

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências – campus Botucatu

**AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O ESTRESSE DE
ALUMÍNIO NA GERMINAÇÃO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.):
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

Tatiana Kazue Silva

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, da Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de Concentração: Fisiologia
Vegetal**

Botucatu – SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências – campus Botucatu

**AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O ESTRESSE DE
ALUMÍNIO NA GERMINAÇÃO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.):
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

Tatiana Kazue Silva

Profa. Dra. Ana Catarina Cataneo

Orientadora

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, da Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de Concentração: Fisiologia
Vegetal**

Botucatu – SP

2007

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	I
Prefácio.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
CAPÍTULO I. Óxido nítrico estimula e neutraliza o efeito inibidor do alumínio sobre a germinação de sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	04
Introdução.....	05
Material e Métodos.....	08
Resultados e Discussão.....	11
Conclusões.....	16
Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO II. Efeito do óxido nítrico sobre a atividade de enzimas antioxidantes na germinação de sementes de soja (<i>Glycine max</i> L.) sob estresse de alumínio.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	32
Resultados e Discussão.....	36
Conclusões.....	45
Referências Bibliográficas.....	46
Considerações Finais.....	56

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, meu pai celeste que cuida de mim, e me conduziu em triunfo nesse trabalho.

Agradeço o apoio de minha família, amo vocês!!!!

Em especial, muito obrigada a Prof^a Ana Catarina, pela paciência e dedicação.

À Yara, amiga preciosa, sou muito grata à você por tudo.

Aos meus amigos Leonardo, Jennifer, Lígia e Joseane, muito obrigada!!!

E agradeço aos meus amigos de Tatuí pelas orações e pelo carinho!

PREFÁCIO

CAPÍTULO I - Avaliação do efeito do óxido nítrico na proteção contra o estresse de alumínio na germinação de arroz (*Oryza sativa* L.), redigido conforme as normas da **Revista Brasileira de Botânica**.

CAPÍTULO II - Determinação da ação do óxido nítrico sobre a atividade de enzimas antioxidantes na germinação de soja (*Glycine max* L.) sob condições de estresse de alumínio, redigido conforme as normas da **Acta Botânica Brasilica**.

SILVA, T.K. **AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O ESTRESSE DE ALUMÍNIO NA GERMINAÇÃO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.): ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.** 2007. 56 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO - 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, e possui efeito tóxico direto sobre o metabolismo vegetal. Estudos recentes demonstram a atividade citoprotetora do radical livre óxido nítrico (NO) em plantas. O óxido nítrico (NO) participa em vários processos fisiológicos nas plantas, além de neutralizar a toxicidade de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) geradas em diversas situações de estresses abióticos, dentre os quais, elevadas concentrações de alumínio nos solos. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: **I** - Verificar a ação citoprotetora do NO em condições de estresse de alumínio durante a germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar Talento, onde foram utilizadas para os tratamentos soluções de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), como doadora de NO e para a simulação de estresse de alumínio foram utilizadas soluções de diferentes concentrações de sulfato de alumínio. O experimento foi conduzido em duas etapas. Para os tratamentos da primeira etapa do experimento foi utilizado solução de SNP nas concentrações 50, 100, 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e soluções de sulfato de alumínio nas concentrações 10, 20, 30, 40, e 50 mmol.L^{-1} . Para o controle foi utilizado água destilada. Na segunda etapa do experimento foram utilizadas soluções de SNP 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e de sulfato de alumínio 30 mmol.L^{-1} . As sementes foram submetidas a uma incubação por 18 h em água destilada (Grupo I) ou em solução de SNP (Grupo II) e em seguida foram transferidas para água destilada, solução de SNP ou solução de sulfato de alumínio. Foram realizadas avaliações de germinação diariamente,

por 4 dias. Pode ser concluído que o NO causa estímulo da germinação de arroz nas fases iniciais deste processo, sendo mais evidente no período de 48 h de embebição. O maior incremento da germinação foi observado na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP, ao passo que as concentrações de SNP acima de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ causaram redução da germinação. Também foi possível detectar que o NO foi capaz de reduzir a inibição da germinação como efeito do estresse de alumínio. **II** - Avaliar o efeito do NO sobre a atividade de enzimas antioxidantes durante a germinação de sementes de soja (*Glycine max* L.) cultivar Perdiz, sob condições de estresse de alumínio. Para atingir este objetivo foram realizados dois experimentos, um para as avaliações de germinação e outro para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). Para os tratamentos foram utilizadas soluções de nitroprussiato de sódio (SNP) $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como doadora de NO e solução de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} para simulação de estresse de alumínio. As sementes foram incubadas por 18 h em água destilada (Grupo I) ou em solução de SNP (Grupo II). Em seguida as sementes de cada grupo foram transferidas para novos rolos de papel “germitest” umedecidos com água destilada, solução de SNP ou solução de sulfato de alumínio. As avaliações da germinação foram realizadas diariamente, por 4 dias. As determinações das atividades da POD e SOD foram realizadas no eixo embrionário das sementes nos períodos de 12 e 36 h após a transferência para os tratamentos. Foi verificado que o NO foi capaz de reduzir a inibição da germinação de soja, como efeito do estresse de alumínio. A ação do NO pode ser, em parte, atribuído à sua capacidade de remoção de ERMO, principalmente na forma de H_2O_2 , diminuindo o efeito negativo do alumínio sobre a germinação.

Palavras-chaves: óxido nítrico, alumínio, germinação, arroz, soja

SILVA, T.K. NITRIC OXIDE ACTION ON ALUMINIUM STRESS IN RICE (*Oryza sativa* L.) GERMINATION: PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMISTS ALTERATIONS

ABSTRACT – Aluminum is a heavy metal that causes problems in 30-40% of the planet's arable land areas, more commonly in the tropics, where soils are acid, and has a direct toxic effect on plant metabolism. Recent studies have demonstrated the cytoprotective activity of free radical nitric oxide (NO) in plants. Nitric oxide (NO) participates in several plant physiological processes, and counteracts reactive oxygen species (ROS) toxicity generated during various abiotic stress situations, including high aluminum concentrations in soils. In view of the above, the objectives of this work were to: **I** - Verify the NO cytoprotective action under aluminum stress conditions during germination of cultivar Talento rice seeds (*Oryza sativa* L.), using solutions at different sodium nitroprussiate (SNP) concentrations as NO donors in the treatments. Solutions at different aluminum sulfate concentrations were used to simulate aluminum stress. The experiment was conducted in two steps. SNP solutions at concentrations of 50, 100, 250, 500, 1000, and 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, and aluminum sulfate solutions at concentrations of 10, 20, 30, 40, and 50 mmol.L^{-1} were used in the treatments of the first step of the experiment. Distilled water was used as a control. In the second step of the experiment, it was used a SNP solution at 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and an aluminum sulfate solution at 30 mmol.L^{-1} . The seeds were submitted to incubation for 18 h in distilled water (Group I) or in SNP solution (Group II) and were then transferred to distilled water, SNP solution, or aluminum sulfate solution. Germination evaluations were carried out daily, for 96 h. It can be concluded that NO stimulates rice germination at the initial stages of the germination process, which is more evident in the 48 h imbibition period. The greatest increase in germination was observed at the SNP concentration of 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, while

SNP concentrations above $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ reduced germination. It was also able to detect that NO was capable to reduce soybean germination inhibition resulting from the aluminum stress effect. **II** - Evaluate the NO effect on the activity of antioxidant enzymes during germination of cultivar Perdiz soybean seeds (*Glycine max* L.) under aluminum stress conditions. In order to achieve this objective, two experiments were conducted, one to evaluate germination and the other to determine activity of the antioxidant enzymes peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD). A $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sodium nitroprussiate (SNP) solution was used in the treatments as NO donor, while a 30mmol.L^{-1} aluminum sulfate solution was used to simulate aluminum stress. The seeds were incubated for 18 h in distilled water (Group I) or in SNP solution (Group II). Then the seeds in each group were transferred to new paper rolls “germitest” moistened with distilled water, SNP solution, or aluminum sulfate solution. Germination evaluations were performed daily, for 4 days. The POD and SOD activity determinations were performed in the embryonic axis of seeds at 12 and 36 h after seed transfer to the treatments. It was observed that NO was capable to reduce soybean germination inhibition resulting from the aluminum stress effect. The NO action could be attributed, in part, to its capacity to remove ROS, especially in the form of H_2O_2 , decreasing the negative effect of aluminum on germination.

Key words: nitric oxide, aluminum, germination, rice, soybean

CAPÍTULO I

**Óxido nítrico estimula e neutraliza o efeito inibidor do alumínio sobre a
germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.)**

**Nitric oxide stimulates and counteracts the inhibitory effect of aluminum on rice
seed (*Oryza sativa* L.) germination**

Tatiana Kazue Silva

RESUMO

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, e possui efeito tóxico direto sobre o metabolismo vegetal. Estudos recentes demonstram a atividade citoprotetora do radical livre óxido nítrico (NO) em plantas sob estresse de alumínio. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação citoprotetora do NO em condições de estresse de alumínio durante a germinação de sementes de arroz. Para os tratamentos, foram utilizadas soluções de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), como doadora de NO e para a simulação de estresse de alumínio foram utilizadas soluções de diferentes concentrações de sulfato de alumínio. O experimento foi conduzido em duas etapas. Para os tratamentos da primeira etapa do experimento foi utilizado solução de SNP nas concentrações 50, 100, 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e soluções de sulfato de alumínio nas concentrações 10, 20, 30, 40, e 50 mmol.L^{-1} . Para o controle foi utilizado água destilada. Na segunda etapa do experimento foram utilizadas soluções de SNP 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e de sulfato de alumínio 30 mmol.L^{-1} . As sementes foram

submetidas a uma incubação por 18 h em água destilada (Grupo I) ou em solução de SNP (Grupo II) e em seguida foram transferidas para água destilada, solução de SNP ou solução de sulfato de alumínio. Foram realizadas avaliações de germinação diariamente, por 4 dias. Pode ser concluído que o NO causa estímulo da germinação de arroz nas fases iniciais deste processo, sendo mais evidente no período de 48 h de embebição. O maior incremento da germinação foi observado na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP, ao passo que as concentrações de SNP acima de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ causaram redução da germinação. Também foi possível detectar que o NO foi capaz de reduzir a inibição da germinação como efeito do estresse de alumínio.

Palavras-chave: óxido nítrico, germinação, arroz, alumínio

ABSTRACT

Aluminum is a heavy metal that causes problems in 30-40% of the planet's arable land areas, more commonly in the tropics, where soils are acid, and has a direct toxic effect on plant metabolism. Recent studies have demonstrated the cytoprotective activity of free radical nitric oxide (NO) in plants under aluminum stress. The objective of this study was to verify NO cytoprotective action under aluminum stress conditions during germination of rice seeds. Sodium nitroprussiate solutions (SNP) at different concentrations were used in the treatments as NO donors, and aluminum sulfate solutions at different concentrations were used to simulate aluminum stress. The experiment was conducted in two steps. SNP solutions at concentrations of 50, 100, 250, 500, 1000, and 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, and aluminum sulfate solutions at concentrations of 10, 20, 30, 40, and 50 mmol.L^{-1} were used in the treatments of the first step of the experiment. Distilled water was used as a control. In the second step of the experiment, we used a SNP solution at 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and an aluminum sulfate solution at 30 mmol.L^{-1} . The seeds were submitted to incubation for 18 h in distilled water (Group I) or in SNP solution (Group II) and were then transferred to distilled water, SNP solution, or aluminum sulfate solution. Germination evaluations were carried out daily, for 4 days. It can be concluded that NO stimulates rice germination at the initial stages of the germination process, which is more evident in the 48 h imbibition period. The greatest increase in germination was observed at the SNP concentration of 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, while SNP concentrations above 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ reduced germination. It was also able to detect that NO was capable to reduce soybean germination inhibition resulting from the aluminum stress effect.

Key words : nitric oxide, germination, rice, aluminium

INTRODUÇÃO

Os metais pesados presentes no solo são originados a partir das rochas, que os contêm em sua composição (MELO et al., 1997).

Teores fitotóxicos de metais pesados não são encontrados em condições naturais nos solos, mas podem ser originados em zonas industriais e de intensa atividade agrícola (CASTILLO, 1992).

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 uso excessivo de fertilizantes sintéticos provoca desequilíbrios na concentração de nutrientes do solo e influencia a retenção de água, sendo que alguns tipos de adubos podem liberar altas concentrações de alumínio e manganês até atingirem níveis tóxicos, influenciando negativamente a lavoura (ROCHA, 1995). Também a prática de utilização de lodo de esgoto na cultura do arroz tem aumentado a proporção de metais pesados no solo, como é o caso de cádmio e zinco, que podem se acumular e persistirem nos solos por longos períodos, podendo ser fitotóxicos (OLIVEIRA et al., 2005).

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. Em solos não-ácidos o alumínio está preso em compostos insolúveis, porém, em solos ácidos ele torna-se solúvel, é absorvido pelas raízes e inibe o crescimento das plantas. O alumínio exerce um efeito direto na disponibilidade de fósforo e, inibe a absorção de ferro, além de possuir efeito tóxico direto sobre o metabolismo vegetal (RAVEN et al., 2001).

De acordo com MARIN et al. (2004) várias hipóteses para os mecanismos de ação do alumínio tóxico têm sido propostas, incluindo inibição do fluxo de íons, ruptura da membrana plasmática, inibição do sinal de transdução e alteração da estrutura do citoesqueleto. A condição de elevada acidez nos solos 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, que reduz a germinação, limitando a produtividade das plantas.

Estes efeitos causados pelos elevados níveis de alumínio nos solos estão associados à produção aumentada de espécies reativas do metabolismo de oxigênio (ERMO), representados pelos radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2), acarretando, portanto, estresse oxidativo nas plantas (RICHARDS et al., 1998; ROUT et al., 2001; BOSCOLO et al., 2003; TAMÁS et al., 2004). O estresse oxidativo é consequência da alteração química das principais classes de biomoléculas, causando alterações estruturais e funcionais em proteínas, clorofila, ácidos nucleicos e lipídios (SCANDALIOS, 1993; SMIRNOFF, 1993; FOYER, 1994; THÉRON et al., 2000), que podem levar à morte celular (BUCKNER et al., 2000; JONES, 2000).

Tem sido caracterizada a ação do radical livre óxido nítrico (NO) em plantas como citoprotetora, regulando o nível e a toxicidade de ERMO (DELLEDONE, 1998; DURNER, 1998). A origem do NO é endógena nas plantas e é produzido a partir da reação catalisada pela NO sintase, como demonstrado por SEN & CHEEMA (1995). Ele também pode ser produzido através da atividade de nitrato redutase (DEAN & HARPER, 1998; YAMASAKI et al., 1999; 2000).

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 & 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 & LAMATTINA, 2001).

O NO pode exercer 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 & GWÓZDZ, 2003).

No Brasil, os solos de cerrado, que compreendem uma extensão de 205 milhões de hectares, apresentam baixa capacidade de troca de íons, além de alta toxicidade de alumínio (MARIN et al., 2004). Deste modo. O estudo dos efeitos do NO sob condições de estresse de alumínio é de suma importância devido ao potencial dos solos de cerrados na utilização para o cultivo agrícola.

Portanto, será investigada a ação citoprotetora do NO em condições de estresse de alumínio durante a germinação de sementes de arroz. O arroz foi escolhido, pois muitos produtores da região dos cerrados estão aumentando seus investimentos nesta cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, SP.

Foram testados os efeitos do óxido nítrico e de alumínio sobre a germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar BRS Talento, cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antonio de Goiás, GO.

As sementes foram colocadas para germinar distribuindo-as sobre duas folhas de papel de germinação “germitest” e cobrindo-as com outra, formando-se rolos de germinação. As folhas de papel de germinação foram previamente umedecidas com as soluções utilizadas em cada tratamento.

Os rolos de germinação foram acondicionados em recipientes plásticos transparentes, contendo perfurações na tampa e mantidos em câmaras de germinação, na temperatura de 25°C, sem fotoperíodo.

O volume em mL das soluções utilizadas em cada tratamento dos experimentos foi na proporção de 2,5 vezes o peso em g do papel “germitest” seco.

Para os tratamentos foram utilizadas soluções de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), como doadora de NO e para a simulação de estresse de alumínio foram utilizadas soluções de diferentes concentrações de sulfato de alumínio.

Para a condução do experimento foram realizadas duas etapas. Para os tratamentos da primeira etapa do experimento foram utilizadas soluções de SNP nas concentrações 50, 100, 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e soluções de sulfato de alumínio nas concentrações 10, 20, 30, 40, e 50 mmol.L^{-1} . Para o controle foi utilizado água destilada.

Para a segunda etapa do experimento foram utilizadas soluções de SNP $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} . Estas concentrações das soluções foram pré-estabelecidas a partir dos resultados da primeira etapa do experimento onde foram constatados, respectivamente, estimulação e redução da germinação.

As sementes foram incubadas por 18 h em rolos de papel “germitest” umedecidos com água destilada (Grupo I) ou em solução de SNP (Grupo II). Em seguida as sementes de cada grupo foram transferidas para novos rolos de papel umedecidos com água destilada, com solução de SNP ou de sulfato de alumínio, perfazendo seis tratamentos, como se segue:

Grupo I : Incubação em água destilada:

T₁: incubação em água destilada e transferência para água destilada;

T₂: incubação em água destilada e transferência para solução de SNP;

T₃: incubação em água destilada e transferência para solução de sulfato de alumínio.

Grupo II : Incubação em óxido nítrico:

T₄: incubação em solução de SNP e transferência para água destilada

T₅: incubação em solução de SNP e transferência para solução de SNP;

T₆: incubação em solução de SNP e transferência para solução de sulfato de alumínio.

As avaliações de germinação foram realizadas diariamente até 96 h, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram comprimento radicular maior ou igual a 2 mm (DURAN & TORTOSA, 1985).

Em todos os experimentos foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes. Os resultados foram

submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da porcentagem de germinação de sementes de arroz, sob efeito de diferentes concentrações de NO. O aumento da porcentagem de germinação como efeito do NO foi observado somente nas fases iniciais das avaliações, sendo mais evidente, 48 h após a instalação do experimento. No período de 96 h de embebição as sementes de arroz praticamente completaram o processo germinativo, alcançando valores de até 90% de germinação.

É possível notar que no período de 48 h de embebição, o NO causou, de modo geral, aumento da germinação na ordem de 27 a 96% nas menores concentrações de SNP utilizadas (50 a 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), onde os maiores incrementos foram observados nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP. Foi também observado tendência à diminuição da germinação nas concentrações acima de 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP.

Os resultados apresentados da ação do NO sobre a germinação de arroz são concordantes com diversos trabalhos na literatura, utilizando sementes de outras espécies. Foi verificado que a aplicação de diferentes concentrações de compostos doadores de NO, incluindo o SNP, causou estimulação da germinação de sementes, indicando que o NO apresenta efeito sobre a quebra de dormência de sementes.

BELIGNI & LAMATTINA (2001) relataram que o NO atua como um indutor do processo germinativo. Em arroz foi evidenciado que o NO estimulou a germinação por simulação do efeito da luz (HUNG et al., 2002) e induziu quebra de dormência em sementes de *Emmenathe penduriflora* (KEELY & FORTHERINGHAM, 1997). SARATH et al. (2006) verificaram que a germinação de sementes de *Panicum virgatum* L. foi significativamente influenciada pelo NO, relatando sua ação como um possível desencadeador endógeno para a quebra de dormência desta espécie. Também foi verificado que o NO reduziu a dormência de sementes de *Arabidopsis* (BATAK et al.,

2002; BETHKE et al., 2004), cevada (BETHKE et al., 2004) e alface (BELIGNI & LAMATTINA, 2000).

No trabalho de SIMONTACCHI et al. (2004) foi observado aumento da produção de NO, principalmente no início da atividade de germinação de sementes de *Sorghum bicolor*.

Aplicando diferentes concentrações de SNP em sementes de *Paulownia tomentosa* Steud., GIBA et al. (1998) verificaram que o NO estimulou a germinação em baixas concentrações e inibiu a germinação em concentrações superiores a $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de SNP.

KOPYRA & GWÓZDZ (2003) observaram aumento da porcentagem de germinação de sementes de tremço-amarelo (*Lupinus luteus*), sob efeito do NO no início da embebição e também detectaram que até próximo a concentração de $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP 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.

Os resultados da porcentagem de germinação de sementes de arroz sob efeito da presença de alumínio estão apresentados na Tabela 2. Pode ser verificado que o alumínio causou diminuição na germinação nas fases iniciais do processo cujo efeito foi mais evidente as 48 e 72 h após a instalação do experimento. Nestes períodos de embebição, foi observado diminuição na porcentagem de germinação, com o aumento da concentração de sulfato de alumínio. As maiores reduções na germinação foram observadas nas concentrações de 30 a 50 mmol.L^{-1} de sulfato de alumínio. O alumínio causou atraso na germinação de arroz, entretanto, no período de 96 h de embebição, as sementes alcançaram até 87% de germinação, igualando ao controle.

Tabela 1. Porcentagens de germinação (%) de sementes de arroz sob efeito de várias concentrações de SNP (doador de NO) em diferentes períodos de embebição.

Tratamentos SNP (mmol.L ⁻¹)	Períodos de Embebição			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (controle)	0 a	35,5 cd	78,0 a	87,0 a
50	0 a	69,5 a	73,5 a	90,5 a
100	0 a	58,0 ab	75,5 a	89,0 a
250	0 a	49,5 bc	68,0 a	83,0 a
500	0 a	45,0 bc	69,5 a	84,0 a
1000	0 a	28,0 d	70,0 a	86,0 a
1500	0 a	24,0 d	68,0 a	85,0 a

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

Tabela 2 Porcentagens de germinação (%) de sementes de arroz sob efeito de várias concentrações de sulfato de alumínio em diferentes períodos de embebição.

Tratamentos SNP (mmol.L ⁻¹)	Períodos de Embebição			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (controle)	0 a	35,5 a	78,0 a	87,0 a
10	0 a	5,5 b	76,0 a	87,5 a
20	0 a	2,0 bc	62,0 b	85,5 a
30	0 a	0,5 c	24,5 c	81,5 a
40	0 a	0,5 c	8,0 d	81,0 a
50	0 a	0 c	5,0 d	66,0 b

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

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância com os relatados por MATSUMOTO (2000), ECHART & CAVALLI-MOLINA (2001) e ROUT et al. (2001), os quais verificaram que altas concentrações de alumínio causam retardamento da germinação de sementes e do desenvolvimento de plântulas.

De acordo com KOCHIAN (1995), MATSUMOTO (2000) e ROUT et al. (2001) altas 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. Um efeito adicional da presença de alumínio é a produção aumentada de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) (RICHARDS et al., 1998; ROUT et al., 2001; BOSCOLO et al., 2003; TAMÁS et al., 2004).

Entretanto, o NO é considerado como citoprotetor, sendo um potente antioxidante (BELIGNI et al., 2002; BELIGNI & LAMATTINA, 2002; HUNG et al., 2002). A citoproteção está baseada na capacidade do NO em regular o nível e a toxicidade das ERMO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Assim, o NO pode exercer uma ação protetora contra o estresse oxidativo provocado por um aumento da concentração de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (WINK et al., 1995).

Também tem sido relatado que o NO apresenta efeito sobre a germinação sob condições de estresse. Em estudos realizados com sementes de tremço amarelo (*Lupinus luteus*), KOPYRA & GWÓZDZ (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 causado por metais pesados sobre a germinação. WANG & YANG (2005) observaram que o alumínio causou inibição do desenvolvimento de raízes de *Cassia tola* L., mas o pré-tratamento das plantas com solução de SNP acarretou em aumento significativo do alongamento radicular.

A fim de avaliar a ação do NO sobre a germinação de sementes de arroz sob condições de estresse de alumínio foi realizado uma pré-incubação das sementes em solução de SNP e posterior transferência para solução de sulfato de alumínio, cujos resultados estão apresentados na Figura 1. Pode ser observado que de modo geral, a incubação das sementes em solução de SNP diminuiu o efeito negativo do alumínio sobre a germinação, nos períodos de 48, 72 e 96 h de embebição. Torna-se, portanto,

evidente que o NO foi capaz de reduzir a inibição da germinação, como efeito da presença de alumínio.

WANG & YANG (2005) observaram que o alumínio causou inibição do desenvolvimento de raízes de *Cassia tola* L., mas o pré-tratamento das plantas com solução de SNP acarretou em aumento significativo no alongamento radicular.

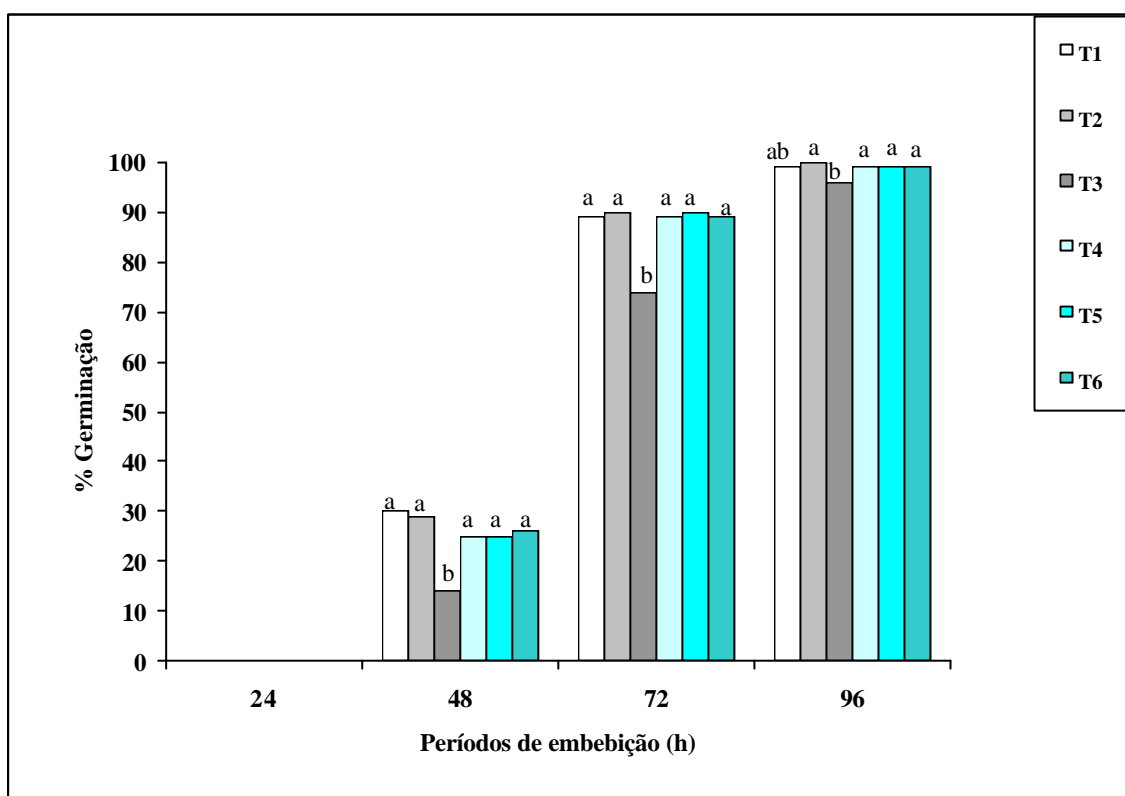


Figura 1. Porcentagens de germinação (%) de sementes de arroz em diferentes períodos de embebição sob os tratamentos de: **T₁**: incubação em água destilada e transferência para água destilada; **T₂**: incubação em água destilada e transferência para solução de SNP; **T₃**: incubação em água destilada e transferência para solução de sulfato de alumínio; **T₄**: incubação em solução de SNP e transferência para água destilada; **T₅**: incubação em solução de SNP e transferência para solução de SNP; **T₆**: incubação em solução de SNP e transferência para solução de sulfato de alumínio.

Médias seguidas de mesma letra em cada período de embebição, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho pode ser concluído que o NO causa estímulo da germinação de arroz nas fases iniciais deste processo, sendo mais evidente no período de 48 h de embebição. O maior incremento da germinação foi observado na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP, ao passo que as concentrações de SNP acima de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ causaram redução da germinação. Também foi possível detectar que o NO foi capaz de reduzir a inibição da germinação, como efeito do estresse de alumínio.

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 Science Research**, v.12, p.253-259, 2002.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.3, p. 199-208, 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 Environmental**, 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 Environmental**, v.25, p.737-748, 2002.

BELIGNI, M.V. et al. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.

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

BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminium-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, v.62, p.181-189, 2003.

BUCKNER, B.; JOHAL, G.S.; JANICK-BUCKNER, D. Cell death in maize. **Plant Physiology**, v.108, p.231-239, 2000.

CASTILLO, F. J. Peroxidases and stresses. In: PENEL, C., GASPAR, T. H., GREPPIN, H. (Ed.) Plant peroxidases 1980-1990: topics and detailed literature of molecular, biochemical, and physiological aspects. Geneva: University of Geneva, 1992. p.187-203.

DEAN, J.V.; HARPER, J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H – nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiology**, v.88, p.389-395, 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. **Proceedings National Academy of Science 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 Science Technology, Zürich.**, 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. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.95, p.10328-10333, 1998.

DURNER, J., KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Current Opinion of Plant Biology**, v.2, 369-374, 1999.

ECHART, C.L., MOLINA, S.C. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, v.31, p.531-541, 2001.

FOYER, C.H; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v.92, p.696-717 1994.

GIBA, Z. et al. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regulation**, v.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 Regulation**, v.21, p.183-187, 1997.

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

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

JONES, A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? **Trends in Plant Science**, v.5, p.273-278, 2000.

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

KIKUI, S. et al. Physiological and genetic analyses of aluminium tolerance in rice, focusing on root growth during germination. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.1837-1844, 2005.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 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 Physiology Biochemistry**, v.41, p.1011-1017, 2003.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regulation**, v.18, p.155-169, 1996.

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

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

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, v.200, p.1-46, 2000.

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

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

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

OLIVEIRA, C. et al. Efeitos da aplicação de lodo de esgoto enriquecido com cádmio e zinco na cultura de arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.109-116, 2005.

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

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 6.ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, cap. 30, p.609-719, cap. 34, p.789-811, 2001.

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

ROCHA, A. A. **Ciências do ambiente, saneamento, saúde pública**. São Paulo: Departamento de Saúde Ambiental. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, p.124-347, 1995.

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

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

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

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

SEN, S.; CHEEMA, I.R.. Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. **Biochemical Archives**, v.11, p.221-227, 1995.

SIMONTACCHI, M; JASID, S.; PUNTARULO, S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. **Plant Science**, v.167, p.839-847, 2004.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.463-470, 2006.

STÖHR, C.; STREMLAU, S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. **New Phytologist**, v.125, p.27-28, 1993.

TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental Experimental Botany**, v.51, p.281-288, 2004.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic 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 Science**, v.163, p.515-523, 2002.

WANG, S.H.; YANG, Z.M.; LU, B.; LI, S.Q.; LU, Y.P. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. **Botany Bulletin Academia Sinica**, v.45, p.203-212, 2004.

WANG, S.Y.; YANG, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L.. **Plant Cell Physiology**, v.46, p. 1915-1923, 2005.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new featured of an old enzyme. **Trends in Plant Science**, v.4, p.128-129, 1999.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase one of the missing link?. **Trends in Plant Science**, v.8, p.20-26, 2000.

CAPÍTULO II

Efeito do óxido nítrico sobre a atividade de enzimas antioxidantes na germinação de sementes de soja (*Glycine max* L.) sob estresse de alumínio

Effect of nitric oxide on the activity of antioxidant enzymes in the germination of soybean seeds (*Glycine max* L.) under aluminum stress

Tatiana Kazue Silva

RESUMO

O óxido nítrico (NO) participa em vários processos fisiológicos nas plantas, além de neutralizar a toxicidade de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) geradas em diversas situações de estresses abióticos, dentre as quais, elevadas concentrações de alumínio nos solos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do NO sobre a atividade de enzimas antioxidantes durante a germinação de sementes de soja sob condições de estresse de alumínio. Foram testados os efeitos do óxido nítrico e de alumínio sobre a germinação de sementes de soja (*Glycine max* L.) cultivar Perdiz, sendo realizados dois experimentos, um para as avaliações de germinação e outro para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). Para os tratamentos foram utilizadas soluções de nitroprussiato de sódio (SNP) $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como doadora de NO e solução de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} para simulação de estresse de alumínio. As sementes foram incubadas por 18 h em água destilada (Grupo I) ou em solução de SNP (Grupo II). Em seguida as sementes de cada grupo foram transferidas para novos rolos de papel “germitest” umedecidos com água destilada, solução de SNP ou solução de sulfato de alumínio. As avaliações da germinação foram realizadas diariamente, por até 96 h. As determinações das atividades da POD e SOD foram realizadas nos eixos embrionários das sementes nos períodos de 12 e 36 h após a transferência para os tratamentos. Foi verificado que o NO

foi capaz de reduzir a inibição da germinação de soja, como efeito do estresse de alumínio. A ação do NO pode ser, em parte, atribuído à sua capacidade de remoção de ERMO, principalmente na forma de H_2O_2 , diminuindo o efeito negativo do alumínio sobre a germinação.

Termos para indexação: óxido nítrico, germinação, alumínio, enzimas antioxidantes, *Glycine max* L.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) participates in several plant physiological processes, and counteracts reactive oxygen species (ROS) toxicity generated during various abiotic stress situations, including high aluminum concentrations in soils. The objective of this study was to evaluate the NO effect on the activity of antioxidant enzymes during germination of soybean seeds under aluminum stress conditions. The nitric oxide and aluminum effects on germination of cultivar Perdiz soybean seeds (*Glycine max* L.) were tested. Two experiments were conducted, one to evaluate germination and the other to determine the activity of the antioxidant enzymes peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD). A 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sodium nitroprussiate (SNP) solution was used in the treatments as NO donor, while a 30 mmol.L^{-1} aluminum sulfate solution was used to simulate aluminum stress. The seeds were incubated for 18 h in distilled water (Group I) or in SNP solution (Group II). Then the seeds in each group were transferred to new paper rolls moistened with distilled water, SNP solution, or aluminum sulfate solution. Germination evaluations were performed daily, for 96h. The POD and SOD activity determinations were performed in the embryonic axis of seeds at 12 and 36 h after seed transfer to the treatments. It was observed that NO was capable to reduce soybean germination inhibition resulting from the aluminum stress effect. The NO action could be attributed, in part, to its capacity to remove ROS, especially in the form of H_2O_2 , decreasing the negative effect of aluminum on germination.

Index terms: nitric oxide, germination, aluminum, antioxidants enzymes, *Glycine max* L.

INTRODUÇÃO

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. Em solos não-ácidos o alumínio está preso em compostos insolúveis, porém em solos ácidos ele torna-se solúvel, é absorvido pelas raízes e inibe o crescimento das plantas. O alumínio exerce um efeito direto na disponibilidade de fosfato e inibe a absorção de ferro, além de possuir efeito tóxico direto sobre o metabolismo vegetal (Raven et al., 2001).

De acordo com Marin et al. (2004) várias hipóteses para os mecanismos de ação do alumínio tóxico têm sido propostas, incluindo inibição do fluxo de íons, ruptura da membrana plasmática, inibição do sinal de transdução e alteração da estrutura do citoesqueleto. A condição de elevada acidez nos solos 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, que reduz a germinação, limitando a produtividade das plantas.

Estes efeitos causados pelos elevados níveis de alumínio nos solos estão associados à produção aumentada de espécies reativas do metabolismo de oxigênio (ERMO), representados pelos radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH \cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (O_2), acarretando portanto, estresse oxidativo nas plantas (Richards et al., 1998; Rout, 2001; Boscolo et al., 2003; Tamás et al., 2004). O estresse oxidativo é consequência da alteração química das principais classes de biomoléculas, causando alterações estruturais e funcionais em proteínas, clorofila, ácidos nucleicos e lipídios (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1993; Foyer, 1994; Théron et al., 2000), que podem levar à morte celular (Buckner et al., 2000; Jones, 2000).

As plantas respondem ao estresse oxidativo pelo aumento da atividade de enzimas que eliminam as ERMO, como é o caso das metaloenzimas superóxido dismutases (Bowler et al., 1992; Horst et al., 1992; Scandalios, 1993; Barabas et al., 1998; Salt, 2001) e peroxidases (Cakmak & Horst, 1991; Campa, 1991; Horst et al., 1992; Knörzer et al., 1996; Barabas et al., 1998; Salt, 2001).

As superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) são enzimas responsáveis pela eliminação do radical superóxido (O_2^{\bullet}), catalisando sua dismutação para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A dismutação é vital para proteger as células da injúria oxidativa, visto que o O_2^{\bullet} pode reagir com o H_2O_2 para formar o radical hidroxila (OH), que é altamente reativo. Entretanto, o H_2O_2 é um subproduto tóxico do metabolismo oxidativo e é posteriormente convertido ou utilizado pelas peroxidases (Bartosz, 1997; Scandalios, 2001).

Ainda não está completamente elucidado se o alumínio induz dano oxidativo nas células das plantas devido a elevada produção das ERMO, mas tem sido mostrado que esse aumento ativa a expressão dos genes de enzimas antioxidantes, tais como a SOD e POD (Ezaki et al., 2000). Os sistemas antioxidantes ativados são benéficos para o desempenho das plantas sob estresse de alumínio porque a capacidade adequada das enzimas antioxidativas e outros metabólitos antioxidantes podem ajudar na remoção do excesso das ERMO e inibir a peroxidação de lipídios (Mittler, 2002; Wang et al., 2004).

Tem sido caracterizado a ação do radical livre óxido nítrico (NO) em plantas como citoprotetora, regulando o nível e a toxicidade de ERMO (Halliwell & Gutteridge, 1984; Delledone, 1998; Durner, 1998).

O NO pode exercer 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). Em sistemas aonde a toxicidade é conseqüência da produção de ERMO, o NO pode proteger as plantas do dano celular, isto é, possui a

capacidade de eliminar ERMO e, desse modo, finalizar as reações propagadas em cadeia (Wink et al., 1993; Beligni & Lamattina, 1999).

A origem do NO é endógena nas plantas e é produzido a partir da reação catalisada pela NO sintase, como demonstrado por Sen & Cheema (1995). Ele também pode ser produzido através da atividade da nitrato redutase (Dean & Harper, 1998; Yamasaki et al., 1999; 2000).

Embora alguns autores considerem o NO como protetor (Beligni & Lamattina, 1999 a; b; Kao & Hsu 2004), outros têm relatado o NO como agente indutor de estresse (Leshem, 1996), outros têm relatado seu papel, dependendo da sua concentração no tecido ou idade da planta e do tipo de estresse. Foi evidenciado que o NO neutralizou a toxicidade de ERMO geradas pelos herbicidas diquat e paraquat em plantas de batata (Beligni & Lamattina, 1999b) e arroz (Hung et al., 2002).

Portanto será investigado se a ação citoprotetora do NO contra as ERMO geradas em condições elevadas de alumínio está relacionada com a atividade de enzimas antioxidantes durante a germinação de sementes de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, SP.

Foram testados os efeitos do óxido nítrico e de alumínio sobre a germinação de sementes de soja (*Glycine max* L.) cultivar Perdiz, lote 8636, cedidas pela Embrapa Soja – Londrina, PR. Através de testes de germinação realizados no laboratório o lote utilizado foi caracterizado como de baixo poder de germinação.

As sementes foram colocadas para germinar distribuindo-as sobre duas folhas de papel de germinação “germitest” e cobrindo-as com outra, formando-se rolos de germinação. As folhas de papel de germinação foram previamente umedecidas com as soluções utilizadas nos tratamentos referentes a cada experimento.

Os rolos de germinação foram acondicionados em recipientes plásticos transparentes, contendo perfurações na tampa e mantidos em câmaras de germinação, na temperatura de 25 °C, sem fotoperíodo.

O volume em mL das soluções utilizadas em cada tratamento dos experimentos foi na proporção de 2,5 vezes o peso em g do papel “germitest” seco.

Para os tratamentos foram utilizadas soluções de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP) $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como doadora de NO e para a simulação de estresse de alumínio foram utilizadas soluções de sulfato de alumínio 30mmol.L^{-1} . Estas concentrações utilizadas foram pré-estabelecidas em testes realizados anteriormente, que causaram, respectivamente, estimulação e redução da germinação.

As sementes foram incubadas por 18 h em rolos de papel “germitest” umedecidos com água destilada (Grupo I) ou em solução de SNP (Grupo II). Em seguidas as sementes de cada grupo foram transferidas para novos rolos de papel

umedecidos com água destilada, com solução de SNP ou de sulfato de alumínio, perfazendo seis tratamentos, como se segue:

Grupo I: Incubação em água destilada:

T₁: incubação em água destilada e transferência para água destilada;

T₂: incubação em água destilada e transferência para solução de SNP;

T₃: incubação em água destilada e transferência para solução de sulfato de alumínio.

Grupo II: Incubação em óxido nítrico:

T₄: incubação em solução de SNP e transferência para água destilada

T₅: incubação em solução de SNP e transferência para solução de SNP;

T₆: incubação em solução de SNP e transferência para solução de sulfato de alumínio.

Foram realizados dois experimentos, um para as avaliações de germinação e outro para a determinação da atividade de enzimas antioxidantes.

As avaliações de germinação foram realizadas diariamente, até 96 h, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram comprimento radicular maior ou igual a 2 mm (Duran & Tortosa, 1985).

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, as sementes de soja foram coletadas em dois diferentes períodos de embebição, as 12 e 36 h após o período de transferência para os tratamentos. Os eixos embrionários das sementes foram retirados, independente da ocorrência de germinação e imediatamente embalados em sacos plásticos e em seguida em papel de alumínio devidamente etiquetado. As amostras foram em seguida congeladas em nitrogênio líquido (-195°C) e armazenadas em *freezer* a -80°C para posterior extração e determinação das atividades da peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD).

A extração enzimática foi realizada segundo o método descrito por Ekler et al. (1993). As amostras dos eixos embrionários coletados foram homogeneizadas em almofariz gelado, utilizando-se 5 mL de tampão gelado TRIS-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,8 contendo 1 mmol.L⁻¹ de EDTA e 7,5% (peso.volume⁻¹) de polivinilpolipirrolidona e uma pequena quantidade de areia lavada e esterilizada. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C (20 minutos em 14000g) e o sobrenadante líquido utilizado como fonte enzimática para a determinação das atividades da POD e da SOD.

A atividade da POD foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire & Guy (2000), utilizando pirogalol como um dos substratos. A mistura de reação foi composta de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,5, pirogalol 20 mmol.L⁻¹ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5 mmol.L⁻¹, num volume final de 1,0 mL.

A mistura de reação foi mantida a temperatura ambiente durante 5 minutos. A mudança na absorvância devido à formação da purpurogalina foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm. O coeficiente de extinção molar da purpurogalina (2,5 mmol.L⁻¹.cm⁻¹) foi usado para calcular a atividade específica da enzima. A razão da conjugação não enzimática foi determinada pelo uso da mesma mistura de reação sem o extrato enzimático. A atividade da POD foi expressa em nmol de purpurogalina .mg de proteína⁻¹.min⁻¹.

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Beauchamp & Fridovich (1971), tendo como base a capacidade da enzima em converter radicais superóxido (O₂^{-•}) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (Bowler et al., 1992). Foi utilizado no sistema de reação tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,8, mistura de nitro bule tetrazolium (NBT) 33 µmol.L⁻¹ + EDTA 0,66 mmol.L⁻¹ (5:4),

mistura L-metionina 10 mmol.L^{-1} + riboflavina $3,3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (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 10 minutos. A redução do NBT foi determinada através de leituras de absorvância em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade enzimática (U) da atividade da SOD expressa em $\text{U.mg de proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$ foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da razão de inibição de redução de NBT medida a 560 nm.

O conteúdo de proteína solúvel presente nos extratos utilizados para as determinações enzimáticas da POD e da SOD foi estimado pelo método de Bradford et al. (1976). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando a caseína como proteína de referência.

Nos experimentos foram adotados o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

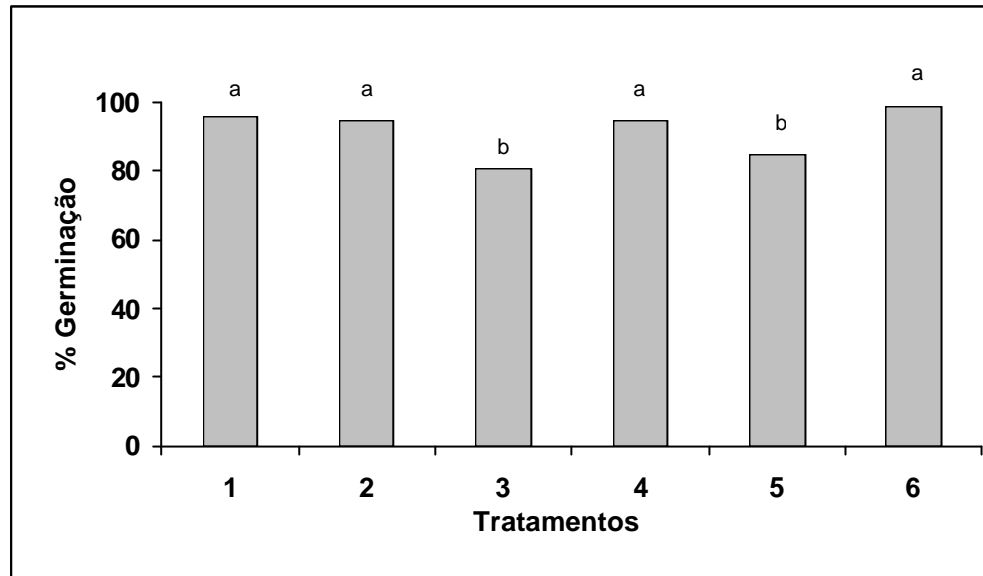
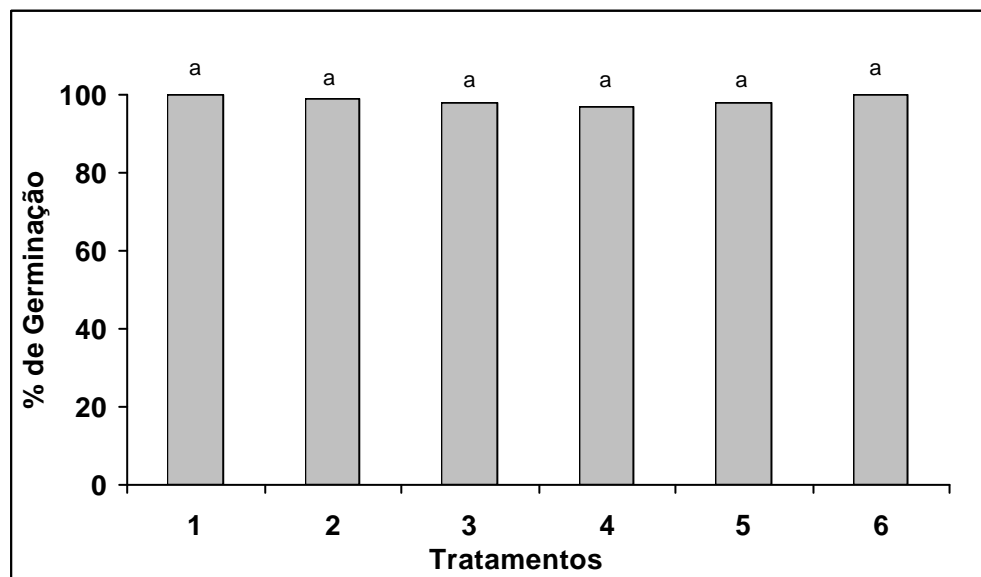
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão apresentados os resultados da porcentagem de germinação de sementes de soja sob os tratamentos associados de NO e alumínio. Analisando os resultados podemos verificar ação do NO sobre a germinação somente no período de 48h de embebição (Figura 1 A). Comparando-se os tratamentos T1 e T4 pode ser observado que não ocorreu alteração significativa na germinação quando as sementes foram incubadas em água destilada ou com solução de SNP e em seguida transferidas para água destilada. Entretanto, diminuição significativa da germinação das sementes que foram incubadas em solução de SNP e em seguida transferidas para a mesma solução (tratamento T5), em comparação com as sementes que foram incubadas em água destilada e transferidas para solução de SNP (tratamento T2). Particularizando para os tratamentos em que as sementes foram transferidas para solução de sulfato de alumínio (tratamentos T3 e T6) pode ser detectado que a incubação das sementes em solução de SNP causou aumento significativo da germinação, quando comparado com o tratamento de incubação em água destilada.

Diante do exposto, podemos verificar que apesar de causar diminuição da germinação, o NO diminui o efeito negativo de condições de estresse de alumínio sobre a germinação de sementes de soja.

Nos períodos de 72 h (Figura 1 B) e 96 h de embebição (Figura 1 C) ocorreram 100% da germinação, independente do tratamento.

Os resultados apresentados da ação do NO sobre a germinação de soja são consistentes com aqueles obtidos usando sementes de outras espécies. Foi verificado em vários trabalhos que a aplicação de diferentes concentrações de compostos doadores de NO, incluindo o SNP, causou estimulação da germinação, indicando que o NO apresenta efeito na quebra de dormência de sementes.

A**B**

C

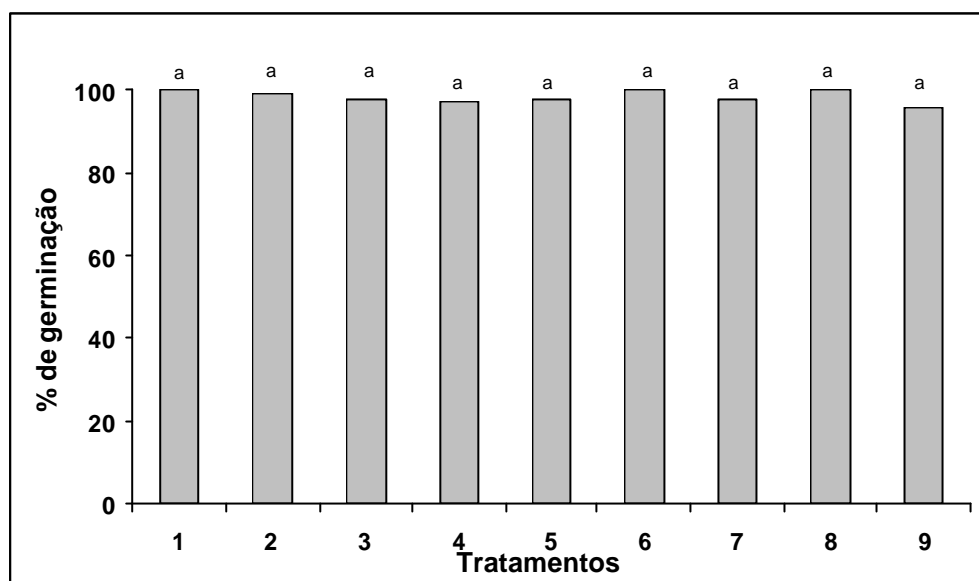


Figura 1. Porcentagem de germinação de sementes de soja nos períodos de A- 48 h, B- 72 h e C- 96 h de embebição sob os tratamentos de: **T₁**: incubação em água destilada e transferência para água destilada; **T₂**: incubação em água destilada e transferência para solução de SNP; **T₃**: incubação em água destilada e transferência para solução de sulfato de alumínio; **T₄**: incubação em solução de SNP e transferência para água destilada; **T₅**: incubação em solução de SNP e transferência para solução de SNP; **T₆**: incubação em solução de SNP e transferência para solução de sulfato de alumínio.

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

Beligni & Lamattina (2001) relataram que o NO atua como um indutor do processo germinativo. Em arroz foi evidenciado que o NO estimulou a germinação por simulação do efeito da luz (Hung et al., 2002) e induziu quebra de dormência em sementes de *Emmenathe penduriflora* (Keeley & Fortheringham, 1997). Sarath et al. (2006) verificaram que a germinação de sementes de *Panicum virgatum* L. foi significativamente influenciada pelo NO, relatando sua ação como um possível desencadeador endógeno para a quebra de dormência desta espécie. Também foi verificado que o NO reduziu a dormência de sementes de *Arabidopsis* (Batak et al.,

2002; Bethke *et al.*, 2004), cevada (Bethke *et al.*, 2004), alface (Beligni & Lamattina, 2000) e *Paulonia tomentosa* (Giba *et al.*, 1998).

No trabalho de Simontacchi *et al.* (2004) foi observado aumento da produção de NO, principalmente no início da atividade de germinação de sementes de *Sorghum bicolor*.

Também tem sido relatado que o NO apresenta efeito sobre a germinação sob condições de estresse. Em estudos realizados com sementes de tremoço amarelo (*Lupinus luteus*), Kopyra & Gowozdz (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 causado por metais pesados sobre a germinação. Wang & Yang (2005) observaram que o alumínio causou inibição do desenvolvimento de raízes de *Cassia tola* L., mas o pré-tratamento das plantas com solução de SNP acarretou em aumento significativo do alongamento radicular.

Um aspecto comum de diversos tipos de estresses, incluindo a toxicidade por alumínio é a produção aumentada de ERMO, que são geralmente consideradas prejudiciais às células das plantas (Richards *et al.*, 1998). Deste modo, é considerado que o alumínio induz estresse oxidativo nas plantas (Boscolo *et al.*, 2003).

O NO é considerado como citoprotetor, sendo um potente antioxidante (Beligni *et al.*, 2002; Beligni & Lamattina, 2002; Hung *et al.*, 2002). A citoproteção está baseada na capacidade do NO em regular o nível e a toxicidade das ERMO (Halliwell & Gutteridge, 1984). Assim, o NO pode exercer uma ação protetora contra o estresse oxidativo provocado por um aumento da concentração de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (Wink *et al.*, 1995).

Alguns estudos têm mostrado indução da atividade de enzimas antioxidantes em plantas sob condições de estresse por metais pesados. O cádmio induziu aumento da

atividade da peroxidase (POD) em plantas de arroz (Kao & Hsu, 2004) e girassol (Groppa et al., 2001). Na tentativa de eliminação dos radicais superóxidos formados sob condições de adversidades ambientais, as plantas apresentam mecanismos de defesa, através do aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), correlacionando-se ao aumento da tolerância ao estresse (Alves et al., 2003).

Para substanciar a hipótese de que o NO pode ter ação sobre enzimas antioxidantes, foi estudado o efeito do NO sobre a atividade da POD e da SOD em sementes de soja colocadas para germinar sob estresse de alumínio em dois períodos de embebição, as 12 e 36 h após a transferência para as soluções utilizadas nos tratamentos.

Analisando a Figura 2A podemos observar efeito significativo do NO sobre a atividade de POD as 12 h após a transferência das sementes para os tratamentos. Independente do tratamento da incubação a transferência das sementes para solução de SNP causou diminuição da atividade da enzima, como observado nos tratamentos T2 e T5. Comparando-se os resultados da atividade de POD nas sementes que foram transferidas para sulfato de alumínio, correspondentes aos tratamentos T3 e T6, pode ser detectado que a incubação das sementes em solução de SNP causou diminuição da atividade da enzima. Deste modo, é notável que o NO causou diminuição da atividade da POD.

No outro período analisado, as 36 h após a transferência para os tratamentos (Figura 2B), apesar dos valores da POD serem mais elevados do que 12h após a transferência, não foi observado efeito da incubação em solução de SNP sobre a atividade da enzima entre os tratamentos de mesma condição de transferência.

Analisando a Figura 3A pode ser verificado que as 12 h após a transferência foi verificado diminuição da atividade da SOD somente nas sementes que foram incubadas em água destilada e transferidas para solução de SNP, não sendo detectado diferenças significativas entre os outros tratamentos. A atividade da SOD não sofreu alteração

significativa, como efeito do NO no período de 36 h após a transferência para os tratamentos (Figura 3B).

Diante dos resultados relativos à atividade das enzimas antioxidantes analisadas, a diminuição da atividade da POD na presença de SNP, pode indicar a ação do NO na remoção de H_2O_2 formado em situações de estresse de alumínio, reduzindo, portanto, substrato disponível para a enzima. Com respeito a SOD, parece que o NO não influencia a atividade desta enzima.

Tem sido relatado que a ação citoprotetora do NO contra o estresse oxidativo é baseada na regulação do nível e da toxicidade das ERMO (Halliwell & Gutteridge, 1984; Wink et al., 1995; Beligni & Lamattina, 1999b; Kao & Hsu, 2004). Foi considerado por Caro & Puntarulo (1998) que o NO exibe um potencial papel antioxidante nas células por reduzir a razão de produção de ânions superóxido em eixos embrionários de soja.

Entretanto, existem relatos de aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como efeito do NO. Em trabalhos relacionados com o efeito do NO sobre o estresse oxidativo induzido por metais pesados foi verificado que quando plantas de arroz (Kao & Hsu, 2004) e de girassol (Groppa et al., 2001) foram pré-tratadas com o NO antes da exposição ao cádmio, ocorreu maior aumento da atividade da POD, em comparação com as plantas que receberam tratamento somente com o metal. Uchida et al. (2002) verificaram que substâncias doadoras de NO induziram a atividade da SOD em plantas de arroz.

De acordo com Kopyra & Gwózdź (2003), uma função antioxidante do NO em raízes de tremoço (*Lupinus luteus*) sob condições de estresse pode também ser atribuído por uma redução na quantidade de radicais superóxido, como resultado de sua eliminação direta. Os autores observaram que o chumbo causou aumento da atividade

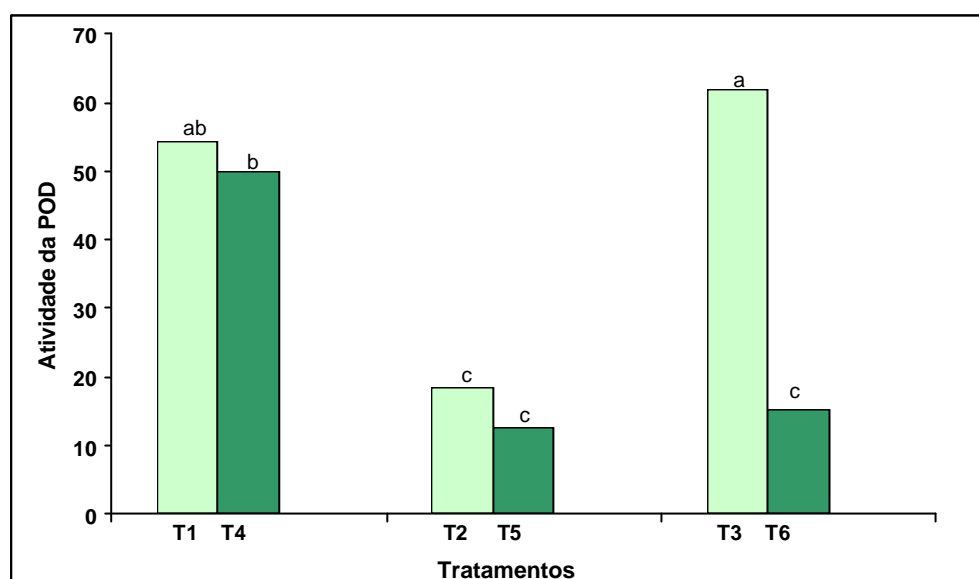
da SOD, porém, incrementos maiores foram detectados quando estas sofreram pré-tratamento com SNP.

Foi também relatado que o pré-tratamento com SNP causou aumento da atividade da SOD quando *callus* embriogênicos de sementes maduras de *Phragmites communis* Trin. foram submetidos ao estresse gerado por temperatura elevada (Song et al., 2006).

Os efeitos citoprotetores do NO em plantas foram relatados sob fortes condições oxidativas durante estresses bióticos e abióticos, até mesmo sob situações fotooxidativas (Beligni & Lamattina, 1999b, 2002). A citoproteção contra dano oxidativo foi claramente observada em diferentes níveis de organização, tais como, culturas de células, tecidos, órgãos e planta inteira, sendo também exercido sobre o DNA, RNA, proteínas, clorofila e lipídios.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho pode ser concluído que o efeito protetor do NO sob condições de estresse de alumínio em sementes de soja pode ser, em parte, atribuído à capacidade do NO da remoção de ERMO, principalmente na forma de H₂O₂, diminuindo o efeito negativo deste metal pesado sobre a germinação.

A



B

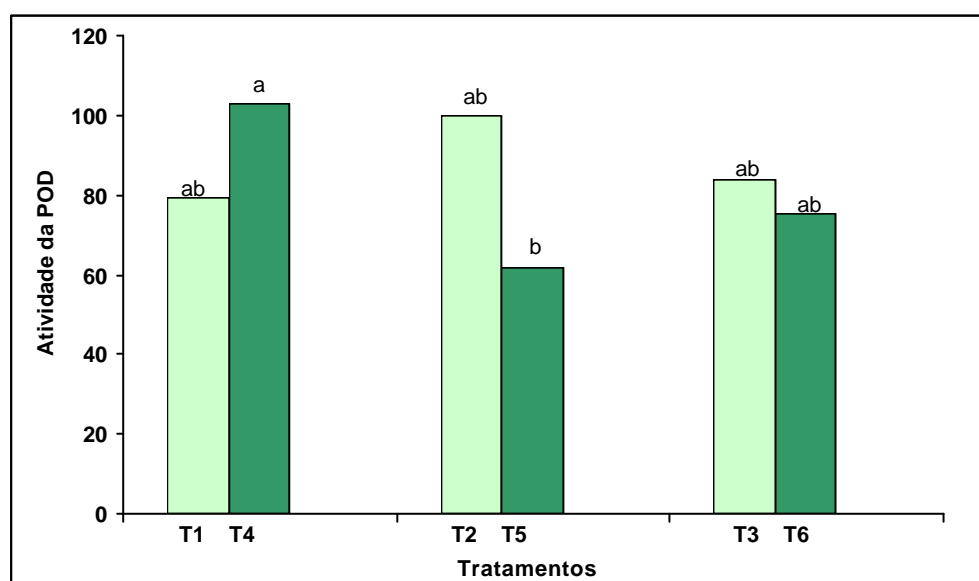
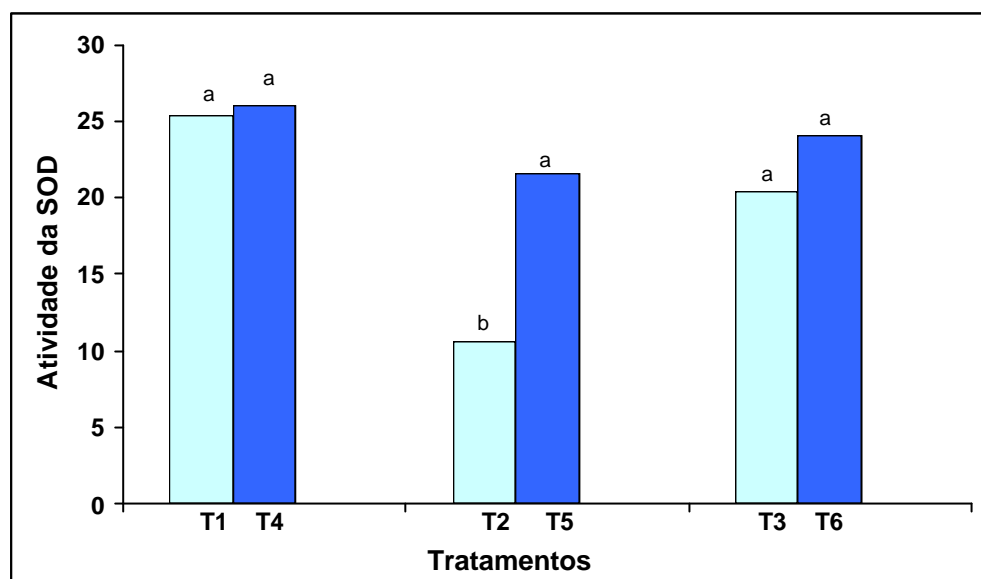


Figura 2. Atividade da POD ($\text{nmol de purpurogalina} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) em eixos embrion\u00e1rios de sementes de soja no per\u00edodo de 12 h (A) e 36 h (B) ap\u00f3s a transfer\u00eancia para os diferentes tratamentos. **T₁**: incuba\u00e7\u00e3o em \u00e1gua destilada e transfer\u00eancia para \u00e1gua destilada; **T₂**: incuba\u00e7\u00e3o em \u00e1gua destilada e transfer\u00eancia para solu\u00e7\u00e3o de SNP; **T₃**: incuba\u00e7\u00e3o em \u00e1gua destilada e transfer\u00eancia para solu\u00e7\u00e3o de sulfato de alum\u00ednio; **T₄**: incuba\u00e7\u00e3o em solu\u00e7\u00e3o de SNP e transfer\u00eancia para \u00e1gua destilada; **T₅**: incuba\u00e7\u00e3o em solu\u00e7\u00e3o de SNP e transfer\u00eancia para solu\u00e7\u00e3o de SNP; **T₆**: incuba\u00e7\u00e3o em solu\u00e7\u00e3o de SNP e transfer\u00eancia para solu\u00e7\u00e3o de sulfato de alum\u00ednio.

M\u00e9dias seguidas de mesma letra n\u00e3o diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A



B

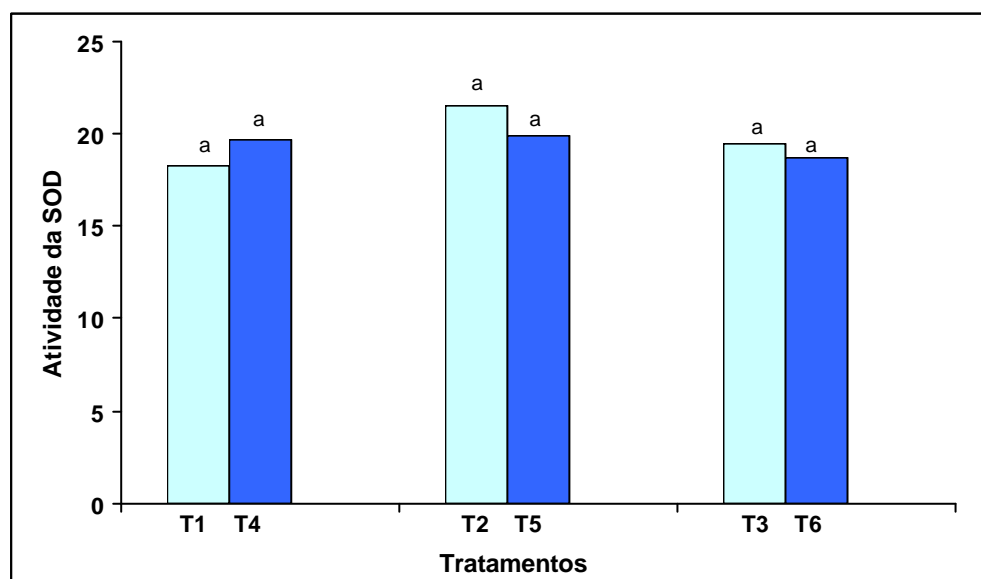


Figura 3. Atividade da SOD ($\text{U.mg proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em eixos embrionários de sementes de soja no período de 12 h (A) e 36 h (B) após a transferência para os diferentes tratamentos. **T₁**: incubação em água destilada e transferência para água destilada; **T₂**: incubação em água destilada e transferência para solução de SNP; **T₃**: incubação em água destilada e transferência para solução de sulfato de alumínio; **T₄**: incubação em solução de SNP e transferência para água destilada; **T₅**: incubação em solução de SNP e transferência para solução de SNP; **T₆**: incubação em solução de SNP e transferência para solução de sulfato de alumínio.

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

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pode ser concluído que:

a) o NO foi capaz de reduzir a inibição da germinação como efeito do estresse de alumínio;

b) o efeito protetor do NO sob condições de estresse de alumínio pode ser, em parte, atribuído à capacidade do NO da remoção de ERMO, principalmente na forma de H_2O_2 , diminuindo o efeito negativo deste metal pesado sobre a germinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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 Science Research**, v.12, p.253-259, 2002.

BARABAS, N.K.et al. Effects of UV-B irradiation on the antioxidant defense mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. **Journal Plant Physiology**, v.153, p.146-153, 1998.

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

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.3, p. 199-208, 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 Environment**, 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 Environment**, v.25, p.737-748, 2002.

BELIGNI, M.V. et al. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.

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

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

BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminium-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, v.62, p.181-189, 2003.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCKNER, B.; JOHAL, G.S.; JANICK-BUCKNER, D. Cell death in maize. **Plant Physiology**, v.108, p.231-239, 2000.

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

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

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

DEAN, J.V.; HARPER, J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H – nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiology**, v.88, p.389-395, 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. **Proceedings National Academy of Science 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 Science of Technology, Zürich.**, 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. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.95, p.10328-10333, 1998.

ECHART, C.L., MOLINA, S.C. Fitotoxicidade do Alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.31, p.531-541, 2001.

EKLER, Z.; DUTKA, F.; STEPHENSON, G.R. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. **Weed Resource**, v.33, p.311-318, 1993.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; ESAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, v.122, p.657-665, 2000

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

GIBA, Z. et al. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree sedes. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.175-181, 1998.

GROPPIA, M.D.; TOMARO, M.L.; BENAVIDES, M.P. Polyamines as protectors against Cd or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. **Plant Science**, v.161, p. 481-488, 2001

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

HORST, W.J., et al. Short term response of soybean roots to aluminium. **Journal Plant Physiology**, v.140, p.174-178, 1992.

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

JONES, A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? **Trends in Plant Science**, v.5, p.273-278, 2000.

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

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

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

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

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regulation**, 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 Physiology Biochemical**, 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**, Campinas, v.63, p.13-24, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance **Trends in Plant Science** v.7, p.405-410, 2002.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 30, p.609-719, cap. 34, p.789-811, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

SEN,S.; CHEEMA, I.R.. Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. **Biochemical Archives**, v.11, p.221-227, 1995.

SIMONTACCHI, M; JASID, S.; PUNTARULO, S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. **Plant Science**, v.167, p.839-847, 2004.

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

SONG, L.; ZANG, L.; SUN, B.; ZHAO, M.; DING, W. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Science**, v.171, p.449-458, 2006.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosilation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p.898-902, 1992.

TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental Experimental Botany**, v.51, p.281-288, 2004.

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

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic 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 Science**, 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, 596p, 1998.

WANG, S.H.; YANG, Z.M.; LU, B.; LI, S.Q.; LU, Y.P. Copper-induced stress and antioxidant responses in roots of *Brassica juncea* L. **Botany Bulletin Academy Sinica** v.45, p.203-212, 2004.

WANG, S.Y.; YANG, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L.. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 1915-1923, 2005.

WINK, D.A. et al. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, 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 Radical Biology Medicine**, v.25, p.434-456, 1998.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new featured of an old enzyme. **Trends in Plant Science**, v.4, p.128-129, 1999.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase one of the missing link?. **Trends in Plant Science**, v.8, p.20-26, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode ser evidenciado que o óxido nítrico (NO) causa estímulo da germinação, tanto em sementes de arroz, como de soja. Também pode ser constatado que O NO teve um papel importante na germinação das sementes de arroz e soja, na proteção contra o estresse provocado pelo alumínio, metal pesado presente na maioria dos solos cultiváveis do Brasil.

As referências consultadas reforçam essas funções do NO durante a germinação das sementes, podendo favorecer melhor desenvolvimento das plantas de arroz e de soja sob condições de estresse.