

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES
DE FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) SUBMETIDAS À
CONDIÇÕES DE ESTRESSE: AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

YARA ANDRÉO DE SOUZA

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.**

BOTUCATU - SP

- 2007 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) SUBMETIDAS À CONDIÇÕES DE ESTRESSE: AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

YARA ANDRÉO DE SOUZA

PROF^a DR^a ANA CATARINA CATANEO

ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal

BOTUCATU - SP

- 2007 -

DEDICATÓRIA

**A meu marido Emerson e aos meus pais,
Newton e Marina.**

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus pais, Newton e Marina pela credibilidade e por estarem ao meu lado em mais essa jornada,

A meu marido Emerson pelo carinho, amor e companheirismo de todos esses anos, amo você,

Aos meus irmãos Claudia, Newton e Henrique pelo amor que nos une hoje e sempre,

Aos pequenos João Gabriel, Maria Fernanda, Mateus, Kauê e Letícia, meus amados sobrinhos,

À Vó Neide pelo grande incentivo em tudo que fiz na vida,

À Profa. Ana Catarina Cateno, pela amizade, confiança e ensinamentos de todos esses anos,

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida,

À EMBRAPA Arroz e Feijão, pelo material cedido,

À minha irmã de coração Mônica B. Neves, pelos momentos que passamos e pelas lições de vida,

À Marina S. Sanine e Jennifer Búffalo, pela amizade que construímos e apoio nesse trabalho,

A Leonardo C. Ferreira, amigo sempre presente e companheiro de trabalho,

Aos muitos amigos: Joseane Scavroni, Jonas Júnior, Valdir Zucareli, Marcio Bonjovane, Daniela Dias Pinto e Maria Olívia G. Corrêa e Luiz Fernando R. Almeida, pelos melhores e inesquecíveis momentos em Botucatu,

A todos meus amigos e amigas do Depto de Agricultura - Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP-Botucatu,

A todos os funcionários da UNESP-Botucatu pela colaboração,

A todos aqueles que estiveram comigo em mais essa jornada por meio de orações e pensamentos.

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

Resumo e Introdução Geral.....	06
Resumo.....	07
Abstract.....	09
Introdução.....	10
Revisão Bibliográfica.....	12
1. Feijão.....	13
1.1. Características Gerais.....	13
1.2. Cultivo e Produção.....	14
2. Germinação de sementes sob condições de estresse.....	15
2.1 Germinação: Deficiência Hídrica.....	16
2.2 Germinação: Alumínio.....	17
3. Estresse Oxidativo.....	19
3.1 Peroxidase.....	20
3.2 Superóxido Dismutase.....	20
3.3 Lipoperóxidos.....	21
4. Efeito do óxido nítrico na germinação.....	22
5. Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo I.....	37
Germinação de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.): efeito do óxido nítrico e do alumínio.	
Capítulo II.....	56
Óxido nítrico na germinação de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sob estresse por alumínio.	
Capítulo III.....	73
Efeito do óxido nítrico na germinação de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sob estresse por deficiência hídrica.	
Capítulo IV.....	91
Ação antioxidante do óxido nítrico em sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) submetidas à deficiência hídrica.	
Conclusões.....	113

RESUMO E INTRODUÇÃO GERAL

YARA, A. S. ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE: AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO. 2007. 114p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo avaliar algumas alterações na germinação e na bioquímica de sementes de feijão submetidas a condições de estresse e efeito do óxido nítrico. Num primeiro experimento foram avaliados os efeitos do NO e do alumínio na germinação e no desenvolvimento dos eixos embrionários de sementes de feijão. Foram utilizadas diferentes concentrações da solução de nitroprussiato de sódio (SNP), substância doadora de NO e diferentes concentrações da solução de sulfato de alumínio. Foi observado que o óxido nítrico e o sulfato de alumínio exercem efeito na germinação de sementes de feijão, acelerando e atrasando esse processo respectivamente, e também sobre a massa fresca dos eixos embrionários. No segundo experimento foi verificada a germinação de sementes de feijão quando submetidas à condição de estresse por alumínio em função do óxido nítrico, e as sementes de feijão foram submetidas a tratamentos com água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L^{-1} e solução de SNP $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, permanecendo nestas condições por um período de 18 h, o qual denominou-se embebição. Seguido da embebição, as mesmas sementes foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos previamente com as mesmas soluções e foi avaliado teor de água, após 18 h de embebição, emissão da radícula, aos sete dias da instalação do experimento, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento aos nove dias da instalação experimento. Foi observado que o alumínio impede a formação e o desenvolvimento de plântulas de feijão e o óxido nítrico não é eficiente na minimização desse efeito. Em experimento similar foi utilizado solução de polietileno glicol (PEG 6000) no potencial osmótico de $-0,6 \text{ MPa}$, para simular a condição de deficiência hídrica. Foram seguidas as mesmas condições descritas anteriormente, porém utilizando solução de PEG $-0,6 \text{ MPa}$, onde foi observado que a deficiência hídrica ocasiona atraso na germinação das sementes e o óxido nítrico é eficiente na redução dos efeitos dessa condição na formação das plântulas de feijão. No quarto experimento, foi verificada a ação antioxidante do NO nas sementes de feijão, assim as sementes foram embebidas em água destilada e em solução de SNP $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 18 h e transferidas para água destilada (T1 e T2), solução de PEG $-0,6 \text{ MPa}$ (T3 e T4) e solução de SNP $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (T5 e T6), sendo determinadas as atividades das peroxidases (POD) e da superóxido dismutase (SOD) e os teores de lipoperóxidos, dos eixos embrionários de sementes que foram coletadas às 12 e 36 h após a transferência destas para os

tratamentos. O óxido nítrico atua como antioxidante em sementes de feijão quando estas são submetidas à deficiência hídrica.

Palavras-chave: óxido nítrico, tratamento de sementes, fisiologia da germinação, enzimas antioxidantes, *Phaseolus vulgaris*.

YARA, A. S. **PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS DURING GERMINATION IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) SEEDS SUBJECTED TO STRESS CONDITIONS: NITRIC OXIDE ACTION.** 2007. 114p. THESIS (PhD) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT – The present work aimed at altercates verifying germination and biochemistry in bean seeds subjected to stress conditions and effect of nitric oxide (NO). Firstly, the effects of sodium nitroprusside (SNP) solution and aluminum evaluated on germination and the growth embryonic axes in bean seeds. Thus utilized different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) solution, NO-donor, and different concentrations aluminum sulfate solution. Were evaluated the NO and aluminium shower effect in bean seeds germination, accelerating and delaying it, respectively, and also in effect fresh mass of embryonic axes. In a second experiment, bean seeds germination kept under such conditions of stress aluminum in function NO, and seeds were treated with distilled water, aluminum sulfate solution, 30 mmol.L⁻¹ and SNP solution, 250 µmol.L⁻¹, and for an 18h period which was called “imbibition”. Water content was evaluated after 18 h imbibition’s; emission the raise primaries, count was carried out at seven days of the experiment, total germination and formation and development of seedlings were verified at nine days after the beginning of the experiment. Thus, of aluminum did not prejudicial of process germination but on development of seedlings and NO did not efficient and minimizes of that injury. In a similar experiment, polyethylene glycol (PEG 6000) solution was used at -0.6 MPa osmotic potential to simulate water deficit under the same conditions as described above. However, for the seeds imbibition to PEG solution to cause retardation emission the raise primaries, effect minimized that seeds transferred to SNP solution, and NO also effect minimized to water deficit condition in formation the bean seedlings. To verify NO antioxidant action, a fourth experiment was carried out: seeds were imbibed in distilled water and in SNP solution, 250 µmol.L⁻¹, for 18 h and then transferred to distilled water (T1 and T2), PEG solution at -0.6 MPa (T3 and T4) and SNP solution, 250 µmol.L⁻¹ (T5 and T6). Peroxidases (PG-POD and GC-POD) and superoxide dismutase (SOD) activities were evaluated as well as lipid peroxide content of the embryonic axes of seeds collected 12 and 36 h after their transference in the treatments, before and after the beginning of the germination process, respectively. NO presented an antioxidant effect on bean seeds under water deficit.

Keywords: nitric oxide, seeds treatments, physiology germination, antioxidant enzymes, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

Pertencente a família das leguminosas e ao gênero *Phaseolus*, o feijão originou-se na América e possui cerca de 55 espécies, sendo que o *Phaseolus vulgaris* recebe destacada atenção por ser a espécie cultivada mais antiga e mais utilizada em todos os continentes (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

A cultura do feijão no Brasil é uma das mais importantes, não só por fazer parte como alimento da mesa da população, mas por envolver, também, uma grande área de produção cultivada por pequenos agricultores (Yokoyama, et al., 2000). No Brasil, seu cultivo é realizado de Norte a Sul, em diferentes épocas e variados sistemas de cultivo.

As condições que as sementes encontram na implantação da cultura algumas vezes são adversas, tais como, solos salinos, ácidos, sódicos e com deficiência hídrica (Neto et al., 2006). Da maioria dos solos cultiváveis, aproximadamente 78,4% compõem-se de solos ácidos que impossibilitam a exploração econômica de culturas viáveis. Somente no Brasil, os solos do cerrado com baixa capacidade de troca de íons e alta toxicidade de alumínio representam 205 milhões de hectares (Fuente-Martínez e Herrera-Estrella, 1999).

Os metais pesados presentes no solo são originados a partir das rochas que os contêm em sua composição (Melo et al., 1997). Porém, em virtude do crescente emprego de fertilizantes e pesticidas nas culturas agrícolas, aliados ao aumento das atividades industriais e de mineração, os metais pesados são responsáveis pela contaminação do solo, cursos de água e lençol freático (Malavolta, 1994).

O alumínio é um metal pesado que causa problemas em 30-40% das terras cultiváveis do planeta, mais comumente nos trópicos, onde os solos são ácidos (Raven et al., 2001). A condição de acidez elevada resulta na disponibilidade do alumínio (Marin et al., 2004), que limita a produtividade das plantas (Custódio et al., 2002).

Outro fator relevante na produtividade das culturas é a deficiência hídrica. Dos fatores externos que interferem no processo germinativo, considera-se como o mais importante a hidratação da semente, pois a água constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos, que resultam na protrusão da raiz primária (Moraes et al., 2005).

O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a períodos de deficiência hídrica, bem como o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerarem períodos prolongados de estiagem, são essenciais na manutenção da produção agrícola brasileira e mundial, em níveis que possam alimentar uma população em constante crescimento (Nepomuceno et al., 2001). Segundo os mesmos autores, o estresse hídrico quebra o equilíbrio oxidativo/reduutivo (redox) em várias organelas celulares, como os cloroplastos. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente, leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO).

As ERO são representadas pelos radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (O_2), cuja elevada produção acarreta estresse oxidativo nas plantas (Richards et al., 1998; Tamás et al., 2004). Isto ocorre quando as ERO estão em quantidades excessivas, ultrapassando a capacidade dos organismos de neutralizá-las com seus sistemas naturais (Kuss, 2005).

O estresse oxidativo é consequência da alteração química das principais classes de biomoléculas, causando severas injúrias, como degradação de clorofila, alterações estruturais e funcionais em proteínas, fragmentação de DNA, extravasamento de íons, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (Scandalios, 1993; Smirnov, 1993; Dodge, 1994; Foyer et al., 1994; Théron et al., 2000; Moller et al., 2007).

Estudos com o óxido nítrico (NO) têm mostrado que essa molécula pode atuar tanto como citoprotetor, quanto citotóxico, de acordo com a concentração (Stamler, 1994; Beligni e Lamattina, 1999a; Leite e Sarni, 2003). Alguns trabalhos relatam seu envolvimento na inibição da expansão foliar, acúmulo de fitoalexinas e ativação de respostas de defesa contra ataque de patógenos (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Beligni e Lamattina, 1999a; Klessig, 2000; Delledonne et al., 2001; Wendehenne et al., 2001; Neil et al., 2003; Romero-Puertas e Delledonne, 2003).

A função protetora do NO contra situações de estresses abióticos também tem sido relatada, detectando-se aumento na tolerância à seca de algumas espécies de plantas por indução do fechamento estomático (Mata e Lamattina, 2001; Neil et al., 2002). Também o NO exerce função na tolerância de plantas ao estresse produzido sob condições de elevada temperatura e salinidade (Uchida et al., 2002), além de estimular a germinação em situações de elevadas concentrações de metais pesados (Kopyra e Gwózdź, 2003). Assim, pesquisas realizadas com NO têm mostrado um novo e estimulante campo de estudos da biologia de plantas (Beligni e Lamattina, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar algumas alterações germinação e a bioquímica em sementes de feijão submetidas a condições de estresse e o efeito do óxido nítrico. Dessa forma no Capítulo I foi verificado o efeito do óxido nítrico e do alumínio na germinação e no desenvolvimento dos eixos embrionários de sementes de feijão. Já nos Capítulos II e III, o objetivo foi verificar a germinação de sementes de feijão submetidas à condição de estresse por alumínio em função do óxido nítrico ou por estresse por deficiência hídrica, respectivamente, e no Capítulo IV foi investigada a ação antioxidante do óxido nítrico (NO) em sementes de feijão sob condições de deficiência hídrica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. FEIJÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

O feijão, como é conhecido popularmente, pertence à família das leguminosas e ao gênero *Phaseolus*, que possui cerca de 55 espécies sendo *Phaseolus vulgaris* a mais importante por ser a espécie cultivada mais antiga e mais utilizada nos continentes. Dessas 55 espécies, apenas cinco são cultivadas: feijoeiro comum (*P. vulgaris*), feijão de lima (*P. lunatus*), feijão Ayocote (*P. coccineus*), feijão tepari (*P. acutifolius*) e *Phaseolus polyanthus* (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Existem diversas hipóteses para explicar a origem do feijoeiro, uma delas aponta a existência a cerca de 7.000 a.C. no México, onde o feijoeiro teria sido domesticado e posteriormente disseminado para a América do Sul. Por outro lado, achados arqueológicos mais antigos, cerca de 10.000 a.C., indicam que o feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e transportado para a América do Norte. A maioria dos historiadores atribui a disseminação dos feijões no mundo em decorrência das guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Os feijões estão entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história da humanidade. Eram cultivados no antigo Egito e na Grécia, sendo também cultuados como símbolo da vida. Os antigos romanos usavam extensivamente feijões nas suas festas gastronômicas, utilizando-os até mesmo como pagamento de apostas (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

O feijoeiro se apresenta com sistema radicular formado por uma raiz principal, da qual se desenvolvem, lateralmente, as raízes secundárias e terciárias. Seu caule é herbáceo, constituído por eixo principal e uma sucessão de nós e entre-nós. O primeiro nó constitui o dos cotilédones, o segundo corresponde à inserção das folhas primárias e o terceiro das folhas trifolioladas (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

Suas flores estão agrupadas em inflorescências compostas de três partes principais: um eixo composto de pedúnculo e ráquis, as brácteas e os botões florais agrupados em complexos axilares inseridos no ráquis (Vieira e Rava, 2000). Segundo os mesmos autores, o fruto do feijão é um legume, deiscente, constituído de duas valvas unidas por duas suturas, uma dorsal e outra ventral. A cor é característica da cultivar, podendo ser uniforme ou apresentar estrias e variar de acordo com o grau de maturação, de verde até marrom (Vieira e Rava, 2000).

Quanto à semente, é exalbuminosa, com alto teor de carboidratos e proteínas, constituída externamente de um tegumento ou testa, hilo, micrópila e rafe e internamente de um embrião formado pela plúmula, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e radícula. Pode apresentar diferentes

tamanhos e ampla variabilidade de cores (preto, bege, roxo, róseo, vermelho, marrom, amarelo e branco). O tegumento pode ter uma cor uniforme ou duas, podendo apresentar estrias, manchas ou pontuações. A grande variabilidade apresentada pelas características externas da semente tem sido usada para diferenciar e classificar cultivares de feijão em alguns grupos ou tipos distintos, com base na cor e no tamanho das sementes: Preto, Mulatinho, Carioca, Roxinho, Rosinha, Amarelo, Manteigão, Branco e outros (Vieira e Rava, 2000; Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

1.2 CULTIVO E PRODUÇÃO

O feijão é um dos mais importantes constituintes da dieta do brasileiro, por ser uma excelente fonte de proteínas, além de possuir elevado conteúdo de carboidratos e ser rico em ferro. É um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, em razão de ser cultivado em grandes áreas e pela mão-de-obra empregada durante o ciclo de cultura (Vieira et al., 1998).

Considerado como um alimento básico para o brasileiro, o feijão chega a ser um componente obrigatório na dieta diária da população. A média de consumo de feijão no ano de 2006 foi 12,7 kg/brasileiro/ano. A preferência do consumidor é regionalizada e diferenciada principalmente quanto à cor e ao tipo de grão (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

As regiões mais adequadas à produção de sementes de feijão são aquelas que proporcionam condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura e adversas ao desenvolvimento de doenças. A identificação de locais que apresentem essas condições requer o estudo das características climáticas da região (Vieira, 1995).

O Brasil Central, norte de São Paulo, Minas Gerais e zonas do Nordeste brasileiro apresentam as melhores condições climáticas para a produção de sementes de feijão de alta qualidade. As condições do Sul do Brasil, com temperaturas mais amenas e alta umidade, exigem dos produtores de sementes a adoção de um eficiente esquema de manejo e tratamento fitossanitário para a obtenção de um produto sadio (Meireles et al., 2000).

O feijoeiro comum é cultivado ao longo do ano, na maioria dos estados brasileiros, proporcionando constante oferta do produto no mercado, sendo cultivado desde cultura de subsistência em pequenas propriedades até altamente tecnificadas em cultivos empresariais. A Região Sul ocupa lugar de destaque no cenário nacional, respondendo por 37% da produção, seguida da Região Sudeste com 31%, Região Nordeste com 16%, Região Centro-Oeste com 13% e da Região Norte com 3% (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

No Estado de São Paulo, o feijoeiro é cultivado em três épocas: águas (primeira safra), seca (segunda safra) e inverno (terceira safra), com a semeadura efetuada em agosto-outubro, janeiro-março

e abril-maio respectivamente (Pinzan et al., 1994). Ribeiro (2005), analisando a safra 2004/2005, no estado de Goiás, verificou que a cultura do feijão irrigado obteve acréscimo de 34,9% em área cultivada e 6,7% em produtividade, enquanto o feijão de primeira safra, apesar da redução de 22,3% em área cultivada, obteve um aumento de 79,3% em produtividade. Já a área plantada em 2005/2006 apresentou um aumento de 18,4%, isto é, uma área próxima de 41.900 hectares.

A irrigação desta cultura pode ser realizada de diferentes formas, sendo a de maior preferência por empresários agrícolas e produtores, a de aspersão, que tem a finalidade de pulverizar o jato de água, proporcionando a aplicação da irrigação na forma de chuva. Outra forma de irrigação é a realizada por sulcos, a qual tem sido usada tanto em terras altas como em várzeas sistematizadas e drenadas. Os sulcos normalmente apresentam a forma de V, com 0,15 a 0,20 m de profundidade e 0,25 a 0,30 m de largura. O espaçamento entre sulcos depende da textura do solo e do perfil de umedecimento. O comprimento do sulco é um dos principais fatores do sistema de irrigação. Também existe o método de subirrigação, no qual a umidade atinge as raízes das plantas por meio da ascensão capilar (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

A produção mundial dessa leguminosa em 2004 foi de 83,1% e ficou restrita a alguns países: Brasil, China, Índia e México, sendo que o Brasil contribuiu com 23,6% desse total. Estes dados colocaram o país como o primeiro produtor mundial de feijão. Neste mesmo ano, a produção brasileira de feijoeiro comum foi de 2,52 milhões de toneladas, em uma área colhida de 2,64 milhões de hectares composta por aproximadamente 20% do tipo preto e 80% do tipo cores, em que o grupo comercial carioca participou com 90% (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

No Paraná a safra 2005/2006 foi de 743,5 mil toneladas, e para 2006/2007 houve uma estimativa de aumento na produção de 6,3%. O Paraná garantiu cerca de 22,3% da produção brasileira de feijão, que ficou entre 3,51 e 3,54 milhões de toneladas, segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) (Agência Estadual de Notícias, 2006).

No Brasil, em relação a safra de feijão de 2007, a área plantada aumentou em até 2,5% em relação à safra passada, quando foram cultivados 4,22 milhões de hectares (Agência Estadual de Notícias, 2006).

2. GERMINAÇÃO DE SEMENTES SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Quando são coletados os frutos, as sementes presentes permanecem em estado de repouso com atividade metabólica mínima até encontrarem condições propícias para iniciarem a germinação (Popinigis, 1985).

A germinação é a retomada da atividade metabólica e crescimento pelos tecidos da semente, envolvendo reidratação, utilização de reservas nutritivas e o gradual desenvolvimento de sistemas sintetizantes, os quais permitem, à jovem planta, assumir uma existência autotrófica. O processo germinativo é endergônico e não espontâneo, necessitando da contribuição de energia do exterior (Carvalho e Nakagawa, 2000).

O processo de germinação ocorre pela ação de vários fatores externos, que incluem a temperatura, a água e o oxigênio, como também o resultado de complexas mudanças que ocorrem no interior da semente. A primeira etapa na seqüência de eventos da germinação é a embebição, um tipo de difusão que ocorre quando as sementes absorvem água. A limitação de água pode diminuir a velocidade da germinação ou até impedi-la (Vieira, 2000).

Quando a semente inicia seu processo germinativo absorve água, ocorrendo hidratação dos tecidos e hidrólise das substâncias de reserva (Carvalho e Nakagawa, 2000). A primeira estrutura a emergir da semente é a radícula, ou raiz embrionária, que possibilita a fixação no solo e assegura a continuidade do processo de absorção de água (Vieira, 2000).

O nível de hidratação das sementes, necessário para desencadear o processo germinativo pode atingir valores como 32-35%, em sementes de milho, ou 48-50% como o requerido pelo feijão (Shioga, 1990).

As condições hídricas do solo são de grande importância para a absorção de água pelas sementes, no entanto outro fator que controla a entrada de água nas sementes é a sua composição química e a permeabilidade do tegumento (Bradford, 1990).

Para os fisiologistas, a germinação começa com o processo de embebição e termina quando tem início o crescimento da plântula, evidenciado com a emissão da raiz primária. Já para os tecnologistas de sementes, esta é considerada germinada somente quando for capaz de apresentar crescimento após a emissão da raiz primária, ou seja, produzir uma plântula normal (Vieira, 2000).

2.1 GERMINAÇÃO: DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Durante o período de formação e maturação das sementes, a água apresenta importante função, atuando inicialmente na expansão e divisão celular e, posteriormente, como veículo para os produtos da fotossíntese que farão parte dos tecidos da semente ou que serão armazenados para futura utilização nas fases iniciais da germinação (Barbedo e Marcos-Filho, 1997).

A disponibilidade e a velocidade do fluxo de água para a semente são determinadas pela diferença de potencial hídrico entre a semente e o solo (Villela et al., 1991). Alterações não acentuadas na atividade metabólica das sementes, de acordo com o conteúdo de água, são provavelmente

associadas a mudanças nas atividades físicas da água, dessa forma estudos tem sugerido associações entre níveis críticos de água e alterações na atividade metabólica (Villela, 1998).

A hidratação controlada vem sendo utilizada em leguminosas e pode ser efetuada mediante exposição das mesmas à atmosfera controlada, embebição em substrato úmido ou imersas em soluções osmóticas, podendo ser realizada continuamente até níveis de umidades programados ou em ciclos de hidratação e secagem (Powell, 1998).

Dessa forma estudos voltados para o conhecimento do comportamento das sementes em situação de deficiência hídrica vêm recebendo destacada atenção e para simular essa condição a solução que mais vem sendo utilizada é a de polietileno glicol (PEG), um polímero de elevado peso molecular e difícil absorção, que não penetra pelas paredes celulares e não apresenta sinais de toxicidade (Knypel e Khan, 1981; Steuter et al., 1981; Braccini et al., 1996; Moraes e Menezes, 2003).

Em trabalhos onde as concentrações da solução de PEG variaram de -0,30 a -0,60 MPa, houve redução da germinação e da formação de plântulas em formação e em desenvolvimento e, de forma geral na manifestação do vigor das sementes de feijão e soja (Braccini et al., 1996; Moraes e Menezes, 2003; Pertel et al., 2003).

Em condição de umidade abaixo do exigido pela cultura pode ocorrer redução da atividade enzimática, como detectado pela baixa germinação de sementes e da velocidade em que ela ocorre (Bewley e Black, 1994).

Outro problema observado pela falta de água é a quebra do equilíbrio oxidativo/reduutivo em várias organelas celulares, como os cloroplastos, e dessa forma o declínio na funcionalidade dessa estrutura, leva à geração de espécies reativas de oxigênio (Nepomuceno et al., 2001).

A deficiência hídrica em plantas inicia um conjunto de processos, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (Moraes et al., 2005).

2.2 GERMINAÇÃO: ALUMÍNIO

Os metais pesados presentes no solo são originados a partir das rochas que os contêm em sua composição (Melo et al., 1997). Porém, em virtude do crescente emprego de fertilizantes e pesticidas nas culturas agrícolas, aliados ao aumento das atividades industriais e de mineração, os metais pesados são responsáveis pela contaminação do solo, cursos de água e lençol freático (Malavolta, 1994).

O alumínio é o metal mais abundante da crosta da terra, compreendendo aproximadamente 7,5% de seu peso (Echart e Cavalli-Molina, 2001). Ele ocorre em diferentes formas no solo e parte da

dificuldade em estudar os processos que ocorrem nas plantas, decorrentes da ação deste metal, pode ser atribuída à complexa química do mesmo.

Este elemento causa problemas em 30-40% das terras cultiváveis do planeta, mais comumente nos trópicos, onde os solos são ácidos. Em solos não-ácidos o alumínio está preso em compostos insolúveis, mas em solos ácidos ele torna-se solúvel, é absorvido pelas raízes e inibe o crescimento. Além disso, ele possui efeito tóxico direto sobre o metabolismo vegetal (Raven et al., 2001).

Na maioria dos solos brasileiros, o teor de alumínio é elevado, o que limita o desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, reduz a absorção, transporte e utilização dos nutrientes, diminuindo a produtividade das culturas (Silva et al., 1984).

Problemas de acidificação do solo podem ser corrigidos por calagem, entretanto, a aplicação de calcário na superfície do solo não soluciona os problemas de acidez nas camadas inferiores e a calagem a grandes profundidades geralmente não é possível por apresentar problemas técnicos e econômicos (Echart e Cavalli-Molina, 2001). Para os mesmos autores, no que se refere aos efeitos na agricultura, pode-se salientar que os resíduos de fertilizantes a base de nitrogênio-fósforo-potássio e materiais nitrogenados são fontes de acidez.

Quando presente em concentrações moderadas, o alumínio pode causar a inibição do crescimento e da divisão celular, refletindo na regulação interna dos processos de crescimento e desenvolvimento da planta (Marschner, 1986).

Algumas hipóteses apontam a ação do alumínio na inibição do fluxo de íons, ruptura da membrana plasmática, inibição do sinal de transdução e alteração da estrutura do citoesqueleto (Tamás et al., 2004). Também pode afetar a fluidez da membrana plasmática, por alterar o ambiente químico dos lipídios e por formar ligações entre as regiões polares dos fosfolipídios (Zhao et al., 1987), causando enrijecimento e levando a uma ampla série de alterações relacionadas à função das enzimas que atuam na membrana plasmática (Echart e Cavalli-Molina, 2001). Nas sementes pode reduzir a germinação, exercendo influências decisivas sobre o metabolismo das mesmas (Cruz et al., 1995).

Estudos sobre os efeitos isolados do estresse hídrico ou da toxicidade do alumínio influenciando a germinação de sementes são pouco relatados na literatura e as informações sob efeito concomitante de estresse hídrico e alumínio são praticamente escassas, necessitando ainda de estudos mais detalhados (Zaifnejad et al., 1997).

3. ESTRESSE OXIDATIVO

De 2 a 5% do oxigênio presente nos organismos é reduzido, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não emparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio – ERO (Leite e Sarni, 2003; Kuss, 2005), representado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (O_2^{\bullet}) e o mais poderoso oxidante, o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Halliwell e Gutteridge, 1984).

A presença de elétrons não pareados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química. Além disso, essa característica confere-lhes grande instabilidade, por tenderem a acoplar o elétron não pareado com um outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (Leite e Sarni, 2003).

Um elétron desemparelhado pode se associar com átomos isolados (hidrogênio ou íons metálicos), ou ainda com moléculas (açúcares, proteínas, lipídeos, DNA), o que resulta em um processo de relevância biológica (Slater, 1984; Kuss, 2005).

Diversas situações de estresse alteram o estado de oxigênio da célula da planta e levam à formação da maioria das EROs. Quando presente em quantidades relativamente baixas, as EROs e especialmente peróxido de hidrogênio podem agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra o estresse (Levine et al., 1994; Low e Mérida, 1996). Porém, quantidades mais elevadas de ERO produzidas de forma não controlada, causam severas injúrias como degradação de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento de íons, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular, causando estresse oxidativo (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1993; Dodge, 1994; Foyer et al., 1994; Thérond et al., 2000).

A resposta das plantas ao estresse oxidativo esta relacionada ao aumento da produção e ativação de metaloenzimas, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) (Bowler et al., 1992; Scandalios, 1993; Salt, 2001) e as peroxidases (POD) (Cakmak e Horst, 1991; Campa, 1991; Knörzer et al., 1996; Salt, 2001). A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção de ERO, é um indicador utilizado para se avaliar nas plantas o nível de estresse oxidativo presente (Verma e Dubey, 2003).

Além disso, fontes distintas, bióticas ou abióticas, parecem ser responsáveis pela produção de ERO sob as diferentes condições de estresse, como poluentes atmosféricos, herbicidas e metais, além de elevada temperatura e radiação (Smirnoff, 1993; Belligni e Lamattina, 1999c; Ghezzi e Bonetto, 2003; Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2005; Gechev et al., 2006).

3.1 PEROXIDASE (PODs, EC 1.11.1.7)

O termo peroxidase inclui o grupo de enzimas capazes de catalisar a oxidação de componentes celulares, tais como peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos (Kvaratskhelia et al., 1997; Rossi e Lima, 2001). Elas existem em uma variedade de isoformas, que usam vários redutores e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (Campa, 1991).

As peroxidases encontram-se amplamente distribuídas nos vegetais, exercendo importantes funções no crescimento, processo de diferenciação e desenvolvimento celular (Menezes et al., 2004). Outras funções estão associadas a estas enzimas, como a lignificação da parede celular, oxidação do ácido indol acético e do etileno e participação no processo de dormência das sementes, sendo que em alguns casos o seu efeito pode ser acentuado quando associado a fatores bióticos e abióticos (Bewley e Black, 1994). Talvez, as peroxidases sejam as únicas enzimas que polimerizam os álcoois em lignina (Rodrigues et al., 2002).

De acordo com Siegel (1993) a atividade da peroxidase é freqüentemente aumentada em resposta ao estresse, pois a proteção celular contra reações oxidativas é uma das principais funções dessa enzima. O aumento da atividade das PODs é uma resposta metabólica relacionada a diferentes tipos de estresses (Cakmak e Horst, 1991; Anderson et al., 1995; Zhang e Kirkham, 1996; Jiménez et al., 1998).

As peroxidases funcionam como uma espécie de termômetro geral das atividades fisiológicas da planta, pois suas atividades são altamente influenciadas pelas condições externas, tais como infecções (Menezes et al., 2004).

Gaspar et al. (1986) afirmou que a peroxidase parece ser a molécula chave de adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente, às mudanças do meio ambiente. De acordo com Markkola et al. (1990), a atividade dessa enzima em tecidos vegetais é usada como um indicador não específico de estresse causado por agentes poluentes, como metais pesados. A indução da atividade da peroxidase foi detectada como resposta em plantas em relação a elevados teores de metais, tais como zinco, cádmio, cobre, níquel e chumbo o que pôde ser observado tanto na parte aérea, como nas raízes (Van Assche e Clijsters, 1990; Rossi e Lima, 2001).

3.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SODs, EC 1.15.1.1)

As SODs são ubíquias nos organismos aeróbicos e são responsáveis pela eliminação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), catalisando sua dismutação para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bowler et al., 1992). A dismutação é vital para proteger as células da injúria oxidativa, visto que o radical superóxido pode reagir com o peróxido de hidrogênio para formar radical hidroxila (OH) que é

altamente reativo. Entretanto, o peróxido de hidrogênio é um subproduto tóxico do metabolismo oxidativo e é posteriormente convertido ou utilizado pelas peroxidases (Bartosz, 1997; Scandalios, 2001). Inicialmente a SOD foi descrita por alguns autores como uma proteína que possuía cobre na sua constituição, mas nenhuma atividade catalítica lhe havia sido atribuída (Kuss, 2005).

Existem tipos diferentes de SODs que variam de acordo com o metal e a localização. As que contêm cobre e zinco são denominadas de superóxido dismutases cobre-zinco dependente (CuZnSOD), encontradas no citoplasma e nos cloroplastos, sendo formas muito estáveis e que parecem estar presentes em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais). Há ainda, a superóxido dismutase dependente do manganês (MnSOD) encontrada nas mitocôndrias e a dependente de ferro (FeSOD), que se encontra nos cloroplastos (Kuss, 2005).

Enzimas como a superóxido dismutase e a glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) desempenham ações relevantes no metabolismo celular normal, na desintoxicação de ampla variedade de compostos xenobióticos e na defesa contra substâncias oxidantes (Alves et al., 2003).

Na tentativa de eliminação dos radicais superóxido formados sob condições de adversidades, as plantas apresentam mecanismos de defesa, por meio do aumento da atividade da SOD, correlacionando-se ao aumento da tolerância ao estresse (Tsang et al., 1991; Gupta et al., 1993; Scandalios, 1993; Mazhoudi et al., 1997).

3.3 LIPOPERÓXIDOS

A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção elevada de ERO, é um indicador utilizado para se avaliar nas plantas o nível de estresse oxidativo gerado (Verma e Dubey, 2003). A importância das ERO em causar alterações nos lipídios tem levado a numerosas pesquisas para determinar o melhor marcador em tecidos e fluidos biológicos (Thérond et al., 2000).

A peroxidação lipídica é o processo por meio do qual as ERO reagem com os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios das membranas das células, desintegrando-os e permitindo a entrada dessas espécies reativas nas estruturas intracelulares. As fosfolipases, ativadas pelas espécies tóxicas desintegram os fosfolipídios, liberando os ácidos graxos não saturados (Halliwell e Gutteridge, 1989), resultando em ações deletérias dos peróxidos lipídicos, tais como, ruptura das membranas celulares (bombas Na/K e Ca/Mg), mutações do DNA, oxidação dos lipídios insaturados, entre outros. Os peróxidos lipídicos possuem poder de ação maior do que as outras espécies tóxicas primárias de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH), atingindo facilmente alvos mais distantes (Kuss, 2005).

Aumentos dos teores de lipoperóxidos foram relatados em plantas submetidas a severo estresse hídrico (Baisak et al., 1994), altas temperaturas (Becana et al., 2000), radiação UV (Malanga e Puntarulo, 1995) e toxidez por cádmio e zinco (Prasad et al., 1999; Shah et al., 2001).

O grau de deterioração das sementes está associado a concentração de exsudatos das sementes na solução, e estes são o reflexo da degradação das membranas (Santos et al., 2005). É válido ressaltar que, conforme Powell e Matthews (1977) e Delouche (2002), os danos nas membranas são os eventos iniciais das alterações degenerativas nas sementes. De forma geral, essas modificações ativam complexos enzimáticos, que iniciam uma cascata de eventos moleculares e que levam à indução da expressão de várias categorias de genes (Hare et al., 1996; Nepumoceno et al., 2001).

4. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA GERMINAÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso lábil sintetizado a partir da L-arginina por ação da óxido nítrico sintetase (NOS) (Beligni e Lamattina, 1999c; Leite e Sarni, 2003). Em mamíferos essa molécula está distribuída intra e intercelularmente com um grande espectro de funções reguladoras de processos fisiológicos, sendo importante como neurotransmissor, atuando na memória. Possui também ação na imunorregulação, presente nos mecanismos de autoimunidade, além de atuar no relaxamento dos vasos sanguíneos e músculo liso, nos sistemas cardiovascular, bronco-pulmonar e renal (Moncada et al., 1991; Schmidt e Walter, 1994; Jeffrey e Synder, 1995; Lloyd-Jones e Bloch, 1996; Wink e Mitchell, 1998; Ignarro, 2000; Zilberstein e Flora, 2000).

Embora a presença do NO em plantas tenha sido conhecida há pouco tempo (Gouvêa et al., 1997; Leshem, 1996, 1998) e algumas de suas funções ainda não tenham sido totalmente esclarecidas, evidencia-se sua participação em vários processos fisiológicos vegetais.

Desde a sua descoberta o NO é considerado tanto como citoprotetor quanto citotóxico, de acordo com a concentração (Stamler, 1994; Beligni e Lamattina, 1999a; Leite e Sarni, 2003). A citoproteção está baseada na sua capacidade de regular o nível e a toxicidade das EROs (Halliwell e Gutteridge, 1984), podendo proteger do dano celular, isto é, possui a capacidade de eliminar ERO e, desse modo, finalizar as reações propagadas em cadeia (Wink, et al., 1993; Beligni e Lamattina, 1999a). Dessa forma, o NO pode exercer uma ação protetora contra o estresse oxidativo provocado por um aumento da concentração de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos alquilas (Wink et al., 1995).

Os efeitos citoprotetores do NO em plantas foram relatados sob fortes condições oxidativas durante estresses bióticos e abióticos, até mesmo sob situações fotooxidativas. A citoproteção contra danos oxidativos foi claramente observada em diferentes níveis de organização, tais como, cultura

celular, tecido, órgão e planta inteira. Também, o NO exerce ação sobre todas as macromoléculas testadas, DNA, RNA, proteínas, clorofila e lipídios (Beligni e Lamattina, 1999b, 1999c, 2002).

Outras funções vêm sendo atribuídas ao NO em plantas, como a atuação nos processos de defesa, de neutralização na vazão de íons e da fragmentação de DNA, que pode ocorrer pela ação de EROs (Kopyra e Gwózdź, 2003). Diversos estudos têm também demonstrado que o NO pode atuar como um antioxidante por impedir reações de peroxidação de lipídios (Hogg et al., 1993; Rubbo et al., 1994).

Inúmeros trabalhos identificam a função do NO na resposta imune das plantas, onde ele participa como um sinal da defesa contra ataque de patógenos (Noritake et al., 1996; Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Van Camp et al., 1998; Durner e Klessig, 1999; Klessig et al., 2000; Delledonne et al., 2001; Wendehenne et al., 2001; Neil et al., 2003; Romero-Puertas e Delledonne, 2003). Também é evidenciada sua participação na regulação da expressão de proteínas relacionadas à patogênese e da enzima fenilalanina amônia liase, ambas envolvidas na morte celular programada e em respostas planta-patógeno (Durner et al., 1998).

A função protetora do NO contra situações de estresses abióticos também tem sido relatada, detectando-se aumento na tolerância à seca de algumas espécies de plantas por indução do fechamento estomático (Mata e Lamattina, 2001; Neil et al., 2002).

O NO pode também regular processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas (Neil et al., 2002). Nas sementes ele atua na indução do processo germinativo (Beligni e Lamattina, 2000; Bethke et al., 2004) e inibição da respiração após a embebição, sendo que na raiz promove o alongamento e formação das raízes adventícias (Beligni e Lamattina, 2001).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS. **Soja deve liderar aumento da produção de grãos no Paraná**. Disponível em: < <http://www.pr.gov.br/ferroeste/> > Acesso em: 01 dez. de 2006.

ALVES, E. et al. Avaliações fisiológicas e bioquímicas de plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*) cultivadas com níveis excessivos de nutrientes. **Planta Daninha**, v.21, ed. esp., p.27-35, 2003.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiol.**, v.09, p.1247-1257, 1995.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.55, p.373–399, 2004.

BAISAK, R. et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant Cell Physiol.**, v.35, p.489-495, 1994.

BARBEDO, C.J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Bot. Bras.**, v.12, n.2, p.145-164, 1997.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiol. Plant.**, v.19, p.47-64, 1997

BECANA, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiol. Plant.**, v.109, p.372-381, 2000.

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

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-344, 1999b.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric oxide Biol. Chem. Arch. Biochem. Biophys.** v.3, n.3, p. 199-208, 1999c.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-278, 2001.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide interferes with plant photooxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant Cell Environ.**, v.25, p.737-748, 2002.

BETHKE, P.C. et al. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, n.219, p.847-855, 2004.

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

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.83-116, 1992.

BRACCINI, A.L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. **Rev. Bras. Sementes**, v.18, n.1, p.10-16, 1996.

BRADFORD, K.J. A water relation analysis of seed germination rates. **Plant Physiol.**, v.94, n.2, p.840-849, 1990.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.**, v.83, p.463-468, 1991.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE. J.; EVERSE. K.E.; GRISHAM. M.B. (Eds.). **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.2, p.25-50.

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

CRUZ, M.S. et al. Factors affecting germination of *Canavalia brasiensis*, *Leucena loucocephala*, *Clitoria ternata* and *Calopogonio mucunoides* seeds. **Seed Sci. Technol.**, v.23, n.2, p.447-454, 1995.

CUSTÓDIO, C.C. et al. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scient. Agric.**, v.59, n.1, p.145-153, 2002.

DELOUCHE, J. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Seed News**, n.6, p.24-31, 2002.

DELLEDONE, M. et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.

DELLEDONE, M. et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13454-13459, 2001.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: FOYER, C.H.; MULINEAUX, P.M. (Eds.). **Causes of Photoactive Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.219-236.

DURNER, J., KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.369-374, 1999.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-10333, 1998.

ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância. **Ciênc. Rural**, v.31, n.3, p.531-541, 2001.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Agência de Informação Feijão**. Disponível em: < <http://www.cnpaf.embrapa.br/> > Acesso em: 01 dez. 2006.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiol. Plant.**, v.92, n.44, p.696-717 1994.

FOYER C.H.; NOCTOR. G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environ.**, v.28, p.1056–1071, 2005.

FUENTE-MARTINÉZ, J. M.; HERRERA-ESTRELLA, L. Advances in the understanding of aluminum toxicity and the development of aluminum-tolerant transgenic plants. **Advanc. Agron.**, v.66, p.103-120, 1999.

GASPAR, T. et al. A twostep control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiol. Plant.**, v.64, p.418-423, 1986.

GECHEV, T.S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays.**, v.28, p.1091–101, 2006.

GHEZZI, P.; BONETTO, V. Redox proteomics: identification of oxidatively, modified proteins. **Proteomics.**, v.3. p.1145–1153, 2003.

GOUVÊA, C.M.C.P.; SOUZA, J.F.; MAGALHAES, M.I.S. NO-releasing substances the induce growth elongation in maize root segments. **Plant Growth Regul.**, v.21, p.183-187, 1997.

GUPTA, A. A. et al. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1067-1073, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of iron in oxygen radical reactions. **Methods Enzymol.**, v.105, p.47–56, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. 543 p.

HARE, P. et al. Stress-induced changes in plant gene expression. **S. Afr. J. Sci.**, v.92. p.431-439, 1996.

HOGG, N. et al. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. **FEBS Lett.**, v.334, p.170-74, 1993.

IGNARRO, L.J. **Nitric oxide: Biology and Pathobiology**. San Diego: Academic Press, 2000.

JEFFREY, S.R.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a neural messenger. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.11, p.417-440, 1995.

JIMÉNEZ, A. et al. Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiol.**, v.118, p.1327-1335, 1998.

KLESSIG, D.F. et al. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.8849-8855, 2000.

KNÖRZER, O.C.; DURNER, J.; BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultures soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiol. Plant.**, v.97, p.388-396, 1996.

KNYPL, J.S.; KHAN, A.A. Osmoconditioning of soybean seeds to improve performance at subtropical temperatures. **Agron. J.**, v.73, p.112-116, 1981.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-1017, 2003.

KUSS, F. **Agentes oxidantes e antioxidantes**, p.1-10, 2005. Disponível em: < http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag_oxid_antioxid.pdf > Acesso em: 10 dez. 2006.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidases isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiol.**, v.114, p.1237-1245, 1997.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. **Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição.** v.artigo de revisão, p.1-14, 2003. Disponível em: <<http://www.rbi.fmrp.usp.br/RFM004/ArtigosSeminarior/artigoSeminariorNF3b.pdf>> Acesso em 05 dez. 2006.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regul.**, v.18, p.155-69, 1996.

LESHEM, Y.Y.; WILLS, R.B.H.; VENG-VA KU, V. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.825-833, 1998.

LEVINE, A. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. **Cell**, v.79, p.583-593, 1994.

LLOYD-JONES, D. M.; BLOCK, K. D. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. **Anu. Rev. Med.**, v.47, p.365-375, 1996.

LOW, P.S.; MÉRIDA, J.R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiol. Plant.**, v.96, p.533-542, 1996.

MALANGA, G.; PUNTARULO, S. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. **Physiol. Plant.**, v.94, p.672-679, 1995.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental:** micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153p.

MARIN, A. et al. Germinação de sementes de guandu sob efeito da disponibilidade hídrica e de doses subletais de alumínio. **Bragantia**, v.63, n.1, p.13-24, 2004.

MARKKOLA, A.M.; OHTONEN, R.; TARVAINEN, O. Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of *Pinus sylvestris*. **Water Air Soil Pollut.**, v.52, p.149-156, 1990.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of higher plants**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1986. 674p.

MATA, C.G.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.**, v.126, p.1196-1204, 2001.

MAZHOUDI, S. et al. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). **Plant Sci.**, v. 127, p. 129-137, 1997.

MEIRELES, E.J.L.; VIEIRA, E.H.N.; SILVA, S.C.S. Clima e Produção de Sementes. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. (Eds). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p.53-63.

MELO, W.J. et al. Uso de resíduos sólidos urbanos na agricultura e impactos ambientais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro, 1997, p.28.

MENEZES, S.M. et al. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Rev. Bras. Sementes**, v.26, n.2, p.150-155, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, p.109-142, 1991.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.58, p.459-481, 2007.

MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciênc. Rural**, v.33, n.2, p.219-226, 2003.

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

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytol.**, v.159, p.11-35, 2003.

NEIL, S.J. et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-16, 2002.

NEPOMUCENO, A.L. et. al. Tolerância a seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnol. Ciência Desenvolv.**, n.23, p.12-18, 2001.

NETO, N.B.M. et al. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. **Rev. Bras. Sementes**, v.28, n.1, p.142-148, 2006.

NORITAKE, T.; KAWAKITA, K.; DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant Cell Physiol.**, v.37, p.113-116, 1996.

PERTEL, J. et al. Efeito do estresse hídrico simulado com polietileno glicol na germinação de sementes de feijão, Viçosa, MG, 2003. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 13; 2003, Gramado, RS. **Anais...Gramado**, 2003.

PINZAN, N. R.; BULISANI, E. A.; BERTI, A. J. **Feijão**: zoneamento ecológico e épocas de semeadura para o Estado de São Paulo. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1994. 19p. (Boletim Técnico, 218).

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: [s.n.], 1985. 289p.

POWELL, A.A. Seed improvement by selection and invigoration. **Sci. Agric.**, v.55, n.esp., p.26-133, 1998.

POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. Deteriorative changes in pea seeds (*Pisum sativum* L.) stored in humid or dry conditions. **J. Exp. Bot.**, v. 28, p.227-236, 1977.

PRASAD, K.V.S.K.; SARANDHI, P.P.; SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environ. Exp. Bot.**, v.42, p.1-10, 1999.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2001. cap. 30, p.609-719.

RIBEIRO, A.B. **Situação Atual (safras 2004 e 2005) e Prognóstico Safra 2005/2006**. Goiânia: Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário- Gerência de Planejamento, Controle e Qualidade, 2005. p.1-6. Disponível em: < <http://www.agronegocio.goias.gov.br/docs/porta/RelpresNov05.pdf> > Acesso em: 01 dez. de 2006.

RICHARDS, K.D. et al. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v.116, p.409-418, 1998.

RODRIGUES, A.C. et al. Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus sp.* nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciênc. Rural**, v.32, n.4, p.559-564, 2002.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, v.55, p.579-583, 2003.

ROSSI, C.; LIMA, G.P.P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Sci. Agric.**, v.58, n.1, p.197-199, 2001.

RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. **J.Biol.Chem.**, v.269, p.26066-26075, 1994.

SALT, D. Responses e Adaptations of plants to metal stress. In: HAWKESFORD. M.J. (Ed), **Molecular Analyses of Plant Adaptations to the Environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers., 2001. p.159-179.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Rev. Bras. Sementes**, v.27, n.1, p.104-114, 2005.

SCANDALIOS, J.G. Molecular responses to oxidative stresses. In: HAWKESFORD, M.J. (Ed), **Molecular Analyses of Plant Adaptations to the Environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.181-208.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v.101, p.7-12, 1993.

SCHMIDT, H.H.H.W.; WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, p.919-925, 1994.

SHAH, K. et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Sci.**, v.161, p.1135-1144, 2001.

SHIOGA, P.S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijão** (*Phaseolus vulgaris* L.). 1990.106f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regul.**, v.12, p. 303-312, 1993.

SILVA, J.B.C.; NOVAIS, R.F.; SEDIYAMA, C.S. Comportamento de genótipos de soja em solo com alta saturação de alumínio. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.19, p.287-289, 1984.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v.222, p.1-15, 1984.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytol.**, v.125, p.27-28, 1993.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p.931-36, 1994.

STEUTER, A.A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J.R. Water potential of aqueous polyethylene glycol. **Plant Physiol.**, v.67, n.1, p.64-67, 1981.

TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environ. Exp. Bot.**, v.51, p.281-288, 2004.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.3, p.373-384, 2000.

TSANG, E.W.T. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, v. 3, p. 783-792, 1991.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-523, 2002.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effect of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell Environ.**, v.3, p.195-206, 1990.

VAN CAMP, W.; INÉS, D.; VAN MONTAGU, M. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. **Trends Plant Sci.**, v.3, p.330-334, 1998.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Sci.**, v.164, p.645-655, 2003.

VIEIRA, C.; PAULA-JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa: UFV, 1998. 596p.

VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. Características Botânicas e Fisiológicas da Semente. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. (Eds.). **Sementes de feijão**: produção e tecnologia, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p.25-38.

VIEIRA, E.H.N. Produção de sementes de feijão no Brasil Central e sua relação com a produção de feijão em outras regiões. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE FEIJÃO, 1., 1995, Chapecó. **Resumos...**Chapecó: EPAGRI, 1995. p. 29-35.

VIEIRA, N.R.A. Fisiologia da Germinação. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. (Eds.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p.39-52.

VILLELA, F.A. Water relations in seed biology. **Sci. Agric.**, v.55, n.esp., p.98-101, 1998.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.26, n.11/12, p.1957-1968, 1991.

WENDEHENNE, D. et al. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.177-183, 2001.

WINK, D.A. et al. Nitric Oxide protects against cellular damage and cytotoxicity form reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p. 9813-9817, 1993.

WINK, D.A. et al. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicol. Lett.**, v.82/83, p.221-226, 1995.

WINK, D.A.; MITCHELL, L.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.434-456, 1998.

YOKOYAMA, L.P. et al. Sementes de feijão: produção, uso e comercialização. In: VIEIRA, E.H.N.(Eds.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000, p.249-270.

ZAIFNEJAD, M.; CLARK, R.B.; SULLIVAN, C.Y. Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum. **J. Plant Physiol.**, v.150, n.3, p.338- 344, 1997.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **J. Plant Physiol.**, v.149, p.489-493, 1996.

ZHAO, X.J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E.J. Al³⁺ and Ca²⁺ alteration of membrane permeability of *Quercus rubre* root cortex cells. **Plant Physiol.**, v.83, p.159-162, 1987.

ZILBERSTEIN, B.; FLORA, F.R. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Brasil.**, v.46, p.265-271, 2000.

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.):
EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO ALUMÍNIO**

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do óxido nítrico (NO) e do alumínio na germinação e no desenvolvimento dos eixos embrionários de sementes de feijão. O trabalho foi dividido em dois experimentos, sendo que no primeiro foram testadas concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), solução utilizada como doadora de NO de 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. No segundo experimento foram testadas diferentes concentrações de sulfato de alumínio de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mmol.L^{-1} . Como controle dos experimentos foi utilizado água destilada. Os experimentos foram avaliados pelo teste de germinação (24, 48, 72 e 96 h) e a massa fresca dos eixos embrionários, após 96 h do início deste teste. A concentração da solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ proporcionou aceleração do processo germinativo e as concentrações da solução de sulfato de alumínio 40 e 50 mmol.L^{-1} causaram atraso deste processo, sendo esses comportamentos mais evidentes 48 h após a instalação dos experimentos. As concentrações de SNP 50 a 750 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ proporcionaram incremento na massa fresca dos eixos embrionários, por meio do alongamento celular. Já o sulfato de alumínio causou redução da massa fresca dos eixos embrionários, sendo este efeito mais pronunciado com o aumento das concentrações das soluções. Dessa forma o NO e o alumínio possuem efeito sobre a germinação de sementes de feijão, acelerando e atrasando esse processo respectivamente, além de exercer efeito sobre a massa fresca dos eixos embrionários.

Palavras-chave: óxido nítrico, alumínio, germinação, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT – The present work aimed at verifying nitric oxide (NO) and aluminum effects on growth the embryonic axes on bean seeds germination. It was divided into two experiments: The first tested different concentrations (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 and 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) of sodium nitroprusside (SNP), which was employed as a NO-donor solution. The second experiment tested different concentrations (5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50 mmol.L^{-1}) of aluminum sulfate. Distilled water was used as control. Experiments were evaluated for using the germination test (24, 48, 72 and 96 h) and the growth of embryonic axes were evaluated by obtaining the fresh mass of the latter 96 h of germination test. The SNP solution concentration that accelerated germination process were 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and concentration the aluminum sulfate that significantly delayed the 40 and 50 mmol.L^{-1} , such effects were more evident 48 h after the beginning of the experiments. Concentration the SNP 50 - 750 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, embryonic axes fresh mass increased, arrives the alignment cell. Since aluminum sulfate reduced the embryonic axes fresh mass and such effect was more pronounced with increasing concentrations. Thus, NO and aluminum can influence bean seeds germination, accelerating and delaying it, respectively, besides practice effect such in .fresh mass of embryonic axes.

Keywords: nitric oxide, aluminum, germination, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

O feijão, como é conhecido popularmente, pertence à família das leguminosas e ao gênero *Phaseolus*, que possui cerca de 55 espécies, sendo que o *Phaseolus vulgaris* recebe destacada atenção por ser a espécie cultivada mais antiga e mais utilizada em todos os continentes. Seu fruto é um legume, deiscente, constituído de duas valvas unidas por suturas, uma dorsal e outra ventral; possui semente exalbuminosa, com elevado teor de carboidratos e proteínas, apresentando ampla variabilidade de cores (Vieira e Rava, 2000; Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

A cultura do feijoeiro envolve grande área de produção, sendo que na maioria das vezes é desenvolvida por pequenos agricultores (Vieira et al., 1998). No Brasil, o feijão é cultivado de Norte a Sul, em diferentes épocas e variados sistemas de cultivo.

Depois de realizada a colheita dos frutos, as sementes permanecem em estado de repouso com atividade metabólica mínima até encontrarem condições propícias para iniciarem a germinação (Popinigis, 1985). Quando a semente inicia seu processo germinativo ocorre absorção de água, hidratação dos tecidos e hidrólise das substâncias de reserva (Carvalho e Nakagawa, 2000) e a primeira estrutura a emergir da semente é a radícula, ou raiz embrionária, que possibilita a fixação no solo e assegura a continuidade do processo de absorção de água (Vieira, 2000).

A qualidade fisiológica das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica. A partir deste momento, processos degenerativos de natureza física, fisiológica ou bioquímica começam a ocorrer, caracterizando a deterioração, que é evidenciada pela perda da integridade do sistema de membranas, peroxidação de lipídios e acúmulo de substâncias tóxicas entre outros (Santos et al., 2004).

Os metais pesados no solo são originados a partir das rochas que os contêm em sua composição (Melo et al., 1997) ou em virtude do crescente emprego de fertilizantes e pesticidas nas culturas agrícolas, aliados ao aumento das atividades industriais e de mineração, sendo responsáveis pela contaminação do solo, cursos de água e lençol freático (Malavolta, 1994).

O alumínio é um metal pesado que limita a produtividade das plantas (Custódio et al., 2002) e sua disponibilidade é uma consequência da acidez do solo, conduzindo ao aparecimento da forma trocável (Marin et al., 2004), que pode reduzir a germinação, influenciando o metabolismo das sementes (Cruz et al., 1995).

Estudos com o óxido nítrico (NO) têm mostrado sua ação tanto como citoprotetor, quanto citotóxico, de acordo com a concentração (Stamler, 1994; Beligni e Lamattina, 1999a; Leite e Sarni, 2003). Embora sua presença em plantas tenha sido conhecida somente há pouco tempo (Leshem, 1996; Gouvêa et al., 1997, Leshem et al., 1998) e algumas de suas funções ainda não tenham sido totalmente esclarecidas, observa-se que o NO participa em vários processos fisiológicos vegetais.

Inúmeros trabalhos identificaram a função do NO na resposta de defesa das plantas, onde ele atua como um sinalizador ao ataque de patógenos (Noritake et al., 1996; Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Van Camp et al., 1998; Durner e Klessig, 1999; Klessig et al., 2000; Delledonne et al., 2001; Wendehenne et al., 2001; Neil et al., 2003; Romero-Puertas e Delledonne, 2003). Também pode regular processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas. Nas sementes ele atua na indução do processo germinativo (Beligni e Lamattina, 2000; Neil et al., 2002; Bethke et al., 2004) e inibição da respiração após a embebição, sendo que no sistema radicular promove o alongamento e formação das raízes adventícias (Beligni e Lamattina, 2001).

O NO exerce função na tolerância de plantas ao estresse produzido sob condições de elevada temperatura e salinidade (Uchida et al., 2002), além de estimular a germinação em situações de elevadas concentrações de metais pesados (Kopyra e Gwózdź, 2003).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do óxido nítrico e do alumínio na germinação e no desenvolvimento dos eixos embrionários de sementes de feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Material Vegetal

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP-Câmpus Botucatu, São Paulo, Brasil.

Foram utilizadas no trabalho sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar BRS Radiante, cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás – GO, da Safra de 2004, recebidas em Fevereiro de 2005, cuja caracterização inicial do lote resultou em 84% de sementes germinadas.

Experimento 1: Efeito do óxido nítrico na germinação

Foi utilizada nesta pesquisa solução de nitroprussiato de sódio (SNP), que é doadora de NO, nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, baseado no trabalho de Kopyra e Gwózdź (2003) e água destilada como controle.

Experimento 2: Efeito do alumínio na germinação

Foram utilizadas neste experimento solução de sulfato de alumínio nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mmol.L^{-1} e água destilada como controle.

Condução dos experimentos e avaliações

Teste de germinação e Massa fresca dos eixos embrionários

Foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes de feijão distribuídas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma terceira folha, formando-se rolos de papel. As folhas de papel foram previamente umedecidas com as soluções dos diferentes tratamentos. O volume (mL) das soluções utilizadas foi na proporção de duas vezes e meia o peso (g) do papel germitest seco e os rolos foram acondicionados em bandejas plásticas, cobertas com plástico filme transparente com perfurações e mantidos em câmaras de germinação (BOD) na temperatura de 25 °C, na ausência de luz (Brasil, 1992).

As avaliações do teste de germinação foram realizadas diariamente (24, 48, 72 e 96 h), sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram emissão de radícula e comprimento da raiz primária maior ou igual a 2 mm (Duran e Tortosa, 1985). No final deste teste (96 h após instalação do teste de germinação), foram coletados os eixos embrionários das 25 sementes, sem os cotilédones, para obtenção da massa fresca dos mesmos, expressa em grama.

Delineamento Experimental

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os dados de germinação foi utilizado esquema fatorial 9x4, ou seja, 9 concentrações de SNP e 4 leituras de germinação e esquema fatorial 8x4, ou seja, 8 concentrações de sulfato de alumínio e 4 leituras de germinação. Para os dados de massa fresca dos eixos embrionários (96 h após o início do teste de germinação) foi feita comparação das médias das diferentes concentrações de SNP ou das concentrações de sulfato de alumínio. Os dados foram submetidos a análise de variância, pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (Vieira e Hoffman, 1989). Os dados em porcentagem foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os resultados de análise de variância da germinação e da massa fresca dos eixos embrionários de sementes de feijão submetidas aos tratamentos de SNP (Experimento 1) e sulfato de alumínio (Experimento 2), onde foi verificar diferença significativa nestas variáveis.

Tabela 1: Valores de F obtidos na análise de variância dos dados referentes a germinação, leituras diárias (24, 48, 72 e 96 h) e a massa dos eixos embrionários, coleta após 96 h da instalação do teste de germinação, obtidos de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas aos tratamentos de SNP (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), Experimento 1, e sulfato de alumínio (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mmol.L^{-1}), Experimento 2.

Experimento 1		
Fatores	F	
	Germinação	Massa dos eixos
SNP(A)	5,722**	9,501**
Leituras/Coleta (B)	2193,103**	-----
A x B	4,863**	-----
CV %	9,48	10,86
DMS	1,44	1,27

** significativo a 1% de probabilidade.

Experimento 2		
Fatores	F	
	Germinação	Massa dos eixos
Sulfato de alumínio (A)	11,237**	67,280**
Leituras/Coleta (B)	4411,416**	-----
A x B	4,131**	-----
CV %	7,68	9,77
DMS	4,38	0,52

** significativo a 1% de probabilidade.

Na Tabela 2, comparando os resultados apresentados entre as concentrações de SNP, para cada leitura de germinação, nenhum dos tratamentos, nas primeiras 24 h, apresentou protusão da raiz primária, no entanto decorridas 48 h torna-se visível o rompimento do tegumento e a exposição da raiz primária da semente em todos os tratamentos. No tratamento com concentração de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi alcançado valores de 51%, valor superior ao tratamento controle e que indicou aceleração da germinação, enquanto que nas concentrações de SNP superiores a esta, ocorreu atraso de forma progressiva, sendo mais evidente 48 h após a instalação do experimento, porém os resultados indicam que essas elevadas concentrações não impediram o prosseguimento do processo germinativo. Nos

períodos subsequentes, 72 e 96 h, observou-se que o processo germinativo é concluído nas diferentes concentrações de SNP, sendo indicado pelos elevados valores de germinação. Os resultados mostram que as sementes de feijão conseguiram estabelecer o processo germinativo independente da concentração de SNP utilizada, sendo que na concentração de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ocorreu aceleração da velocidade de germinação, enquanto concentrações superiores a essa atrasaram o processo.

Tabela 2. Germinação (%) de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas a soluções de diferentes concentrações de SNP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

SNP	Germinação			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (controle)	0 aC	30 bcB	89 bA	96 bA
50	0 aC	49 aB	93 abA	100 aA
100	0 aC	37 abB	95 abA	99 abA
250	0 aC	51 aB	98 aA	100 aA
500	0 aC	35 abcB	95 abA	100 aA
750	0 aC	33 abcB	95 abA	100 aA
1000	0 aC	24 bcB	94 abA	100 aA
1250	0 aC	21 cB	98 abA	100 aA
1500	0 aC	20 cB	99 aA	100 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados da ação do NO sobre a germinação no presente trabalho são concordantes com a literatura. Em pesquisas pioneiras referentes a este assunto foi considerado por Beligni e Lamattina (2001) que o NO atua como um indutor do processo germinativo. Em outros trabalhos foi evidenciado que o NO estimulou a germinação de arroz por simulação do efeito da luz (Hung et al., 2002) e induz a quebra de dormência em sementes de *Emmenathe penduriflora* (Keeley e Fortheringham, 1997).

Sarath et al. (2006) verificaram que a germinação de sementes de *Panicum virgatum* L. foi significativamente influenciada pelo NO e relataram que ele poderia agir como desencadeador endógeno para a quebra de dormência desta espécie. Também foi verificado que o NO reduz a dormência de sementes de *Arabidopsis* (Batak et al., 2002; Bethke et al., 2004), cevada (Bethke et al., 2004), alface (Beligni e Lamattina, 2000) e *Paulonia tomentosa* (Giba et al., 1998).

Kopyra e Gwózdź (2003) observaram aumento da porcentagem de germinação de sementes de tremoço-amarelo (*Lupinus luteus*), sob efeito do NO no início da embebição e também detectaram que até próximo a concentração de SNP 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ocorre um favorecimento do processo germinativo. No entanto, nas concentrações superiores de SNP (600-1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a germinação foi afetada negativamente.

Em relação às massas dos eixos embrionários (Tabela 3), foi observado que as concentrações de SNP 50 a 750 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentaram resultados muito semelhantes entre si, e apenas a concentração de SNP 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentou menor incremento de massa. Esse comportamento semelhante entre as concentrações foi atribuído a presença do NO, que pode ocasionar alongamento celular em plantas, visto que a velocidade de germinação para esses tratamentos foi diferente quando analisamos o processo germinativo (Tabela 2).

De acordo com Gouvêa et al. (1997) e Beligni e Lamattina (2001) o NO ou compostos que o liberam estão envolvidos no desenvolvimento das raízes, sendo que induzem o alongamento celular de modo similar à auxina. Um aumento na concentração de NO foi indicado como responsável pelo desenvolvimento de raízes adventícias induzido por ácido indol acético (Pagnussat et al., 2002), sugerindo assim que o NO poderia mediar a resposta de auxina neste processo.

Tabela 3. Massa fresca dos eixos embrionários (g) obtidos de 25 sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas a soluções de diferentes concentrações de SNP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), após 96 h da instalação do teste de germinação.

SNP	Massa fresca dos eixos embrionários
0 (controle)	8,552 bc
50	10,901ab
100	11,866 a
250	12,046 a
500	10,218 abc
750	10,080 abc
1000	8,616 bc
1250	8,206 bc
1500	7,986 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando os resultados da Tabela 4, comparando as concentrações de sulfato de alumínio, para cada leitura de germinação, foi observado que nas 24 h iniciais do experimento não ocorreu protusão da raiz primária, assim como observado para as sementes de feijão submetidas ao SNP (Tabela 2), contudo decorridas 48 h tornou-se visível o rompimento do tegumento e a emissão da raiz primária das sementes.

Destaca-se que em 48 h as concentrações de sulfato de alumínio de 40 e 50 mmol.L⁻¹ ocasionaram maior atraso do processo germinativo, alcançando valores de 13 e 15%, respectivamente, no entanto, nos períodos subseqüentes (72 e 96 h) as sementes prosseguiram com o processo germinativo nas diferentes concentrações, alcançando elevados resultados, porém apenas nas concentrações de sulfato de alumínio 5 e 30 mmol.L⁻¹ (96 h) foram atingidos 100% de germinação.

Assim os resultados mostram que as sementes de feijão sofreram atraso na velocidade de germinação quando na presença de elevadas concentrações de sulfato de alumínio, contudo a concentração de 30 mmol.L⁻¹ parece não ter afetado o prosseguimento do processo germinativo.

Em sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) Marin et al. (2004) verificaram redução significativa da germinação, proporcional ao aumento das concentrações de alumínio. Matsumoto (2000), Echart e Cavalli-Molina (2001) e Rout et al. (2001) verificaram que altas concentrações de alumínio causam retardamento da germinação e do desenvolvimento de plântulas.

Tabela 4. Germinação (%) de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas a soluções de diferentes concentrações de sulfato de alumínio (mmol.L⁻¹).

sulfato de alumínio	Germinação			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (controle)	0 aD	38 aC	90 aB	99 abA
5	0 aD	31 abC	89 aB	100 aA
10	0 aD	29 abC	90 aB	96 cA
15	0 aD	24 bcC	85 abB	95 bcA
20	0 aD	28 abC	87 abB	95 bcA
30	0 aD	24 bcC	89 aB	100 aA
40	0 aD	13 dC	77 bB	97 bcA
50	0 aD	15 cdC	81 abB	97 bcA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

São apresentados na Tabela 5 os resultados da massa fresca dos eixos embrionários, onde se nota que de acordo com o aumento das concentrações utilizadas ocorreu redução da massa. Esse fato pode ser atribuído a toxicidade apresentada pelo alumínio nas plantas, gerando danos ao sistema radicular.

Estudos com sementes de guandu indicam que quanto maior a situação de estresse por metal, menor o acúmulo de massa seca das raízes, ou seja, são parâmetros diretamente proporcionais (Marin et al., 2004).

Tem sido relatado que os sintomas de toxicidade de alumínio se manifestam primeiramente no sistema radicular e que diferentes cultivares de feijão, em condições de elevada acidez do solo, apresentam redução do diâmetro radicular à custa do crescimento em comprimento, além de que a inibição do crescimento da raiz é o sintoma primariamente da toxicidade do alumínio em plantas (Silva et al., 1984; Degenhardt et al., 1998; Silva et al., 2004).

Tabela 5. Massa fresca dos eixos embrionários (g) obtidos de 25 sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas a soluções de diferentes concentrações de sulfato de alumínio (mmol.L^{-1}), após 96 h da instalação do teste de germinação.

sulfato de alumínio	Massa fresca dos eixos embrionários	
0 (controle)	8,934	A
5	5,932	B
10	4,850	Bc
15	4,180	Cd
20	4,030	Cd
30	3,808	Cd
40	3,228	D
50	3,152	D

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Durante as avaliações foi observado que o alumínio causou modificação nas radículas das sementes germinadas, apresentando enrolamento e até necrose nas extremidades dessa estrutura, como ilustrado na Figura 1.

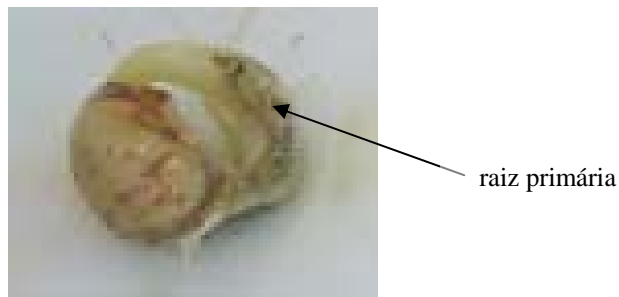


Figura 1. Aspecto geral de semente de feijão, após 48 h do início do processo germinativo, na presença de sulfato de alumínio.

De acordo com Kochian (1995), Matsumoto (2000) e Rout et al. (2001) elevadas concentrações de alumínio inibem a elongação radicular, sendo proposto que o efeito é devido à inibição da divisão celular, disjunção da parede celular, inibição do fluxo de íons e perda da integridade da membrana plasmática. A perda de integridade de membrana ocorre devido ao alumínio deslocar por competição o cálcio externo, que determinam a rigidez da membrana de tal modo que removendo o cálcio, a integridade da membrana fica comprometida, tornando-a vazada e desfazendo sua função normal (Kinraide et al., 1992; Echart e Cavalli-Molina, 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óxido nítrico e o sulfato de alumínio possuem efeitos sob as sementes de feijão, acelerando e atrasando esse processo respectivamente, e sobre a massa fresca dos eixos embrionários.

A concentração de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ocasionou aceleração do processo germinativo nas primeira 48 h de avaliação, enquanto que as concentrações de sulfato de alumínio de 40 e 50mmol.L^{-1} ocasionaram atraso nesse mesmo período.

As sementes de feijão, nos períodos de 72 e 96 h apresentaram 100% de germinação em praticamente todos os tratamentos com SNP. Já para os tratamentos com sulfato de alumínio apenas as concentrações de 5 e 30mmol.L^{-1} apresentaram esse resultado.

As concentrações de SNP 50 a $750 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentaram efeito similar no desenvolvimento dos eixos embrionários de sementes de feijão, proporcionando alongamento celular, enquanto que todas concentrações de sulfato de alumínio foram prejudiciais ao desenvolvimento dos eixos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATAK, I. et al. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B- specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Seed Sci. Res.**, n.12, p.253-259, 2002.

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

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-278, 2001.

BETHKE, P.C. et al. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, n.219, p.847-855, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

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

CRUZ, M.S. et al. Factors affecting germination of *Canavalia brasiensis*, *Leucena loucocephala*, *Clitoria ternata* and *Calopogonio mucunoides* seeds. **Seed Sci. Technol.**, v.23, n.2, p.447-454, 1995.

CUSTÓDIO, C.C. et al. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Sci. Agric.**, v.59, n.1, p.145-153, 2002.

DEGENHARDT, J. et al. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiol.** v.117, p.19-27, 1998.

- DELLEDONE, M. et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.
- DELLEDONE, M. et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13454-13459, 2001.
- DURAN, J.M.; TORTOSA, M.E. The effect of mechanical and chemical scarification on germination of charlock *Sinapsis arvensis* L. seed. **Seed Sci. Technol.**, v.13, p.155-163, 1985.
- DURNER, J., KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p369-374, 1999.
- DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-10333, 1998.
- ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância. **Ciênc. Rural**, v.31, n.3, p.531-541, 2001.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Agência de Informação Feijão**. Disponível em: < <http://www.cnpaf.embrapa.br/> > Acesso em: 01 dez. 2006.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In...45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.
- GIBA, Z. et al. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree sedes. **Plant Growth Regul.**, n.26, p.175-181, 1998.
- GOUVÊA, C.M.C.P.; SOUZA, J.F.; MAGALHAES, M.I.S. NO-releasing substances the induce growth elongation in maize root segments. **Plant Growth Regul.**, v.21, p.183-187, 1997.

HUNG, K.T.; CHANG, C.J.; KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-166, 2002.

KEELEY, J.E.; FORTHERINGHAM, J. Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. **Science**, v.276, p.1248-1250, 1997.

KINRAIDE, T.B. et al. Interactive effects of Al³⁺, H⁺ and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. **Plant Physiol.** v.99, p.1461-1468, 1992.

KLESSIG, D.F. et al. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.8849-8855, 2000.

KOCHIAN, L.V., Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.46, p.267-260, 1995.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-1017, 2003.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. **Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição.** v.artigo de revisão, p.1-14, 2003. Disponível em: <<http://www.rbi.fmrp.usp.br/RFM004/ArtigosSeminarario/artigoseminarioNF3b.pdf>> Acesso em 05 dez. 2006.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regul.**, v.18, p.155-69, 1996.

LESHEM, Y.Y.; WILLS, R.B.H.; VENG-VA KU, V. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.825-833, 1998.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental:** micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153p.

MARIN, A. et al. Germinação de sementes de guandu sob efeito da disponibilidade hídrica e de doses subletais de alumínio. **Bragantia**, v.63, n.1, p.13-24, 2004.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Int. Rev. Cytol.** v.200, p.1-46, 2000.

MELO, W.J. et al. Uso de resíduos sólidos urbanos na agricultura e impactos ambientais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro, 1997, p.28.

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytol.**, v.159, p.11-35, 2003.

NEIL. S.J. et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-16, 2002.

NORITAKE, T.; KAWAKITA, K.; DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant Cell Physiol.**, v.37, p.113-116, 1996.

PAGNUSSAT, G.C. et al. Nitric oxide required for root organogenesis. **Plant Physiol.**, n.129, p.954-956, 2002.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: [s.n.], 1985. 289p.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, v.55, p.579-583, 2003.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v.21, p.3-21, 2001.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Rev. Bras. Sementes**, v. 26, n.1, p.110-119, 2004.

SARATH, G. et al. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, n.223, p.1154-1164, 2006.

SILVA, J.B.C.; NOVAIS, R.F.; SEDIYAMA, C.S. Comportamento de genótipos de soja em solo com alta saturação de alumínio. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.19, p.287-289, 1984.

SILVA, L.M. et al. Sistema radicular de cultivares de feijão em resposta à calagem. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.39, n.7, p.701-707, 2004.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, v.78, p.931-36, 1994.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-523, 2002.

VAN CAMP, W.; INÉS, D.; VAN MONTAGU, M. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. **Trends Plant Sci.**, v.3, p.330-334, 1998.

VIEIRA, C.; PAULA-JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa: UFV, 1998. 596p.

VIEIRA, N.R.A. Fisiologia da Germinação. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. (Eds.). **Sementes de feijão**: produção e tecnologia, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p.39-52.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

WENDEHENNE, D. et al. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.177-183, 2001.

**ÓXIDO NÍTRICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
FEIJÃO (*Phaseolus Vulgaris* L.) SOB ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo verificar a germinação de sementes de feijão submetidas a condição de estresse por alumínio em função do óxido nítrico. Para realização do experimento foi utilizada solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doadora de NO, na concentração de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e solução de sulfato de alumínio na concentração de 30mmol.L^{-1} . As sementes de feijão foram distribuídas sobre papel umedecido com água destilada, solução de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo mantidas nestas condições por um período de 18 h, o qual denominou-se embebição. Decorridas 18 h, as mesmas sementes foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos previamente com água destilada, solução de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Foi avaliado teor de água, após 18 h de embebição, emissão da radícula, aos sete dias da instalação do experimento, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento aos nove dias da instalação do experimento. As sementes submetidas a embebição em solução de SNP absorveram maior quantidade de água que as sementes submetidas as demais condições. Independe das condições de embebição e de transferência, a que foram submetidas às sementes de feijão, houve emissão da radícula no período avaliado, assim, os resultados de germinação total foram elevados. Já quando as sementes foram transferidas para solução de sulfato de alumínio, houve danos na formação e no desenvolvimento das plântulas, independente da solução de embebição. Dessa forma pode-se concluir que o alumínio não foi prejudicial ao processo germinativo, mas sim ao desenvolvimento das plântulas de feijão e o óxido nítrico não foi eficiente na minimização desse dano.

Palavras-chave: óxido nítrico, alumínio, germinação, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT – The present work aimed at verifying the germination of bean seeds subjected to aluminum-stress condition on function the nitric oxide (NO). A sodium nitroprusside (SNP) solution, NO-donor, at $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, and an aluminum sulfate solution, at 30 mmol.L^{-1} , were used in the experiment. Bean seeds were distributed onto paper moistened with distilled water, aluminum sulfate solution, 30 mmol.L^{-1} and SNP solution, $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, and kept in such conditions for an 18h period which was called imbibitions. Then, the seeds were transferred to new rolls of paper previously moistened with distilled water, aluminum sulfate solution, 30 mmol.L^{-1} , and SNP solution, $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Water content was evaluated after 18 h imbibition's; emission the raise primaries, count was carried out at seven days of the experiment, total germination and formation and development of seedlings were verified at nine days after the beginning of the experiment. The seeds subjected imbibition's SNP solution and aluminum sulfate solution absolver increase water that another condition. Independents the condition imbibition's and transference, the bean seeds subjected, heave emission the raise primaries on evaluated period and resulted total germination that increase. When seeds were transference in sulfate aluminum solution, the formation and development of seedlings were damaged, independent the solution imbibition. Thus, of aluminum did not prejudicial of process germination but on development of seedlings and NO did not efficient and minimizes of that injury. NO show any protective action against the harmful effects on bean seeds germination.

Keywords: nitric oxide, aluminum, germination, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, sendo a mais cultivada o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Sabe-se que os grandes exploradores ajudaram a difundir o uso e o cultivo de feijão para diversos lugares do planeta (Embrapa Arroz e Feijão, 2006). A cultura do feijão no Brasil é uma das mais importantes, não só por fazer parte, em boa proporção, da mesa da população, mas por envolver, também, uma grande área de produção cultivada na maior parte, por pequenos agricultores (Yokoyama et al., 2000).

Da maioria dos solos cultiváveis, aproximadamente 78,4%, compõem-se de solos ácidos que impossibilitam a exploração econômica de culturas viáveis. Somente no Brasil, os solos dos cerrados, com baixa capacidade de troca de íons e alta toxicidade de alumínio, representam 205 milhões de hectares. A condição de acidez elevada resulta na dissolução de minerais de argila e óxido de alumínio, conduzindo ao aparecimento de forma trocável, ou seja, a disponibilidade do alumínio é uma consequência da acidez do solo (Marin et al., 2004), que limita a produtividade das plantas (Custódio et al., 2002).

O alumínio pode afetar a fluidez da membrana plasmática, por alterar o ambiente químico dos lipídios e formar ligações entre as regiões polares dos fosfolipídios (Zhao et al., 1987). Outras hipóteses apontam que, a ação do alumínio tóxico inclui inibição do fluxo de íons, ruptura da membrana plasmática, inibição do sinal de transdução e alteração da estrutura do citoesqueleto (Tamás et al., 2004). Nas sementes pode reduzir a germinação, exercendo influências decisivas sobre o metabolismo das mesmas (Cruz et al., 1995).

Em contrapartida, desde a sua descoberta como um radical livre endógeno, o óxido nítrico (NO) é considerado tanto como citoprotetor, quanto citotóxico, de acordo com a concentração (Stamler, 1994; Leite e Sarni, 2003; Beligni e Lamattina, 1999a). Em plantas sua atuação tem sido conhecida somente há pouco tempo (Gouvêa et al., 1997; Leshem, 1996; 1998) e embora algumas de suas funções ainda não tenham sido totalmente esclarecidas, evidencia-se sua participação em vários processos fisiológicos vegetais.

Diversos trabalhos relatam seu envolvimento na inibição da expansão foliar, acúmulo de fitoalexinas e ativação de respostas de defesa contra ataque de patógenos (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Beligni e Lamattina, 1999b; Klessig et al., 2000; Delledonne et al., 2001; Wendehenne et al., 2001; Neil et al., 2003; Romero-Puertas e Delledonne, 2003).

A função protetora do NO contra situações de estresses abióticos também tem sido relatada, detectando-se aumento na tolerância à seca de algumas espécies de plantas por indução do fechamento estomático (Mata e Lamattina, 2001; Neil et al., 2002). O NO exerce função na tolerância de plantas ao

estresse produzido sob condições de elevada temperatura e salinidade (Uchida et al., 2002), além de estimular a germinação em situações de elevadas concentrações de metais pesados (Kopyra e Gwózdź, 2003). Assim, pesquisas realizadas com NO têm mostrado um novo e estimulante campo de estudos da biologia de plantas (Beligni e Lamattina, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a germinação de sementes de feijão submetidas à condição de estresse por alumínio em função do óxido nítrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Material Vegetal

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP-Câmpus Botucatu, São Paulo, Brasil.

Foram utilizadas no trabalho sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar BRS Radiante, cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás – GO, da Safra de 2004, recebidas em Fevereiro de 2005, cuja caracterização inicial resultou em 84% de sementes germinadas e teor de água de 9%.

Tratamentos: Óxido Nítrico e Alumínio na germinação

Em experimento preliminar foi estabelecida a concentração da solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doadora de óxido nítrico (NO), que causou aceleração da germinação e a concentração da solução de sulfato de alumínio que causou atraso deste processo, equivalentes a $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 30mmol.L^{-1} , respectivamente. Como controle foi utilizada a condição de embebição em água destilada.

Condução do experimento

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes de feijão distribuídas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma terceira folha, formando-se rolos de papel. As folhas de papel foram previamente umedecidas com as soluções dos diferentes tratamentos. O volume (mL) das soluções utilizadas foi na proporção de duas vezes e meia o peso (g) do papel germitest seco e os rolos foram acondicionados em bandejas plásticas, cobertas com plástico filme transparente com perfurações e mantidos em câmaras de germinação (BOD) na temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, na ausência de luz (Brasil, 1992).

Os papéis de germinação foram umedecidos com água destilada, solução de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As sementes foram mantidas nestas condições por um período de 18 h, o qual denominou-se embebição, conforme especificado na Figura 1. Nesse período as sementes de feijão apresentavam maior volume que o inicial, conforme observado visualmente, indicando absorção das soluções.

Decorridas 18 h, as mesmas sementes foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos previamente com água destilada, solução de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 1) e foram mantidos em câmara de germinação nas mesmas condições anteriormente descritas.

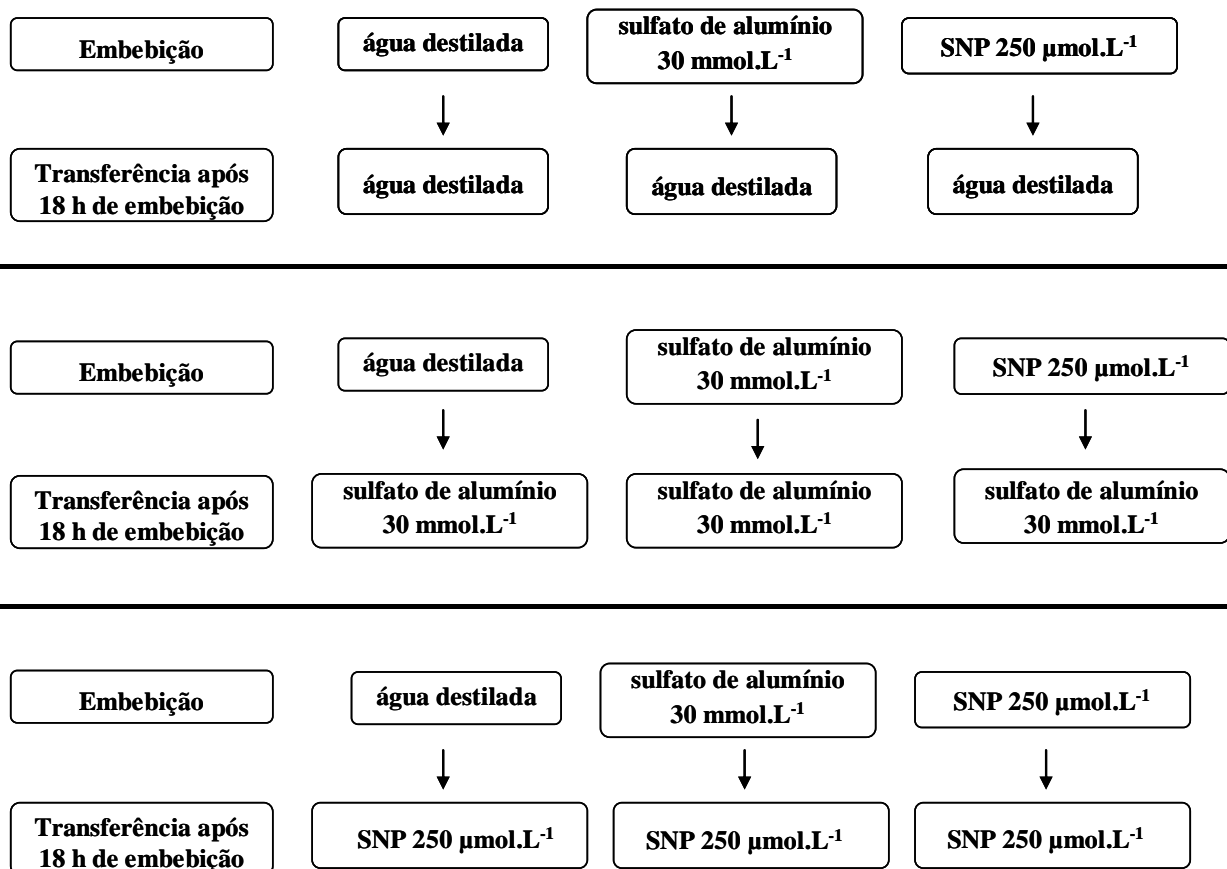


Figura 1. Esquema dos diferentes tratamentos (combinação das condições de embebição e transferência) a que foram submetidas às sementes de feijão.

Avaliações

Teor de água

A fim de avaliar a absorção de água pelas sementes nos diferentes tratamentos durante o período de embebição, foi determinado o teor de água. Para tanto, quatro repetições de 10 sementes de feijão foram colocadas nas mesmas condições de embebição, conforme Figura 1 e decorridas 18 h, as sementes foram coletadas, pesadas e acondicionadas em saco de papel, sendo mantidas em estufa a 65°C até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem com base na massa fresca das sementes.

Teste de Germinação

As avaliações do teste de germinação foram realizadas aos sete dias (emissão da radícula) e aos nove dias (germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento) a partir da instalação do experimento. Foram consideradas para emissão da radícula as sementes que apresentavam a estrutura

radicular com comprimento maior ou igual a 2 mm (Duran e Tortosa, 1985) e como germinação total as sementes que apresentavam raiz e parte aérea emitidas após nove dias da instalação do experimento. Foram consideradas plântulas em formação e em desenvolvimento as que apresentavam parte aérea e sistema radicular formados e em desenvolvimento.

Delineamento Experimental

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os dados de teor de água foi realizada comparação de médias entre as condições de embebição (água destilada, solução de sulfato de alumínio e solução de SNP). Já para os dados de emissão da radícula, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento foi utilizado esquema fatorial 3x3, ou seja, 3 condições de embebição (água destilada, solução de sulfato de alumínio e solução de SNP) e 3 condições de transferência (água destilada, solução de sulfato de alumínio e solução de SNP). Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (Vieira e Hoffman, 1989). Os dados em porcentagem foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise realizada para teor de água mostrou que houve diferença significativa entre as condições de embebição. Os valores de F, CV e DMS foram 4,073* (significativo a 5% de probabilidade), 5,67% e 4,88 respectivamente.

Na Tabela 1 os dados apresentados de teor de água, de sementes de feijão, mostram que a condição de embebição em solução de SNP favoreceu a entrada de água nas sementes, visto que seu resultado foi superior as condições embebição em água destilada e sulfato de alumínio.

Tabela 1: Teor de água (%) obtido de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após terem sido submetidas à 18 h de embebição em água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹.

Embebição	Teor de Água
água destilada	41,47 b
sulfato de alumínio	43,14 ab
SNP	46,38 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da Tabela 2 indicam interação significativa entre os fatores analisados para emissão de radícula e plântulas em formação e em desenvolvimento, enquanto que os dados de germinação total não apresentaram esse comportamento.

Tabela 2: Valores de F obtidos na análise de variância dos dados referentes a emissão da radícula, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento obtidos de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas as condições de embebição (água destilada, solução de sulfato de alumínio e solução de SNP) e transferência (água destilada, solução de sulfato de alumínio e solução de SNP).

Fatores	F		
	Emissão da Radícula	Germinação Total	Plântulas em formação e em desenvolvimento
Embebição (A)	0,646 ^{NS}	0,077 ^{NS}	0,336 ^{NS}
Transferência (B)	1,841 ^{NS}	1,462 ^{NS}	498,860**
AxB	11,465**	1,000 ^{NS}	471,010**
CV %	8,19	2,44	7,86
DMS	1,79	2,43	4,66

** significativo a 1% de probabilidade e NS não significativo.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de emissão da radícula, após sete dias da instalação do experimento, onde foi possível verificar que independe das condições de embebição e de

transferência às sementes de feijão conseguiram emitir a radícula nesse período avaliado, dessa forma os resultados de germinação total (Tabela 4) foram elevados e confirmam que as condições a que foram submetidas às sementes de feijão não são prejudiciais aos processos de emissão da radícula e germinação total.

Tabela 3: Emissão da radícula (%) de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após sete dias da instalação do experimento, submetidas a embebição em água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹ e após 18 h transferidas para água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹.

Transferência	Embebição		
	água destilada	sulfato de alumínio	SNP
água destilada	80 aB	100 aA	83 aB
sulfato de alumínio	85 aA	98 aA	79 aB
SNP	84 aA	95 aA	75 aB

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4: Germinação total (%) de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após nove dias da instalação do experimento, submetidas a embebição em água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹ e após 18 h transferidas para água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹.

Transferência	Embebição		
	Água destilada	Sulfato de alumínio	SNP
Água destilada	99 aA	99 aA	99 aA
Sulfato de alumínio	100 aA	99 aA	98 aA
SNP	96 aA	98 aA	99 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Matsumoto (2000), Echart e Cavalli-Molina (2001) e Rout et al. (2001) verificaram que elevadas concentrações de alumínio causam retardamento da germinação e no desenvolvimento de plântulas. No entanto, no presente trabalho, a concentração de 30 mmol.L⁻¹ de sulfato de alumínio parece não ter influenciado o processo germinativo das sementes de feijão, uma vez que em todos os tratamentos foram alcançados valores elevados de germinação total, indicando que mesmo em condições com um agente estressante, no caso o sulfato de alumínio, as sementes de feijão conseguiram estabelecer o processo germinativo (Tabela 4).

Em estudos realizados com sementes de outras espécies, como tremço amarelo (*Lupinus luteus*), Kopyra e Gwózdź (2003) relataram que o SNP exerceu considerável efeito na promoção da germinação sob condições de estresse causado pela presença de chumbo e cádmio, indicando que o NO é eficiente contra o impacto negativo ocasionado por metais pesados sobre a germinação, porém no presente trabalho tal comportamento não foi observado, sendo que a concentração de alumínio utilizada não ocasionou danos aparentes nos parâmetros até aqui avaliados.

Contudo na Tabela 5 os resultados mostram que independente da condição de embebição, a transferência das sementes para solução de sulfato de alumínio não permitiu plântulas em formação e em desenvolvimento, e que a presença desse metal afeta diretamente o desenvolvimento de plantas de feijão.

Tabela 5: Plântulas em formação e em desenvolvimento (%) obtidas de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após 9 dias da instalação do experimento, submetidas a embebição em água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹ e após 18 h transferidas para água destilada, solução de sulfato de alumínio 30 mmol.L⁻¹ e solução de SNP 250 µmol.L⁻¹.

Transferência	Embebição		
	Água destilada	Sulfato de alumínio	SNP
Água destilada	88 aA	87 aA	99 aA
sulfato de alumínio	0 bA	1 bA	0 bA
SNP	87 aA	89 aA	87 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Outro ponto observado foi que a embebição em água destilada ou em solução de SNP proporcionaram de forma semelhante à formação das plântulas de feijão, indicando que o óxido nítrico da solução não apresentou, nessa situação específica, o comportamento de citoproteção quando as sementes foram expostas ao alumínio.

De acordo com Kochian (1995), Matsumoto (2000) e Rout et al. (2001) elevadas concentrações de alumínio inibem a alongação radicular, sendo proposto que o efeito é devido à inibição da divisão celular, disjunção da parede celular, inibição do fluxo de íons e perda da integridade da membrana plasmática.

Quando presente em concentrações moderadas, o alumínio pode causar a inibição do crescimento e da divisão celular, refletindo na regulação interna dos processos de crescimento e desenvolvimento da planta (Marschner, 1991). De acordo com alguns autores a redução do crescimento

da parte aérea da planta pode ocorrer num momento posterior e parece ser uma consequência dos danos que ocorrem na raiz (Matsumoto et al., 1976; Ryan e Kochian et al., 1993).

A partir dos resultados apresentados constata-se que o alumínio, embora não tenha apresentado efeito sobre a germinação de sementes de feijão, apresenta efeito no desenvolvimento das plântulas e que o NO não foi eficiente na minimização deste efeito.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de alumínio não impediu que as sementes de feijão germinassem, porém foi prejudicial na continuação do processo, impedindo a formação de plântulas em formação e em desenvolvimento.

A presença de óxido nítrico favoreceu a entrada de água nas sementes, no entanto não foi eficiente na minimização dos efeitos prejudiciais do alumínio durante a formação das plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-344, 1999b.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-278, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

CRUZ, M.S. et al. Factors affecting germination of *Canavalia brasiensis*, *Leucena loucocephala*, *Clitoria ternata* and *Calopogonio mucunoides* seeds. **Seed Sci. Technol.**, v.23, n.2, p.447-454, 1995.

CUSTÓDIO, C.C. et al. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Sci. Agric.**, v.59, n.1, p.145-153, 2002.

DELLEDONE, M. et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.

DELLEDONE, M. et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13454-13459, 2001.

DURAN, J.M.; TORTOSA, M.E. The effect of mechanical and chemical scarification on germination of charlock *Sinapsis arvensis* L. seed. **Seed Sci. Technol.**, v.13, p.155-163, 1985.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-10333, 1998.

ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância. **Ciênc. Rural**, v.31, n.3, p.531-541, 2001

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Agência de Informação Feijão**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/>> Acesso em: 01 dez. 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In...45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

GOUVÊA, C.M.C.P.; SOUZA, J.F.; MAGALHAES, M.I.S. NO-releasing substances the induce growth elongation in maize root segments. **Plant Growth Regul.**, v.21, p.183-187, 1997.

KLESSIG, D.F. et al. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.8849-8855, 2000.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.46, p.267-260, 1995.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-1017, 2003.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. **Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição**. v.artigo de revisão, p.1-14, 2003. Disponível em: <<http://www.rbi.fmrp.usp.br/RFM004/ArtigosSeminarario/artigoseminarioNF3b.pdf>> Acesso em 05 dez. 2006.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regul.**, v.18, p.155-69, 1996.

LESHEM, Y.Y.; WILLS, R.B.H.; VENG-VA KU, V. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.825-833, 1998.

MARIN, A. et al. Germinação de sementes de guandu sob efeito da disponibilidade hídrica e de doses subletais de alumínio. **Bragantia**, v.63, n.1, p.13-24, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1986. 674p.

MATA, C.G.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.**, v.126, p.1196-1204, 2001.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Int. Rev. Cytol.** v.200, p.1-46, 2000.

MATSUMOTO, H. et al. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nuclei acid. **Plant Cell Physiol.** v.17, p.627-631, 1976.

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytol.**, v.159, p.11-35, 2003.

NEIL. S.J. et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-16, 2002.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, v.55, p.579-583, 2003.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v.21, p.3-21, 2001.

RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum*) differing in aluminum tolerance. **Plant Physiol.**, v.102, p.975-982, 1993.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p.931-36, 1994.

TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environ. Exp. Bot.**, v.51, p.281-288, 2004.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-523, 2002.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

WENDEHENNE, D. et al. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.177-183, 2001.

YOKOYAMA, L.P. et al. Sementes de feijão: produção, uso e comercialização. In: VIEIRA, E.H.N.(Eds.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000, p.249-270.

ZHAO, X.J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E.J. Al³⁺ and Ca²⁺ alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiol.**, v.83, p.159- 162, 1987.

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus Vulgaris* L.) SOB ESTRESSE POR
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo verificar a germinação de sementes de feijão submetidas à condição de deficiência hídrica em função do óxido nítrico. Para realização do experimento foi utilizada solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doadora de óxido nítrico, na concentração de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e como simulador de deficiência hídrica o polietileno glicol (PEG) 6000 no potencial osmótico de $-0,6 \text{ MPa}$. As sementes de feijão foram distribuídas sobre papel umedecido com água destilada, solução de PEG $-0,6 \text{ MPa}$ e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e as sementes foram mantidas nestas condições por um período de 18 h, a qual denominou-se embebição. Decorridas 18 h, as mesmas sementes foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos previamente com água destilada, solução de PEG $-0,6 \text{ MPa}$ e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Foram avaliados o teor de água, após 18 h de embebição, emissão da radícula, aos sete dias da instalação do experimento, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento, aos nove dias da instalação do experimento. Foi verificado que as sementes submetidas à solução de PEG, apresentaram menor absorção de água quando comparadas com as sementes submetidas à embebição em água destilada e solução de SNP. A embebição em solução de PEG ocasionou atraso na emissão da radícula, principalmente quando as sementes foram transferidas para essa mesma condição, no entanto quando transferidas para solução de SNP esse efeito foi minimizado e dessa forma apresentaram elevados resultados de germinação total. Quanto às plântulas em formação e em desenvolvimento a condição de embebição e transferência para solução de PEG foi a que ocasionou os menores resultados, já quando as sementes foram transferidas para SNP, houve minimização do efeito da deficiência hídrica proporcionando a formação dessas plântulas. Dessa forma a presença de PEG em solução de embebição ocasionou atraso na emissão da radícula das sementes, porém esse efeito foi minimizado quando as sementes foram transferidas para solução de SNP, e a presença do óxido nítrico também minimizou os efeitos da condição de deficiência hídrica na formação das plântulas de feijão.

Palavras-chave: óxido nítrico, deficiência hídrica, germinação, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT – The present work aimed at verifying the germination of bean seeds subjected to water deficit condition on function the nitric oxide (NO). A sodium nitroprusside (SNP) solution, NO-donor, at $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, was prepared, and polyethylene glycol (PEG) 6000, at -0.6 MPa osmotic potential, was used for simulation of water deficit. Bean seeds were distributed onto paper moistened with distilled water, PEG solution, -0.6 MPa , and SNP solution, $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, and kept in such condition for an 18h period which was called imbibition. Then, the seeds were transferred to new rolls of paper previously moistened with distilled water, PEG solution, -0.6 MPa , and SNP solution, $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Water content was evaluated after 18 h imbibition's; emission the raise primaries, count was carried out at seven days of the experiment, total germination and formation and development of seedlings were verified at nine days after the beginning of the experiment. The seeds that were allowed to germinate in PEG solution showed less water absorption than those subjected to imbibition in distilled water and SNP solution. The imbibition on PEG solution occasion retardation emission the raise primaries, principal that seeds transferred to some condition, thus seeds transfer to SNP solution effect the minimizes and resulted total germination that increase. That's formation and development of seedlings the independent condition of embibiton and transfer to PEG solution the resulted decreasing, thus that seeds transferred of SNP solution the effect minimizing water deficit formed seedling. However, for the seeds imbibition to PEG solution to cause retardation emission the raise primaries, effect minimized that seeds transferred to SNP solution, and NO also effect minimized to water deficit condition in formation the bean seedlings.

Keywords: nitric oxide, water deficit, germination, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

Pertencente a família das leguminosas e ao gênero *Phaseolus*, o feijão originou-se na América e possui cerca de 55 espécies, sendo que o *Phaseolus vulgaris* recebe destacada importância por ser a espécie cultivada mais antiga e mais utilizada em todos os continentes (Embrapa Arroz e Feijão, 2006).

O feijão é um importante constituinte da dieta do brasileiro, por ser uma excelente fonte de proteínas, carboidratos e ser rico em ferro. É um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, em razão de ser cultivado em grandes áreas e pela mão-de-obra empregada durante o ciclo de cultura (Vieira et al., 1998).

O nível de hidratação da semente, necessário para desencadear o processo germinativo pode atingir valores como 32-35%, em sementes de milho, ou 48-50% como o requerido pelo feijão (Shioga, 1990). As condições hídricas do solo para as sementes, em que os potenciais osmóticos são muito negativos, de modo geral, provocam atraso ou mesmo reduzem a porcentagem de germinação; o mínimo de umidade, porém, a ser atingido pela semente para que a germinação ocorra, depende de sua composição química e da permeabilidade do tegumento (Bradford, 1990).

Quando a semente inicia seu processo germinativo ocorre absorção de água, hidratação dos tecidos e hidrólise das substâncias de reserva (Carvalho e Nakagawa, 2000). A primeira estrutura a emergir da semente é a radícula, ou raiz embrionária, que possibilita a fixação no solo e assegura a continuidade do processo de absorção de água (Vieira, 2000). Deste modo, dentre os fatores externos que interferem no processo germinativo, considera-se como o mais importante a hidratação da semente, pois a água constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos, que resultam na protrusão da raiz primária (Moraes et al., 2005).

As condições que as sementes encontram na implantação da cultura, algumas vezes são adversas, tais como, solos salinos, sódicos e com deficiência hídrica (Neto et al., 2006). A diminuição da germinação de sementes submetidas ao estresse hídrico é atribuída à redução das atividades enzimáticas. Por outro lado, em condições de plena disponibilidade de água no solo, as sementes, principalmente as mais secas, podem absorver água rapidamente, ocasionando rupturas em seus tecidos, com conseqüentes prejuízos à germinação (Braga et al., 1999).

Uma substância que vem sendo utilizada para simular condição de estresse hídrico é a de polietileno glicol (PEG), um polímero de alto peso molecular, não iônico, inerte, que não penetra pelas paredes celulares e não apresenta sinais de toxicidade (Knypel e Khan, 1981; Steuter et al., 1981; Braccini et al., 1996; Moraes e Menezes, 2003).

O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a períodos de deficiência hídrica, bem como o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem,

são essenciais na manutenção da produção agrícola brasileira e mundial em níveis que possam alimentar uma população em constante crescimento (Nepomuceno et al., 2001).

Estudos com o óxido nítrico (NO) têm mostrado sua ação tanto como citoprotetor, quanto citotóxico, de acordo com a concentração (Stamler, 1994; Beligni e Lamattina, 1999a; Leite e Sarni, 2003) e embora suas funções fisiológicas em plantas sejam muito pouco documentadas, alguns trabalhos relatam seu envolvimento na inibição da expansão foliar, acúmulo de fitoalexinas e ativação de respostas de defesa contra ataque de patógenos (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Beligni e Lamattina, 1999b; Klessig et al., 2000; Delledonne et al., 2001; Wendehenne et al., 2001; Neil et al., 2003; Romero-Puertas e Delledonne, 2003).

O NO também pode regular processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas. Nas sementes ele atua na indução do processo germinativo (Beligni e Lamattina, 2000; Neil et al., 2002; Bethke et al., 2004) e inibição da respiração após a embebição, sendo que na raiz promove o alongamento e formação das raízes adventícias (Beligni e Lamattina, 2001).

A função protetora do NO contra situações de estresses abióticos também tem sido relatada, detectando-se aumento na tolerância à seca de algumas espécies de plantas por indução do fechamento estomático (Mata e Lamattina, 2001; Neil et al., 2002). Também o NO exerce função na tolerância de plantas ao estresse produzido sob condições de elevada temperatura e salinidade (Uchida et al., 2002), além de estimular a germinação em situações de altas concentrações de metais pesados (Kopyra e Gwózdź, 2003).

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo verificar a germinação de sementes de feijão submetidas à condição de deficiência hídrica em função do óxido nítrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Material Vegetal

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP-Câmpus Botucatu, São Paulo, Brasil.

Foram utilizadas no trabalho sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar BRS Radiante, cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás – GO, da Safra de 2004, recebidas em Fevereiro de 2005, cuja caracterização inicial resultou em 84% de sementes germinadas e teor de água de 9%.

Tratamentos: Óxido Nítrico e Deficiência Hídrica na germinação

Para realização do experimento foi utilizada solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doadora de NO, na concentração pré-estabelecida, equivalente a $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e como simulador de deficiência hídrica solução de polietileno glicol (PEG) 6000 no potencial osmótico de -0,6 MPa, calculado pela equação de Michel e Kaufmann (1973), para temperatura de 25°C. As concentrações da solução de SNP e de PEG foram aquelas que causaram, respectivamente, aceleração e atraso da germinação em experimentos preliminares. Como controle foi utilizada a condição de embebição em água destilada.

Condução do experimento

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes de feijão distribuídas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma terceira folha, formando-se rolos de papel. As folhas de papel foram previamente umedecidas com as soluções dos diferentes tratamentos. O volume (mL) das soluções utilizadas foi na proporção de duas vezes e meia o peso (g) do papel germitest seco, os rolos foram acondicionados em bandejas plásticas, cobertas com plástico filme transparente com perfurações e mantidos em câmaras de germinação (BOD) na temperatura de 25 °C, na ausência de luz (Brasil, 1992).

Os papéis de germinação foram umedecidos com água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As sementes foram mantidas nestas condições por um período de 18 h, o qual denominou-se embebição, conforme especificado na Figura 1. Nesse período as sementes de feijão apresentavam maior volume que o inicial, conforme observado visualmente, indicando absorção das soluções.

Decorridas 18 h, as mesmas sementes foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos previamente com água destilada, solução de sulfato PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 1) e foram mantidos em câmara de germinação nas mesmas condições anteriormente descritas.

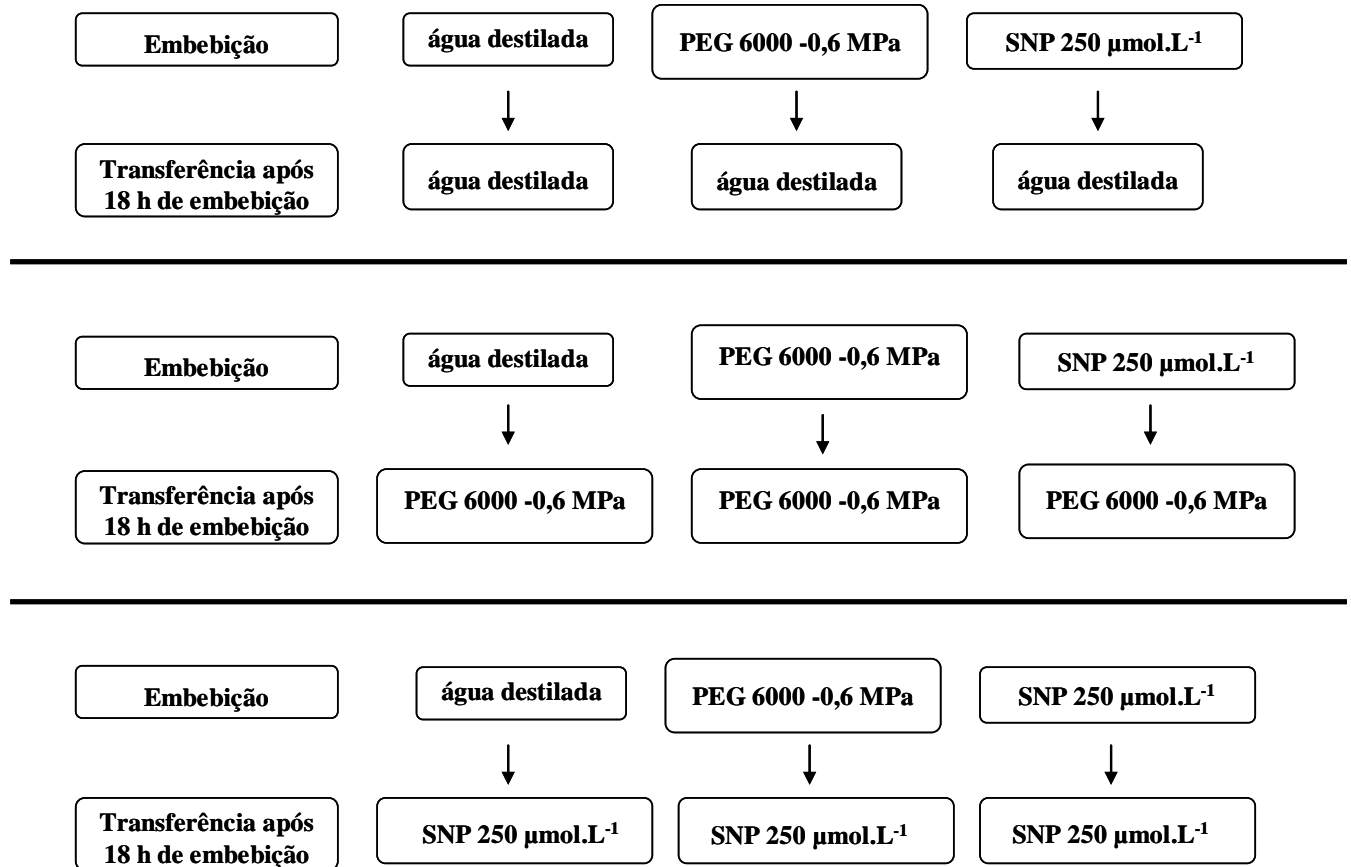


Figura 1. Esquema dos diferentes tratamentos (combinação das condições de embebição e transferência) a que foram submetidas às sementes de feijão.

Avaliações

Teor de água

A fim de avaliar a absorção de água pelas sementes nos diferentes tratamentos durante o período de embebição, foi determinado o teor de água. Para tanto, quatro repetições de 10 sementes de feijão foram colocadas nas mesmas condições de embebição, conforme Figura 1 e decorridas 18 h, as sementes foram coletadas, pesadas e acondicionadas em saco de papel, sendo mantidas em estufa a 65°C até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem com base na massa fresca das sementes.

Teste de Germinação

As avaliações do teste de germinação foram realizadas aos sete dias (emissão da radícula) e aos nove dias (germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento) a partir da instalação do experimento. Foram consideradas para emissão da radícula as sementes que apresentavam a estrutura radicular com comprimento maior ou igual a 2 mm (Duran e Tortosa, 1985) e como germinação total as sementes que apresentavam raiz e parte aérea emitidas após nove dias da instalação do experimento. Foram consideradas plântulas em formação e em desenvolvimento as que apresentavam parte aérea e sistema radicular formados e em desenvolvimento.

Delineamento Experimental

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os dados de teor de água foi realizada comparação de médias entre as condições de embebição (água destilada, solução de PEG 6000 e solução de SNP). Já para os dados de emissão da radícula, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento, foi utilizado esquema fatorial 3x3, ou seja, 3 condições de embebição (água destilada, solução de PEG 6000 e solução de SNP) e 3 condições de transferência (água destilada, solução de PEG 6000 e solução de SNP). Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (Vieira e Hoffman, 1989). Os dados em porcentagem foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância realizada para o teste de teor de água apresentou diferença significativa entre os tratamentos, sendo o valor de F 19,910** (significativo no nível de 1% de probabilidade), CV 4,45% e o DMS 3,52.

Na Tabela 1 os dados apresentados de teor de água, de sementes de feijão, mostram que a condição de embebição em água destilada e solução de SNP favoreceram a absorção de água pelas sementes, apresentando resultados de 43,27 e 41,29%, respectivamente, enquanto que a solução de PEG dificultou a absorção. Esse comportamento indica que o PEG pode ser utilizado para simular condições de deficiência hídrica, atuando como uma barreira na entrada de água nas sementes, quando presente em solução.

Tabela 1: Teor de água (%) obtido de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após terem sido submetidas à 18 h de embebição em água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Embebição	Teor de Água
Água destilada	43,27 a
PEG	35,61 b
SNP	41,29 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da Tabela 2 indicam que houve interação significativa para os fatores analisados para emissão da radícula, germinação total e plântulas em formação e desenvolvimento.

Tabela 2: Valores de F obtidos na análise de variância dos dados referentes à emissão da radícula, germinação total e plântulas em formação e em desenvolvimento, obtidos de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas às condições de embebição (água destilada, solução de PEG e solução de SNP) e transferência (água destilada, solução de PEG e solução de SNP).

Fatores	F		
	Emissão da Radícula	Germinação Total	Plântulas em formação e em desenvolvimento
Embebição (A)	4,895*	6,908*	16,439**
Transferência (B)	3,349 ^{NS}	15,736**	22,922**
AxB	18,266**	8,842*	20,913**
CV %	19,29	7,26	12,29
DMS	12,82	6,90	9,21

** significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade e NS não significativo.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de emissão da radícula, onde as condições embebição em água destilada e SNP favoreceram a formação dessa estrutura, independente da condição de transferência, apresentando valores superiores a 70%. Entretanto, na condição de embebição em solução de PEG, verificou-se um atraso da emissão da radícula, principalmente quando as sementes foram transferidas para PEG. Quando as sementes foram embebidas em PEG e foram transferidas para SNP, a presença do óxido nítrico minimizou esse atraso, protegendo as sementes do efeito ocasionado pela deficiência hídrica.

Tabela 3: Emissão da radícula (%) de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após sete dias da instalação do experimento, submetidas a embebição em água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e após 18 h transferidas para água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Transferência	Embebição		
	Água destilada	PEG	SNP
Água destilada	79 aA	58 aB	80 aA
PEG	73 aB	21 bB	76 aA
SNP	85 aA	43 abB	76 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura foram encontrados trabalhos em que sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Braga et al., 1999; Pertel et al., 2003; Moraes et al., 2005) e de soja (*Glycine max*) (Braccini et al., 1996; Rosseto et al., 1997; Silva et al., 2006) apresentaram redução da germinação quando estas foram submetidas a condição de deficiência hídrica, por meio da utilização de solução de PEG 6000.

O decréscimo na germinação de sementes submetidas à restrição de água pela utilização de soluções de PEG pode estar relacionada a alta viscosidade que essa solução apresenta, comprometendo a absorção de oxigênio pelas sementes (Yoon et al., 1997), além de que, nessas condições, o prolongamento da fase estacionária do processo de embebição, leva a um menor desenvolvimento meristemático e, conseqüentemente, a atraso na protrusão da raiz primária (Falleri, 1994).

Outra causa provável para essa redução é a falta de energia para o início da germinação, já que tal energia é obtida a partir de incrementos na taxa respiratória das sementes após a embebição, que ocorre de forma mais lenta na presença de potenciais osmóticos muito baixos (Silva et al., 2006).

Em trabalhos pioneiros relacionados ao assunto abordado, foi considerado por Beligni e Lamattina (2001) que o NO atua como um indutor do processo germinativo. Em outros trabalhos foi evidenciado que o NO estimula a germinação de arroz por simulação do efeito da luz (Hung et al.,

2002). Sarath et al. (2006) verificaram que a germinação de sementes de *Panicum virgatum* L. foi significativamente influenciada pelo NO e relatou que este composto poderia ser um desencadeador endógeno para os processos fisiológicos dessa espécie.

Analisando os resultados de germinação total (Tabela 4), foi observado que apesar do PEG ter ocasionado atraso na emissão da radícula (Tabela 3), o processo germinativo se completa ao final do período avaliado e a presença do óxido nítrico, por ter minimizado o atraso da germinação quando as sementes foram submetidas à condição de deficiência hídrica, favoreceu uma elevada porcentagem de sementes germinadas, nessa condição, com valores de 99%. As condições de embebição em água destilada e SNP apresentaram mesmo comportamento quanto à germinação total, sendo dessa forma, eficientes para esse processo.

Tabela 4: Germinação total (%) de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após nove dias da instalação do experimento, submetidas a embebição em água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e após 18 h transferidas para água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Transferência	Embebição		
	água destilada	PEG	SNP
água destilada	96 aA	88 abA	97 aA
PEG	100 aA	67 bB	97 aA
SNP	100 aA	98 aA	100 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de plântulas em formação e em desenvolvimento obtidas de sementes de feijão, onde pode ser observado que as condições de embebição em água destilada e solução de SNP favoreceram esse processo, independente da condição de transferência.

Na condição de embebição em solução de SNP e transferência para PEG, o resultado indica que apesar de ser esta uma condição onde as sementes se desenvolveram em deficiência hídrica, houve a formação das plântulas, o que pode ser atribuído a presença do óxido nítrico no início do processo de germinação, ou seja, na absorção inicial da solução pelas sementes.

Tabela 5: Plântulas em formação e em desenvolvimento (%) obtidas de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, após 9 dias da instalação do experimento, submetidas a embebição em água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e após 18 h transferidas para água destilada, solução de PEG 6000 -0,6 MPa e solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Transferência	Embebição		
	água destilada	PEG	SNP
água destilada	88 aA	69 aB	84 aA
PEG	76 bA	23 bB	87 aA
SNP	89 aA	72 aB	83 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A deficiência hídrica teve seu maior efeito na formação das plântulas, que tiveram as sementes submetidas a solução de PEG na embebição e na transferência, o que é confirmado pelos baixos valores desse parâmetro (23%), no entanto quando foram transferidas para solução de SNP as sementes tiveram seu processo de desenvolvimento continuado, o que indica o efeito do óxido nítrico, também, na minimização dos efeitos da deficiência hídrica na formação das plântulas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O PEG reduz a absorção de água pelas sementes de feijão, simulando condição de deficiência hídrica.

A presença de PEG em solução de embebição ocasionou atraso na emissão da radícula das sementes, porém esse efeito foi minimizado quando as sementes foram transferidas para solução de SNP, e a presença do óxido nítrico também minimizou os efeitos da condição de deficiência hídrica na formação das plântulas de feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-344, 1999b.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-278, 2001.

BETHKE, P.C. et al. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, n.219, p.847-855, 2004.

BRACCINI, A.L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. **Rev. Bras. Sementes**, v.18, n.1, p.10-16, 1996.

BRADFORD, K.J. A water relation analysis of seed germination rates. **Plant Physiol.**, v.94, n.2, p.840-849, 1990.

BRAGA, L.F. et al. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Rev. Bras. Sementes**, v.21, n.2, p.95-102, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

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

DELLEDONE, M. et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-588, 1998.

DELLEDONE, M. et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13454-13459, 2001.

DURAN, J.M.; TORTOSA, M.E. The effect of mechanical and chemical scarification on germination of charlock *Sinapsis arvensis* L. seed. **Seed Sci. Technol.**, v.13, p.155-163, 1985.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-10333, 1998.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Agência de Informação Feijão**. Disponível em: < <http://www.cnpaf.embrapa.br/> > Acesso em: 01 dez. 2006.

FALLERI, F. Effect of water stress on germination in six provenances of *Pinus pinaster* Ait. **Seed Sci. Technol.**, v.22, n.3, p.591-599, 1994.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In...**45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

HUNG, K.T.; CHANG, C.J.; KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-166, 2002.

KLESSIG, D.F. et al. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.8849-8855, 2000.

KNYPL, J.S.; KHAN, A.A. Osmoconditioning of soybean seeds to improve performance at subtropical temperatures. **Agron. J.**, v.73, p.112-116, 1981.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-1017, 2003.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. **Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição**. v.artigo de revisão, p.1-14, 2003. Disponível em: <<http://www.rbi.fmrp.usp.br/RFM004/ArtigosSeminarior/artigoSeminariorNF3b.pdf>> Acesso em 05 dez. 2006.

MATA, C.G.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.**, v.126, p.1196-1204, 2001.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic Potencial of Polyethylene Glycol 6000. **Plant Physiol.**, v.51, n.5, p. 914-916, 1973.

MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciênc. Rural**, v.33, n.2, p.219-226, 2003.

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

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytol.**, v.159, p.11-35, 2003.

NEIL. S.J. et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-16, 2002.

NEPOMUCENO, A.L. et. al. Tolerância a seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnol. Ciênc. Desenvolv.**, n.23, p.12-18, 2001.

NETO, N.B.M. et al. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. **Rev. Bras. Sementes**, v.28, n.1, p.142-148, 2006.

PERTEL, J. et al. Efeito do estresse hídrico simulado com polietileno glicol na germinação de sementes de feijão, Viçosa, MG, 2003. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 13; 2003, Gramado, RS. **Anais...**Gramado, 2003.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, v.55, p.579-583, 2003.

ROSSETO, C.A.V. et al. J. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. **Sci. Agríc.**, v.54, n.1/2 , p.97-105, 1997.

SARATH, G. et al. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, n.223, p.1154-1164, 2006.

SHIOGA, P.S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijão** (*Phaseolus vulgaris* L.). 1990.106f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVA, J.B.; RODRIGUES, T.J.D.; VIEIRA, R.D. Desempenho de sementes de soja submetidas a diferentes potenciais osmóticos em polietilenoglicol. **Ciênc. Rural**, v.36, n.5, p.1634-1637, 2006.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p.931-36, 1994.

STEUTER, A.A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J.R. Water potential of aqueous polyethylene glycol. **Plant Physiol.**, v.67, n.1, p.64-67, 1981.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-523, 2002.

VIEIRA, C.; PAULA-JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: UFV, 1998. 596p.

VIEIRA, N.R.A. Fisiologia da Germinação. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. (Eds.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p.39-52.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

WENDEHENNE, D. et al. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.177-183, 2001.

YOON, Y. et al. Priming with salt solutions improves germination of pansy seed at high temperatures. **HortScience**, v.32, n.2, p.248-250, 1997.

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DO ÓXIDO NÍTRICO EM SEMENTES
DE FEIJÃO (*Phaseolus Vulgaris* L.) SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA
HÍDRICA**

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação antioxidante do óxido nítrico (NO) em sementes de feijão sob condições de deficiência hídrica por meio de determinações bioquímicas. Para realização do experimento foi utilizada solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doadora de NO, na concentração de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e solução de polietileno glicol (PEG) 6000 no potencial osmótico de $-0,6 \text{ MPa}$. As sementes foram distribuídas em papel germitest, formando-se rolos de papel, que foram umedecidos, primeiramente, com água destilada e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As sementes permaneceram nessas condições por 18 h, a qual denominou-se embebição. Decorrido esse período as sementes foram transferidas para novos rolos de papel que foram umedecidos com água destilada (T1 e T2), solução de PEG $-0,6 \text{ MPa}$ (T3 e T4) e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (T5 e T6) e após 12 e 36 h da transferência, as sementes foram coletadas e seus eixos embrionários foram retirados para as avaliações bioquímicas. Foram determinados as atividades das enzimas peroxidases (POD), superóxido dismutase (SOD) e os teores de lipoperóxidos. As enzimas antioxidantes, POD e SOD, apresentaram suas atividades reduzidas nos tratamentos onde as sementes estiveram em contato com a solução de SNP (T2, T4 e T6), e os teores de lipoperóxidos, nessa mesma condição, também foram reduzidos. Assim, sob condição de deficiência hídrica, as sementes de feijão formaram espécies reativas de oxigênio, que foram removidas pelo óxido nítrico, diminuindo deste modo, substrato disponível para as enzimas antioxidantes POD e SOD, bem como atuando na proteção contra peroxidação de lipídios e dessa forma apresentando ação antioxidante.

Palavras-chave: óxido nítrico, deficiência hídrica, enzimas antioxidantes, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT – The present work aimed at investigating the antioxidant action of nitric oxide (NO) on bean seeds under water-deficit conditions through biochemistry determination. A sodium nitroprusside (SNP) solution, NO donor, at $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, and a polyethylene glycol (PEG) 6000 solution, at -0.6 MPa osmotic potential, were used in the experiment. Seeds were distributed onto rolls of Germitest paper previously moistened with distilled water and SNP solution, $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. They were kept in such conditions for 18 h, and this period was called imbibition. Then, the seeds were transferred to new rolls of paper moistened with distilled water (treatments T1 and T2), PEG solution, -0.6 MPa (T3 and T4), and SNP solution, $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (T5 and T6). After 12 and 36 h, the seeds were collected and their embryonic axes were removed for biochemical analyses. Peroxidases (POD) and superoxide dismutase (SOD) activities as well as lipid peroxide content were determined. The antioxidant enzymes. POD and SOD decrease activity in treatments the seeds in contact to SNP solution (T2, T4 and T6), and lipid peroxide content, in condition identic, also decrease. Thus in water deficit bean seeds reactive oxygen species were formed and NO removed the species, decrease substrate available for the antioxidant enzymes POD and SOD as well as the protection against lipid peroxidation and present effect antioxidant

Keywords: nitric oxide, water deficit, antioxidant enzymes, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

O nível de hidratação da semente, necessário para desencadear o processo germinativo pode atingir valores como 32-35%, em sementes de milho, ou 48-50% como o requerido pelo feijão (Shioga, 1990). As condições hídricas do solo para as sementes, em que os potenciais osmóticos são muito negativos, de modo geral, provocam atraso ou mesmo reduzem a porcentagem de germinação; o mínimo de umidade, porém, a ser atingido pela semente para que a germinação ocorra, depende de sua composição química e da permeabilidade do tegumento (Bradford, 1990).

A qualidade fisiológica das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica. A partir deste momento, processos degenerativos de natureza física, fisiológica e bioquímica começam a ocorrer, caracterizando a deterioração, que é evidenciada pela perda da integridade do sistema de membranas, peroxidação de lipídios, acúmulo de substâncias tóxicas, entre outros (Santos et al., 2004).

As condições em que as sementes se encontram algumas vezes são adversas, tais como solos salinos, sódicos e com deficiência hídrica. A diminuição da germinação de sementes submetidas ao estresse hídrico é atribuída à redução das atividades enzimáticas (Braga et al., 1999).

Uma substância que tem sido utilizada para simular experimentalmente condição de estresse hídrico é a de polietileno glicol (PEG), um polímero de elevada massa molecular, não iônico, inerte, que não penetra pelas paredes celulares e não apresenta sinais de toxicidade (Knypel e Khan, 1981; Steuter et al., 1981; Braccini et al., 1996; Moraes e Menezes, 2003).

O estresse hídrico quebra o equilíbrio oxidativo/reduutivo (redox) em várias organelas celulares, como os cloroplastos. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente, leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim, a real função do ajuste osmótico poderia estar potencialmente ligada à eliminação destas espécies, mas gerando, como função adicional, a retenção de água (Nepomuceno et al., 2001).

As ERO são representadas pelos radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2), cuja elevada produção acarreta estresse oxidativo nas plantas (Richards et al., 1998; Tamás et al., 2004). Isto ocorre quando as ERO estão em quantidades excessivas, ultrapassando a capacidade dos organismos de neutralizá-las com seus sistemas naturais (Kuss, 2005).

O estresse oxidativo é conseqüência da alteração química das principais classes de biomoléculas, causando severas injúrias como degradação de clorofila, alterações estruturais e funcionais em proteínas, fragmentação de DNA, extravasamento de íons, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1993; Dodge, 1994; Foyer et al., 1994; Thérond et al., 2000; Moller et al., 2007).

A resposta das plantas ao estresse oxidativo esta relacionada ao aumento da produção e ativação de metaloenzimas, como a catalase, superóxido dismutases (Bowler et al., 1992; Scandalios, 1993; Salt, 2001) e peroxidases (Cakmak e Horst, 1991; Campa, 1991; Knörzer et al., 1996; Salt, 2001). A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da elevada produção de ERO, é um indicador utilizado para se avaliar nas plantas o nível de estresse oxidativo (Verma e Dubey, 2003). Deste modo, aumentos dos teores de lipoperóxidos elevam-se em plantas submetidas a severo estresse hídrico (Baisak et al., 1994).

Em contrapartida, a função protetora do NO contra situações de estresses abióticos também tem sido relatada, detectando-se aumento na tolerância à seca de algumas espécies de plantas por indução do fechamento estomático (Mata e Lamattina, 2001; Neil et al., 2002). Também o NO exerce função na tolerância de plantas ao estresse produzido sob condições de elevada temperatura e salinidade (Uchida et al., 2002).

Alguns estudos têm mostrado que NO pode regular processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas. Nas sementes ele atua na indução do processo germinativo (Beligni e Lamattina, 2000; Neil et al., 2002; Bethke et al., 2004) e inibição da respiração após a embebição, sendo que na raiz promove o alongamento e formação das raízes adventícias (Beligni e Lamattina, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação antioxidante do óxido nítrico em sementes de feijão sob condições de deficiência hídrica por meio de determinações bioquímicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Material Vegetal

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP - Câmpus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Foram utilizadas no trabalho sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar BRS Radiante, cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás – GO, da Safra de 2004, recebidas em Fevereiro de 2005.

Tratamentos: Óxido Nítrico e Deficiência Hídrica

Em experimento preliminar foi estabelecida a concentração da solução de nitroprussiato de sódio (SNP), doadora de óxido nítrico (NO), que causou aceleração da germinação e o potencial osmótico, obtido com polietileno glicol (PEG 6000), que causou atraso na germinação. A concentração utilizada de SNP foi $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e o potencial osmótico de PEG foi $-0,6 \text{ MPa}$, calculado por meio de da equação de Michel e Kaufmann (1973) para temperatura de 25°C . Como controle foi utilizada a condição de embebição em água destilada.

Condução do experimento

Foram utilizadas três repetições de 25 sementes de feijão distribuídas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma terceira folha, formando-se rolos de papel. As folhas de papel foram previamente umedecidas com as soluções dos diferentes tratamentos. O volume (mL) das soluções utilizadas foi na proporção de duas vezes e meia o peso (g) do papel germitest seco, os rolos foram acondicionados em bandejas plásticas, cobertas com plástico filme transparente com perfurações e mantidos em câmaras de germinação (BOD) na temperatura de 25°C , na ausência de luz (Brasil, 1992).

Os papéis de germinação foram umedecidos com água destilada, solução de PEG 6000 $-0,6 \text{ MPa}$ e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As sementes foram mantidas nestas condições por um período de 18 h, o qual denominou-se embebição, conforme especificado na Figura 1. Nesse período as sementes de feijão apresentavam maior volume que o inicial, conforme observado visualmente, indicando absorção das soluções.

Decorridas 18 h, as mesmas sementes foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos previamente com água destilada, solução de sulfato PEG 6000 $-0,6 \text{ MPa}$ e solução de SNP $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 1) e foram mantidos em câmara de germinação nas mesmas condições anteriormente descritas.

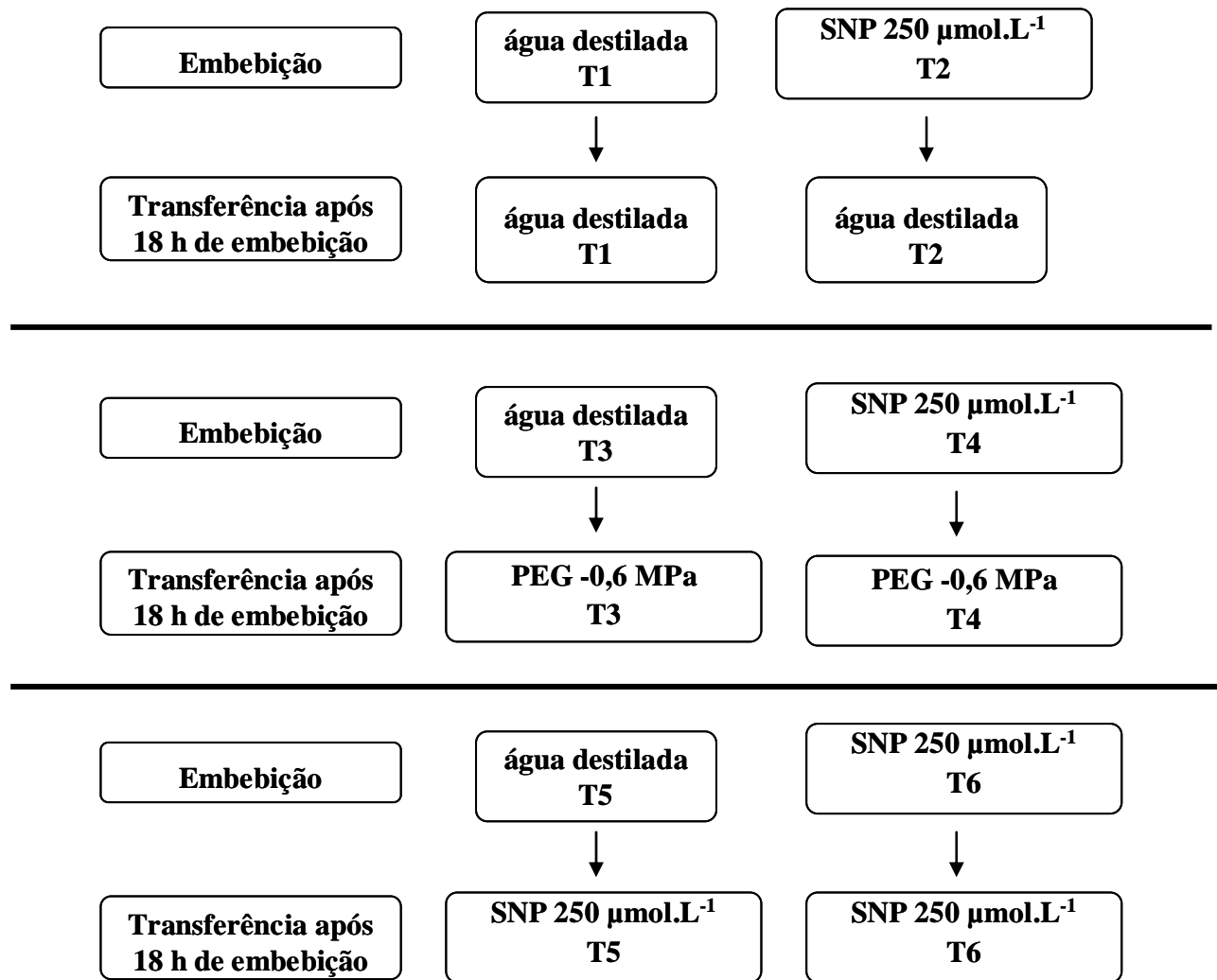


Figura 1. Esquema dos diferentes tratamentos (combinação das condições de embebição e transferência) a que foram submetidas às sementes de feijão.

Coleta do Material

As sementes de feijão foram coletadas, seus eixos embrionários retirados e utilizados para as determinações bioquímicas. As coletas foram realizadas nos períodos anterior e posterior a emissão da radícula, respectivamente, às 12 e 36 h após a transferência das sementes para os novos tratamentos.

Os eixos embrionários foram coletados, independentemente da emissão da radícula e, imediatamente embalados em saco plástico e em papel alumínio devidamente etiquetados. As amostras foram em seguida congeladas em nitrogênio líquido (-195°C) e armazenadas em *freezer* a -80°C para posterior extração e determinações bioquímicas.

Obtenção dos extratos enzimáticos

A obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada segundo o método descrito por Sharma e Sengupta (1987), por meio da homogeneização dos eixos embrionários em almofariz previamente gelado em 20 mL de tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (4°C) pH 7,5, contendo 7,5% (peso.volume⁻¹) de polivinilpolipirrolidona, além de uma pequena quantidade de areia lavada e esterilizada. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 14000 g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo o extrato enzimático foi armazenado em *freezer* a -20°C .

Determinações Enzimáticas

Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7): Pirogalol Peroxidase (PG-POD) e Guaiacol Peroxidase (GC-POD).

As atividades da PG-POD e da GC-POD foram determinadas de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire e Guy (2000). A mistura de reação para cada tipo de peroxidase foi composta de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} pH 6,5, pirogalol 20 mmol.L^{-1} ou guaiacol 0,25% (volume.volume⁻¹) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol.L^{-1} , num volume final de 1,0 mL e mantida a temperatura ambiente durante 5 minutos.

As mudanças nas absorvâncias devido à formação da purpurogalina, para a PG-POD, e do tetraguaiacol, para a GC-POD, foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm e 470 nm, respectivamente.

Os coeficientes de extinção molar da purpurogalina ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e do tetraguaiacol ($26,6 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foram usados para calcular a atividade enzimática específica, expressas em $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$ e $\text{nmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$, respectivamente. A razão da conjugação não enzimática foi determinada pelo uso da mesma mistura de reação, sem o extrato enzimático.

Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971), tendo como base a capacidade da enzima em converter radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular. Foi utilizado no sistema de reação tampão fosfato de sódio pH 7,8 (50 mmol.L^{-1}), mistura de nitro blue tetrazolium (NBT) $33 \mu\text{mol.L}^{-1}$ + EDTA $0,66 \text{ mmol.L}^{-1}$ (5:4), mistura L-metionina 10 mmol.L^{-1} + riboflavina $0,0033 \text{ mmol.L}^{-1}$ (1:1) e extrato enzimático, totalizando um volume de 3,0 mL. A mistura de reação foi mantida a 25°C sob iluminação por um

período de dez minutos. A redução do NBT foi determinada por meio de leituras de absorvância em espectrofotômetro a 560 nm.

Uma unidade enzimática (U) da atividade da SOD expressa em $U \cdot mg^{-1} \cdot proteína^{-1}$ foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução de NBT, medida a 560 nm.

Conteúdo de Proteína Solúvel nos Extratos Enzimáticos

O conteúdo de proteína solúvel presente nos extratos utilizados para as determinações enzimáticas foi estimado pelo método de Lowry et al. (1951), que utiliza o reagente de fenol Folin. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 660 nm, utilizando como proteína de referência a albumina sérica bovina (BSA). Os dados de proteína solúvel foram expressos em mg proteína.

Quantificação dos Teores de Lipoperóxidos

A peroxidação de lipídios foi determinada pela técnica de Heath e Packer (1968), por meio de determinação de malondialdeído (MDA), que é um produto da decomposição da peroxidação de lipídios. Amostras de eixos embrionários de sementes, após a determinação de suas massas frescas (g), foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido ticloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho fervente (90°C) por 1 h. Após o resfriamento as amostras foram centrifugadas em 10000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante foi separado, no qual foram realizadas leituras de absorvância a 560 e 600 nm. O coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para os cálculos. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}^{-1} \cdot \text{grama de tecido fresco}^{-1}$.

Delineamento Experimental

Para cada coleta dos experimentos (12 e 36 h), adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (Vieira e Hoffman, 1989). As médias foram comparadas entre as mesmas condições de transferência: água destilada (T1 e T2), solução de PEG - 0,6MPa (T3 e T4) e solução de SNP $250 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ (T5 e T6), para cada uma das coletas. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar na análise de variância para as determinações bioquímicas nas coletas realizadas 12 (Tabela 1 A) e 36 h (Tabela 1 B) após a transferência das sementes, que ocorreu diferença significativa dos resultados das PODs somente entre os tratamentos T3 e T4. Com relação aos resultados da SOD, ocorreu diferença significativa entre todos os tratamentos de mesma condição de transferência, com exceção para os tratamentos T3 e T4 às 12 h (Tabela 1 A). Também pode ser verificada diferença significativa nos resultados de teores de lipoperóxidos entre os tratamentos de mesma condição de transferência, na coleta realizada às 12 h (Tabela 1 A), sendo que às 36 h, somente ocorreu essa diferença nos tratamentos T5 e T6.

Tabela 1. Valores de F, CV e DMS obtidos na análise de variância dos dados referentes às enzimas Pirogalol Peroxidase (PG-POD), Guaiacol Peroxidase (GC-POD) e Superóxido Dismutase (SOD) e Teores de Lipoperóxidos, determinados a partir de 25 eixos embrionários de sementes de feijão, CV. BRS Radiante, submetidas às condições de embebição (18 h) e transferência: T1 embebição em água destilada e transferência para água destilada; T2 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para água destilada; T3 embebição em água destilada e transferência para solução de PEG -0,6MPa; T4 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para solução de PEG -0,6MPa; T5 embebição em água destilada e transferência para solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; T6 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Eixos coletados após 12 h (A) e 36 h (B) da transferência das sementes.

(A)

Tratamentos	PG-POD			GC-POD			SOD			Teores de Lipoperóxidos		
	F	CV%	DMS	F	CV%	DMS	F	CV%	DMS	F	CV%	DMS
T1, T2	3,169 ^{NS}	75,63	2,230	0,924 ^{NS}	12,22	0,106	114,560*	4,70	0,879	8,708**	6,95	8,52
T3, T4	7,946**	65,52	4,480	12,253**	19,23	4,480	0,002 ^{NS}	15,33	2,614	11,097**	8,87	12,197
T5, T6	4,538 ^{NS}	46,16	1,911	0,778 ^{NS}	42,69	0,524	48,947*	6,50	1,268	24,174*	12,54	14,283

(B)

Tratamentos	PG-POD			GC-POD			SOD			Teores de Lipoperóxidos		
	F	CV%	DMS	F	CV%	DMS	F	CV%	DMS	F	CV%	DMS
T1, T2	1,725 ^{NS}	30,36	1,135	4,677 ^{NS}	42,59	24,821	8,076**	29,77	4,317	0,243 ^{NS}	20,93	8,191
T3, T4	12,149**	21,94	0,692	86,228*	16,33	5,438	12,152*	6,61	0,895	1,395 ^{NS}	16,24	13,548
T5, T6	0,549 ^{NS}	59,51	2,601	0,963 ^{NS}	26,20	11,856	11,059**	14,49	1,722	51,675*	7,56	3,485

** significativo a 1% de probabilidade, * significativo a 5% de probabilidade e NS não significativo.

Os dados das análises bioquímicas foram representados nas Figuras 2 e 3, respectivamente às 12 e 36 h após a transferência das sementes.

Nas Figuras 2A e 2B e 3A e 3B, os resultados das peroxidases indicam redução da atividade dessas enzimas nos eixos onde as sementes estiveram em contato com solução SNP (T2, T4 e T6), exceto em T6 às 12 h (Figura 2B). O material embebido em solução de SNP e transferido para PEG (T4), apresentou redução significativa da atividade da PG-POD e da GC-POD nas duas coletas, indicando que o óxido nítrico apresentou efeito protetor às sementes submetidas à condição de estresse. A atividade da SOD (Figuras 2C e 3C) também sofreu redução nos tratamentos onde as sementes foram submetidas à solução de SNP (T2, T4 e T6), exceto para o T4 às 36 h (Figura 3C).

A presença do óxido nítrico na solução de transferência dos tratamentos ocasionou redução do substrato para atividade enzimas antioxidantes, peroxidases e superóxido dismutase, atuando ele próprio como um antioxidante.

Embora alguns autores considerem o NO como um agente indutor de estresse (Leshem, 1996), outros têm relatado seu papel protetor (Beligni e Lamattina, 1999 a, b; Kao e, Hsu 2004; Laspina et al., 2005), da mesma forma como observado nos resultados do presente trabalho.

Foi evidenciado que o NO neutralizou a toxicidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pelos herbicidas diquat e paraquat em plantas de batata (Beligni e Lamattina, 1999b) e arroz (Hung et al., 2002), e Laxalt et al. (1997) relataram que o NO foi capaz de evitar parcialmente a degradação de clorofila, onde postularam sua capacidade na eliminação das ERO em folhas de batata infestadas por *Phytophthora infestans*.

Caro e Puntarulo (1998) e Kopyra e Gwózdź (2003), observaram uma função antioxidante do NO em raízes sob condições de estresse, atribuído a ele a redução na quantidade de radicais superóxido, como resultado da eliminação direta desses elementos.

Xing et al. (2004) verificaram que o NO está envolvido com a tolerância a condição de estresse osmótico em plântulas de trigo, o que é semelhante a condição de deficiência hídrica a que foram submetidas as sementes de feijão.

Foi observada redução dos teores de lipoperóxidos nos eixos das sementes de feijão que foram embebidas em solução de SNP, independentemente da condição de transferência (Figura 2 D e 3D). Esse comportamento indica que houve menores danos ao sistema de membranas das células, fato esse atribuído à presença do óxido nítrico na solução.

Em trabalhos com metais como cobre, níquel, alumínio e cádmio foi verificado a indução da peroxidação de lipídios em *Silene cucubalus* (De Vos et al., 1989), trigo (Pandolfini et al., 1992), soja (Cakmak e Horst, 1991) e feijão (Somasekariah et al., 1992).

Em ambiente natural, as respostas antioxidativas de plantas às variações abióticas são induzidas por mecanismos que resultam em adaptações, isso porque fatores ambientais extremos levam ao aumento das concentrações das espécies reativas de oxigênio, e, conseqüentemente, estimulam do mesmo modo os antioxidantes (Ghezzi e Bonetto, 2003; Kuk et al., 2003; Apel e Hirt, 2004; Bulbovas et al., 2005; Foyer e Noctor, 2005; Gechev et al., 2006).

A função protetora do NO em plantas submetidas a deficiência de ferro e por outras situações estressantes tem sido relatada, mostrando que sua presença reduz o acúmulo de H₂O₂ e de O₂ (Prats et al., 2005). Outros estudos têm indicado que a presença de NO protege a membrana lipoprotéica dos danos oxidativos (Sun et al., 2007).

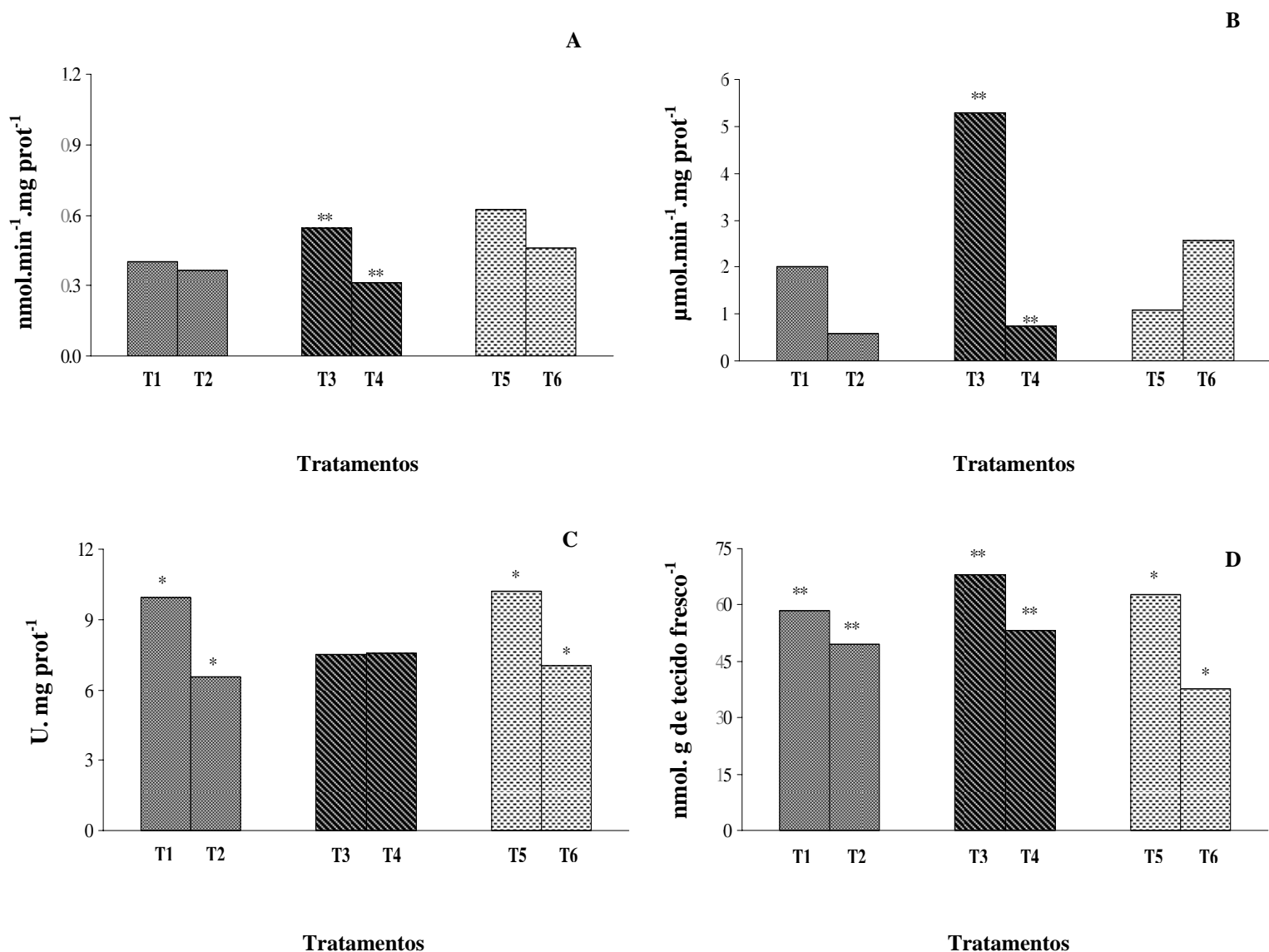


Figura 2. Atividade das enzimas pirogalo peroxidase (A), guaiacol peroxidase (B), superóxido dismutase (C) e teores de lipoperóxido (D), determinadas no extrato obtido de 25 eixos embrionários de sementes de feijão submetidas as condições de embebição (18 h) e transferência. T1 embebição em água destilada e transferência para água destilada; T2 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para água destilada; T3 embebição em água destilada e transferência para solução de PEG -0,6MPa; T4 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para solução de PEG -0,6MPa; T5 embebição em água destilada e transferência para solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; T6 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Coleta realizada após 12 h da transferência. Significativo a 1% (**) e a 5% (*) de probabilidade.

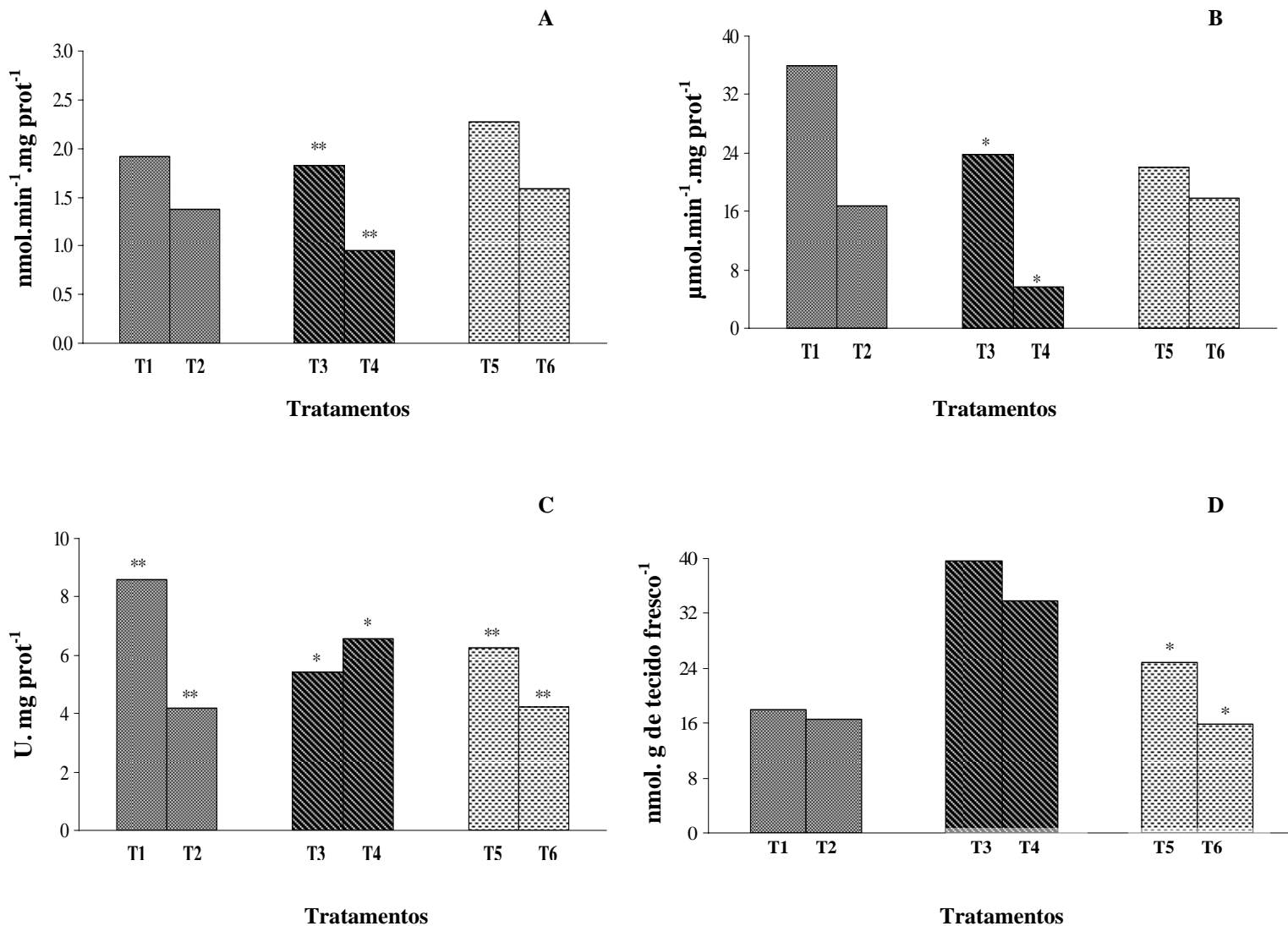


Figura 3. Atividade das enzimas pirogalol peroxidase (A), guaiacol peroxidase (B), superóxido desmutase (C) e teores de lipoperóxido (D), determinadas no extrato obtido de 25 eixos embrionários de sementes de feijão submetidas as condições de embebição (18 h) e transferência. T1 embebição em água destilada e transferência para água destilada; T2 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para água destilada; T3 embebição em água destilada e transferência para solução de PEG -0,6MPa; T4 embebição em solução de SNP de 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para solução de PEG -0,6MPa; T5 embebição em água destilada e transferência para solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; T6 embebição em solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e transferência para solução de SNP 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Coleta realizada após 36h da transferência. Significativo a 1% (**) e a 5% (*) de probabilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As determinações bioquímicas mostraram que o óxido nítrico reduziu os substratos disponíveis para enzimas peroxidases e SOD, bem como atuou na proteção contra peroxidação de lipídios, apresentando ação antioxidante em sementes de feijão submetidas à deficiência hídrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.55, p.373-99, 2004.

BAISAK, R. et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant Cell Physiol.**, v.35, p.489-495, 1994.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v.44, p.276-287, 1971.

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

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-344, 1999b.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-278, 2001.

BETHKE, P.C. et al. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, n.219, p.847-855, 2004.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.83-116, 1992.

BRACCINI, A.L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. **Rev. Bras. Sementes**, v.18, n.1, p.10-16, 1996.

BRADFORD, K.J. A water relation analysis of seed germination rates. **Plant Physiol.**, v.94, n.2, p.840-849, 1990.

BRAGA, L.F. et al. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Rev. Bras. Sementes**, v.21, n.2, p.95-102, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BULBOVAS, P. et al. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Rev. Bras. Bot.**, v.28, n.4, p.687-696, 2005.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.**, v.83, p.463-468, 1991.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE. J.; EVERSE. K.E.; GRISHAM. M.B. (Eds.). **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.2, p.25-50.

CARO, A.; PUNTARULO, S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. **Physiol. Plant.**, n.104, p.357-364, 1998.

DE VOS, C.H.R. et al. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. **Plant Physiol.**, v.135, p.165-169, 1989.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: FOYER, C.H.; MULINEAUX, P.M. (Eds.). **Causes of Photoactive Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.219-236.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In...45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiol. Plant.**, v.92, n.44, p.696-717 1994.

FOYER C.H.; NOCTOR. G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environ.**, v.28, p.1056–1071, 2005.

GECHEV, T.S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays.**, v.28, p.1091–101, 2006.

GHEZZI, P.; BONETTO, V. Redox proteomics: identification of oxidatively, modified proteins. **Proteomics.**, v.3. p.1145–1153, 2003.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-198, 1968.

HUNG, K.T.; CHANG, C.J.; KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-166, 2002.

KAO, C.H.; HSU, Y. T. Cd toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul.**, v.42, p.227-238, 2004.

KNÖRZER, O.C.; DURNER, J.; BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultures soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiol. Plant.**, v.97, p.388-396, 1996.

KNYPL, J.S.; KHAN, A.A. Osmoconditioning of soybean seeds to improve performance at subtropical temperatures. **Agron. J.**, v.73, p.112-116, 1981.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-1017, 2003.

KUK, Y.I. et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Sci.**, n.43, 2109-2117, 2003.

KUSS, F. **Agentes oxidantes e antioxidantes**, p.1-10, 2005. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag_oxid_antioxid.pdf> Acesso em: 10 dez. 2006.

LASPINA, N.V. et al. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Sci.**, v.169, p.323-330, 2005.

LAXALT, A.M.; BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected with *Phytophthora infestans*. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.73, p.643-651, 1997.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with Folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-75, 1951.

MATA, C.G.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.**, v.126, p.1196-1204, 2001.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. **Plant Physiol.**, v.51, n.5, p.914-916, 1973.

MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciênc. Rural**, v.33, n.2, p.219-226, 2003.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.58, p.459-481, 2007.

NEIL, S.J. et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-16, 2002.

NEPOMUCENO, A.L. et al. Tolerância a seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnol. Ciênc. Desenvolv.**, n.23, p.12-18, 2001.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environ.**, v.15, p.719-725, 1992.

PRATS, E. et al. Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f.sp. *Hordei*. **Mol. Plant Pathol.**, n.6, p. 65-78, 2005.

RICHARDS, K.D. et al. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v.116, p.409-418, 1998.

SALT, D. Responses e Adaptations of plants to metal stress. In: HAWKESFORD. M.J. (Ed), **Molecular Analyses of Plant Adaptations to the Environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers., 2001. p.159-179.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Rev. Bras. Sementes**, v. 26, n.1, p.110-119, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v.101, p.7-12, 1993.

SHARMA, A.; SENGUPTA, V.K. Changes in protease and alpha amylase activity in germinating seeds of groundnut. **Indian J. Plant Physiol.**, v.30, p.176-182, 1987.

SHIOGA, P.S. **Controle da hidratação e desempenho das sementes de feijão** (*Phaseolus vulgaris* L.). 1990.106f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. **New Phytol.**, v.125, p.27-28, 1993.

SOMASHEKARIAH, B.V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A.R.K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiol. Plant.**, v.85, p.85-89, 1992.

STEUTER, A.A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J.R. Water potencial of aqueous polythylene glycol. **Plant Physiol.**, v.67, n.1, p.64-67, 1981.

SUN, B. et al. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in Maite (*Zea mays*). **J. Plant Physiol.**, n.164, p.536-543, 2007.

TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environ. Exp. Bot.**, v.51, p.281-288, 2004.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Sci.**, v.153, p.65-72, 2000.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.3, p.373-384, 2000.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-523, 2002.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Sci.**, v.164, p.645-655, 2003.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

XING, H. et al. Evidence for the involvement of nitric and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. **Plant Growth Regul.**, n.42, p.61-68, 2004.

CONCLUSÕES

O óxido nítrico e o sulfato de alumínio exercem efeito na germinação de sementes de feijão, acelerando e atrasando esse processo respectivamente, e também sobre a massa fresca dos eixos embrionários.

O alumínio impede a formação e o desenvolvimento de plântulas de feijão e o óxido nítrico não é eficiente na minimização desse efeito.

A deficiência hídrica ocasiona atraso na germinação das sementes e o óxido nítrico é eficiente na redução dos efeitos dessa condição e na formação das plântulas de feijão.

O óxido nítrico atua como antioxidante em sementes de feijão quando estas são submetidas à deficiência hídrica.