto que essas espécies possuem fatores que dificultam a obtenção de sementes de alta qualidade, como a desuniformidade na emissão das inflorescências, o florescimento irregular dentro das panículas, baixo número de sementes férteis, e elevada degrana natural (BONOME *et al.*, 2006). Além das sementes de baixa qualidade, outros fatores interferem na produção de braquiária no país, como altas temperaturas, baixa disponibilidade de água e solos com alta salinidade e contaminação por metais.

A técnica de condicionamento fisiológico pode mitigar esses efeitos adversos, visto que beneficia o desempenho de lotes de sementes principalmente em condições de estresses.

2.2 Condicionamento fisiológico

A técnica do condicionamento fisiológico consiste no controle da embebição de água pelas sementes, com uso de soluções osmóticas, que possibilite o ajuste do potencial hídrico do substrato em um nível em que as sementes absorvam água suficiente para ocorrência de processos fisiológicos iniciais da germinação, sem atingir umidade suficiente para que ocorra a fase III da embebição (VARIER *et al.*, 2010).

Este método permite que ocorra procedimentos de reparo nas membranas das células da semente, o que melhora o vigor do lote sujeito ao tratamento (BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). Por reduzir o tempo de germinação e padronizar este processo, este tipo de método permite a germinação em várias condições de temperatura, luz, solo e disponibilidade de água, possibilitando elevado desenvolvimento da parte aérea e aceleração no crescimento das plantas (MARCOS FILHO, 2015; PEREIRA *et al.*, 2018).

O vigor das sementes é o componente da qualidade fisiológica mais influenciado pelo condicionamento fisiológico (MARCOS FILHO, 2015). Por essa razão, o tratamento tem sido designado na literatura como um envigoreamento de sementes (SILVA *et al.*, 2016). No entanto, Marcos Filho (2015) explica que essa impressão de ‘envigoreamento’ ocorre porque a germinação é praticamente instantânea após o condicionamento fisiológico. O efeito principal, entretanto, é a redução da diferença da atividade metabólica das sementes mais e menos vigorosas, caracterizando a uniformidade de germinação.

Por envolver a absorção de água pela semente sob condições controladas, o condicionamento fisiológico ativa o metabolismo das sementes durante as fases I e II da embebição, sem que ocorra a protrusão da raiz primária (fase III) (BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). Sendo assim, a digestão das reservas, sua translocação e assimilação são ativadas para que as sementes componentes do lote alcancem estado metabólico relativamente uniforme, quando o acesso à água é interrompido. Conforme destacaram Heydecker e Gibbins (1977) e Marcos Filho (2015), uma vez que o condicionamento fisiológico dá à semente condições para iniciar o processo germinativo, mas não para sua conclusão, a técnica possibilita que sementes menos vigorosas ‘alcancem’ as de maior vigor, visto que estas últimas estarão estagnadas próximo do final do processo, sem concluí-lo. Desta forma, a germinação é praticamente instantânea após o condicionamento fisiológico, tendo como efeito principal a redução da diferença da atividade metabólica das sementes mais e menos vigorosas, caracterizando a uniformidade de germinação.

A técnica pode ser aplicada por meio de várias formas, como imersão direta em água, umedecimento de substratos para embebição e contato com substâncias que realizam o osmocondicionamento. Este último se baseia na hidratação da semente de maneira equilibrada, utilizando soluções de baixo potencial hídrico. O composto utilizado deve ser quimicamente inerte, mas osmoticamente ativo, como o NaCl, KNO₃, MgSO₄ e polietileno glicol (PEG), em temperaturas e períodos definidos (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016).

Para uma absorção de água suficiente para a ocorrência dos processos fisiológicos iniciais da germinação, é necessário que a água seja absorvida de forma equilibrada, e que a absorção seja interrompida quando ocorre o equilíbrio entre o potencial osmótico da solução e das sementes (ALMEIDA *et al.*, 2016; MARCOS FILHO, 2015). Em seguida, estas sementes podem ser secadas até atingir a umidade com valor igual ao anterior ao condicionamento, o que possibilita que as sementes sejam armazenadas por um determinado tempo até a semeadura (WOJTYLA *et al.*, 2016).

Com a reestruturação do sistema de membranas durante o condicionamento, ocorre a manutenção da permeabilidade seletiva. As membranas restruturadas não permitem a entrada rápida de água e nem a liberação excessiva de exsudados (RIBEIRO *et al.*, 2019). De acordo com Nascimento *et al.* (2009), o condicionamento pode provocar alterações no estado energético da água, modificando sua distribuição entre os vários sítios de ligação de diferentes tecidos. Essa redistribuição de água no interior das sementes pode ser uma das razões para a maior velocidade de germinação após o tratamento. Isso porque há maior disponibilidade de água e aumento do nível de hidratação das macromoléculas que participam do processo germinativo, reduzindo também, a disponibilidade da ocorrência de injúrias durante a embebição (RIBEIRO *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que, para que haja sucesso, alguns fatores devem ser manuseados cuidadosamente como temperatura, luz, concentração da solução, período de duração do tratamento, o tipo de soluto a ser utilizado, o método e tempo de secagem após o condicionamento. Tais fatores variam consideravelmente dependendo da espécie que será trabalhada, do lote, das condições edafoclimáticas, do tamanho e tratamento que as sementes irão receber, desde a época de sua produção e ao longo de sua vida (CARDOSO *et al.*, 2015).

As atividades metabólicas durante o condicionamento incluem o reparo de outras macromoléculas, do mRNA e de enzimas hidrolíticas, que atuam durante a mobilização de reservas (PILL, 1995; MARTÍNEZ, 2013). Pill (1995) destacou a importância dos efeitos do condicionamento fisiológico sobre os ajustes do potencial osmótico celular, o acréscimo do

turgor radicular e a ação de enzimas que provocam o enfraquecimento de tecidos que restringem a expansão da radícula durante a germinação.

Além disso, o tipo de soluto utilizado pode influenciar no sucesso do tratamento, sendo que o melhor agente condicionante varia entre as espécies (OLIVEIRA, 2016). Vários agentes condicionantes podem ser utilizados no condicionamento fisiológico das sementes, dentre eles, a melatonina, ácido indolilacético (AIA), óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e quitosana (KAISER *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2016).

Um dos principais efeitos benéficos do condicionamento, relatado por diferentes autores, é conferir resistência a estresses abióticos como deficiência hídrica, aumento da concentração salina, estresse por altas temperaturas e tolerância a metais pesados (BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; BARBIERI *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019; SABERALI *et al.*, 2019).

2.3 Estresses abióticos em plantas

Plantas estão sujeitas a vários fatores abióticos, como frio, seca, estresse salino, dentre outros, que contribuem significativamente para a distribuição espacial e produtividade das culturas (AGARWAL *et al.*, 2006). Além da distribuição geográfica, as condições climáticas também influenciam sobremaneira na época em que as culturas serão semeadas, muitas vezes limitando o período favorável para o desenvolvimento das culturas. A água é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (SOUZA *et al.*, 2001), atua como solvente de minerais e solutos, além de ser fundamental na fotossíntese e na hidrólise do amido em açúcar, ainda possui um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

As plantas são organismos sésseis que têm desenvolvido mecanismos de respostas que conferem características de tolerância a estresses. Essas características facilitam a sobrevivência das plantas em diferentes condições ambientais e em uma ampla faixa de amplitude térmica. Estresses ambientais podem afetar quase todos os seus aspectos do crescimento e desenvolvimento, o que resulta em importantes mudanças na morfologia e fisiologia das plantas. Conseqüentemente, vias de sinalização específicas são disparadas e causam variações na expressão genética e no metabolismo das mesmas, tendo como resposta ao estresse um processo altamente dinâmico, dependente de muitos fatores.

Na tentativa de aumentar a tolerância das plantas aos diferentes estresses ambientais, surge o interesse pela utilização de substâncias que promovam essa tolerância. Dentre essas substâncias, a melatonina é uma molécula descrita como promotora de tolerância a estresses em plantas (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014). Sua síntese é induzida nos vegetais, quando estes estão expostos a estresses bióticos e abióticos. O estresse oxidativo é limitado pela indução da expressão de genes relacionados a estresses, redução da peroxidação lipídica e dos níveis de H_2O_2 , além de maior expressão do sistema antioxidante enzimático (ZHANG *et al.*, 2014; REITER *et al.*, 2015). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um derivado do triptofano, é onipresente nos organismos vivos e é relatado ter um papel semelhante ao hormônio em várias espécies de plantas (HARDELAND *et al.*, 2016; NAWAZ *et al.*, 2016).

Este hormônio atua como um neurotransmissor em mamíferos, porém, sua presença e potencial papel nas plantas foi relatado recentemente (ARNAO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). Nas plantas, a melatonina está envolvida em múltiplos processos fisiológicos, incluindo crescimento e fotossíntese, ritmos biológicos, germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, além da osmorregulação (TAN *et al.*, 2013). Sua capacidade de proteção contra tensões abióticas e bióticas tem sido relatada em situações de baixas temperaturas de germinação (LEI *et al.*, 2004), restrição hídrica (WANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013), e contaminação por metais pesados (XU *et al.*, 2010). Em várias pesquisas tem sido observado que a melatonina é um regulador de crescimento de plântulas e plantas. Seu modo de ação é ativado quando da interação com outros fito-hormônios derivados do corismato, incluindo ácido indol-3-acético (IAA) e ácido salicílico (WANG *et al.*, 2009). Tendo como principal função a ativação do sistema antioxidante, a melatonina altera os níveis de expressão gênica de vários genes que atuam em diferentes mecanismos fisiológicos (TAN *et al.*, 2013; GALANO *et al.*, 2011).

Além da melatonina, em alguns estudos tem sido relatado que o ácido indol-3-acético (AIA), atua na ativação do metabolismo energético central das células (BIANCO *et al.*, 2006a), auxiliando na proteção destas contra vários estresses abióticos, como UV, salinidade e restrição hídrica (BIANCO *et al.*, 2006b).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto geralmente encontrado como subproduto na planta, durante o ciclo de vida normal (GILL; TUTEJA, 2010). No entanto, sabe-se que desempenha um papel vital na tolerância ao estresse, atuando como um mensageiro secundário quando seu nível se apresenta em baixa concentração (YOU; CHAN, 2015;

FAROOQ *et al.*, 2017). Além disso, atua na sinalização da regulação de enzimas antioxidantes via sinalização ABA (SAXENA *et al.*, 2016).

Embora o papel do peróxido de hidrogênio na resposta fisiológica, sob condições de estresse, já tenha sido relatado em diferentes estudos (TENA *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2016; JAGODZIK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019), a eficácia do H₂O₂ no desencadeamento da tolerância ao estresse em sementes ainda é inconclusiva. Uma ampla gama de concentrações de peróxido de hidrogênio já foram utilizadas e os resultados variaram entre as espécies, bem como o método de aplicação. No entanto, em nenhum dos trabalhos foi testada a aplicação via condicionamento fisiológico, e posterior efeito em diferentes condições de estresse, como proposto neste estudo.

Assim como para o peróxido de hidrogênio, para o nitroprussiato de sódio (ON) há escassez de trabalhos sobre a forma como age nas sementes submetidas ao condicionamento fisiológico. Porém, o seu efeito sobre o processo germinativo de sementes já foi comprovado em diversos trabalhos, demonstrando que é eficiente na superação de dormência de sementes de várias espécies, dentre elas, a de alface (BELIGNI; LAMATTINA, 2000), cevada (BETHKE *et al.*, 2004), *Arabidopsis* (BETHKE; LIBOUREL; JONES, 2006; LIBOUREL *et al.*, 2006) e *Paulownia tomentosa* (GIBA *et al.*, 1998). O nitroprussiato de sódio é um composto químico de fórmula Na₂[Fe (CN)₅NO]·2H₂O que serve como fonte de óxido nítrico (ON). A aplicação de doadores de ON também faz com que as sementes germinem em maior quantidade e mais rápido (ATAÍDE *et al.*, 2015; KAISER *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2016), e ainda aumenta a atividade de enzimas do sistema antioxidante (SILVA *et al.*, 2019).

O ON também é capaz de diminuir os efeitos do envelhecimento das sementes armazenadas (PEREIRA *et al.*, 2014) assim como aumenta a tolerância da semente aos diversos estresses abióticos, como estresse hídrico, salino e por metais pesados (SILVA *et al.*, 2015; KAISER *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2016). O estresse oxidativo, provocado pelo aumento da concentração de superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos de alquila, pode ser combatido pelo óxido nítrico, uma vez que ele possui propriedades antioxidantes (SILVA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2016).

Além disso, o ON pode reagir com tirozinases pelo processo de nitratação, ou com os resíduos de tiol pela oxidação. Na presença de metais de transição, como ferro, cobre ou zinco, o ON pode interagir para formar complexos metal-nitrosil. Estes complexos podem estar relacionados aos efeitos regulatórios dos fatores de transcrição do ON e certas enzimas (SILVA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2016). A tolerância aos diferentes tipos de estresse se dá pelo estímulo

à atividade de uma ou mais enzimas do sistema antioxidante como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX), diminuindo a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SILVA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2016).

Outro composto relatado que pode induzir tolerância a estresses abióticos é a quitosana. Esta é um polímero linear de 3-(1,4) -glucosamina produzido pela desacetilação da quitina, sendo um componente estrutural importante na constituição de várias paredes celulares (RADMAN *et al.*, 2003). Um dos mais importantes efeitos da quitosana em plantas é o estímulo da germinação em sementes. Em amendoim, sementes revestidas com quitosana, apresentaram aumento no metabolismo para produção de energia durante o processo germinativo, resultando em maiores valores de germinação (ZHU *et al.* 2002).

2.4 Germinação de sementes sob condições de estresses abióticos

O crescimento e o desenvolvimento das plantas podem ser inibidos ou atrasados pela presença de um ou mais tipos de estresses abióticos. Estes são regulados por interações complexas entre vários hormônios, o que é crítico em diferentes estágios de desenvolvimento. Alguns dos principais aspectos do crescimento incluem desenvolvimento de sementes, sua germinação e sobrevivência das plantas em condições desfavoráveis (VISHAL; KUMAR, 2018), sendo a germinação das sementes a etapa mais crucial, uma vez que garante a sobrevivência da próxima geração.

As plantas, sendo organismos sésseis, precisam integrar sinais internos e externos para produzir a resposta correta. Para isso desenvolveram mecanismos que permitem que a germinação das sementes seja parada sob condições de estresse, e depois retomada quando as condições são favoráveis (DASZKOWSKA, 2011).

Salinidade e déficit hídrico são os principais estresses abióticos que afetam a produtividade das culturas ao redor mundo, especialmente nas regiões áridas e semiáridas (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016). Esses fatores interferem diretamente na germinação das sementes e, com isso, no crescimento da cultura, limitando o desempenho máximo da produção (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016).

A germinação é um estágio crítico no ciclo de vida das plantas, e o movimento da água que ocorre através dos tecidos da semente, é necessário para o acionamento adequado do processo de germinação (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016; SANTOS *et al.*, 2016). Esse movimento depende da presença de um gradiente de potencial hídrico, que é reduzido

quando há presença de sais, sendo que esta presença pode, eventualmente, restringir a absorção de água das sementes (PEREIRA *et al.*, 2014). Essas condições de estresse diminuem a velocidade de emergência e de desenvolvimento de plântulas, afetam o número de folhas, sementes por planta, tamanho e massa de sementes (JOSÉ *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; BARBIERI *et al.*, 2019).

Em regiões com essas adversidades recorrentes, a absorção de água pelas sementes durante o processo de germinação, é dificultada pela negatividade do potencial matricial do solo (SANTOS *et al.*, 2016). Podem ocorrer também, efeitos tóxicos nas sementes em processo de germinação, que levam a alterações no metabolismo celular, redução na porcentagem e velocidade de germinação, além de mudanças no desenvolvimento e crescimento de plantas (PELEGRINI *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2016).

A germinação de sementes em substratos salinizados e com restrição hídrica são possíveis métodos promissores para se determinar a tolerância das plantas ao excesso de sais e déficit hídrico no campo (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016; JOSÉ *et al.*, 2016). Um dos métodos usados para determinar a tolerância de uma planta ao déficit hídrico é avaliar a capacidade de germinação, com o uso de polietilenoglicol (PEG) (MASETTO *et al.*, 2013). Este é um composto inorgânico que reduz o potencial osmótico da solução e impõe uma condição de dificuldade para absorção de água, resultando assim, no estresse por déficit hídrico. Vale ressaltar, que essa ação do PEG não resulta em intoxicação causada pelo composto.

Para a sinalização do estresse hídrico também são utilizadas soluções salinas, já que as respostas das plantas à seca e à salinidade estão intimamente relacionadas. Em ambos os estresses, os mecanismos se sobrepõem, o que indica que sejam percebidos pelas células como um evento de privação de água (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016). Porém, a salinidade não atua apenas por restringir a absorção de água e causar estresse hídrico, mas também causa toxicidade, devido aos íons Na^+ e Cl^- (LIANG *et al.*, 2018). A presença desses íons cria um desequilíbrio iônico no citoplasma celular, que pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio, as quais causam peroxidação lipídica da membrana, danos ao DNA, desnaturação de proteínas, oxidação de carboidratos e diminuição da atividade enzimática (LIANG *et al.*, 2018).

Por reduzir o tempo de germinação e padronizar este processo, o condicionamento fisiológico propicia mais tolerância sob condições desfavoráveis no campo e diminui os efeitos das variações ambientais. Isso permite que a germinação ocorra em variáveis condições de temperatura, luz, solo e disponibilidade de água, e possibilita ainda, o desenvolvimento da parte aérea e aceleração do crescimento das plantas (ZHENG *et al.*, 2016; BONOME *et al.*, 2017;

BATISTA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). Como esses processos iniciais da germinação são ativados ainda em condições ótimas, a técnica fornece uma vantagem às sementes, quando estas forem expostas às condições adversas de salinidade e déficit hídrico.

O estresse causado por temperaturas altas geralmente ocorre durante um período de tempo suficiente para provocar danos irreversíveis no crescimento e desenvolvimento da planta. A extensão em que isto ocorre em zonas climáticas específicas, depende da probabilidade e período de temperaturas elevadas, durante o dia e/ou noite. A tolerância ao calor é geralmente definida como a capacidade da planta para crescer e produzir sob altas temperaturas (PEET; WILLITS, 1998).

As altas temperaturas prejudicam o processo germinativo, no entanto, não existem relatos sobre em qual fase do processo de germinação essas são mais prejudiciais. Também não se sabe ao certo, quais mecanismos podem prejudicar a germinação nessas condições.

Na fase de germinação das sementes, os carboidratos armazenados no endosperma constituem a principal fonte de energia para o processo germinativo e o crescimento inicial das plântulas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Quando essas plântulas são submetidas a altas temperaturas, a eficiência do uso dos carboidratos armazenados é função da tolerância ao calor de cada genótipo. Essa eficiência é traduzida pelo menor consumo de carboidratos no processo respiratório, o que proporciona maior acúmulo de massa seca na plântula (BLUM; SINMENA, 1994).

De acordo com Levite (1982) citado por Blum e Sinmena (1994), o maior dano à produtividade da planta sob estresse por calor, é atribuído à ‘fome’ de carbono devido a interrupção do processo fotossintético e agravada com a perda desse elemento pela elevada taxa de respiração.

Nesse contexto, existem evidências de que a tolerância ao calor da planta adulta está associada com a tolerância no estágio de plântula (BLUM; SINMENA, 1994). Cargnin *et al.*, (2006) trabalharam com sementes de oito genitores e oito populações segregantes (geração F₃) de trigo, e concluíram que a alta temperatura na fase de germinação, ocasiona redução da massa seca de plântula e da eficiência de uso do endosperma. Além disso, afirmam que há tolerância ao estresse ao calor entre as populações e entre os genitores na fase de germinação.

Em climas tropicais, as altas temperaturas e o excesso de radiação solar são muitas vezes os fatores mais limitantes que afetam o crescimento da planta e produção de sementes. Altas temperaturas podem causar consideráveis danos pré e pós-colheita (GUILIONI *et al.*, 1997; ISMAIL; HALL, 1999; VOLLENWEIDER; GUNTARDT-GOERG, 2005). Da mesma

forma, nas regiões temperadas, o estresse ao calor tem sido relatado como uma das mais importantes causas de redução da produção de matéria seca e de rendimento em muitas culturas (GIAVENO; FERRERO, 2003).

Os metais bioativos com base em suas propriedades físico-químicas, são divididos em dois grupos: metais redox, como Cr, Cu, Mn e Fe, e metais não-redox, como Cd, Ni, Hg, Zn e Al. Os metais redox podem gerar diretamente lesões oxidativas nas plantas por meio das reações de Haber-Weiss e Fenton, o que leva à produção de EROS, resultando em estresse oxidativo, via desequilíbrio entre a homeostase pró-oxidante e antioxidante (JOZEFCZAK *et al.*, 2012). Por outro lado, metais não redox atuam indiretamente como estressores oxidativos por vários mecanismos, incluindo a depleção da glutatona, ligando-se a grupos sulfidril de proteínas, inibindo enzimas antioxidantes ou induzindo enzimas produtoras de ROS como NADPH oxidases (BIELEN *et al.*, 2013). Assim, altas concentrações de contaminantes afetam as plantas, desde os níveis moleculares até os fisiológicos. No entanto, os mecanismos envolvidos nesses processos não são bem compreendidos.

Considerando que o termo ‘metal pesado’ geralmente está associado com toxidez e poluição, é recomendável que se diferencie os elementos que são essenciais, como por exemplo Cobre, Zinco, Cobalto, Selênio, Ferro, Manganês, Molibdênio etc., daqueles não essenciais e tóxicos ao ambiente como Chumbo, Cádmio, Mercúrio, Arsênio, ainda que todos sejam classificados como metais pesados (OLIVEIRA, 2008). A poluição ou contaminação de solos agrícolas com metais pesados, preocupa, quando se considera a possibilidade de transferência dos mesmos do solo para a cadeia alimentar do homem (VOLESKY, 1990).

Muitos destes metais, como o Cobalto, Zinco, Cobre e Níquel são essenciais para o crescimento de organismos eucariotos e/ou procariotos, sendo exigidos em concentrações muito pequenas. Outro, contudo, como o Cádmio, não é essencial para o crescimento celular, sendo extremamente tóxico mesmo em baixas concentrações (VOLESKY, 1990).

O cádmio é considerado um dos metais mais tóxicos, uma vez que apresenta efeito sobre todos os processos biológicos de animais e plantas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000). O cádmio chega ao meio ambiente pela ação antrópica, sendo que as contaminações em solos, ocorrem por adição de resíduos da fabricação do cimento, pelas cinzas produzidas pela queima de combustíveis fósseis e lixos urbanos, desgaste de pneus, rejeitos de mineradoras e fundições, utilização de fertilizantes fosfatados, uso de dejetos suínos como fertilizantes, dentre outras (SALGADO, 1996).

Sabe-se que, quando sementes são postas à germinação em ambientes com altos níveis de Cádmio, a atividade das enzimas α e β amilase são significativamente reduzidas, comprometendo a respiração (CHUGH; SAWHNEY, 1996), resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000).

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da pecuária no Brasil, relatório anual, 2022**. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 25 maio 2022.
- ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. **Anuário 2018**. Disponível em: http://www.abrasem.com.br/wpcontent/uploads/2020/06/Arte_Anuario2018_COMPLETO_WEB.pdf. Acesso em: 12 jan. 2022.
- AGARWAL, S. *et al.* Role of ABA, salicylic acid, calcium, and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. **Plant Science**, [S.l.], v. 169, p. 559-570, 2005.
- ALMEIDA, A.S. *et al.* Protrusão da radícula e métodos para superação de dormência de sementes de trigo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.15, n.3, p.271-276, 2016.
- ARNAO, M.B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress. **Trends Plant Sci.**, [S.l.], v. 19, p. 789–797, 2014.
- ATAÍDE, G.M. Óxido nítrico na germinação de sementes de baixo vigor de *Dalbergia nigra*. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 38, n. 3, p. 438-444, 2015.
- BARBIERI, G.F. *et al.* Seed germination and initial growth of quinoa seedlings under water and salt stress. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 11, n. 15, p. 153-161. 2019.
- BATISTA, T.B. *et al.* Priming of braquiária seeds with different sugar sources and concentrations. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 843-849, 2018.
- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, Berkeley, v. 210, n. 2, p. 215-221, 2000.
- BETHKE, P.C. *et al.* Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, Berkeley, v. 219, n. 5, p. 847-855, 2004.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 57, n. 3, p. 517-526, 2006.
- BHANUPRAKASH, K.; YOGESHHA, H.S. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. *In: Abiotic stress physiology of horticultural crops*, New Delhi, 2016. p. 103-117.
- BIANCO, C. *et al.* Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. **Archives of Microbiology**, [S.l.], v. 185, p. 373-382, 2006a.
- BIANCO, C. *et al.* Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. **Microbiology Sgm.**, [S.l.], v. 152, p. 2421-2431, 2006b.

BIELEN AA, VERHAART MR, VAN DER OOST J & KENGEN SW. Biohydrogen Production by the Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: Current Status and Perspectives. **Life**, [S.l.], p. 52-85, 2013.

BLUM, A.; SINMENA, B. Wheat seed endosperm utilization under heat stress and its relation to thermotolerance in the autotrophic plant. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 185-191, 1994.

BONOME, L.T. *et al.* Osmoconditioning of *Urochloa brizantha* seeds to reduce pelleting negative effects. Brazilian. **Journal of Agriculture-Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 92, n. 2, p. 87-100, 2017.

BONOME, L.T.S.; GUIMARÃES, R.M.; OLIVEIRA, J.A.; ANDRADE, V.C.; CABRA, P. S. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Braquiária brizantha* cv. Marandu. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 422-428, 2006.

BUCKERIDGE, M.S. *et al.* Mobilização de Reservas. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. FERREIRA, A.; BORGHETTI, F (Eds.). Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-185.

CARGNIN, A.; SOUZA, M.A.; CARNEIRO, P.C.S.; SOFIATTI, V. Interação entre genótipos e ambientes e implicações em ganhos com seleção em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.l.], v. 41, p. 987-993, 2006.

CARDOSO, E.D.; SÁ, M.E.; HAGA, K.I.; BINOTTI, F.F.S.; COSTA, E. Qualidade fisiológica e composição química de sementes de *Braquiária brizantha* em função do condicionamento osmótico. **Revista de Agricultura Neotropical**, [S.l.], v. 2, p. 42-48, 2015.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, London, v. 92, p.1-5, 1996.

DASZKOWSKA-GOLEC, A. Arabidopsis seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormones. Omics. **Journal of Integrative Biology**, [S.l.], v. 15, n. 11, p. 763-774, nov. 2011.

FAROOQ, M. *et al.* Foliage- applied sodium nitroprusside and hydrogen peroxide improves resistance against terminal drought in bread wheat. **Journal of Agronomy and Crop Science**. [S.l.], v. 203, p. 473-482, 2017.

GADJEV, I. *et al.* Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, [S.l.], v. 270, p. 87-144, 2008.

GALANO, A.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **J. Pineal Res.**, [S.l.], v. 51, p. 1-16, 2011.

GIAVENO, C.; FERRERO, J. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, p. 89-94, 2003.

- GIBA, Z. *et al.* Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regulation**, Dresden, v. 2, n. 3, p. 175-181, 1998.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, p. 909-930, 2010.
- GUILIONI, L.; WERY, J.; TARDIEU, F. Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs. **Annal of Botany**, London, v. 80, p. 159-168, 1997.
- GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics**, London, 2014. 18 p.
- HARDELAND, H. Melatonin in plants—diversity of levels and multiplicity of functions. **Front. Plant Sci.**, [S.l.], v. 7, p. 198, 2016.
- HEYDECKER, W.; GIBBINS, B.M. The 'priming' of seeds. *In: Symposium on Seed Problems in Horticulture*, Sutton Bonington, v. 83, p. 213-224, 1977.
- ISMAIL, A.M.; HALL, A.E. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. **Crop Science**, [S.l.], v. 39, p. 1.762-1.768, 1999.
- JAGODZIK, P. TAJDEL-ZIELINSKA, M.; CIESLA, A.; MARCZAK, M.; LUDWIKOW, A. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. **Front Plant Sci.**, [S.l.], v. 8, n. 9, p. 1387, oct. 2018.
- JOSÉ, A.C. *et al.* Influence of priming on Eucalyptus spp. seeds tolerance to salt stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 329-334, 2016.
- JOZEFCAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.l.], v. 13, 2012.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press, 2001. 413 p.
- KAISER, I.S. *et al.* Efeito de liberadores de óxido nítrico na qualidade fisiológica de sementes de repolho sob salinidade. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 1, p. 39-45, 2016.
- KERCHEV, P. *et al.* Molecular *priming* como uma abordagem para induzir tolerância contra estresses abióticos e oxidativos em plantas cultivadas. **Biotechnologia Adv**, 2020.
- LEI, X.Y.; ZHU, R.Y.; ZHANG, G.Y.; DAI, Y.R. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. **J. Pineal Res.**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 126-131, 2004.
- LIANG, W.; MA, X.; WAN, P.; LIU, P. Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochem Biophys Res Commun.**, [S.l.], v. 495, n. 1, 286-291, 2018.

- LIBOUREL, I.G. *et al.* Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. **Planta**, Berkeley, v. 223, n. 4, p. 813-820, 2006.
- LIU, L. *et al.* Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. **Frontiers in Plant Science**, Parkville, v. 9, p. 275, 2018.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.
- MARTINEZ, P.A.H. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de repolho (*Brassica oleraceae* Var. *Capitata*) osmocondicionadas**. 2013. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- MASETTO, T.E. *et al.* Germinação de sementes de *Urochloa ruziziensis* em função da disponibilidade hídrica do substrato e teor de água das sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 385-391, 2013.
- NASCIMENTO, W.M. *et al.* Germinação de sementes de cenoura osmoticamente condicionadas e pelletizadas com diversos ingredientes. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 27, n. 1, p. 12-16, 2009.
- NAWAZ, M.A. *et al.* Melatonin: current status and future perspectives in plant science. **Front. Plant Sci.**, [S.l.], v. 6, p. 1230, 2016.
- OLIVEIRA, L.R. **Metais pesados e atividade enzimática em latossolos tratados com lodo de esgoto e cultivados com milho**. 2008. 108 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008.
- OLIVEIRA, A.S. **Condicionamento fisiológico de sementes de tabaco**. 60 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- PEET, M.M.; WILLITS, D.H. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 92, p. 191-202, 1998.
- PELEGRINI, L.L. *et al.* Efeito do estresse hídrico simulado com NaCl, manitol e PEG (6000) na germinação de sementes de *Erythrina falcata* Benth. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 511-519, 2013.
- PEREIRA, M.R.R. *et al.* Estresse hídrico induzido por soluções de PEG e de NaCl na germinação de sementes de nabiça e fedegoso. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 687-696, 2014.
- PEREIRA, S.R. *et al.* Priming of *Urochloa brizantha* cv. Xaraés seeds. **African Journal of Agriculture Research**, Pretoria, v. 13, n.1, p. 2804-2807, 2018.

- PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B. *et al.* ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Front Plant Sci.**, [S.l.], v. 18, n. 6, p. 69, feb. 2015.
- PILL, W.G. Low water potential and presowing germination treatments to improve seed quality. 1st Edition. **Seed quality**. eBook: CRC Press, 1955. 412 p.
- PIRES, R.M.O.; SOUZA, G.A.; CARDOS, A.A.; DIAS, D.C.F.S.; BORGES, E.E.L. Action of nitric oxide in sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) submitted to stress by cadmium. **Journal of Seed Science**, [S.l.], v. 38, p. 22-29, 2016.
- RADMAN, R. *et al.* Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 91-102, 2003.
- REITER, R.J.; TAN, D.X.; ZHOU, Z.; CRUZ, M.H.C.; FUENTES-BROTO, L.; GALANO, A. Phyto-melatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 7396-7437, 2015.
- RIBEIRO, E.C.G. *et al.* Physiological quality of *Urochloa brizantha* seeds submitted to priming with calcium salts. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, 2019.
- SABERALI, S.F.; MORADI, M. Effect of salinity on germination and seedling growth of *Trigonella foenum-graecum*, *Dracocephalum moldavica*, *Satureja hortensis* and *Anethum graveolens*. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, Riyadh, v. 18, n. 3, p. 316-323, 2019.
- SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos Metais. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.
- SANTOS, C.A. *et al.* Germinação de duas espécies da caatinga sob déficit hídrico e salinidade. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 36, v. 87, p. 219-224, 2016.
- SAXENA, J.; SHARMA, K.P.; SHARMA, M.M.; SINGH, A. Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial properties. **SpringerPlus**, [S.l.], v. 5, p. 861, 2016.
- SILVA, S.F.; FERRARI, J.L. Descrição botânica, distribuição geográfica e potencialidades de uso da *Braquiária brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) Stapf. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14. p. 302, 2012.
- SILVA, A.L.D. *et al.* Effect of sodium nitroprusside (SNP) on the germination of *Senna macranthera* seeds (DC. ex Collad.) HS Irwin & Baneby under salt stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 236-243, 2015.
- SILVA, A.L.D. *et al.* Effect of cyanide by sodium nitroprusside (SNP) application on germination, antioxidative system and lipid peroxidation of *Senna macranthera* seeds under saline stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 1, p. 86-96, 2019.
- SOUZA, F.H.D. **Produção de sementes de gramíneas forrageiras tropicais**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2001. 43 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 719 p.

TAN, D.X. *et al.* Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **J. Pineal Res.** [S.l.], v. 54, n. 2, p. 127-138, 2013.

TENA, G.; ASAI, T.; CHIU, W.L.; SHEEN, J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Curr Opin Plant Biol**, [S.l.], v. 4, p. 392-400, 2001.

VALE, A.R.V.; PEREIRA, W. Disputas e barreiras não-tarifárias no comércio agrícola: as exportações de carne bovina brasileira entre 2006 e 2015. **Revista Brasileira de Políticas Públicas e Internacionais-RPPI**, v. 3, n. 2, p. 01-28, 2019.

VARIER, A. *et al.* The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Bangalore. v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VISHAL, B.; KUMAR, P.P Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 9, p. 838, 2018.

VOLLENWEIDER, P.; GUNTARDT-GOERG, M.S.) Diagnosis of Abiotic and Biotic Stress Factors Using the Visible Symptoms in Foliage. **Environmental Pollution**, [S.l.], v. 137, p. 455-465, 2005.

VOLESKY, B. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. *In*: VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. cap.1.2, p. 7-43.

WANG, F.; ZENG, B.; SUN, Z.; ZHU, C. Relationship between proline and Hg+2 – induced oxidative stress in tolerant rice mutant. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [S.l.], v. 56, p. 723-731, 2009.

WANG, P. *et al.* Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. **J. Pineal Res.**, [S.l.], v. 54, n. 3, p. 292-302, 2013.

WANG, Q. *et al.* Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in Arabidopsis. **Front. Plant Sci.** 7, 1882, 2016.

WOJTYLA, L.; LECHOWSKA, K.; KUBALA, S.; GARNCZARSKA, M. Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. **Front Plant Sci**, [S.l.], v. 7, p. 66.69, 2016.

XU, S.C. *et al.* Melatonin protects against Nickel-induced neurotoxicity in vitro by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function. **J Pineal Res.**, [S.l.], v. 49, n. 1, p. 86-94, 2010.

YOU, J.; CHAN, Z. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. **Front Plant Sci.**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 1092, dec. 2015.

ZHENG, M. *et al.* Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 78, n. 2, p.167-178, 2016.

ZHANG, M.; DONG, H.; ZHAO, L.; WANG, D.; MENG, D. A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 670, p. 110-121, jun. 2019.

ZHANG, H.J.; ZHANG, N.; YANG, R.C.; WANG, L.; SUN, Q.Q.; LI, D.B. *et al.* Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **J. Pineal Res.** [S.l.], v. 57, p. 269–279. 2014.

ZHANG, N. *et al.* Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **J. Pineal Res.**, [S.l.], v. 54, p. 1, p. 15-23, 2013.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.

CAPÍTULO 2 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA A RESTRIÇÃO HÍDRICA E SALINA EM SEMENTES DE *UROCHLOA RUZIZIENSIS* COM O USO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS

RESUMO

O Brasil se destaca na produção de sementes de braquiária sendo o maior consumidor, produtor e exportador mundial. No entanto, seu cultivo abrange grandes áreas, expondo a espécie às adversidades ambientais, tais como, restrição hídrica e estresse salino. Diante disto, objetivou-se nessa pesquisa avaliar a eficiência de moléculas sinalizadoras associadas ao condicionamento fisiológico na indução de tolerância à restrição hídrica e estresse salino em sementes de *Urochloa ruziziensis* cv. Ruziziensis. O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes da Universidade Federal de Lavras. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5x3+1 sendo 5 moléculas sinalizadoras (ácido indolacético, melatonina, quitosana, peróxido de hidrogênio, e nitroprussiato de sódio), 3 condições de germinação (água, salinidade com NaCl e restrição hídrica com PEG) mais um controle (sementes não condicionada). Determinou-se: teor de água após o condicionamento (antes de secagem) e após a secagem das sementes; primeira contagem de germinação; germinação aos sete e aos 21 dias após a semeadura; índice de velocidade de germinação; comprimento de plântulas e; análises da atividade das enzimas peróxido de hidrogênio, ascorbato peroxidase, catalase, superóxido dismutase além da peroxidação lipídica. Aplicação de moléculas sinalizadoras por meio da técnica de condicionamento foi eficiente em minimizar os efeitos negativos da salinidade e restrição hídrica. O condicionamento fisiológico foi eficiente para minimizar os efeitos do estresse salino. O condicionamento usando melatonina, quitosana ou peróxido de hidrogênio tem maior potencial para induzir tolerância à estresse salino em sementes de braquiária. O condicionamento foi eficaz em induzir a ativação do sistema antioxidante das sementes em resposta a estresses abióticos.

Palavras chaves: Braquiária. *Priming*. Melatonina. Nitroprussiato de sódio. Estresse abióticos.

INDUCTION OF WATER AND SALT RESTRICTION TOLERANCE IN UROCHLOA RUZIZIENSIS SEEDS USING SIGNALING MOLECULES

ABSTRACT

The Brazil stands out in the production of brachiaria seeds, being the largest consumer, producer and exporter in the world. However, its cultivation covers large areas, exposing the species to environmental adversities, such as water restriction and salt stress. In view of this, the objective of this research was to evaluate the efficiency of signaling molecules associated with physiological conditioning in inducing tolerance to water restriction and salt stress in seeds of *Urochloa ruziziensis* cv. *ruziziensis*. The experiment was installed and conducted at the Central Laboratory for Research in Seeds at the Federal University of Lavras. A completely randomized design with four replications was used. The treatments were arranged in a 5x3+1 factorial scheme, with 5 signaling molecules (indoleacetic acid, melatonin, chitosan, hydrogen peroxide, and sodium nitroprusside), 3 germination conditions (water, salinity with NaCl and water restriction with PEG) plus one control (unconditioned seeds). It was determined: Water content after conditioning (before drying) and after drying the seeds; first germination count, germination at seven and 21 days after sowing, germination speed index, seedling length, and analysis of the activity of the enzymes hydrogen peroxide, ascorbate peroxidase, catalase, superoxide dismutase in addition to lipid peroxidation. Application of signaling molecules through the conditioning technique was efficient in minimizing the negative effects of salinity and water restriction. Physiological conditioning was efficient to minimize the effects of saline stress. Conditioning using melatonin, chitosan or hydrogen peroxide has the greatest potential to induce salt stress tolerance in brachiaria seeds. Conditioning was effective in inducing activation of the antioxidant system in seeds in response to abiotic stresses.

Keywords: Brachiaria. *Priming*. Melatonin. Sodium nitroprusside. Abiotic stress.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais situações de estresse que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas em campo, estão a restrição hídrica e a salinidade. Esses fatores interferem diretamente na germinação das sementes e, com isso, no desenvolvimento da cultura, limitando a produção (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016). A baixa disponibilidade de água é um dos fatores que mais influenciam o desenvolvimento dos cultivos agrícolas. A restrição hídrica interfere no desenvolvimento das culturas, pois, além de afetar a produção das plantas, altera o metabolismo, diminui o potencial hídrico foliar e a perda de turgor, além de atuar no fechamento dos estômatos (JALEEL *et al.*, 2009). Além da restrição hídrica, outro fator que pode comprometer a germinação das sementes é a salinidade, que dificulta a cinética e a absorção de água, além de facilitar a entrada de íons tóxicos nas sementes (BRACCINI *et al.*, 1996).

Nesse contexto é importante o uso de técnicas que propiciem maior tolerância às condições desfavoráveis no campo, como o condicionamento fisiológico. Este permite que as etapas iniciais do processo germinativo sejam ativadas e reduzam os danos presentes nas células da semente, melhorando o vigor do lote (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016). Além disso, melhora o desempenho de sementes de baixa qualidade cuja germinação é inferior, proporcionando maior tolerância às condições desfavoráveis no campo, diminuindo os efeitos das variações ambientais, e possibilitando que a germinação ocorra em diferentes condições de temperatura, luz, solo e disponibilidade de água (ZHENG *et al.*, 2016; BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Associado ao condicionamento fisiológico, estudos relacionados à adaptação de culturas ao clima, com a utilização de moléculas que aumentam a tolerância ao estresse, são cada vez mais necessários para combater os efeitos negativos de ambientes desfavoráveis, principalmente relacionados ao processo germinativo de sementes e estabelecimento de plântulas. Várias moléculas naturais e produtos químicos sintéticos têm sido estudados com o intuito de induzir a tolerância ao estresse em plantas. Dentre estas moléculas podem ser citadas a melatonina, ácido indolilacético (AIA), óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e quitosana.

A ação destes produtos contra estresses abióticos parece estar associada aos mecanismos de defesa, ou seja, atuam como moléculas sinalizadoras da indução de rotas de proteção oxidativa.

Diante disto, objetivou-se nessa pesquisa, avaliar a eficiência de moléculas sinalizadoras associadas ao condicionamento fisiológico na indução de tolerância à restrição hídrica e estresse salino em sementes de *Urochloa ruziziensis* cv. Ruziziensis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes - LCPS do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, Minas Gerais. Foram utilizadas sementes de *Urochloa ruziziensis* cv. Ruziziensis, fornecidas pela empresa Sementes Mineirão Ltda.

As sementes de braquiária foram submetidas ao condicionamento fisiológico, realizado em BOD regulada a 25 °C (PEREIRA *et al.*, 2018), sem luz e adaptada com um compressor de ar, responsável pela aeração das soluções, pelo tempo de 24 horas. Como moléculas sinalizadoras foram utilizadas: ácido indolilacético (100 µM), peróxido de hidrogênio (100 µM), quitosana (0,75 mM), melatonina (1mM) e solução doadora de ON nitroprussiato de sódio (100µM). Foram colocados 40 gramas de sementes em 400 ml de solução. As sementes utilizadas como controle não foram condicionadas.

Após o condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente, secadas em estufa de circulação de ar por 24 horas a 25 °C e após esse período secadas a 35 °C com circulação de ar por mais 72 horas. O teor de água foi determinado logo após o condicionamento (antes da secagem) e após a secagem das sementes. Foram retiradas quatro repetições de 200 sementes de cada tratamento e submetidas à estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009).

As sementes condicionadas e não condicionadas (controle), foram submetidas a diferentes condições de germinação: condição sem estresse (água destilada), estresse salino induzido por meio de solução de NaCl, concentração de -0,4MPa (PEREIRA *et al.*, 2012) e finalmente, restrição hídrica induzida por polietileno glicol 6000 – PEG, -0,4MPa (PEREIRA *et al.*, 2012).

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, sobre duas folhas de papel mata borrão, que foram colocadas em caixas tipo gerbox. Os papéis foram umedecidos com volume de solução contendo as referidas soluções, equivalente a 2,5 vezes o peso seco do papel, e as caixas foram acondicionadas em câmaras tipo BOD com temperatura alternada 20-35 °C, com fotoperíodo de 8-16 horas. A primeira contagem do teste foi realizada aos 7 dias e a contagem final aos 21 dias após a semeadura (BRASIL, 2009). Concomitante ao teste de germinação foi realizado o índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962).

Para a análise de imagens, foram utilizadas quatro repetições de 25 plântulas. Estas foram obtidas a partir do teste de germinação em rolos, em que a semeadura foi realizada sobre duas folhas de papel germitest e sobrepostas com mais uma folha, as quais foram umedecidas

da mesma maneira e submetidas às mesmas condições citadas anteriormente. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos para evitar perda de umidade. As imagens das plântulas foram obtidas aos 7 dias após a instalação do teste, equivalente ao período de primeira contagem de germinação (BRASIL, 2009).

Para a captura das imagens foi utilizado o sistema GroundEye[®], versão S800, composta por um módulo de captação que possui uma bandeja de acrílico, uma câmera de alta resolução e um software integrado para avaliação. As plântulas foram retiradas do papel germitest e inseridas na bandeja do módulo de captação para a obtenção das imagens. Na etapa de configuração da análise foi utilizada a calibração da cor de fundo, índice de luminosidade, dimensão 'a' e dimensão 'b'. Depois da calibração da cor do fundo foi feita a análise das imagens e foram extraídos valores de comprimento da raiz e comprimento de parte aérea.

Para as análises bioquímicas foram utilizadas as plântulas obtidas na última contagem (21 dias), as quais foram armazenadas à temperatura de -80 °C até o momento das análises.

Para a extração das enzimas do sistema antioxidantes, foram macerados 200 mg de massa fresca em nitrogênio líquido com 10 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração [100 mM de fosfato de potássio, 0,1 mM de EDTA e 10 mM de ácido ascórbico]. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas conforme apresentado por Biemelt, Keetman e Albrecht (1998).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima inibir a redução fotoquímica do nitroazul de tetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Dez microlitros do extrato foram adicionados a 190 µL de solução tampão contendo 50 mM de fosfato de potássio, 14 mM de metionina, 0,1 mM de EDTA, 75 µM de NBT e 2 µM de riboflavina. Os tubos contendo o tampão juntamente com a amostra, e o controle (meio de incubação sem a amostra), foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20W por 7 minutos e as leituras realizadas a 560 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de SOD é definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do NBT.

Para mensurar a atividade da catalase (CAT), foram pipetados 9 µL do extrato aos quais foram adicionados 90 µL de solução de fosfato de potássio (200 mM) e 72 µL de água. A esta mistura, foram adicionados 9 µL de solução de peróxido de hidrogênio (250 mM). A atividade da CAT foi determinada pelo decréscimo dos valores em absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio (HAVIR;

MICHALE, 1987). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de CAT é definida pela quantidade de enzima necessária para decompor $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 .

Para analisar a atividade da ascorbato peroxidase (APX) foram adicionados $9 \mu\text{L}$ de extrato 162 na solução previamente aquecida em banho-maria a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo $90 \mu\text{L}$ de fosfato de potássio, $9 \mu\text{L}$ de ácido ascórbico, $63 \mu\text{L}$ de água e $9 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio na concentração de 2 mM . A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela diminuição da absorvância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm a cada 15 segundos durante 3 minutos (NAKANO; ASADA, 1981). Uma unidade de APX é definida pela quantidade de enzima que oxida $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido ascórbico.

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica, foram macerados 200 mg de massa fresca em nitrogênio líquido com 10 mg polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizados em $1,5 \text{ mL}$ de ácido tricloroacético a $0,1\%$ (TCA- $0,1\%$). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante foi coletado para realização das análises.

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada mediante a quantificação do malonaldeído (MDA), que é produzido pela reação de ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme método TBARS proposto por Buege e Aust (1978). Para uma alíquota de $125 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram adicionados $250 \mu\text{L}$ do meio de reação de ácido tiobarbitúrico $0,5\%$ (TBA) e ácido tricloroacético 10% (TCA). A mistura foi aquecida a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos e depois rapidamente esfriada em um banho de gelo. Posteriormente foi feita a leitura de absorvância a 535 nm e a 600 nm e a concentração do MDA calculada utilizando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para a quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizada uma alíquota de $45 \mu\text{L}$ do sobrenadante. Nela foram adicionados $45 \mu\text{L}$ do tampão fosfato de potássio (10 mM a pH $7,0$) e $90 \mu\text{L}$ de Iodeto de potássio (1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de peróxido de hidrogênio expressa em $\mu\text{mol de } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca (VELIKOVA *et al.*, 2000).

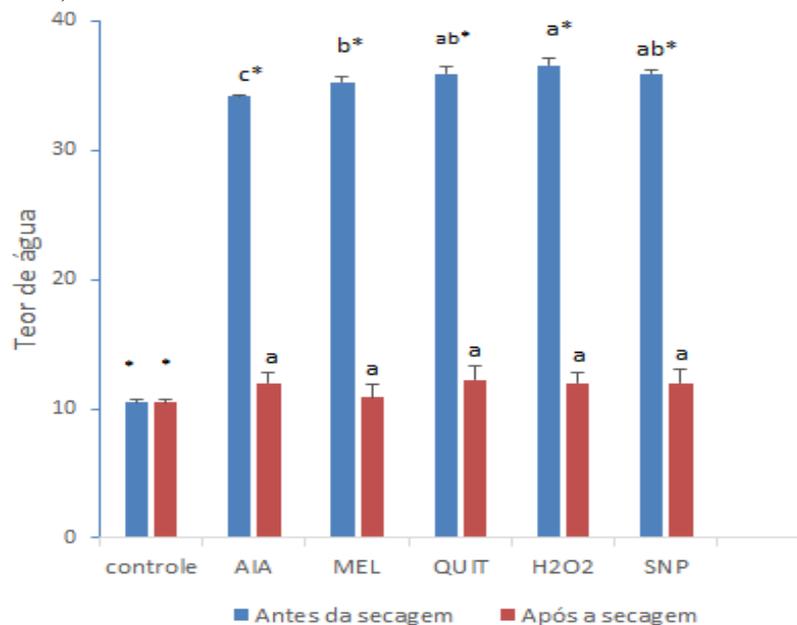
Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial $(5 \times 3) + 1$, sendo cinco moléculas condicionantes, três condições de germinação e um controle (sementes sem condicionamento). As médias foram submetidas a análise de variância e, quando significativas, foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade e para a comparação do controle com os tratamentos do fatorial foi realizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Para as análises bioquímicas, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Ressalta-se que cada repetição foi feita em triplicata, esquema fatorial (3x5), sendo três condições de germinação e cinco moléculas sinalizadoras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Figura 1, o teor de água em sementes de braquiária após o condicionamento fisiológico variou dependendo do agente condicionante usado. O condicionamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi o que resultou em maior teor de água comparado com os demais, sendo aquelas, tratadas com ácido indolilacético as com menor valor dentre os condicionantes (FIGURA 1). Após a secagem o teor de água variou de 11 a 13% independente da molécula condicionante (e controle), não havendo diferenças estatísticas entre estes (FIGURA 1). É importante ressaltar, que o teor de água adequado para conservação de sementes de braquiária e entre 10 e 12% (RIBEIRO *et al.*, 2019), valores que foram observados no presente trabalho após a secagem realizada ao final do condicionamento. Após o condicionamento, a secagem é realizada visando garantir o armazenamento das sementes até o momento da semeadura, sem que haja perdas dos benefícios obtidos durante os tratamentos (WOJTYLA *et al.*, 2016).

Figura 1 – Teor de água de sementes de *Uroclhoa ruziziensis*, antes e após a secagem após condicionamento fisiológico com soluções de ácido indolilacético, melatonina, quitosana, peróxido de hidrogênio, nitroprussiato de sódio ou não tratadas (controle).

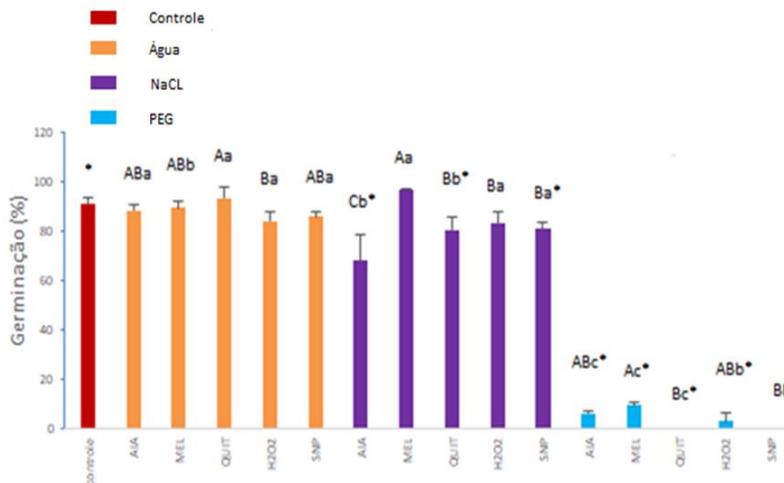


Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade* Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Quando em condição sem estresse, maiores valores de germinação (primeira contagem) foram observados em sementes condicionadas com melatonina e quitosana (FIGURA 2). Já quando as sementes condicionadas foram submetidas ao estresse por salinidade o tratamento com quitosana e peróxido de hidrogênio, o resultado foi de maiores percentuais de germinação na primeira contagem, havendo superioridade do tratamento controle sobre os demais nesta condição (FIGURA 2). A redução do vigor de sementes sob condição de salinidade é conhecida, e é causada não só pela dificuldade na absorção de água pela semente, mas também na absorção dos íons presentes no substrato, os quais interferem negativamente no metabolismo celular e consequentemente na germinação (MUNNS; TESTER 2008). Resultados similares têm sido observados em culturas como a do tomate (JÚNIOR *et al.*, 2020) verificaram redução na porcentagem de germinação de sementes de tomate em condições de estresse salino.

Figura 2 – Germinação (primeira contagem) sementes de *Urochloa ruziziensis* sob condições de estresse ou não, após condicionamento fisiológico em soluções de ácido indolacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H_2O_2), nitroprussiato de sódio (SNP) e não tratadas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

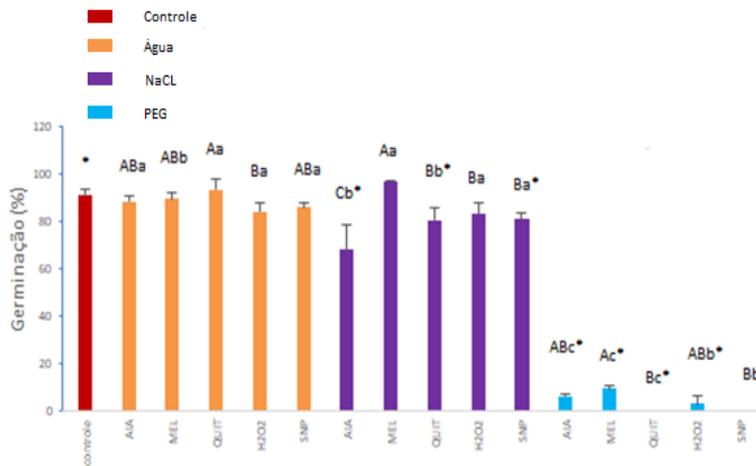
Não foi observada germinação das sementes quando sob déficit hídrico aos 7 dias após a semeadura, indicando que as moléculas sinalizadoras usadas não foram eficientes para induzir maior tolerância a este estresse (FIGURA 2). Esses resultados possivelmente devem estar relacionados tanto com o fato de, sob déficit hídrico, as sementes não foram capazes de absorver

quantidades de água necessárias para a ativação e manutenção do metabolismo para a germinação, mesmo quando tratadas (BEWLEY *et al.* 2013).

O aumento na qualidade, bem como a tolerância a estresses abióticos em sementes de forrageiras após o condicionamento, já foi relatado em trabalho de Silva *et al.* (2019). Oliveira *et al.* (2021) também relataram os benefícios da técnica para *U. ruziziensis*, quando foi observada maior germinação das sementes quando tratadas com nitroprussiato de sódio. Diferentemente do presente estudo, Oliveira *et al.* (2021) observaram germinação das sementes na primeira contagem, apesar de estar em valores inferiores a 5% em quase todos os tratamentos, exceto pelo nitroprussiato de sódio.

Quanto ao percentual de germinação na última contagem, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados e o controle na ausência de estresse (FIGURA 3). Contudo, quando comparadas as moléculas sinalizadoras entre si, maior germinação foi observado naquelas sementes tratadas quitosana, melatonina e ácido indolacético (FIGURA 3).

Figura 3 – Germinação (última contagem) de sementes de *Urochloa ruziziensis* sem serem submetidas ao condicionamento fisiológico (controle), e submetidas ao condicionamento com moléculas sinalizadoras ácido indolacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nitroprussiato de sódio (SNP) e não tratadas, germinadas em água, salinidade e restrição hídrica.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

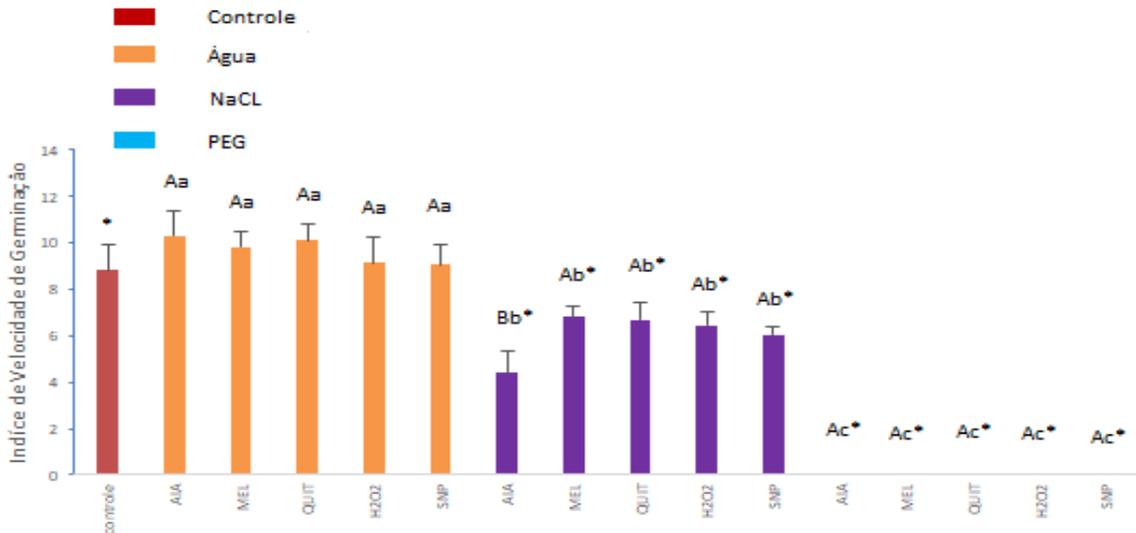
À exceção da melatonina e do peróxido de hidrogênio, os demais tratamentos germinaram em taxas inferiores ao controle quando sob condição de déficit hídrico (FIGURA 3), resultados similares foram obtidos em estudos com algodão (CHEN *et al.*, 2020) e mostarda (PARK *et al.*, 2021). A melatonina está envolvida em múltiplos processos durante o desenvolvimento da planta, com destaque na osmorregulação (TAN *et al.*, 2013). Sua síntese é iniciada sob situação de estresses bióticos e abióticos, como resposta a esses. Por outro lado, o peróxido de hidrogênio apesar de ser associado a espécies reativas de oxigênio, as quais podem ser danosas para a célula, desempenha papel vital na resposta ao estresse pela planta, atuando, quando sob baixas concentrações, como mensageiro secundário para indução de resposta ao estresse (YOU; CHAN, 2015; FAROOQ *et al.*, 2017), regulando assim, a síntese de enzimas antioxidantes via sinalização do ácido abscísico (SAXENA *et al.*, 2016).

Sob déficit hídrico, a germinação de sementes de braquiária não foi superior a 10% independentemente da molécula sinalizadora utilizada (FIGURA 3), apesar de maiores valores terem sido observados quando sementes foram tratadas com a melatonina. De maneira similar, o condicionamento fisiológico não propiciou resposta satisfatória das sementes ao déficit hídrico quando avaliado em sementes de pepino sob restrição hídrica (ZHANG *et al.*, 2013), por outro lado, foi observado aumento da germinação e crescimento em plantas de trigo (LEI *et al.*, 2021). Em geral a redução da germinação sob déficit hídrico é esperada em sementes devido a menor absorção de água (KAPPES *et al.*, 2010), como discutido anteriormente, devido a imposição de dificuldades na aquisição de água em quantidade necessária para que o processo germinativo ocorra (TAIZ *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2019).

Os resultados aqui observados evidenciam que a condição de restrição hídrica proporcionou maior redução da germinação quando comparada ao estresse por salinidade. Importante ressaltar os efeitos benéficos da melatonina e do peróxido de hidrogênio que mesmo em condições de estresse proporcionou maior porcentagem de germinação de sementes de braquiária.

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos quando analisado o índice de velocidade de germinação das sementes em condição sem estresse (FIGURA 4). Sob salinidade, sementes condicionadas com AIA germinaram em velocidade inferior aos demais tratamentos, os quais foram estatisticamente similares entre si. Nesta condição, observa-se que em todos os tratamentos as sementes germinaram mais lentamente quando comparados ao controle (FIGURA 4).

Figura 4 – Índice de velocidade de germinação de sementes de *Urochloa ruziziensis* sem serem submetidas ao condicionamento fisiológico (controle), e submetidas ao condicionamento com moléculas sinalizadoras ácido indolilacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H_2O_2), nitroprussiato de sódio (SNP) e não tratadas, e germinadas em água, salinidade e restrição hídrica.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

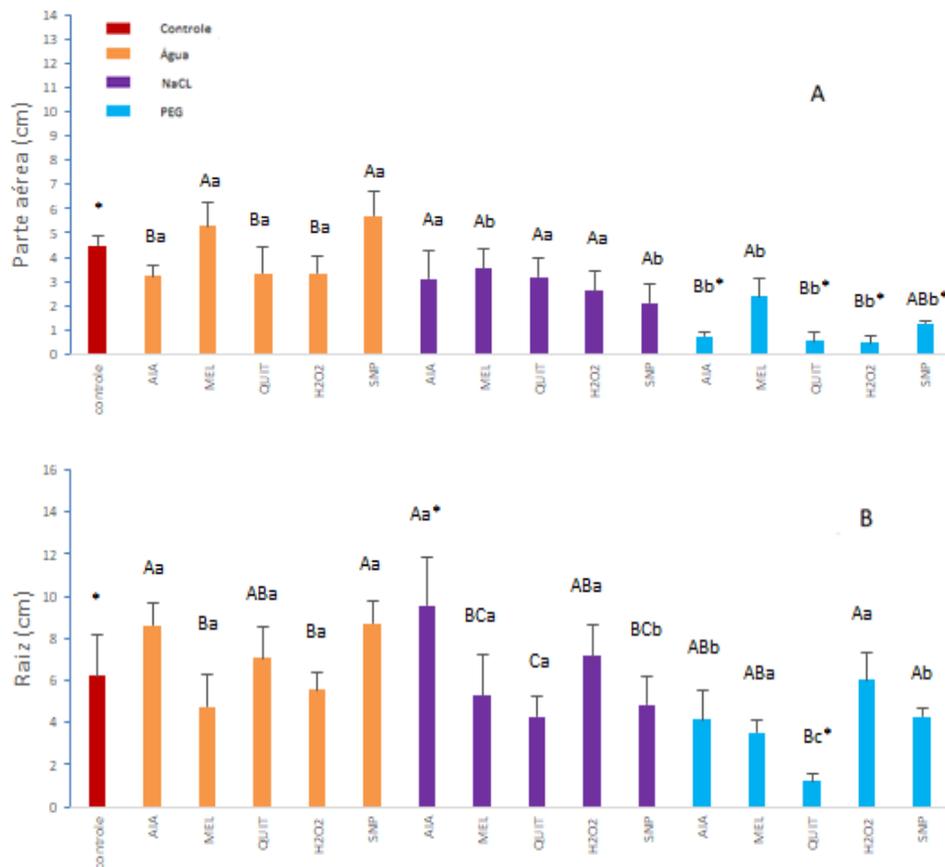
Na ausência de estresse hídrico, maiores valores de comprimento da parte aérea foram observados quando o condicionamento foi realizado usando melatonina ou nitroprussiato de sódio. Os valores para esta variável foram estatisticamente iguais sob estresse salino (FIGURA 5A). Sob déficit hídrico, todos os tratamentos foram inferiores ao controle, havendo maior tamanho de parte aérea quando o tratamento com melatonina foi aplicado, em relação aos demais condicionantes. Em plântulas sob restrição hídrica houve diminuição do crescimento, devido a menor expansão e alongamento celular, processos dependentes da disponibilidade de água. Também provoca a redução do crescimento em consequência do decréscimo da turgescência celular (PEREZ; MORAIS, 1991). Esse fato ficou evidente no presente estudo, quando houve uma redução do tamanho das plântulas, apesar da influência positiva de algumas moléculas como a melatonina (FIGURA 5A).

Em relação ao tamanho da raiz na condição sem estresse (água), maiores valores foram observados na presença de o ácido indolilacético quitosana e nitroprussiato de sódio, esses proporcionaram maiores médias. Quando germinadas na presença de salinidade, maior tamanho da raiz foi observado quando as sementes foram tratadas com o ácido indolilacético e peróxido de hidrogênio, valores estes superiores aos observados no tratamento controle. Sob restrição

hídrica, o tamanho da raiz foi maior quando as sementes foram tratadas com peróxido de hidrogênio ou nitroprussiato de sódio, sendo estes estatisticamente iguais ao controle (FIGURA 5B).

De forma geral, foi observado efeito positivo do uso das moléculas sinalizadoras no crescimento das plântulas. Contudo, para o desenvolvimento da raiz, os valores variaram em função das moléculas sinalizadora e do estresse aplicado, havendo destaque para o peróxido de hidrogênio o qual resultou em maiores valores. O melhor desenvolvimento do sistema radicular implica em maior capacidade de exploração do solo, o que garante alocação de água e nutrientes mais eficaz, e consequente crescimento da planta (DOURADO NETO et al., 2014).

Figura 5 – Comprimento (cm) de parte aérea (A) e raiz (B) obtidos pela análise de imagens de plântulas de *Urochloa ruziziensis* os 7 dias de germinação em água, estresse salino (NaCl) e restrição hídrica (PEG), após serem submetidas ao condicionamento fisiológico com as moléculas sinalizadoras ácido indoliacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H_2O_2), nitroprussiato de sódio (SNP) e não tratadas.

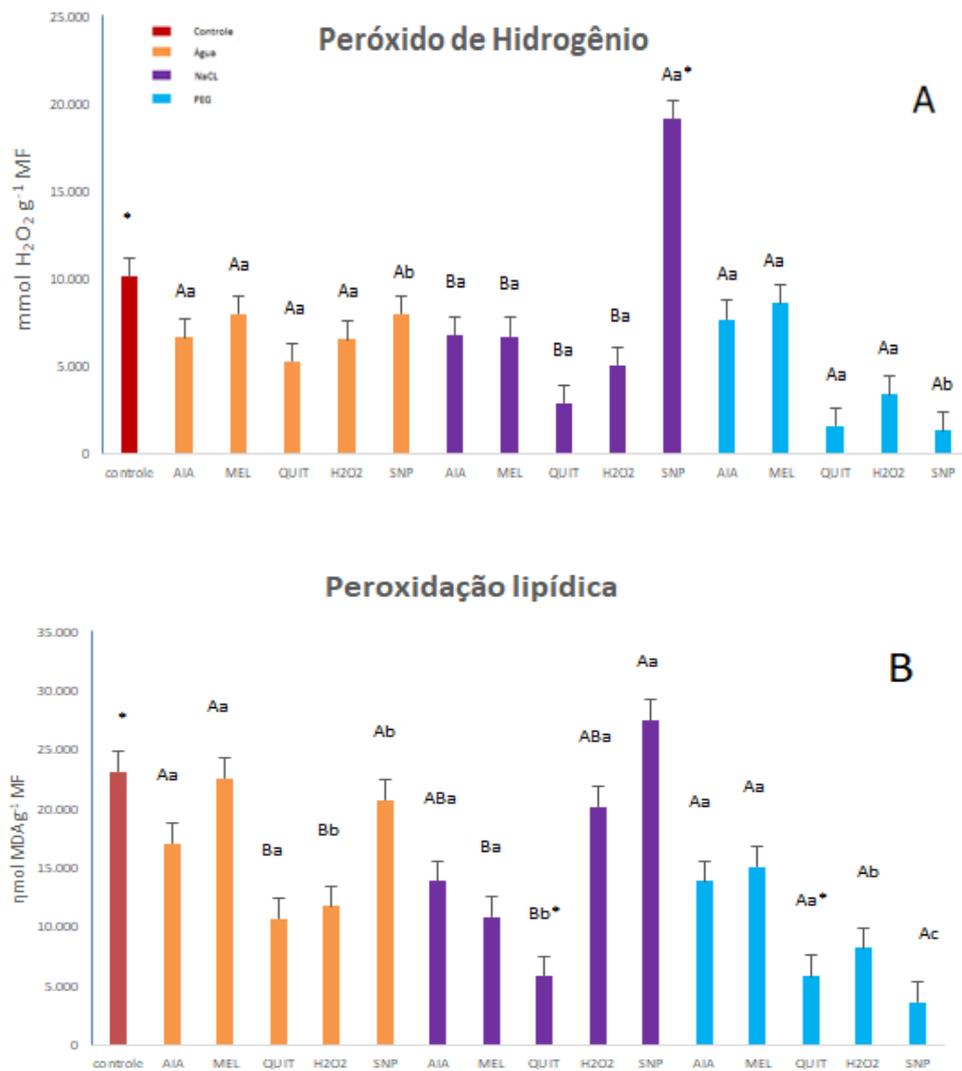


Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Não houve diferenças entre os tratamentos quanto a quantificação de peróxido de hidrogênio, na ausência de estresse (FIGURA 6A). Quando sob estresse salino, maiores valores do peróxido de hidrogênio foram observados em sementes tratadas com nitroprussiato de sódio. Na condição de estresse hídrico observa-se que não houve diferença entre as moléculas sinalizadoras (FIGURA 6A).

Figura 6 – Quantificação de peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação lipídica (B) em plântulas de *Urochloa ruziziensis* germinadas em água, estresse salino (NaCl) e restrição hídrica (PEG), submetidas ao condicionamento fisiológico em soluções de ácido indoliacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H_2O_2), nitroprussiato de sódio (SNP) e não tratadas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

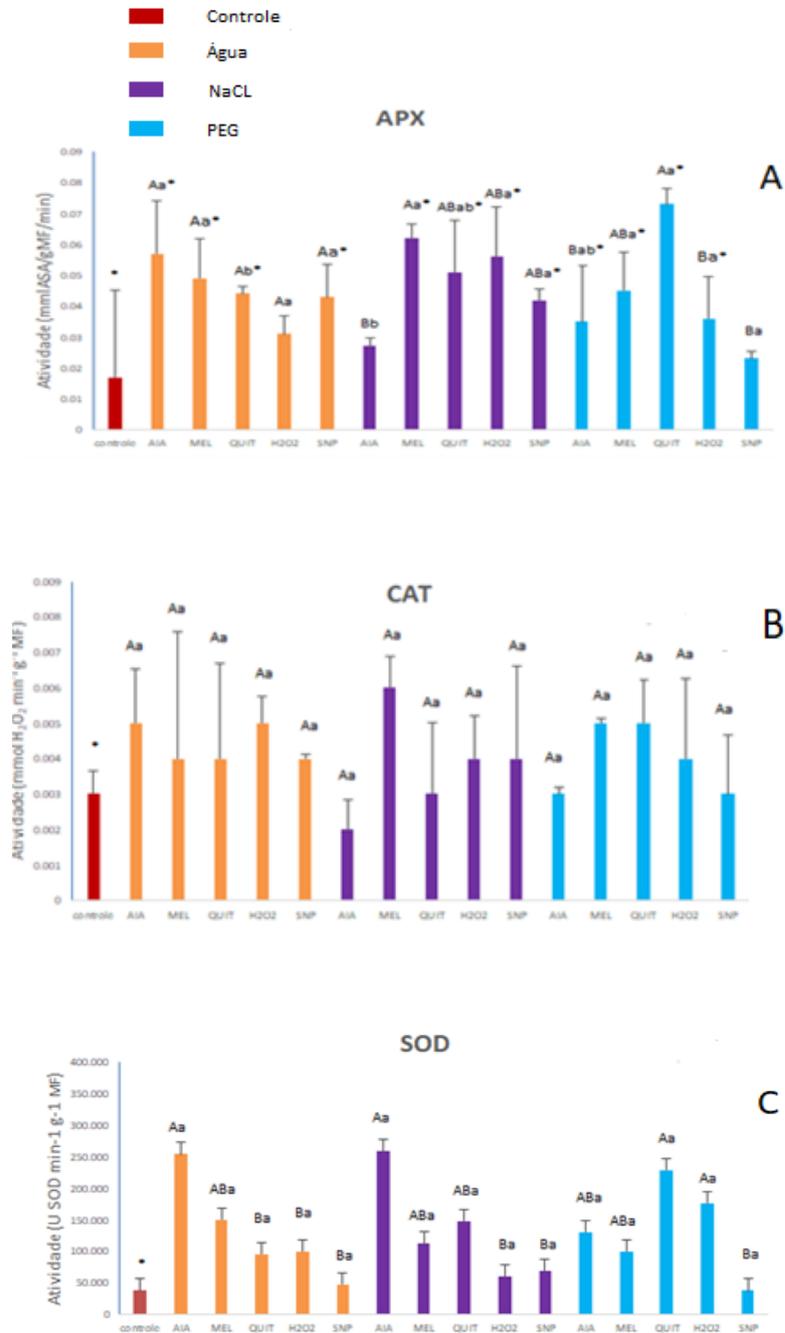
Fonte: Do autor (2023).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto geralmente encontrado como subproduto do metabolismo celular, sendo seu acúmulo danoso para a célula (GILL; TUTEJA, 2010). No entanto, sabe-se que desempenha um papel vital na tolerância ao estresse, atuando como um mensageiro secundário quando seu nível se apresenta em baixa concentração (YOU; CHAN, 2015; FAROOQ *et al.*, 2017). Além disso, atua na sinalização da regulação de enzimas antioxidantes via sinalização ABA (SAXENA *et al.*, 2016).

Em relação a quantificação da peroxidação lipídica (FIGURA 6B), quando na ausência do estresse, maiores valores foram observados em sementes tratadas com ácido indolacético, melatonina e nitroprussiato de sódio. Sob estresse salino, maiores valores foram observados quando as sementes foram tratadas com nitroprussiato, peróxido de hidrogênio e ácido indolacético. Já para o déficit hídrico, observa-se que não houve diferença estatística independentemente da molécula sinalizadora (FIGURA 6B). Sob condições adversas, o estresse oxidativo é observado, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a peroxidação de lipídios das membranas celulares um dos danos resultantes deste processo (LIU *et al.*, 2018; YALAMALLE *et al.*, 2019). Maior peroxidação lipídica foi observada em sementes submetidas ao estresse salino (FIGURA 6B). A maior quantidade do malonaldeído está diretamente relacionada à maior peroxidação lipídica, o que indica que a célula não foi capaz de conter os danos resultantes do acúmulo de EROs.

À exceção do peróxido de hidrogênio, na ausência de estresse e sob estresse salino o ácido indolilacético, enquanto que no estresse hídrico o nitroprussiato de sódio, todos os tratamentos, independentemente do estresse aplicado, foram superiores ao controle quanto à atividade da ascorbato peroxidase (APX) (FIGURA 7A). Não houve diferenças significativas quanto à atividade desta enzima quando comparadas as moléculas condicionantes na ausência de estresse. Quando sob salinidade, a melatonina resultou em maior atividade da APX, apesar de não diferenciar estatisticamente a quitosana, peróxido de hidrogênio e nitroprussiato de sódio. Já sob déficit hídrico, maior atividade foi observada em sementes tratadas com a quitosana ou melatonina (FIGURA 7A). Maior atividade da APX indica que o sistema antioxidante está funcionando de maneira eficiente, uma vez que essa enzima está correlacionada ao impedimento do acúmulo de EROs e consequente estresse oxidativo na célula (ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 7 – Quantificação de ascorbato peroxidase (A) e catalase (B) e superóxido dismutase (C) em plântulas de *Urochloa ruziziensis* germinadas em água, estresse salino (NaCl) e restrição hídrica (PEG), submetidas ao condicionamento fisiológico em soluções de ácido indoliacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H₂O₂), nitroprussiato de sódio (SNP) e não tratadas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Em relação a atividade da enzima catalase (FIGURA 7B) nota-se que independentemente da molécula sinalizadora e do estresse, não houve diferença entre os tratamentos. A catalase é uma enzima antioxidante que atua na conversão de peróxido de hidrogênio em água. A maior atividade dessa enzima é observada em condições de estresse possivelmente em resposta à maior atividade respiratória durante o estresse (SILVA NETA, 2014), contudo, no presente estudo, a catalase apresentou atividade similar, independentemente ou não da aplicação do estresse.

Quando sob ausência de estresse, maior atividade da superóxido dismutase foi observada em sementes tratadas com ácido indolilacético e melatonina (FIGURA 7C), tal como na condição de estresse salino. Por outro lado, sob restrição hídrica, o tratamento com quitosana ou peróxido de hidrogênio resultou maior atividade desta enzima, apesar de não diferenciar estaticamente as sementes condicionadas com ácido indolilacético e melatonina. Considerando que a superóxido dismutase é citada como a primeira enzima a atuar na defesa da célula contra o estresse oxidativo (PAUL; ROYCHOUDHURY, 2017; CHOUDHARY *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019), os resultados inferem que o tratamento com ácido indolilacético induz maior resposta (atividade desta enzima) sob condição de salinidade, ao passo que para déficit hídrico, essa resposta é observada para a quitosana e peróxido de hidrogênio.

4 CONCLUSÕES

O condicionamento fisiológico foi eficiente para minimizar os efeitos do estresse salino em sementes de *Urochloa ruziziensis*.

O condicionamento usando melatonina, quitosana ou peróxido de hidrogênio tem maior potencial para induzir tolerância à estresse salino em sementes de braquiária.

O condicionamento foi eficaz em induzir a ativação do sistema antioxidante das sementes em resposta a estresses abióticos.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, T.B. *et al.* Priming of braquiária seeds with different sugar sources and concentrations. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 843-849, 2018.
- BEWLEY, J.D. *et al.* **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.
- BHANUPRAKASH, K.; YOGESHA, H.S. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. *In: Abiotic stress physiology of horticultural crops*, New Delhi, 2016. p. 103-117.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 116, n. 2, p. 651–658, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/116/2/651/6085595>. Acesso em: 27 set. 2021
- BONOME, L.T. *et al.* Osmoconditioning of *Urochloa brizantha* seeds to reduce pelleting negative effects. Brazilian. **Journal of Agriculture-Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 92, n. 2, p. 87-100, 2017.
- BRACCINI, A.L. *et al.* Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina-PR, v.18, n.1, p.10-16, 1996.
- BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 52, n. C, p. 302–310, 1978. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>. Acesso em: 23 out. 2021.
- CHEN, L. *et al.* Exogenous melatonin promotes seed germination and osmotic regulation under salt stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **PLoS ONE**, [S.l.], v. 15, p. 228-241, 2020.
- CHOUDHARY, A.; KUMAR, A.; KAUR, N. **ROS, and oxidative burst: Roots in plant development**. Beijing: Plant Diversity, 2019.
- DOURADO NETO, D. *et al.* Ação de bioestimulante no desempenho agrônômico de milho e feijão. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 371-379, 2014.
- DUARTE, M.M. *et al.* Influência do estresse hídrico na germinação de sementes e formação de plântulas de angico branco. **Advances in Forestry Science**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 375-379, 2019.

- FAROOQ, M. *et al.* Foliage- applied sodium nitroprusside and hydrogen peroxide improves resistance against terminal drought in bread wheat. **Journal of Agronomy and Crop Science**, [S.l.], v. 203, p. 473-482, 2017.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, p. 909-930, 2010.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana sylvestris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 283, n. 2, p. 491-495, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000398619090672L>. Acesso em: 23 out. 2021.
- JALEEL, C.A. *et al.* Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plant**, [S.l.], v. 31, p. 427-436, 2009.
- JUNIOR, M. *et al.* Indução de Tolerância ao Estresse Salino em Sementes de Tomateiro Condicionadas com Ácido Salicílico. **Applied Resesearch & Agrotechnology**, [S.l.], v.13, 26-66, 2020.
- KAPPES, C. *et al.* Germinação, vigor de sementes e crescimento de plântulas de milho sob condições de déficit hídrico. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 11, n. 2, p. 125-134, 2010.
- LEI, K. *et al.* Seed soaking with melatonin promotes seed germination under chromium stress via enhancing reserve mobilization and antioxidant metabolism in wheat. **Ecotoxicology and Environmental Safty**, v.3, p. 1-9, 2021.
- LIU, L. *et al.* Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. **Frontiers in Plant Science**, Parkville, v. 9, p. 275, 2018.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, [S.l.], v. 2, p.176-77, 1962.
- MASETTO, T.E. *et al.* Germinação de sementes de *Urochloa ruziziensis* em função da disponibilidade hídrica do substrato e teor de água das sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 385-391, 2013.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Biology**, [S.l.], v. 59, p. 651-681, 2008.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. O peróxido de hidrogênio é eliminado pela peroxidase específica do ascorbato em cloroplastos de espinafre. **Fisiologia Vegetal e Celular**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

- OLIVEIRA, T.F., SANTOS, H.O., TOSTES, D.P., CAVASIN, P.Y., ROCHA, D.K., TIRELLI, G.V. Protective action of priming agents on *Urochloa brizantha* seeds under water restriction and salinity conditions. **Journal of Seed Sciences**, [S.l.], v. 43, p. 1, 2021.
- PARK, H.S. *et al.* A melatonina melhora os mecanismos de tolerância e recuperação em *Brassica juncea* (L.) Czern. sob condições salinas. **Front Plant Sci.**, [S.l.], v.12, p. 593-617, 2021.
- PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties. **Plant Gene**, Kidlington, v. 11, 124-132, 2017.
- PEREZ, S.C.J.G.A.; MORAES, J.A.P.V. Determinações de potencial hídrico, condutância estomática e potencial osmótico em espécies dos estratos arbóreo, arbustivo e herbáceo de um cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 27-37, 1991.
- PEREIRA, M.R.R. *et al.* Influência do estresse hídrico e salino na germinação de *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, 2012.
- PEREIRA, S.R. *et al.* Priming of *Urochloa brizantha* cv. Xaraés seeds. **African Journal of Agriculture Research**, Pretoria, v. 13, n.1, p. 2804-2807, 2018.
- RIBEIRO, E.C.G. *et al.* Physiological quality of *Urochloa brizantha* seeds submitted to priming with calcium salts. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, 2019.
- SAXENA, J.; SHARMA, K.P.; SHARMA, M.M.; SINGH, A. Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial properties. **SpringerPlus**, [S.l.], v. 5, p. 861, 2016.
- SILVA, A.L.D. *et al.* Effect of cyanide by sodium nitroprusside (SNP) application on germination, antioxidative system and lipid peroxidation of *Senna macranthera* seeds under saline stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 1, p. 86-96, 2019.
- SILVA NETA, I. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho. 2014.** 81 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TAN, D.X. *et al.* Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **J. Pineal Res.**, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 127-138, 2013.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, [S.l.], v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.
- WOJTYLA, L. *et al.* Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. **Front. Plant Sci.**, [S.l.], v. 7, n. 66, 2016.

YALAMALLE, V.R. *et al.* Spermine induced protection of onion seed vigour and viability during accelerated ageing. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 40, n. 5, p. 1079-1083, 2019.

ZHANG, N. *et al.* Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **J. Pineal Res.**, [*S.l.*], v. 54, p. 1, p. 15-23, 2013.

ZHENG, M. *et al.* Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 78, n. 2, p.167-178, 2016.

CAPÍTULO 3 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA A ALTAS TEMPERATURAS E CÁDMIO EM SEMENTES DE *UROCHLOA RUZIZIENSIS* COM O USO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS

RESUMO

A Braquiária se destaca entre as espécies forrageiras cultivadas no Brasil, no entanto, a produção de sementes da cultura ainda enfrenta problemas quanto a baixa qualidade, florescimento irregular, baixo número de sementes férteis, elevada degrana natural e dormência. Aliados a esses fatores existem os estresses abióticos, como o estresse térmico e a contaminação por metais pesados, como o cádmio. Sendo assim, técnicas como o condicionamento fisiológico aliados ao uso de moléculas sinalizadoras podem minimizar esses efeitos, promovendo maior rapidez e uniformidade na germinação. Diante disto, objetivou-se nessa pesquisa, avaliar a eficiência de moléculas sinalizadoras na indução de tolerância a altas temperaturas e a presença de cádmio em sementes de *Urochloa ruziziensis* cv. Ruziziensis. O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes da Universidade Federal de Lavras. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5x3+1 sendo 5 moléculas sinalizadoras (ácido indolacético, melatonina, quitosana, peróxido de hidrogênio, e nitroprussiato de sódio), 3 condições de germinação (sem estresse, alta temperatura (40 °C) e contaminação por cádmio) mais controle (sementes não condicionada). Determinou-se: teor de água após o condicionamento (antes de secagem) e após a secagem das sementes; primeira contagem de germinação, germinação aos sete e aos 21 dias após a semeadura; índice de velocidade de germinação, comprimento de plântulas, e análise das atividades das enzimas peróxido de hidrogênio, ascorbato peroxidase, catalase, superóxido dismutase e peroxidação lipídica. Há potencial da técnica de condicionamento fisiológico para induzir maior tolerância a estresses por cádmio e temperatura em sementes de *Urochloa ruziziensis*. O condicionamento fisiológico com peróxido de hidrogênio, nitroprussiato de sódio e ácido indolacético tem maior potencial para induzir maior tolerância a estresses abióticos em sementes de braquiária. Em resposta aos estresses abióticos, foi possível observar eficácia do condicionamento fisiológico quanto ao estímulo à ativação do sistema antioxidante.

Palavras-chaves: Braquiária. Melatonina. Quitosana. Enzimas antioxidantes. Estresses abióticos.

INDUCTION OF TOLERANCE TO HIGH TEMPERATURES AND CADMIUM IN UROCHLOA RUZIZIENSIS SEEDS USING SIGNALING MOLECULES

ABSTRACT

The Brachiaria stands out among the forage species cultivated in Brazil, however the production of seeds of the culture still faces problems regarding low quality, irregular flowering, low number of fertile seeds, high natural degermination and dormancy. Allied to these factors are abiotic stresses, such as thermal stress and contamination by heavy metals such as cadmium. Therefore, techniques such as physiological conditioning combined with the use of signaling molecules can minimize these effects, promoting greater speed and uniformity in germination. In view of this, the objective of this research was to evaluate the efficiency of signaling molecules in inducing tolerance to high temperatures and the presence of cadmium in seeds of *Urochloa ruziziensis* cv. *ruziziensis*. The experiment was installed and conducted at the Central Laboratory for Research in Seeds at the Federal University of Lavras. A completely randomized design with four replications was used. The treatments were arranged in a 5x3+1 factorial scheme, with 5 signaling molecules (indoleacetic acid, melatonin, chitosan, hydrogen peroxide, and sodium nitroprusside), 3 germination conditions (no stress, high temperature (40°C) and contamination by cadmium) plus control (unprimed seeds). It was determined: Water content after conditioning (before drying) and after drying the seeds; first germination count, germination at seven and 21 days after sowing, germination speed index, seedling length, and analysis of the activities of the enzymes hydrogen peroxide, ascorbate peroxidase, catalase, superoxide dismutase and lipid peroxidation. There is potential for the priming technique to induce greater tolerance to cadmium and temperature stress in *Urochloa ruziziensis* seeds. Conditioning with hydrogen peroxide, sodium nitroprusside and indoleacetic acid has the greatest potential to induce greater tolerance to abiotic stresses in brachiaria seeds. In response to abiotic stresses, it was possible to observe the effectiveness of physiological conditioning in terms of stimulating the activation of the antioxidant system.

Keywords: Brachiaria. Melatonin. Chitosan. Antioxidant enzymes. Abiotic stresses.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as áreas de pastagens têm aumentado ano a ano, com previsão de alcançar em 2027 156.397.000 ha (ABIEC, 2018). Esse aumento se justifica pelo fato de o país ser um dos maiores produtores mundiais de carne bovina (VALE; PEREIRA, 2019), sendo que a produção animal é baseada principalmente em pastagens de gramíneas e leguminosas. Dentre as espécies forrageiras se destaca o gênero *Urochloa* com mais de 70% da área cultivada com forragem no país. Geralmente estas áreas de pastagens são de baixa qualidade, devido principalmente à utilização de sementes de baixo vigor, dadas as dificuldades de produção de sementes de boa qualidade para a cultura (BONOME *et al.*, 2006). A obtenção de sementes de boa qualidade de braquiária também é dificultada por outros fatores, tais como baixo número de sementes férteis, florescimento irregular, elevada degrana natural, além da dormência. Aliado a essas características existem ainda as instabilidades climáticas que vêm ocorrendo nos últimos anos, como altas temperaturas, além da contaminação por metais pesados como o cádmio, dentre outros fatores que podem comprometer a qualidade das sementes.

Os estresses abióticos são as principais causas de perdas de produtividades de grãos em todo o mundo. Por meio de alguns estudos tem sido relatado que o crescimento e o desenvolvimento das plantas podem ser inibidos ou atrasados por diferentes estresses abióticos que envolvem interações complexas entre vários hormônios, em diferentes estágios de desenvolvimento. Alguns dos principais aspectos do crescimento incluem desenvolvimento de sementes, sua germinação e sobrevivência das plantas em condições desfavoráveis, sendo a germinação das sementes a etapa mais crucial, uma vez que garante a sobrevivência da maioria das espécies cultivadas. Para garantir a sobrevivência, as plantas desenvolveram mecanismos que permitem que a germinação das sementes seja suspensa sob condições de estresse, e depois retomada quando as condições são favoráveis (DASZKOWSKA, 2011).

Nesse contexto, por reduzir o tempo de germinação e padronizar este processo, o condicionamento fisiológico de sementes propicia maior tolerância sob condições desfavoráveis no campo e diminui os efeitos das variações ambientais. Isso permite que a germinação ocorra em diferentes condições de temperatura, luz, solo e disponibilidade de água, e possibilita ainda, o desenvolvimento da parte aérea e aceleração do crescimento das plantas (ZHENG *et al.*, 2016; BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). Como esses processos iniciais da germinação são ativados ainda em condições ótimas, a técnica fornece uma vantagem às sementes, quando estas forem expostas

às condições adversas como elevadas temperaturas, contaminação por metais pesados ou outros tipos de estresse.

O estresse causado por temperaturas altas geralmente pode provocar danos irreversíveis no crescimento e desenvolvimento da planta. A extensão em que isto ocorre, em zonas climáticas específicas, depende da probabilidade e período de temperaturas elevadas, durante o dia e/ou noite. A tolerância ao calor é geralmente definida como a capacidade da planta para crescer e produzir sob altas temperaturas (PEET; WILLITS, 1998). Em climas tropicais, as altas temperaturas e o excesso de radiação solar são muitas vezes os fatores mais limitantes que afetam o crescimento da planta e a produção de sementes. Altas temperaturas podem causar consideráveis danos pré e pós-colheita (GUILIONI *et al*, 1997; ISMAIL; HALL, 1999). Da mesma forma, nas regiões temperadas o estresse por calor tem sido relatado como uma das mais importantes causas de redução da produção de matéria seca e de rendimento em muitas culturas (GIAVENO; FERRERO, 2003). Além de altas temperaturas, outros estresses podem comprometer a germinação, crescimento e desenvolvimento das plantas, como a contaminação por metais pesados, não essenciais, como o cádmio. O cádmio é considerado um dos metais mais tóxicos, uma vez que apresenta efeito sobre todos os processos biológicos de animais e plantas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000). O cádmio chega ao meio ambiente pela ação antrópica, sendo que as contaminações em solos, ocorrem por adição de resíduos da fabricação do cimento, pelas cinzas produzidas pela queima de combustíveis fósseis e lixos urbanos, desgaste de pneus, rejeitos de mineradoras e fundições, utilização de fertilizantes fosfatados, uso de dejetos suínos como fertilizantes, dentre outras (SALGADO, 1996).

Diante disto, objetivou-se nessa pesquisa, avaliar a eficiência de moléculas sinalizadoras na indução de tolerância à altas temperaturas e à presença de cádmio em sementes de *Urochloa ruziziensis* cv. Ruziziensis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes - LCPS do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, Minas Gerais. Foram utilizadas sementes de *Urochloa ruziziensis* cv. Ruziziensis, fornecidas pela empresa Sementes Mineirão Ltda.

As sementes de braquiária foram submetidas ao condicionamento fisiológico, realizado em BOD regulada a 25 °C (PEREIRA *et al.*, 2018), sem luz e adaptada com um compressor de ar, responsável pela aeração das soluções, pelo tempo de 24 horas. Como moléculas condicionantes foram utilizadas: ácido indolacético (100 µM), peróxido de hidrogênio (100 µM), quitosana (0,75 mM), melatonina (1mM) e solução doadora de ON nitroprussiato de sódio (100µM). Foram colocados 40 gramas de sementes em 400 ml de solução. As sementes utilizadas como controle não foram condicionadas.

Após o condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente, secadas em estufa de circulação de ar por 24 horas a 25 °C e após esse período secadas a 35 °C com circulação de ar por 72 horas. O teor de água foi determinado logo após o condicionamento (antes da secagem) e após a secagem das sementes. Foram retiradas quatro repetições de 200 sementes de cada tratamento e submetidas à estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009).

As sementes condicionadas e não condicionadas (controle), foram submetidas a diferentes condições de germinação: sem estresse (água destilada), estresse térmico por meio da germinação à temperatura de 40 °C (NAKAO; CARDOSO, 2015) e contaminação por cádmio, concentração de 3 mg.L-1 (CONAMA, 2009).

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, sobre duas folhas de papel mata borrão, que foram colocadas em caixas tipo gerbox. Os papéis foram umedecidos com volume de solução contendo as referidas soluções, equivalente a 2,5 vezes o peso seco do papel, e as caixas foram acondicionadas em câmaras tipo BOD com temperatura alternada 20-35 °C, com fotoperíodo de 8-16 horas, exceto o estresse por temperatura o qual foi submetido a temperatura de 40 °C, com luz constante em BOD. A primeira contagem do teste foi realizada aos 7 dias e a contagem final aos 21 dias após a semeadura (BRASIL, 2009). Concomitante ao teste de germinação foi realizado o índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962).

Para a análise de imagens, foram utilizadas quatro repetições de 25 plântulas. Estas foram obtidas a partir do teste de germinação em rolos, em que a semeadura foi realizada sobre

duas folhas de papel germitest e sobrepostas com mais uma folha, as quais foram umedecidas da mesma maneira e submetidas às mesmas condições citadas anteriormente, exceto o estresse por temperatura o qual foi submetido a temperatura de 40 °C, com luz constante em BOD. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos para evitar perda de umidade. As imagens das plântulas foram obtidas aos 7 dias após a instalação do teste, equivalente ao período de primeira contagem de germinação (BRASIL, 2009).

Para a captura das imagens foi utilizado o sistema GroundEye®, versão S800, composto por um módulo de captação que possui uma bandeja de acrílico, uma câmera de alta resolução e um software integrado para avaliação. As plântulas foram retiradas do papel germitest e inseridas na bandeja do módulo de captação para a obtenção das imagens. Na etapa de configuração da análise foi utilizada a calibração da cor de fundo, índice de luminosidade, dimensão 'a' e dimensão 'b'. Depois da calibração da cor do fundo foi feita a análise das imagens e foi extraído valores de comprimento da raiz e comprimento de parte aérea.

Para as análises bioquímicas foram utilizadas as plântulas obtidas na última contagem (21 dias), as quais foram armazenadas à temperatura de -80 °C até o momento das análises. Para a extração das enzimas antioxidantes foram macerados 200 mg de massa fresca em nitrogênio líquido com 10 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração [100 mM de fosfato de potássio, 0,1 mM de EDTA e 10 mM de ácido ascórbico]. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas conforme apresentado por Biemelt, Keetman e Albrecht (1998).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima inibir a redução fotoquímica do tetrazólio de nitroazul (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). 10 µL do extrato foi adicionado a 190 µL de solução tampão contendo 50 mM de fosfato de potássio, 14 mM de metionina, 0,1 mM de EDTA, 75 µM de NBT e 2 µM de riboflavina. Os tubos contendo o tampão juntamente com a amostra e o controle (meio de incubação sem a amostra), foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20W por 7 minutos e as leituras realizadas a 560 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de SOD é definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do NBT.

Para mensurar a atividade da catalase (CAT), foram pipetados 9 µL do extrato aos quais foram adicionados 90 µL de solução de fosfato de potássio (200 mM) e 72 µL de água. A esta mistura foi adicionado 9 µL de solução de peróxido de hidrogênio (250 mM). A atividade da CAT foi determinada pelo decréscimo dos valores em absorbância a 240nm, a cada 15

segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio (HAVIR; MICHALE, 1987). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de CAT é definida pela quantidade de enzima necessária para decompor $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 .

Para analisar a atividade da ascorbato peroxidase (APX) foram adicionados $9 \mu\text{L}$ de extrato 162 na solução previamente aquecida em banho-maria a 30°C , contendo $90 \mu\text{L}$ de fosfato de potássio, $9 \mu\text{L}$ de ácido ascórbico, $63 \mu\text{L}$ de água e $9 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio na concentração de 2 mM . A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela diminuição da absorbância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm a cada 15 segundos durante 3 minutos (NAKANO; ASADA, 1981). Uma unidade de APX é definida pela quantidade de enzima que oxida $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido ascórbico.

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica, foram macerados 200 mg de massa fresca em nitrogênio líquido com 10 mg polivinilpirrolidona (PVPP) e homogeneizados em $1,5 \text{ mL}$ de ácido tricloroacético a $0,1\%$ (TCA- $0,1\%$). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado para realização das análises.

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada mediante a quantificação do malonaldeído (MDA), que é produzido pela reação de ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme método TBARS proposto por Buege e Aust (1978). Para uma alíquota de $125 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram adicionados $250 \mu\text{L}$ do meio de reação de ácido tiobarbitúrico $0,5\%$ (TBA) e ácido tricloroacético 10% (TCA). A mistura foi aquecida a 95°C durante 30 minutos e depois rapidamente esfriada em um banho de gelo. Posteriormente, foi feita a leitura de absorbância a 535 nm e a 600 nm e a concentração do MDA calculada utilizando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para a quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizada uma alíquota de $45 \mu\text{L}$ do sobrenadante. Nela foram adicionados $45 \mu\text{L}$ do tampão fosfato de potássio (10 mM a pH $7,0$) e $90 \mu\text{L}$ de Iodeto de potássio (1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de peróxido de hidrogênio expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca (VELIKOVA *et al.*, 2000).

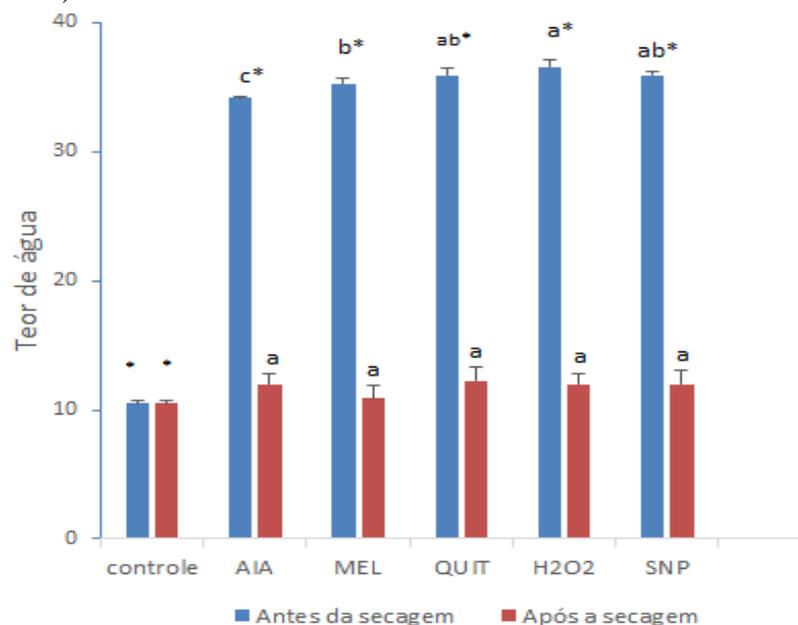
Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial $(5 \times 3) + 1$, sendo cinco moléculas condicionantes, três condições de germinação e um controle (sementes sem condicionamento). As médias foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade e para a comparação do controle com os tratamentos do fatorial foi realizado o teste de Dunnett a 5%

de probabilidade. Para as análises bioquímicas, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Ressalta-se que, cada repetição foi feita em triplicata, em esquema fatorial (3x5), sendo três condições de germinação e cinco moléculas sinalizadoras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em sementes condicionadas foi observado maior quantidade de água quando condicionadas com peróxido de hidrogênio, seguidas pelas que foram condicionadas com quitosana e nitroprussiato de sódio (FIGURA 1). A absorção de água é limitada pelo potencial osmótico da solução permitindo que sementes menos vigorosas ‘alcancem’ as mais vigorosas, tornando a germinação mais rápida e mais uniforme (RIBEIRO *et al.*, 2019). A fase de embebição é de grande importância, uma vez que a captação da quantidade adequada de água é essencial para o reinício da atividade metabólica. O condicionamento fisiológico ativa o metabolismo das sementes durante as fases I e II da embebição, sem que ocorra a protrusão da raiz primária (fase III) (BONOME *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). O controle da absorção de água é importante para que ocorra equilíbrio entre o potencial hídrico interno das sementes e da solução condicionante (ALMEIDA *et al.*, 2016; MARCOS FILHO, 2015). É importante que a água seja absorvida de forma equilibrada e que a embebição seja interrompida quando ocorre o equilíbrio entre o potencial osmótico da solução e das sementes (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Figura 1 – Teor de água de sementes de *Uroclhoa ruzizensis*, antes e após a secagem, após condicionamento fisiológico com soluções de ácido indolacético, melatonina, quitosana, peróxido de hidrogênio, nitroprussiato de sódio ou não tratadas (controle).

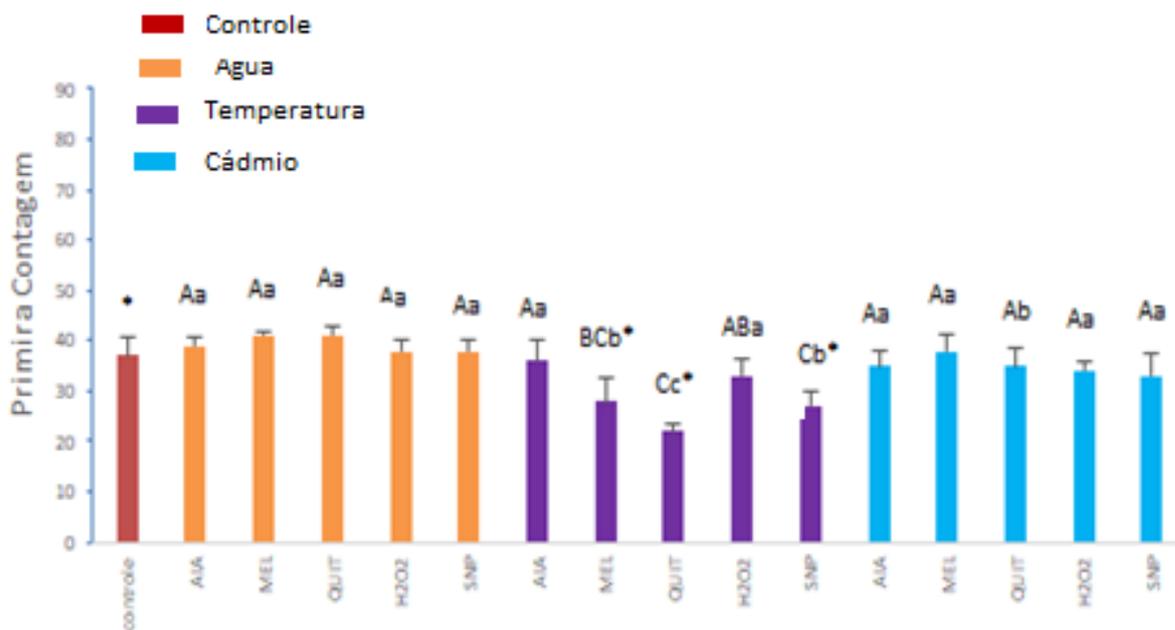


Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade* Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Para a germinação, aos sete dias após sementeira, observa-se que independentemente da molécula sinalizadora todos os tratamentos foram estatisticamente iguais entre si na condição de sem estresse, sendo o mesmo observado sob estresse por cádmio (FIGURA 2). Sementes germinadas sob estresse térmico (40 °C), quando tratadas com peróxido de hidrogênio e ácido indolilacético germinaram em percentuais estatisticamente iguais ao controle, indicando que estas moléculas foram capazes de induzir tolerância à alta temperatura nas sementes de braquiária, enquanto o oposto foi observado nos demais tratamentos (FIGURA 2). O ácido indolilacético atua na ativação do metabolismo energético das células (BIANCO *et al.*, 2006b), auxiliando na proteção destas contra estresses abióticos, como UV, salinidade e restrição hídrica (BIANCO *et al.*, 2006a).

Figura 2 – Germinação (primeira contagem) sementes de *Urochloa ruziziensis* sob condições de estresse ou não, após condicionamento fisiológico em soluções de ácido indolilacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e não tratadas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Sementes condicionadas com ácido indolilacético obteve maior vigor em condições de estresse (temperatura e cádmio). Sementes mais vigorosas, mesmo sob condições ambientais adversas, tem maior, potencial de apresentar alto nível de desempenho (MARCOS FILHO. 2015). Altas temperaturas e o excesso de radiação solar são fatores limitantes que afetam o

crescimento e o desenvolvimento de plantas além disso, podem causar consideráveis danos pré e pós-colheita (GUILIONI *et al.*, 1997; ISMAIL; HALL, 1999; VOLLENWEIDER; GUNTARDT-GOERG, 2005).

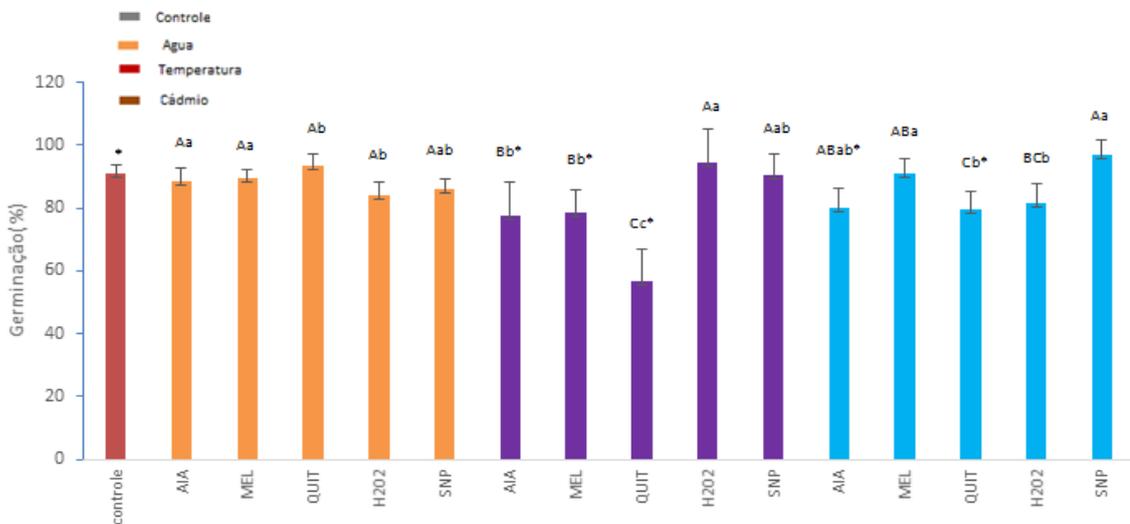
Ausência de diferenças estatísticas significativas foram observadas entre as moléculas sinalizadoras e o controle quando em condição sem estresse para a germinação (FIGURA 3). Por outro lado, para esta variável, maior percentual de germinação foi observado em sementes tratadas com peróxido de hidrogênio e nitroprussiato de sódio, quando sob alta temperatura. Enquanto que ácido indolilacético, melatonina e nitroprussiato de sódio proporcionaram maior germinação quando na presença de cádmio (FIGURA 3). Esses resultados indicam maior potencial do nitroprussiato de sódio como indutor da tolerância à estresse por alta temperatura e contaminação por cádmio.

O nitroprussiato de sódio serve como fonte de óxido nítrico (ON). A aplicação de doadores de ON faz com que as sementes germinem em maior percentagem e velocidade (ATAÍDE *et al.*, 2015; KAISER *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2016). O ON ainda estimula maior atividade de enzimas do sistema antioxidante (SILVA *et al.*, 2019). As condições térmicas estão entre os principais fatores que influenciam a germinação. A temperatura afeta tanto a porcentagem final de germinação, quanto a sua velocidade, devido ao fato de estar relacionado com as reações bioquímicas necessárias para o início do processo germinativo (LAPERA *et al.*, 2018). Existe uma faixa de temperatura na qual o processo de germinação ocorre com a máxima eficiência (MARCOS FILHO, 2015).

Na presença de cádmio, o nitroprussiato de sódio, melatonina e ácido indolilacético foram as moléculas sinalizadoras que apresentaram melhores resultados, proporcionando maior taxa de germinação das sementes. Resultados semelhantes também foram encontrados por outros autores. Pereira *et al.* (2010), concluíram que o uso de óxido nítrico em sementes de *Plathymenia reticulata*, aumentou a sua qualidade, mesmo em condições de estresse. Kaiser *et al.* (2016), concluíram que o uso de óxido nítrico em sementes de repolho aumentou a tolerância das sementes ao estresse salino. Da mesma forma, Oliveira *et al.* (2021), relataram que a utilização de nitroprussiato de sódio proporcionou maior germinação e vigor de sementes de *Urochloa brizantha* em condições de restrição hídrica e salinidade. Sekita *et al.* (2021), concluíram que o nitroprussiato de sódio aumentou o vigor de sementes de ervilha com baixo potencial fisiológico. A aplicação de óxido nítrico reduziu os efeitos tóxicos induzidos por cádmio em mudas de azevém (BAI *et al.*, 2015). O ON é capaz de diminuir os efeitos do envelhecimento das sementes armazenadas (PEREIRA *et al.*, 2010) assim como aumenta a

tolerância da semente aos diversos estresses abióticos, como estresse por metais pesados (SILVA *et al.*, 2015; KAISER *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2016). O estresse oxidativo, provocado pelo aumento da concentração de superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos de alquila, pode ser reduzido pelo óxido nítrico, uma vez que este possui propriedades antioxidantes (SILVA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2016).

Figura 3 – Germinação (ultima contagem) de sementes de *Urochloa ruziziensis* sem serem submetidas ao condicionamento fisiológico (controle), e submetidas ao condicionamento com moléculas sinalizadoras ácido indolilacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H₂O₂), e não tratadas, germinadas em água, altas temperaturas e contaminação por cádmio.

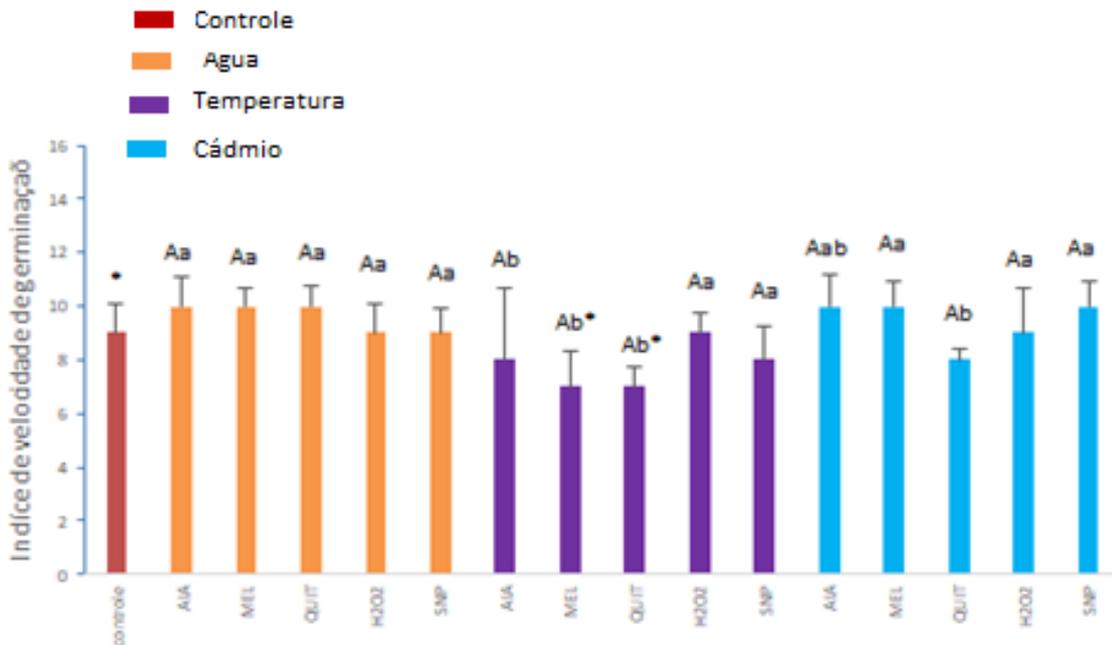


Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Não houve influência das moléculas sinalizadoras sobre a velocidade de germinação de sementes de braquiária quando da ausência de estresse (FIGURA 4). Resultado similar foi observado para a germinação sob presença de cádmio. Por outro lado, em alta temperatura, o ácido indolilacético, peróxido de hidrogênio e nitroprussiato de sódio, resultaram em velocidade similar ao controle, os valores para melatonina e quitosana foram inferiores a estes e ao controle (FIGURA 4).

Figura 4 – Índice de velocidade de germinação de sementes de *Urochloa ruziziensis* sem serem submetidas ao condicionamento fisiológico (controle), e submetidas ao condicionamento com moléculas sinalizadoras ácido indolacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H_2O_2), e não tratadas, e germinadas em água, altas temperaturas e contaminação por cádmio.

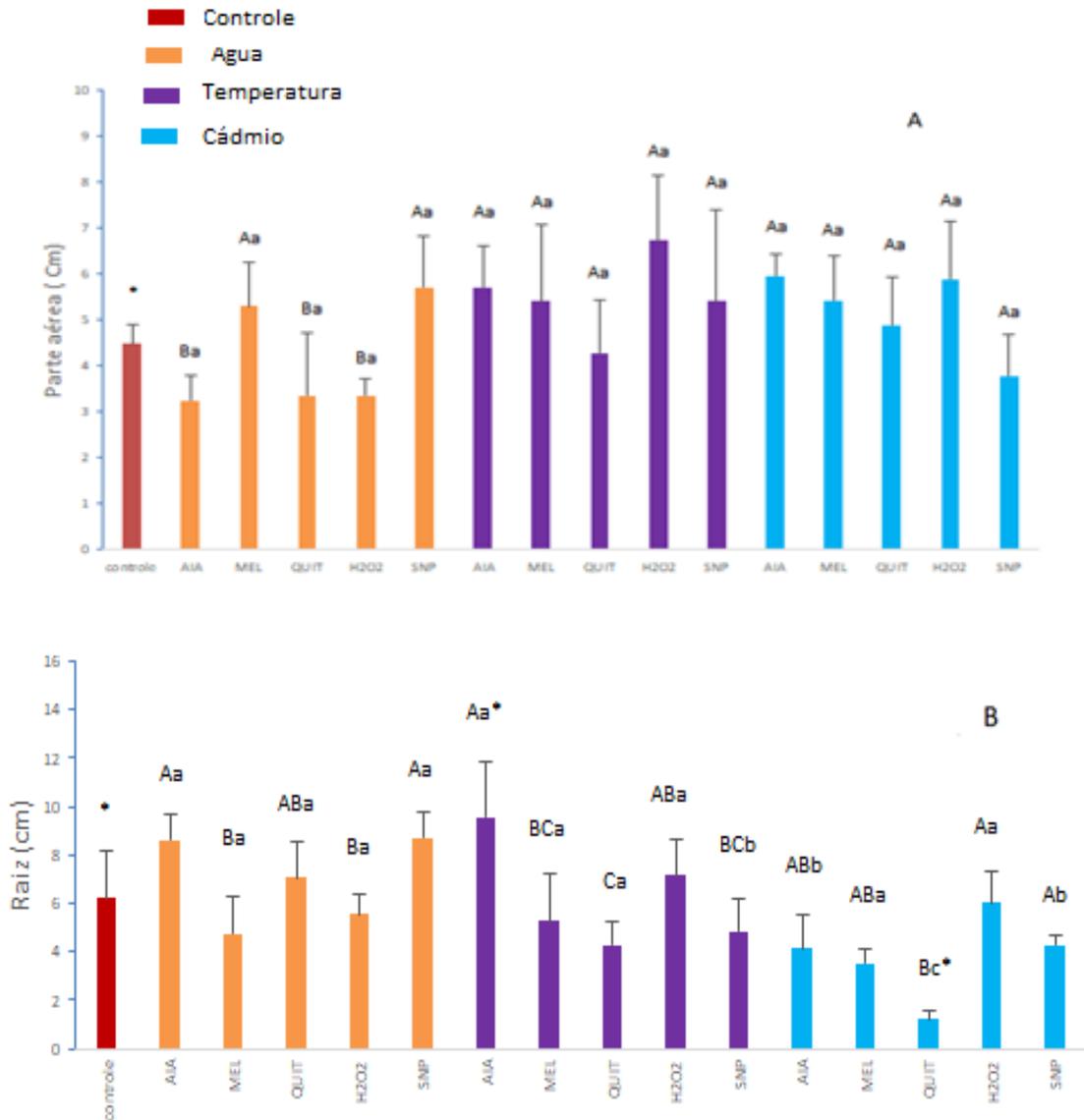


Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Sementes condicionadas em nitroprussiato de sódio e melatonina resultaram em plântulas com maior tamanho da parte aérea quando a germinação ocorreu na ausência de estresse (FIGURA 5A). Por outro lado, em ambas as condições de estresse (temperatura e cádmio), não foi observada diferença significativa entre os tratamentos de condicionamento. Além disso, em nenhuma condição de estresse foi observada diferença entre o tratamento de condicionamento e o controle (FIGURA 5A). Na ausência de estresse, maior desenvolvimento da raiz foi observado quando as sementes foram tratadas com ácido indolacético e nitroprussiato de sódio (FIGURA 5B). O uso do ácido indolacético resultou em maior tamanho da raiz na condição de alta temperatura, enquanto que nitroprussiato de sódio e peróxido de hidrogênio resultaram maiores valores quando germinadas na presença de cádmio, seguidas pelas sementes condicionadas com ácido indolacético e melatonina (FIGURA 5B). O principal efeito do ácido indolacético é promover o crescimento de raízes e caules, por meio do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (LAST *et al.*, 1991; NORMANLY *et al.*, 1993).

Figura 5 – Comprimento (cm) de parte aérea (A) e raiz (B) obtidos pela análise de imagens de plântulas de *Urochloa ruziziensis* com 7 dias de germinação em água, estresse salino (NaCl) e restrição hídrica (PEG), após serem submetidas ao condicionamento fisiológico com as moléculas sinalizadoras ácido indolacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H₂O₂), e não tratadas.



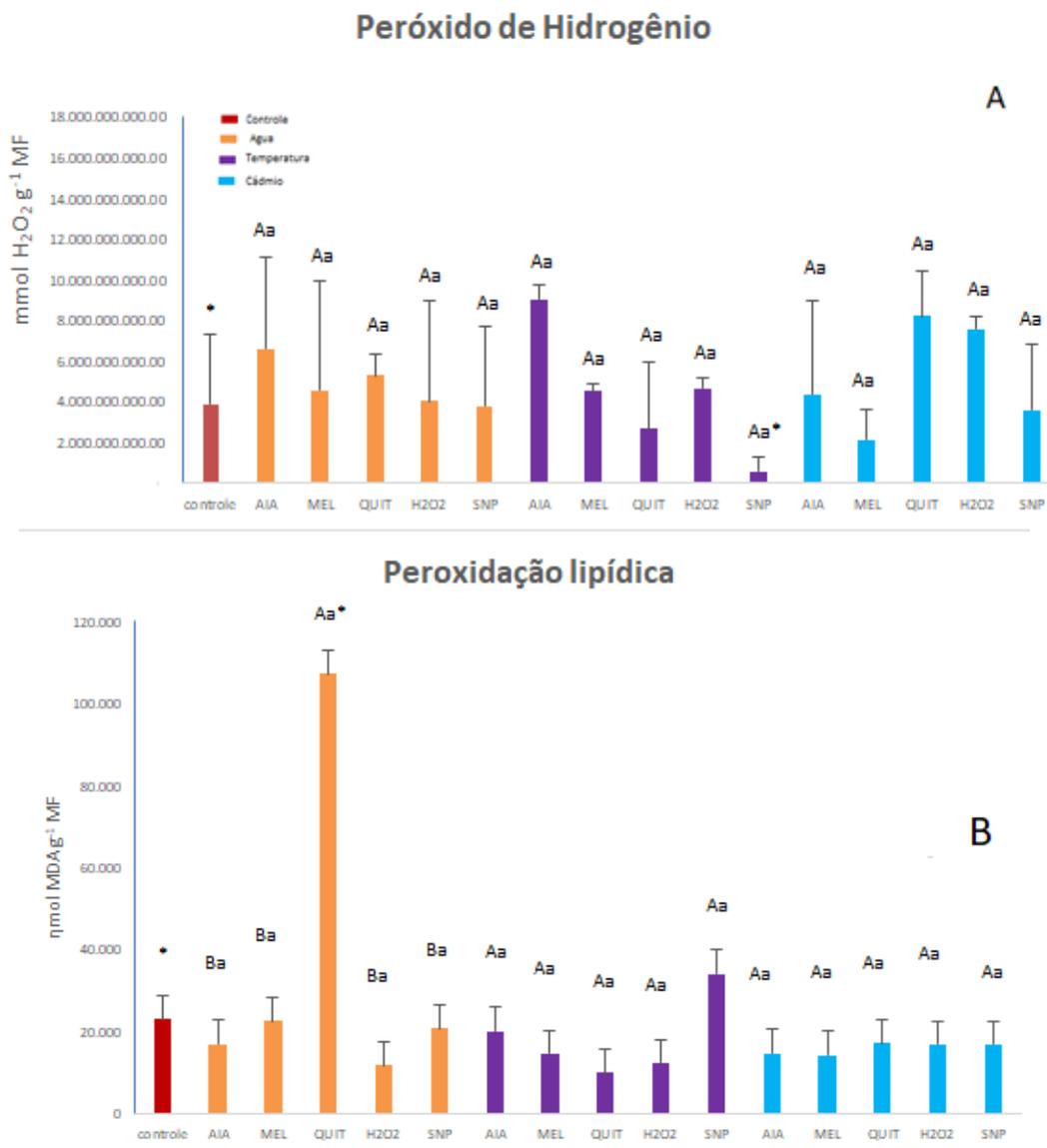
Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

Quando analisada a quantificação de peróxido de hidrogênio em sementes de braquiária (FIGURA 6A), observa-se que, dentre os tratamentos de condicionamento, bem como condição de germinação, não houve diferenças estatísticas. Contudo, para esta variável, menor valor foi observado em sementes tratadas com nitroprussiato de sódio, quando comparado ao controle (FIGURA 6A). Já quando se observa a peroxidação lipídica (FIGURA 6B), não foram

observadas diferenças entre os tratamentos de condicionamento quando as sementes foram germinadas sob ambas as condições de estresse (FIGURA 6B). Sob condição de ausência de estresse, maior peroxidação lipídica foi observada quando as sementes foram tratadas com a quitosana.

Figura 6 – Quantificação de peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação lipídica (B) em plântulas de *Urochloa ruziziensis* germinadas em água, estresse salino (NaCl) e restrição hídrica (PEG), submetidas ao condicionamento fisiológico em soluções de ácido indoliacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H₂O₂), e não tratadas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

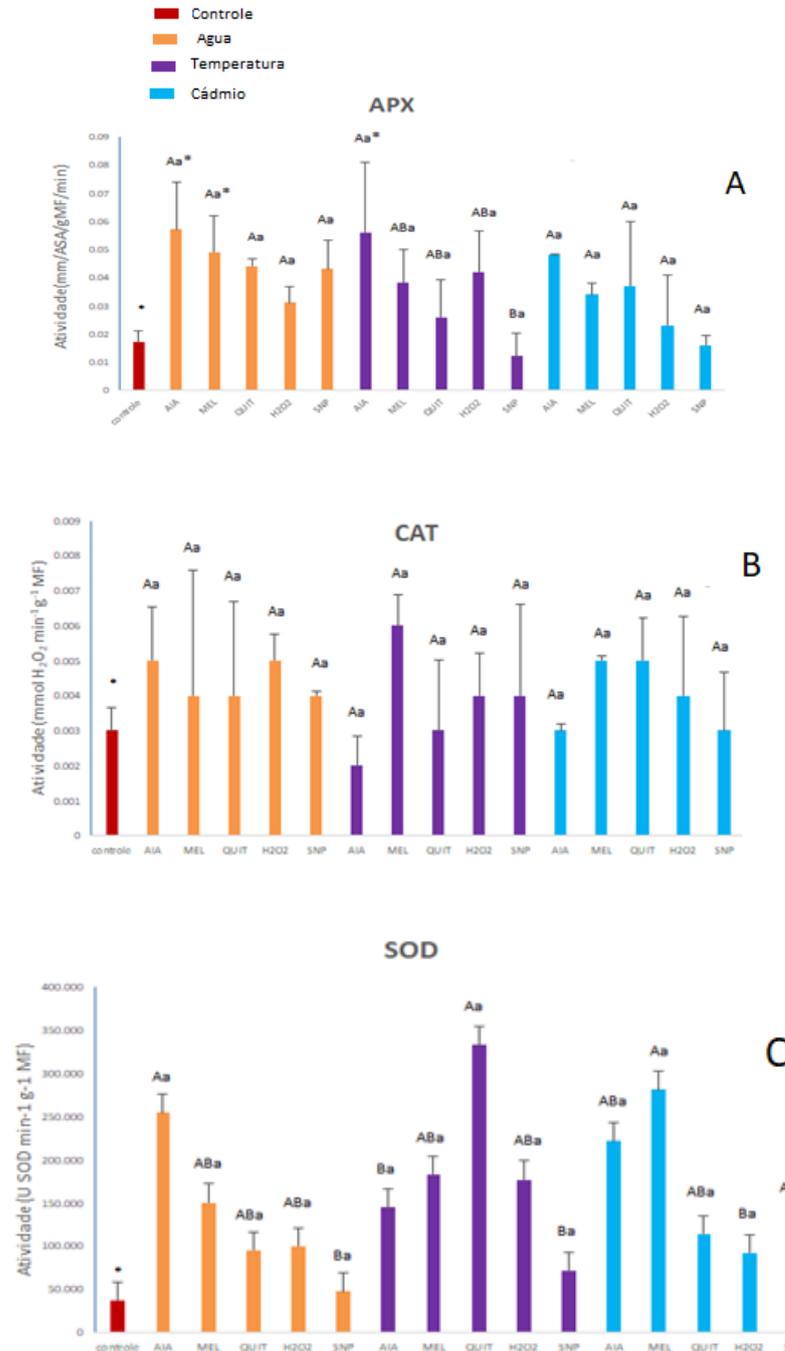
Fonte: Do autor (2023).

Para a enzima APX na ausência de estresse, não houve diferença entre os tratamentos. Diferenças foram observadas na presença de cádmio (FIGURA 7A). Quando germinadas em temperaturas de 40 °C e tratadas com ácido indolacético foi observada maior atividade da APX, apesar de não diferenciar estaticamente a melatonina, quitosana e peróxido de hidrogênio. Plantas quando expostas a estresse abióticos, causados por temperatura metais pesados, deficiência de nutrientes, salinidade e seca podem aumentar a formação de EROs (MILLER *et al.*, 2010). Ao analisar a enzima catalase é possível observar que independentemente das condições de germinação e da molécula sinalizadora não houve diferença dos valores desta enzima em sementes submetidas aos diferentes tratamentos (FIGURA 7B).

Na ausência de estresse, observa-se que ácido indolacético, melatonina, quitosana e peróxido de hidrogênio foram estaticamente iguais entre si. Verifica-se que apesar de não diferenciar estaticamente, maior expressão dessa enzima quando condicionada com ácido indolacético (FIGURA 7C). Já sob condição de estresse por temperatura, maior atividade desta enzima foi observada em sementes condicionamento com quitosana, seguidas pelas que foram condicionadas com melatonina e peróxido de hidrogênio. Na presença do cádmio, o tratamento com melatonina e ácido indolacético foram superiores aos demais (FIGURA 7C). Contudo, ao comparar os valores de SOD em sementes submetidas aos diferentes tratamentos e controle não houve diferenças estatísticas significativas.

De forma geral é possível observar maior expressão da enzima superóxido dismutase em condição de estresse altas temperaturas e cádmio. SOD atua na primeira linha de defesa contra EROs, na conversão de O_2 em H_2O_2 (MITTLER *et al.*, 2004; GILL; TUTEJA, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Porém, nem sempre está diretamente relacionada a resposta ao estresse, como observado por Chen e Arora (2011) para *Spinacia oleracea*. Estes autores verificaram que a atividade da enzima SOD diminuiu durante a germinação em condições controle, sob desidratação e sob estresse por frio.

Figura 7 – Quantificação de ascorbato peroxidase (A) e catalase (B) e superóxido dismutase (C) em plântulas de *Urochloa ruziziensis* germinadas em água, estresse salino (NaCl) e restrição hídrica (PEG), submetidas ao condicionamento fisiológico em soluções de ácido indoliacético (AIA), melatonina (MEL), quitosana (QUIT), peróxido de hidrogenio (H₂O₂), e não tratadas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula entre condições de germinação e maiúscula entre moléculas sinalizadora não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023).

4 CONCLUSÕES

Há potencial da técnica de condicionamento fisiológico para induzir maior tolerância a estresses por cádmio e temperatura em sementes de *Urochloa ruziziensis*.

O condicionamento fisiológico com peróxido de hidrogênio, nitroprussiato de sódio e ácido indolacético tem maior potencial para induzir maior tolerância a estresses abióticos em sementes de braquiária.

Em resposta aos estresses abióticos, foi possível observar eficácia do condicionamento fisiológico quanto ao estímulo à ativação do sistema antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da pecuária no Brasil, relatório anual, 2022**. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 25 maio 2022.
- ALMEIDA, A.S. *et al.* Protrusão da radícula e métodos para superação de dormência de sementes de trigo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.15, n.3, p.271-276, 2016.
- ATAÍDE, G.M. Óxido nítrico na germinação de sementes de baixo vigor de *Dalbergia nigra*. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 38, n. 3, p. 438-444, 2015.
- BAI, X.Y., Dong, Y.J., Xu, L.L. Effects of exogenous nitric oxide on physiological characteristics of perennial ryegrass under cadmium and copper stress. **Russ J Plant Physiol** v. 62, p. 237–245, 2015.
- BATISTA, T.B. *et al.* Priming of braquiária seeds with different sugar sources and concentrations. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 843-849, 2018.
- BEWLEY, J.D. *et al.* **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.
- BIANCO, C. *et al.* Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. **Archives of Microbiology**, [S.l.], v. 185, p. 373-382, 2006a.
- BIANCO, C. *et al.* Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. **Microbiology Sgm.**, [S.l.], v. 152, p. 2421-2431, 2006b.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 116, n. 2, p. 651–658, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/116/2/651/6085595>. Acesso em: 27 set. 2021.
- BONOME, L.T.S.; GUIMARÃES, R.M.; OLIVEIRA, J.A.; ANDRADE, V.C.; CABRA, P. S. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Braquiária brizantha* cv. Marandu. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.l.], v. 30, n. 3, p. 422-428, 2006.
- BONOME, L.T. *et al.* Osmoconditioning of *Urochloa brizantha* seeds to reduce pelleting negative effects. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 92, n. 2, p. 87-100, 2017.
- BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 52, n. C, p. 302–310, 1978. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>. Acesso em: 23 out. 2021.

- CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Sci.**, [S.l.], v. 180, n. 2, p. 212-20, feb. 2011.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 420, de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2017/09/resolucao-conama-420-2009-gerenciamento-de-acs.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2022.
- DASZKOWSKA-GOLEC, A. Arabidopsis seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormones. **Omics. Journal of Integrative Biology**, [S.l.], v. 15, n. 11, p. 763-774, nov. 2011.
- GIAVENO, C.; FERRERO, J. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central área of Santa Fe, Argentina. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, p. 89- 94, 2003.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, p. 909-930, 2010.
- GUILIONI, L.; WERY, J.; TARDIEU, F. Heat stress- induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs. **Annal of Botany**, London, v. 80, p. 159- 168, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5 th Edition. New York: Oxford University Press, 2015.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana glauca*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 283, n. 2, p. 491-495, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000398619090672L>. Acesso em: 23 out. 2021.
- ISMAIL, A.M.; HALL, A.E. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. **Crop Science**, [S.l.], v. 39, p. 1.762-1.768, 1999.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press, 2001. 413 p.
- KAISER, I.S. *et al.* Efeito de liberadores de óxido nítrico na qualidade fisiológica de sementes de repolho sob salinidade. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 1, p. 39-45, 2016.
- LAPERLA, C.A.I.; LIMA, M.W.P.; VILARINHO, M. S. Ecofisiologia da soja. *In*: DIAS, J.P. T.D. **Ecofisiologia de Culturas Agrícolas**. 1 ed. Belo Horizonte: EdUEMG, 2018. p. 120-132.

LAST, R.I. *et al.* Tryptophan mutants in Arabidopsis. The consequences of duplicated tryptophan synthase β genes. **Plant Cell**, [S.l.], v. 3, p. 345-358, 1991.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination - Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2015. p. 660.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, [S.l.], v. 33, p. 453-467, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 9, p. 405-410, 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. O peróxido de hidrogênio é eliminado pela peroxidase específica do ascorbato em cloroplastos de espinafre. **Fisiologia Vegetal e Celular**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAKAO, E.A; CARDOSO, V.J.M - Priming and temperature limits for germination of dispersal units of *Urochloa brizantha* (Stapf) Webster cv. Basilisk. **Brazilian Journal of Biology**, [S.l.], v. 75, n. 1, jan./mar. 2015.

NORMANLY, J.; COHEN, J.D.; FINK, G.R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. **Proc Natl Acad Sci., USA**, v. 90, p. 10355-10359, 1993.

OLIVEIRA, T.F., SANTOS, H.O., TOSTES, D.P., CAVASIN, P.Y., ROCHA, D.K., TIRELLI, G.V. Protective action of priming agents on *Urochloa brizantha* seeds under water restriction and salinity conditions. **Journal of Seed Sciences**, [S.l.], v. 43, p. 1, 2021.

PEREIRA, B.L.C. *et al.* Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Phathymenia reticulata* benth com baixo vigor. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 32, n. 38, p. 626-636, 2010.

PEREIRA, S.R. *et al.* Priming of *Urochloa brizantha* cv. Xaraés seeds. **African Journal of Agriculture Research**, Pretoria, v. 13, n.1, p. 2804-2807, 2018.

PEET, M.M.; WILLITS, D.H. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 92, p. 191-202, 1998.

PIRES, R. *et al.* Action of nitric oxide in sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) submitted to stress by cadmium. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n.1, p. 022-029, 2016.

RIBEIRO, E.C.G. *et al.* Physiological quality of *Urochloa brizantha* seeds submitted to priming with calcium salts. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, 2019.

SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos Metais. *In*: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

SEKITA, M.C. *et al.* Action of nitric oxide on the physiological potential and biochemical mechanisms of pea seeds. **Journal of Seed Science**, [S.l.], v. 43, 2021.

SILVA, A.L.D. *et al.* Effect of cyanide by sodium nitroprusside (SNP) application on germination, antioxidative system and lipid peroxidation of *Senna macranthera* seeds under saline stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 1, p. 86-96, 2019.

SILVA, A.L.D. *et al.* Effect of sodium nitroprusside (SNP) on the germination of *Senna macranthera* seeds (DC. ex Collad.) HS Irwin & Baneby under salt stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 236-243, 2015.

VALE, A.R.V.; PEREIRA, W. Disputas e barreiras não-tarifárias no comércio agrícola: as exportações de carne bovina brasileira entre 2006 e 2015. **Revista Brasileira de Políticas Públicas e Internacionais-RPPI**, v. 3, n. 2, p. 01-28, 2019.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, [S.l.], v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VOLLENWEIDER, P.; GUNTARDT-GOERG, M.S. Diagnosis of Abiotic and Biotic Stress Factors Using the Visible Symptoms in Foliage. **Environmental Pollution**, [S.l.], v. 137, p. 455-465, 2005.

ZHENG, M. *et al.* Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 78, n. 2, p.167-178, 2016.